

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
**UNIVERSIDAD
CATÓLICA**
DEL PERÚ

**OBTENCIÓN DE QUITOSANAS CON ALTO GRADO DE
DESACETILACIÓN**

Tesis para optar el Título de **Licenciado en Química**, que presenta el bachiller:

Jimmy Laurence Cánepa Ivazeta

ASESOR: Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

Lima, abril de 2018



*A mis padrinos, André Michel, Ronald y Salvador,
que siempre me acompañan*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mis padres, Dina y Jimmy, por su constante apoyo y amor. Especialmente a mi madre, quien me lleva día a día de la mano en busca de crecimiento profesional. A Giannina por darme tanto amor, apoyo y tenacidad a lo largo de los años. A todos mis hermanos por darme siempre el empuje y la confianza de seguir adelante. A los tatas, Salvador, Aurora y July, y la gran cantidad de familiares que siempre me animan con una sonrisa.

A mi asesor, Dr. Javier Nakamatsu, por todo el apoyo y consejos que me ha brindado antes y durante este trabajo. Gracias por su amistad y su paciencia. Le agradezco la oportunidad de dejarme volver al laboratorio para cumplir con este objetivo.

A Mariela Elgegren, Jorge Ayarza, Luis Felipe Sánchez y Diego Córdova por su amistad, ayuda y consejos para la realización de la tesis. Así como a todos los miembros del Laboratorio 211 y amigos de la Especialidad de Química por el compañerismo, las vivencias y hacer del trabajo un lugar agradable.

A José Carlos Ugaz y Milka Cajahuanca por su ayuda y recomendaciones en los análisis realizados por resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja, respectivamente.

A la Dra. Suyeon Kim de Aguilar por tomarme en cuenta para el proyecto “Desarrollo de propiedades antimicrobianas y antioxidantes de nano-partículas biodegradables elaborados con polímeros naturales” (161-2015-FONDECYT) y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por colaborar con el financiamiento.

A la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) por el apoyo económico brindado en el proyecto “Obtención de quitosana con 100% de desacetilación” (2016-1-0052), relacionado con este trabajo. A la Pontificia Universidad Católica del Perú por tantos años llenos de enseñanza y experiencias.

RESUMEN

La quitina es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza y a partir de ella se obtiene la quitosana, un polielectrolito catiónico cuando se disuelve en soluciones acuosas ácidas que es biodegradable, biocompatible, bacteriostático, antifúngico y tiene la capacidad para formar películas, fibras y matrices porosas ligeras. Así, la quitosana es un polímero natural interesante para aplicaciones en medicina, farmacia, alimentos, cosmética, agricultura, tratamiento de aguas, etc.

La quitina se transforma en quitosana por medio de la desacetilación. El grado de desacetilación (DDA) indica la cantidad total de grupos acetamida convertidos en amina, lo que determina directamente sus propiedades (como solubilidad, basicidad, adsorción, entre otras), funcionalidad y, por tanto, las aplicaciones del polímero.

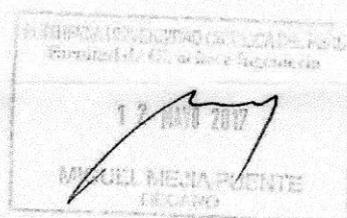
En primer lugar, se desacetiló quitina (sólida y disuelta en base a baja temperatura) por calentamiento convencional y con microondas. En el primer método se evaluó el tiempo de reacción (entre 0,5 y 5 h), y en el segundo, el número de ciclos de reacción sin variar el tiempo neto de irradiación (10 min).

En segundo lugar, se desacetiló quitosana por el método convencional cambiando la concentración de la base. Además, se realizó la desacetilación con microondas, con la variable del número de ciclos de irradiación, cada uno de 1,5 min.

Finalmente, se compararon los métodos entre sí. Los resultados fueron evaluados en función al DDA, analizado por espectrometría infrarroja (FT-IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN), y al peso molecular, cuantificado por cromatografía de permeación de gel (GPC) y viscosimetría capilar. En general, todos los resultados muestran que se produce la degradación del polímero durante la desacetilación. Sin embargo, los métodos con microondas y de quitina alcalina no son tan agresivos como el método convencional, de manera que reducen el rompimiento de las cadenas. Se logró obtener quitosanas totalmente desacetiladas (>99% DDA) y con relativamente alto peso molecular (>700 kDa).

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : "Obtención de quitosanas con alto grado de desacetilación"
ÁREA : Materiales
ASESOR : Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi
ALUMNO : Jimmy Laurence Cánepa Ivazeta
CÓDIGO : 20077027
FECHA : 4 de mayo de 2017
NUMERO : # 216



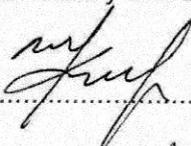
DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

La quitina es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza y a partir de ella se obtiene la quitosana, un polielectrolito catiónico cuando se disuelve en soluciones acuosas ácidas que es biodegradable, biocompatible, bacteriostático, antifúngico y tiene la capacidad para formar películas, fibras y matrices porosas ligeras. Así, la quitosana es un polímero natural interesante para aplicaciones en medicina, farmacia, alimentos, cosmética, agricultura, tratamiento de aguas, etc. Sin embargo, existen reportes contradictorios o poco reproducibles de las propiedades de muestras de quitosana de un mismo grado de desacetilación y peso molecular. Esto se debe a que su obtención, a partir de la quitina, es un proceso heterogéneo que no permite una reacción homogénea y resulta en una distribución no controlada de las dos unidades repetitivas (glucosamina y glucosamina acetilada) a lo largo de la cadena. La diferencia en la distribución de estas unidades repetitivas puede hacer variar la solubilidad, viscosidad e incluso reactividad química del polímero, por lo que es importante diseñar un método eficiente para su desacetilación completa sin llegar a degradar sustancialmente las cadenas de la quitosana.

El objetivo de la tesis es el estudio de procedimientos para la obtención de quitosana con un alto grado de desacetilación (cercano al 100%). Se comparará un sistema de calentamiento convencional con el calentamiento por microondas y procesos con una y varias etapas. Esto requerirá caracterizar, no solo el grado de desacetilación de la quitosana obtenida, sino además, determinar el peso molecular y la distribución de tamaño de las cadenas del producto. Para esto se emplearán las técnicas de resonancia magnética nuclear de ^1H , viscosidad intrínseca y cromatografía por permeación de gel.

Máximo 100 paginas

FIRMA DEL ASESOR:



FIRMA DEL COORDINADOR:

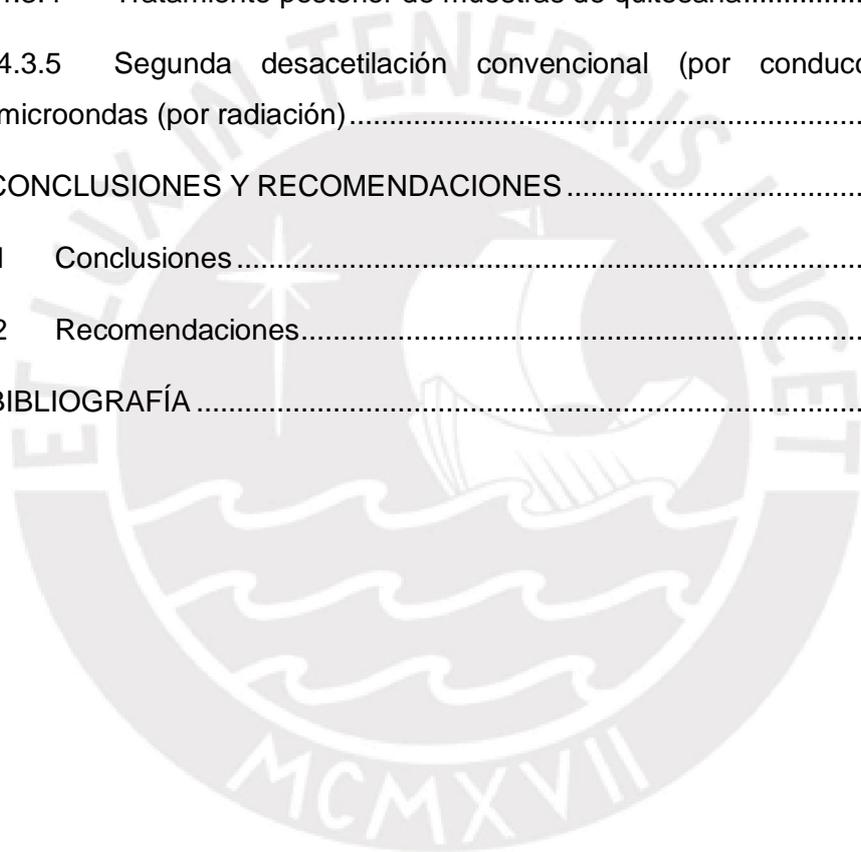


ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción	1
1.2 Quitina	2
1.2.1 Composición y estructura química.....	2
1.2.2 Estructura cristalina.....	2
1.2.3 Producción marítima de quitina a nivel mundial.....	6
1.2.4 Proceso de extracción	11
1.2.5 Propiedades y solubilidad	12
1.2.6 Aplicaciones	13
1.3 Quitosana	14
1.3.1 Desacetilación de la quitina	14
1.3.2 Propiedades	17
1.3.3 Aplicaciones	17
1.4 Determinación del peso molecular.....	18
1.5 Reacciones con microondas	20
2 OBJETIVOS	21
3 PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1 Reactivos, equipos y materiales	22
3.1.1 Reactivos.....	22
3.1.2 Equipos	23
3.1.3 Materiales.....	24
3.2 Metodología.....	25

3.2.1	Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	25
3.2.2	Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹ H-RMN)	25
3.2.3	Análisis por GPC.....	26
3.2.4	Análisis por viscosimetría capilar.....	26
3.3	Desacetilación de la quitina	27
3.3.1	Tratamiento previo	27
3.3.2	Desacetilación convencional (por conducción)	28
3.3.3	Desacetilación con microondas (por radiación)	28
3.3.4	Formación de quitina alcalina	28
3.3.5	Lavado y secado	28
3.4	Desacetilación de la quitosana	29
3.4.1	Tratamiento previo	30
3.4.2	Desacetilación convencional (por conducción)	30
3.4.3	Desacetilación con microondas (por radiación)	30
3.4.4	Lavado y secado	31
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	Caracterización de muestras	32
4.1.1	Análisis de composición molecular por FT-IR	32
4.1.2	Análisis químico estructural y determinación del grado de desacetilación (DDA) de la quitosana por RMN	35
4.1.3	Análisis del peso molecular promedio por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	40
4.1.4	Análisis del peso molecular por viscosimetría capilar.....	43
4.2	Desacetilación de la quitina	45
4.2.1	Tratamiento previo	45
4.2.2	Desacetilación convencional (por conducción)	45

4.2.3	Desacetilación con microondas (por radiación)	48
4.2.4	Quitina alcalina.....	49
4.2.5	Tratamiento posterior de muestras de quitina.....	51
4.3	Desacetilación de la quitosana	53
4.3.1	Tratamiento previo	53
4.3.2	Desacetilación convencional (por conducción)	53
4.3.3	Desacetilación con microondas (por radiación)	54
4.3.4	Tratamiento posterior de muestras de quitosana.....	55
4.3.5	Segunda desacetilación convencional (por conducción) y con microondas (por radiación).....	59
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
5.1	Conclusiones.....	64
5.2	Recomendaciones.....	65
6	BIBLIOGRAFÍA.....	66



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las unidades repetitivas de a) quitina y b) celulosa.	2
Figura 2. Arreglo de la quitina según el tipo de empaquetamiento de sus cadenas.	3
Figura 3. Tipos de enlaces de H en α -quitina: (a, b) enlaces intramoleculares, (c, d) enlaces intermoleculares.	4
Figura 4. Tipos de enlaces de H en β -quitina: (a) enlace intramolecular, (b, c) enlaces intermoleculares.	5
Figura 5. Variación de la producción de pesca y acuicultura en el mundo entre 2007 y 2014.....	6
Figura 6. Mapa mundial con los 25 principales países de producción de la pesca de captura marina en el año 2014.	7
Figura 7. Producción peruana de congelado de mariscos marítimos según especie, 2004 – 2014.	10
Figura 8. Exportación peruana de langostino congelado por tipo según continente de destino en 2014.....	10
Figura 9. Proceso de extracción regular de α -quitina del caparazón de crustáceos.	11
Figura 10. Representación espacial de la desacetilación de la quitosana.	14
Figura 11. Estructura química de las unidades repetitivas de la quitosana, acetilada (A) y desacetilada (D).	15
Figura 12. Ecuaciones para determinar la viscosidad intrínseca.....	20
Figura 13. Métodos de desacetilación de quitina.	27
Figura 14. Métodos de desacetilación de quitosana.....	29
Figura 15. Espectro de FT-IR de película de la quitina, la quitosana Aldrich (80,59%) y la quitosana más desacetilada (99,85%) separados en dos rangos según el número de onda: (A) 2000 a 4000 cm^{-1} y (B) 400 a 2000 cm^{-1}	33
Figura 16. Espectro ^1H -RMN de cloruro de quitosana (Aldrich, Lote: STBF3507V) en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz.	35
Figura 17. Estructura y desplazamiento químico en el espectro ^1H -RMN de la quitosana Aldrich en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 500 MHz.....	36
Figura 18. Espectros ^1H -RMN de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz.	38
Figura 19. Espectros ^1H -RMN de dos muestras de cloruro de quitosana en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz.....	39

Figura 20. Cromatogramas de estándares de pululano (fase móvil HOAc 0,2 M y NaOAc 0,1 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C).	41
Figura 21. Cromatograma y pesos moleculares promedio de la quitosana Aldrich (DDA = 80,59%), comparada con los estándares de pululano (fase móvil HOAc 0,2 M y NaOAc 0,1 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C).	42
Figura 22. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Aldrich (DDA = 80,59%).	43
Figura 23. DDA (%) y M_p (kDa) de los productos obtenidos por los distintos métodos de desacetilación de quitina.	51
Figura 24. DDA (%) y M_p (kDa) de quitosana Aldrich en polvo por microondas de 90 s por ciclo.	55
Figura 25. DDA (%) y M_p (kDa) de los productos obtenidos por los métodos de desacetilación de quitosana Aldrich.	56
Figura 26. DDA (%) y M_p (kDa) de los productos de todos los métodos realizados.	57
Figura 27. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de una muestra de quitosana desacetilada (DDA = 90,36%) a partir de quitina por el método convencional por 0,5 h, [NaOH]= 50% (w/w).	61
Figura 28. Línea de tendencia entre los pesos moleculares por viscosimetría (M_v) y del pico máximo del cromatograma de GPC (M_p).	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción mundial de especies cultivadas en aguas continental y marina en 2015.	6
Tabla 2. Proporción de la producción de fauna marina que contiene quitina en el comercio mundial del 2013.	8
Tabla 3. Solventes para quitina y quitosana.	13
Tabla 4. Pesos moleculares de los estándares de pululano PSS utilizados para la curva de calibración de GPC.	40
Tabla 5. Valores de K y α para quitosana según el DDA en 0,2 M HOAc / 0,1 M NaOAc a 30°C.	43
Tabla 6. Efecto de volumen de reactor en el DDA y los pesos moleculares de los productos de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w).	46
Tabla 7. Efecto de los tiempos de reacción en el DDA y los pesos moleculares de los productos de desacetilación convencional de la quitina con 50% NaOH (w/w).	47
Tabla 8. Efecto de los periodos de reacción en el DDA y el M_p de los productos de la desacetilación de quitina con microondas en 2 secuencias con 50% NaOH (w/w).	48
Tabla 9. Efecto del tiempo de reacción en el DDA y el M_p de los productos de desacetilación de quitina alcalina con 25% NaOH (w/w).	50
Tabla 10. Efecto de la concentración de la base en el DDA y el M_p de los productos de la desacetilación convencional de quitosana Aldrich (DDA = 80,59% y M_p = 408 kDa).	54
Tabla 11. Efecto del método de desacetilación en el DDA y el M_p en los productos de quitosana en polvo y en escamas, con NaOH 50% (w/w).	59
Tabla 12. Viscosidad intrínseca, peso molecular por viscosimetría (M_v) y peso molecular del pico del cromatograma de GPC (M_p) de las quitosanas obtenidas por diferentes métodos de desacetilación.	62

ABREVIATURAS

A	β -2-acetamida-D-glucopiranos, monómero acetilado
ASTM	American Society for Testing Materials
c	concentración
D	β -2-amina-D-glucopiranos, monómero desacetilado
DA	grado de acetilación
DDA	grado de desacetilación
FT-IR	espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GPC	cromatografía de permeación en gel
h	hora (s)
$^1\text{H-RMN}$	resonancia magnética nuclear de protón
min	minuto (s)
M_p	peso molecular de la cadena más abundante
M_n	peso molecular promedio en número
M_v	peso molecular de viscosidad
M_w	peso molecular promedio en peso
MW	peso molecular
$[\eta]$	viscosidad intrínseca
η_{inh}	viscosidad inherente
η_{red}	viscosidad reducida
η_r	viscosidad relativa
η_{sp}	viscosidad específica
PA	patrón de acetilación
PDI	índice de polidispersión (M_w/M_n)
s	segundos
t	tiempo
Tm	toneladas métricas
TMB	toneladas métricas brutas
TMSP	sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d ₄
UV	espectroscopía ultravioleta
v/v	relación en volumen

w/v	relación peso / volumen
w/w	relación en peso
XRD	difracción de rayos X



1 MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en el mundo, por detrás de la celulosa. Dicha abundancia está distribuida entre algas, crustáceos, moluscos e insectos; además, es el principal polímero fibrilar de las paredes celulares de ciertos hongos.^{1,2} Principalmente radica en los caparazones de los crustáceos e insectos, pues producen la quitina del mismo modo que las plantas generan celulosa en las paredes celulares.³

Al utilizar al langostino, por ejemplo, como insumo humano, se desecha casi el 50% del volumen inicial del producto, repartido entre cabeza, caparazón y cola. Estos desperdicios generados por la industria alimentaria crean un problema ambiental si no son controlados.⁴ Lo más preocupante es que los desperdicios no tratados son descargados cerca de aguas costeras,⁵ originando la eutrofización de estas aguas por la cantidad de compuestos nitrogenados y fosfatos. Esto daña y fertiliza el ecosistema marino a partir de la putrefacción bacteriana. De esta manera, disminuye la floración de algas e induce la disminución de la concentración de oxígeno en el agua, limitando así la vida de especies acuáticas.⁶ Debido a esta problemática, la modificación estructural de la quitina por procesos químicos surgió como solución.

Las industrias cosméticas, biomédicas, textiles, entre otras, utilizan a la quitina como recurso primario en el procesamiento de la quitosana, ya que los varios millones de toneladas anuales que se recolectan la vuelven económica y disponible.^{7,8} La desacetilación (modificación estructural) de la quitina da lugar a la quitosana, la cual tiene solubilidad en medio ácido y, por tanto, más aplicaciones. Este proceso es muy utilizado en diversos sectores industriales por el gran rango de utilidad debido a las propiedades que puede adoptar el polímero a partir de su grado de desacetilación (DDA) y su peso molecular (MW) que, a la vez, dependen del método de desacetilación.⁹

El motivo de este trabajo es evaluar la eficiencia del tratamiento de la quitina y la quitosana a distintas condiciones de desacetilación; para ello, se compara la desacetilación mediante el método convencional y utilizando microondas. En el mismo contexto, se trató de analizar la dependencia del DDA y del peso molecular promedio de acuerdo a las condiciones a las que se llevó a cabo la reacción.

1.2 Quitina

1.2.1 Composición y estructura química

La quitina es un polímero lineal, integrado por la unidad β -2-acetamida-D-glucopiranososa (**A**), o también llamada unidad acetilada, unida por enlaces glicosídicos 1-4 (ver figura 1a), lo que permite la conformación estructural de tipo escalera lineal. El comportamiento estructural de la quitina es parecido al de la celulosa, debido a estar constituido por unidades similares a la β -D-glucopiranososa. La diferencia se encuentra en el sustituyente hidroxilo en la celulosa y el sustituyente nitrogenado del carbono C2 en la quitina (ver figura 1b).⁵ A diferencia de la mayoría de polisacáridos naturales que son ácidos o neutros en sus formas naturales, el sustituyente de la quitina la convierte en un polisacárido altamente básico.⁵

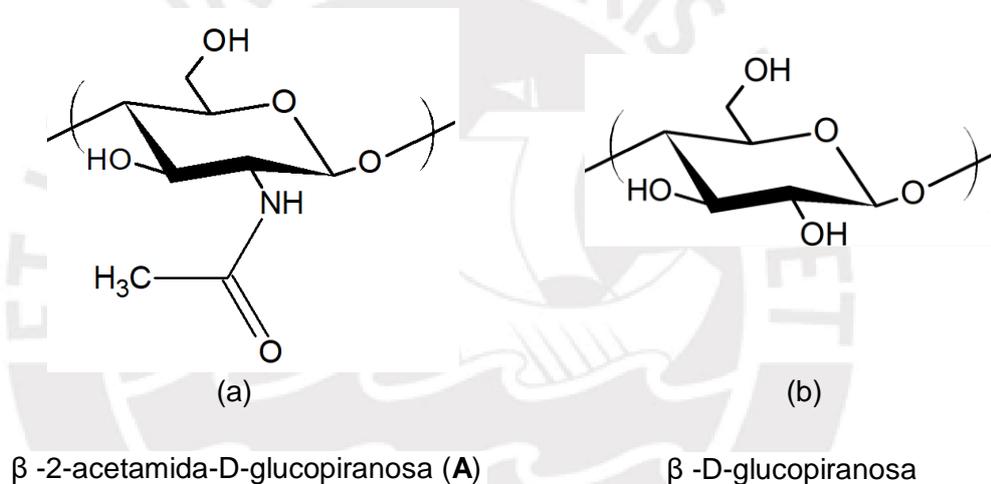


Figura 1. Estructura química de las unidades repetitivas de a) quitina y b) celulosa.

1.2.2 Estructura cristalina

La quitina es un biopolímero biológicamente importante que se puede encontrar en más del 70% de todos los organismos vivos a nivel mundial.¹⁰ Según la fuente de obtención, se pueden encontrar tres polimorfos de la quitina, α , β y γ , en base al empaquetamiento y al arreglo de las cadenas moleculares. Las cadenas poliméricas pueden empacarse en diversas direcciones, según la orientación que tiene el carbono 1 en el enlace glicosídico: izquierda o derecha en el eje de la cadena y con respecto a las otras cadenas (ver figura 2). Se conoce por difracción de rayos X (XRD) que la celda unitaria de la α -quitina se basa en un arreglo anti-paralelo por tener dos cadenas en la celda unitaria con simetría $P2_12_12_1$; la β -

quitina, en un arreglo paralelo, más ordenado, con una cadena en la celda unitaria con simetría $P2_1$; y la γ -quitina combina dos cadenas de arreglo paralelo con una de arreglo antiparalelo (figura 2).^{8,11}

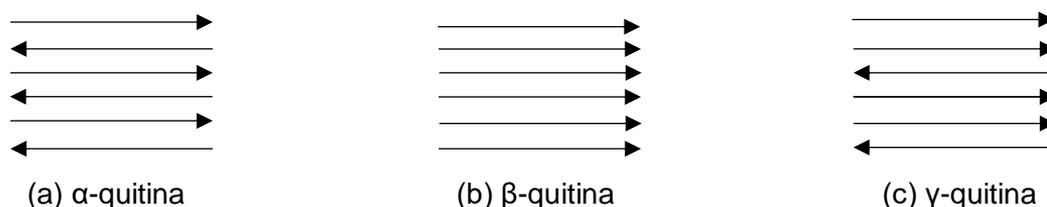


Figura 2. Arreglo de la quitina según el tipo de empaquetamiento de sus cadenas. Cada flecha indica la orientación de enlaces glicosídicos C1 – O – C4 en la cadena.

La quitina presenta rigidez intramolecular por el enlace de hidrógeno entre O3 – H y O5' (figura 3a y 4a). De los tres tipos de empaquetamiento de la quitina, la primera es la de mayor cristalinidad, pues tiene diversos tipos de enlace intra e intermolecular (figura 3). De ellos, los enlaces intermoleculares de hidrógeno O6 – H --- O6' (figura 3c) son los responsables de la resistencia a la adsorción de las moléculas de agua y, por tanto, limitan la reactividad. Además, los enlaces intermoleculares entre el hidrógeno y el carbonilo de las amidas (figura 3d) son responsables en mayor medida de la morfología cristalina.¹²

La β -quitina es más reactiva por tener menos fuerzas intermoleculares. De acuerdo a lo reportado por Gardner y Blackwell,¹³ en el empaquetamiento paralelo solo es posible el enlace de H entre el C=O, de la cadena inferior, con los grupos O6 – H y N' – H, de la cadena superior (figura 4b y 4c). Con ello, los grupos O6 – H no pueden formar enlaces de hidrógeno intermolecularmente con grupos O6' – H de distinto empaquetamiento, como lo hace la α -quitina (figura 3c). Por ello, las moléculas de agua están permitidas en el empaquetamiento y, por tanto, la β -quitina se presenta físicamente como un hidrato cristalino. Los resultados están basados en proyecciones estadísticas de la formación de enlaces, en restricciones estereoquímicas, en resultados de espectroscopía infrarroja (IR) y en cristalografía. Por otro lado, es importante mencionar que al recristalizar la quitina de una solución, sistemáticamente toma el ordenamiento de la α -quitina. Sin embargo, no es posible cambiar el ordenamiento de manera inversa, ya que la β -quitina es resultado de un mecanismo biosintético específico.¹⁴

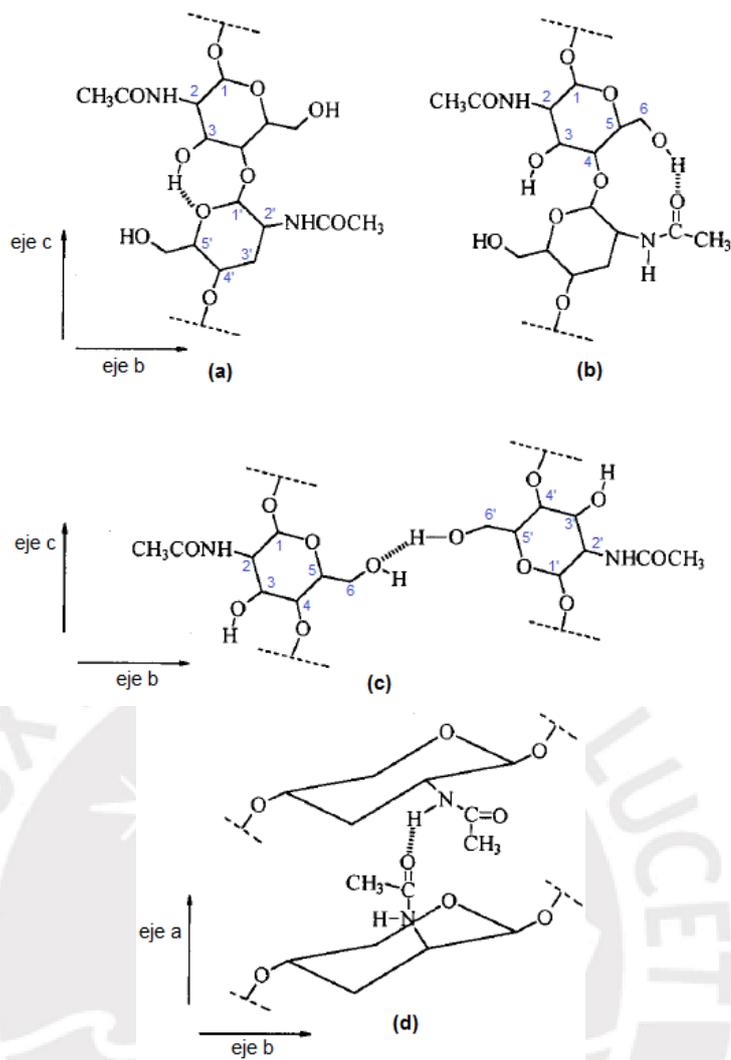


Figura 3. Tipos de enlaces de H en α -quitina: (a, b) enlaces intramoleculares, (c, d) enlaces intermoleculares. Tomado de Cho et al. (2000).¹²

La α -quitina es la conformación estructural cristalina más abundante, la cual se encuentra en varios organismos vivos marinos de estructuras duras (en su mayoría de camarones y cangrejos).¹⁵ Específicamente, la α -quitina se encuentra en el caparazón de los crustáceos en un 20 – 30%. El resto son proteínas (20 – 40%), carbonatos y fosfatos (30 – 60%) y lípidos (0 – 14%), aunque varían con la especie y la temporada.¹⁶ En el mundo existen especímenes específicos que poseen α -quitina de alta cristalinidad y con alta pureza (sintetizadas sin pigmentos, proteínas o calcitas). Por ejemplo, es posible encontrarla en los arpones de los caracoles marinos de la familia *Conidae*, en la columna vertebral y espinas de gusanos marinos del tipo *Sagitta* y en los filamentos expulsados por el fitoplancton del tipo *Phaeocystis*.¹⁷

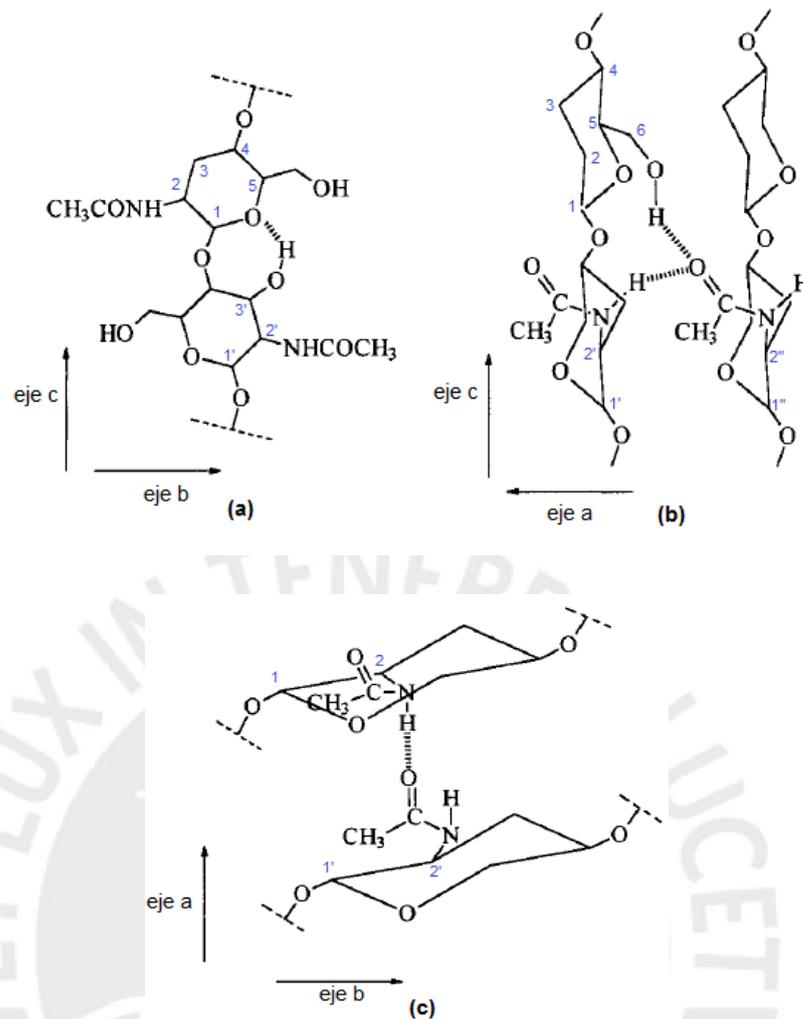


Figura 4. Tipos de enlaces de H en β -quitina: (a) enlace intramolecular, (b, c) enlaces intermoleculares. Tomado de Cho et al. (2000).¹²

Las quitinas β y γ son encontradas en estructuras flexibles.¹⁰ La forma estructural β -quitina, muy difícil de encontrar, suele estar asociada a proteínas en las plumas del calamar, y en los tubos sintetizados por el gusano de tubo gigante o gusano vestimentífero gigante, ubicado en las cordilleras marinas de Galápagos. Asimismo, se puede encontrar en setas del tipo afrodita, en la cubierta protectora de algas unicelulares del género *Trachelomonas*, presente en aguas dulces, y en las espinas monocristalinas excretadas por una microalga unicelular, llamada *Thalassiosira fluviatilis*, ubicada en ambientes salinos como las costas del Pacífico y Atlántico.^{17,18} Por último, la γ -quitina se ha encontrado en hilos de capullo de larvas del escarabajo araña australiano (*Ptinus tectus*), en membranas peritróficas larvales y adultas de langostas, cucarachas, mantis, larvas de gusano de libélula (*Antheraea pernyi*) y en una larva de la mosca *Phymatocera aterrima*.¹⁰

1.2.3 Producción marítima de quitina a nivel mundial

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), se ha producido un aumento masivo de la producción de las especies marinas – entre ellas los crustáceos y moluscos – a nivel mundial, debido principalmente a la acuicultura (ver figura 5). Esta actividad empezó a tomar fuerza a partir de 1990 y desde entonces ha ido en ascenso, de manera que en unos años podría superar lo producido en la actividad pesquera.¹⁹

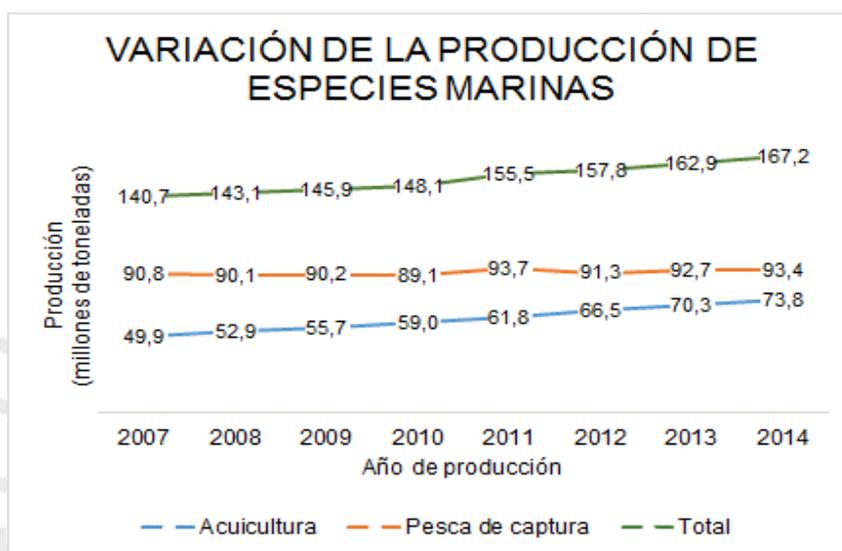


Figura 5. Variación de la producción de pesca y acuicultura en el mundo entre 2007 y 2014.^{19,20}

Tabla 1. Producción mundial de especies cultivadas en aguas continental y marina en 2015. Los valores están dados en millones de toneladas. Tomado de la FAO 2017.²⁰

	Acuicultura continental	Acuicultura marina	Subtotal	Subtotal (%)
Peces de escama	45 097	6 810	51 907	67,8
Crustáceos	2 857	4 495	7 352	9,6
Moluscos	284	16 148	16 432	21,5
Otras especies	522	387	909	1,2
Total	48 759	27 841	76 600	100

Como ejemplo de la importancia que tiene este tipo de producción a la procedencia de la quitina, la tabla 1 toma la muestra del año 2015 y diferencia a las especies de mayor producción a nivel mundial. Las cantidades están separadas en los campos de acuicultura continental y marina, o producción en agua dulce y agua salada, respectivamente. Estos datos mencionan a los crustáceos y moluscos como las especies más cultivadas, después de los peces de escama, con más de 20 millones de toneladas producidas en ese año. Estas cantidades las convierten en más de la tercera parte del volumen cultivado en dicha temporada.

Por otro lado, la pesca de captura es la más importante actividad de recolección de especies marinas, ya sea para el consumo humano u otras aplicaciones. Como se observa en la figura 6, según la FAO, la pesca se da principalmente en América y Asia. De hecho, la mayor potencia con gran diferencia es China, con casi 15 millones de toneladas de productos marinos al año, cantidades bastante más superiores al resto de potencias en producción pesquera.

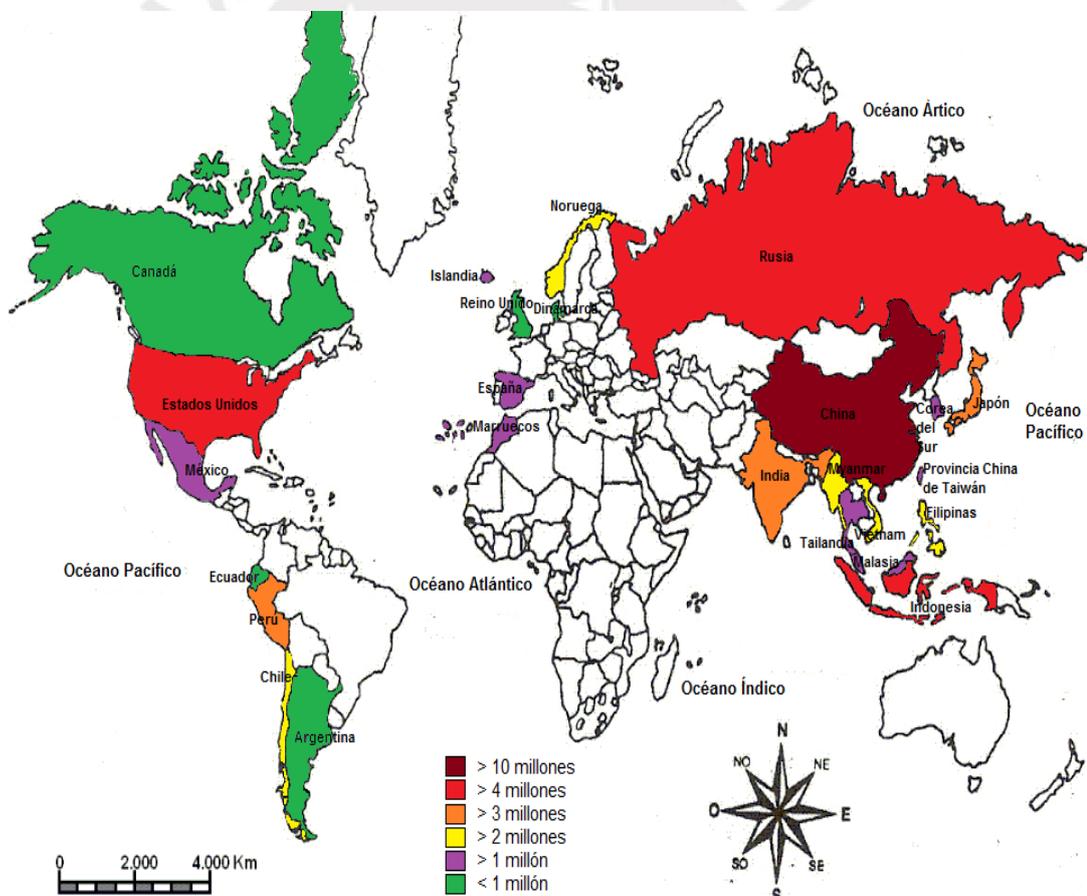


Figura 6. Mapa mundial con los 25 principales países de producción de la pesca de captura marina en el año 2014. Las magnitudes relacionadas a los colores de países están dadas en toneladas. Generado a partir de la FAO 2016.²⁰

En el año 2014, la suma de la producción pesquera de los 25 países representados en la figura 6 llegó a poco menos de 67 millones de toneladas, representando el 82,1% de la producción de especies marinas total mundial en ese año.²⁰ Si bien los distintos tipos de pescado conforman la mayor parte de la producción, los crustáceos y moluscos se ubican en el centro del comercio mundial. De acuerdo a las tablas 1 y 2, a la figura 6 y a los porcentajes aproximados de quitina en los crustáceos y moluscos (15 y 38%, respectivamente),^{21,22} el estimado de quitina producida anualmente a nivel mundial a partir de la pesca y la acuicultura sería por lo menos de 5 millones de toneladas y 7 347 millones de toneladas, respectivamente.

Tabla 2. Proporción de la producción de fauna marina que contiene quitina en el comercio mundial del 2013. Tomado de la FAO 2016.²⁰

		Valor económico (%)	Peso vivo (%)
CRUSTÁCEOS	Langostinos, gambas	15,30	6,00
	Otros crustáceos	6,40	2,10
MOLUSCOS	Calamares, sepias	5,60	4,00
	Bivalvos	3,00	5,60
	Otros moluscos	1,10	0,70

La tabla 2 brinda información más detallada de las especies comercializadas en el año 2013, haciendo hincapié en el valor y la cantidad de las mismas. Según ambos factores, se observó que los crustáceos están representados principalmente por langostinos y gambas, mientras que los moluscos, por calamares y sepias. Como se indicó anteriormente, todos los mencionados contienen quitina, pero en distintas proporciones. El portador principal de la quitina es, según este estudio, el langostino.

De acuerdo al valor, el langostino es el producto más importante en términos de quitina pues representó el 15% del valor económico total de los productos pesqueros comercializados a nivel internacional en el 2013 (ver la tabla 2).²⁰ Su producción ocurre principalmente en los países en desarrollo para luego, en su mayoría, introducirlos al mercado internacional. Sin embargo, algunas potencias agotaron sus recursos y son las industrias de elaboración las que compensan el déficit de materias primas mediante importaciones de langostino congelado.¹⁹

El proceso de congelamiento del langostino facilita la disposición de quitina. Es conocido que la industria de langostinos congelados normalmente genera residuos que equivalen a casi el 50% del peso del langostino fresco.²³ Conforme aumenta su producción, los desechos producidos a partir de su procesamiento también lo hacen. Los desperdicios están formados por la cabeza, cola y coraza; la última contiene aproximadamente un 99,1% de quitina.²⁴ En Indonesia, uno de los mayores productores de captura marina a nivel mundial (ver figura 6), por ejemplo, el residuo del langostino es utilizado como ingrediente de galletas de langostino, de *terasi* (un condimento hecho a partir de pasta de langostino fermentada), y para preparar suplementos de bajo costo y calidad para la alimentación de peces.^{23,24}

Si se hace un enfoque nacional de la producción de mariscos, se tiene que el cangrejo, langostino, calamar y otros moluscos, principalmente la pota, forman parte del mercado nacional e internacional. En la figura 7 se muestra el aumento de especies congeladas de Perú en la comercialización mundial durante 11 años. La pota es la más comercializada, pero los otros mariscos mencionados también se distribuyen en miles de toneladas, sobre todo el langostino, cuya producción ha incrementado desde el 2011.²⁵

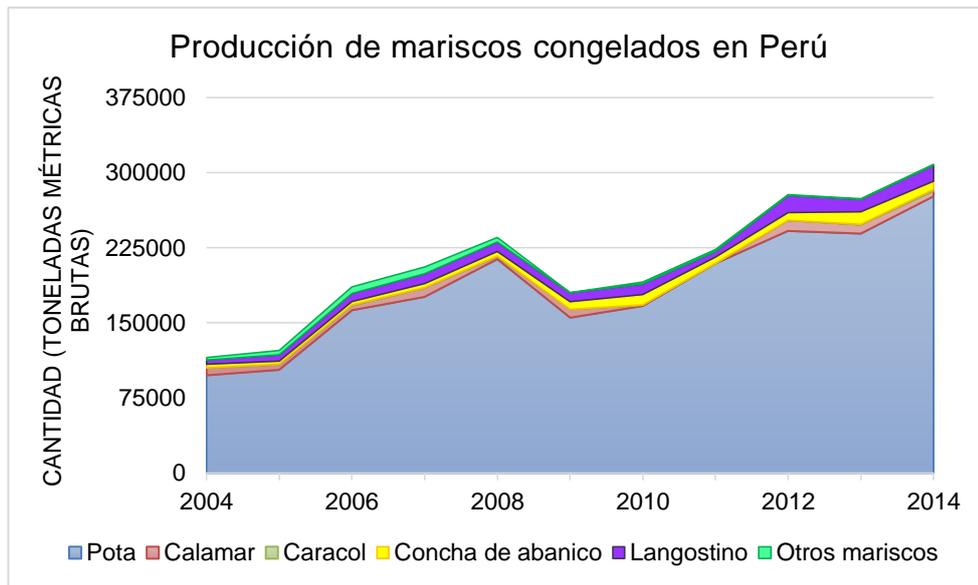


Figura 7. Producción peruana de congelado de mariscos marítimos según especie, 2004 – 2014. Generado a partir del Ministerio de la Producción del Perú.²⁵

A partir de los datos de exportación del langostino en la figura 8, se puede apreciar indirectamente la cantidad de quitina que se pierde a nivel nacional. En el caso de la exportación de la cola, hay gran generación de residuos del langostino, ya que se ha lavado, limpiado y desechado la cabeza y el caparazón del mismo. Incluso, cobra más valor al notar que son 15 000 TMB (toneladas métricas brutas) de langostino únicamente para este propósito.²⁵ Por todo lo expuesto, a pesar de no ser un gran productor de crustáceos como los países asiáticos, el Perú también genera gran cantidad de desechos que contienen quitina.

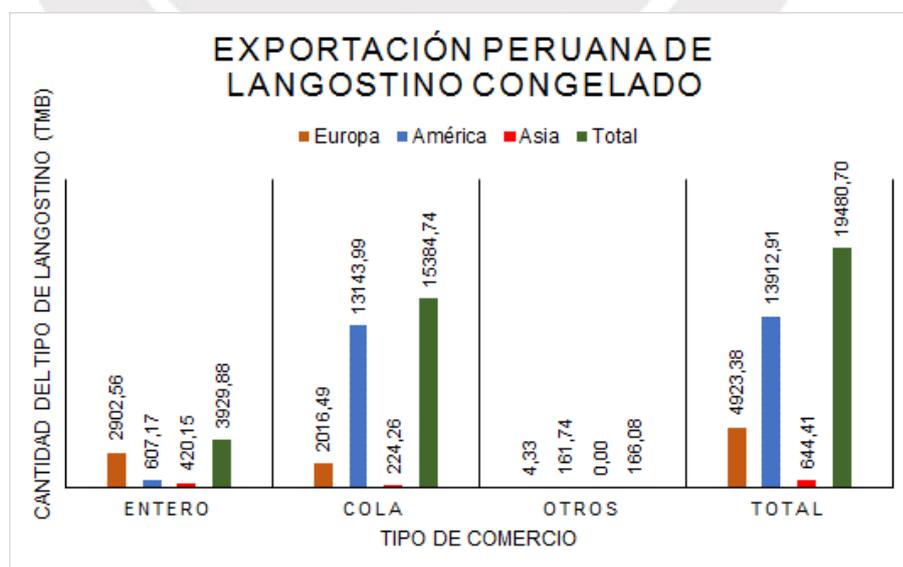


Figura 8. Exportación peruana de langostino congelado por tipo según continente de destino en 2014. Generado a partir del Ministerio de la Producción del Perú.²⁵

1.2.4 Proceso de extracción

La literatura muestra que el porcentaje de la quitina varía por especie y temporada. Así, por ejemplo, los caparazones de crustáceos consisten en proteínas (30 – 40%), carbonato de calcio (30 – 50%), quitina (20 – 30%) y pigmentos (astaxantina, cantaxantina, luteína o β -caroteno). El proceso generalizado de extracción de la α -quitina de los crustáceos, la más abundante y más comercial, se aprecia en la figura 9.^{15,26–28}

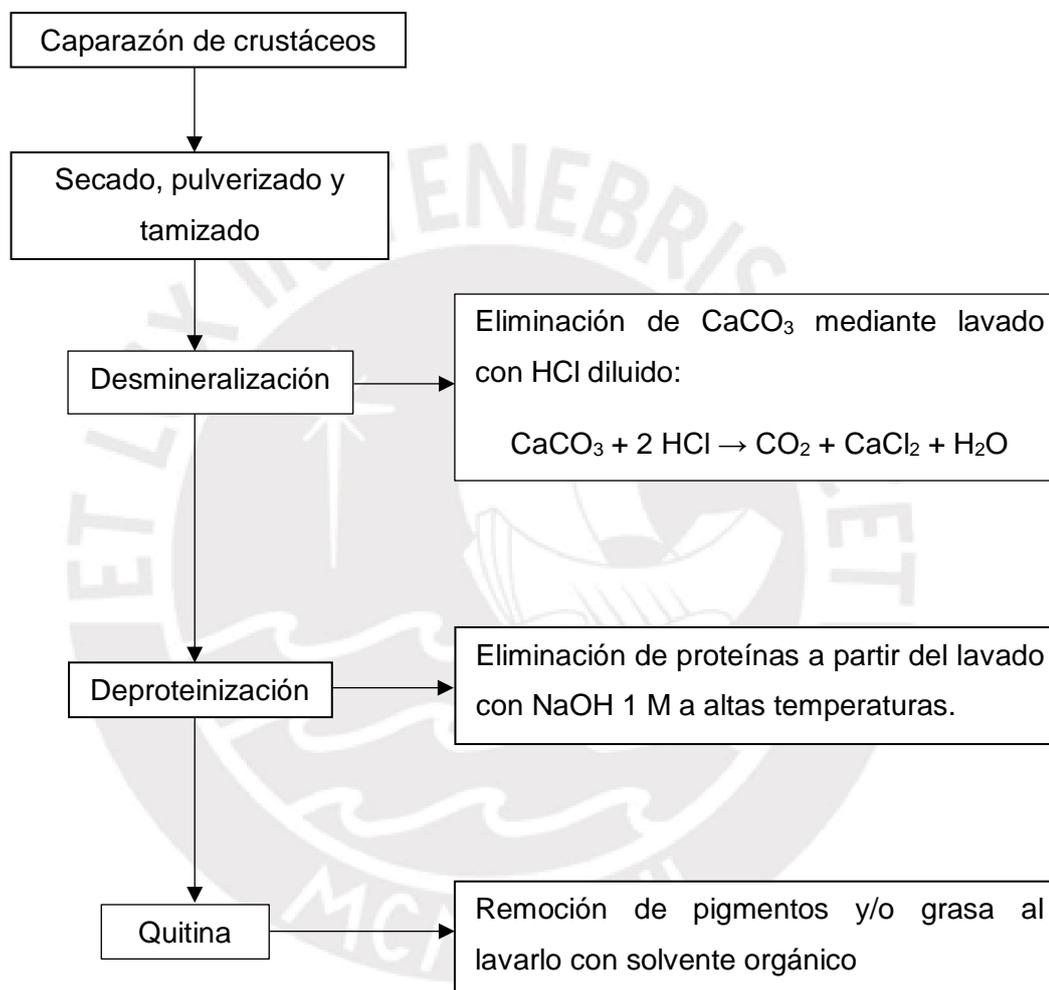


Figura 9. Proceso de extracción regular de α -quitina del caparazón de crustáceos.

La β -quitina no presenta tantos enlaces intermoleculares de hidrógeno como el arreglo α (figura 3c, ítem 1.2.2). Por ello, la β -quitina tiene mayor afinidad de moléculas de agua en su estructura. En consecuencia, los seres vivos en los que se encuentra este arreglo, como las plumas de calamar y la pota, tienen mínimamente iones carbonato en su composición, aunque varía según la especie.²⁹ La diferencia entre especies que se conforman por α - y β -quitina es notoria, pues mientras los

camarones están compuestos por casi 20% de calcio (la mayoría en forma de carbonato), la cantidad de calcio en los moluscos es solo 0,1025%. Entonces, dado que no hay CaCO_3 en la β -quitina, no se lava con ácido diluido y, por tanto, la extracción de este tipo de quitina se limita a la desproteínización.²⁹

1.2.5 Propiedades y solubilidad

La quitina es un polisacárido nitrogenado, duro e inelástico con alta rigidez en sus cadenas.⁵ Tiene excelentes propiedades biológicas como biodegradabilidad, inmunología antibacteriana, biocompatibilidad y no toxicidad que le permiten ser una opción a diversos puntos de la industria sin acrecentar los problemas ambientales.^{30,31} Además, al tener grupos hidroxilo y principalmente átomos de nitrógeno en las unidades repetitivas de la cadena (véase Figura 1a, ítem 1.2.1), permite la posibilidad de modificaciones químicas que mejoren o simplemente varíen sus propiedades.³²

La limitada utilidad de este polisacárido es por su baja solubilidad en solventes comunes, orgánicos e inorgánicos, a causa de sus enlaces de hidrógeno intra e intermolecular¹¹. Estos enlaces generan densidad de energía cohesiva y aumentan el parámetro de solubilidad.³ En otras palabras, su estructura rígida altamente cristalina y ordenada dificulta la penetración y difusión del solvente.³²

La literatura muestra varios tipos de solventes para la quitina (la tabla 3 muestra algunos de ellos); sin embargo, muchos de ellos son perjudiciales para el polímero. Por ejemplo, se han usado mezclas de ácido tricloroacético (TCA) y de ácido dicloroacético (DCA), que disminuyeron el peso molecular del polímero a tal punto que la fuerza de las fibras fuera afectada. Por ello, no han podido ser usados en aplicaciones médicas y han tenido dificultades al aumentar la escala en producción industrial.³

Para modificaciones eficientes de la quitina, se ha tomado como precursor conveniente a la quitina alcalina a bajas temperaturas. Para explicar este fenómeno, se debe entender que la solución de NaOH en agua forma los iones de sodio e hidróxido, que son solvatados por moléculas de agua. Esto dificulta a los iones ingresar entre las cadenas del polímero. No obstante, al aumentar la concentración básica, la mayor cantidad de iones induce menor solvatación para cada uno de ellos, por lo que se forman dipolos hidratados que son lo suficientemente pequeños para difundirse dentro de la matriz de quitina y, por lo tanto, la adsorción mejora.³²

Tabla 3. Solventes para quitina y quitosana. Tomada de Mourya, V. et al. y Rathke, T. et al.^{8,33}

Quitina	Quitosana
1% (w/v) en LiCl y dimetilacetamida (DMA) o dietilacetamida (DEA) 5% (w/v)	Ácido orgánico o mineral diluido en agua con pH debajo de 6,5
0,75% (w/w) en LiCl con N-metil-2-pirrolidona y DMA (5/100/100 en peso)	Dimetilsulfóxido
CaCl ₂ ·2H ₂ O con metanol saturado	Ácido <i>p</i> -tolueno sulfónico
1% (w/w) en fluoroanfetamina y ácido dicloroacético (DCA) (5% v/v)	Ácido 10-canforsulfónico
Alcohol hexafluoroisopropilo	
Sesquihidrato de hexafluoroacetona	
Mezcla de 1,2-dicloroetano y ácido tricloroacético (TCA) (35:65)	
Solución saturada de tiocianato de litio	

Por otro lado, al bajar la temperatura, las moléculas de agua difundidas en la matriz estabilizan mejor los enlaces de hidrógeno entre ellas, de manera que aumentan el volumen y debilitan los enlaces entre la quitina macromolecular y la estructura de la quitina deformada. En consecuencia, hay mayor penetración de la solución alcali dentro de las partículas de quitina e induce a la quitina, a nivel macro, a comportarse como gel por su disolución parcial.³² La cristalinidad de la quitina se reduce a la mitad en los primeros 3 días como quitina alcalina, luego de ello experimenta cambios sin perder más su cristalinidad.¹¹

1.2.6 Aplicaciones

Como material natural renovable, la quitina ofrece muchas aplicaciones potenciales en varios campos, tales como farmacéuticas, cosméticas, biomédicas, biotecnológicas, agricultura, comida, e industrias dirigidas a tratamiento de aguas, papel y textiles.⁸ A nivel atómico, la proporción de átomos de nitrógeno en la quitina la convierte en un gran agente quelante.⁵ Esto, sumado a la biodegradabilidad,

biocompatibilidad y no toxicidad de la quitina, propició el éxito de la quitina en pruebas para la inmovilización de enzimas, uso de biosensores, supresión de células tumorales, control de liberación de drogas, supresor hábil para formar complejos con metales pesados, entre otros.³⁰⁻³²

En el área de cosméticos, los nanofilamentos de quitina aumentan las propiedades físicas a nivel molecular de los compuestos producidos. Por ejemplo, se usan como relleno de una superficie de fibra quitosana para hacerla más suave y resistente. De esta manera, puede ser usado para hacer películas transparentes, destinadas a máscaras de belleza o tejidos medicinales avanzados, de acuerdo a los ingredientes activos agregados en estas películas. Además, los biopolímeros basados en los nanofilamentos de quitina pueden ser procesados fácilmente en varios productos como hidrogeles, membranas, nanofibras, micro/nanopartículas, esponjas, entre otras.³⁴

1.3 Quitosana

1.3.1 Desacetilación de la quitina

En 1907 Rouget discutió por primera vez sobre la solubilidad de la quitina a partir de tratamientos químicos y térmicos.⁷ Fue la primera vez que la quitosana fue obtenida por desacetilación termoquímica de la quitina en solución alcalina (figura 10). Como muestra la figura 11, la quitosana está comprendida por la unidad de la quitina (β -2-acetamida-D-glucopiranososa (**A**)) y su par desacetilado (β -2-amina-D-glucopiranososa (**D**)) en cantidades variables.

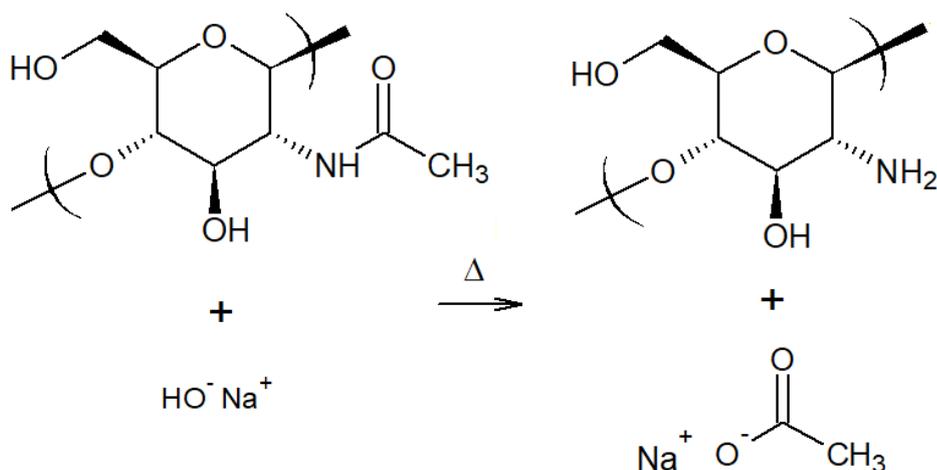
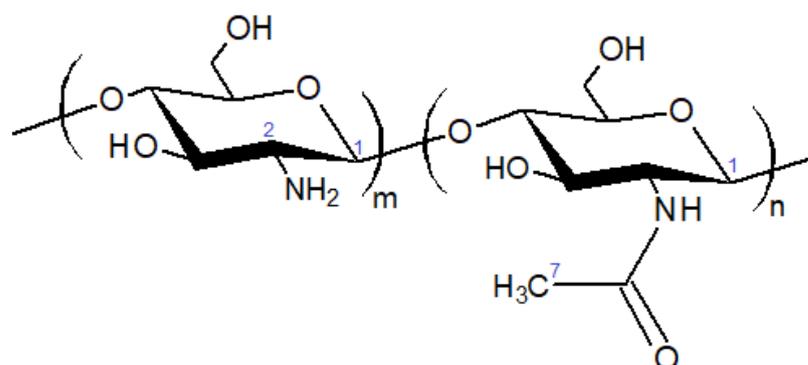


Figura 10. Representación espacial de la desacetilación de la quitosana.



β -2-amino-D-glucopiranososa (D) β -2-acetamida-D-glucopiranososa (A)

Figura 11. Estructura química de las unidades repetitivas de la quitosana, acetilada (A) y desacetilada (D).

La reacción de desacetilación se da por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente, se realiza heterogéneamente en los grupos acetamida involucrados a lo largo de las cadenas moleculares utilizando soluciones concentradas de NaOH o KOH (30 – 50%).³⁵ Esta reacción tiene varias variables que cambian las propiedades del producto final, como lo son la temperatura de reacción, la concentración del álcali, la proporción con la solución, etc.¹⁵

Se ha estudiado que a medida que aumenta la desacetilación, se pierden enlaces de H intermolecular entre una amina y el carbonilo de una acetamida (NH---O=C), así como entre dos grupos hidroxilo, lo cual implica que el arreglo antiparalelo de las cadenas de la α -quitina se transforma en un arreglo paralelo, que genera mejor difusión de la base o solvente entre las cadenas de quitosana.¹² El grado de desacetilación se relaciona con las propiedades y funcionalidad de la quitosana, como la adsorción, basicidad, solubilidad, entre otras.^{36,37}

Son conocidas varias técnicas analíticas que permiten determinar el grado de desacetilación de la quitosana. Se destacan la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$), la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), la espectroscopia ultravioleta (UV), la potenciometría y la conductimetría.¹⁵ De todas ellas, la técnica de RMN en estado líquido es la más precisa para la cuantificación de alto DDA; además, no necesita el peso específico de la muestra ni alta pureza, siempre y cuando los picos no se

superpongan con los relevantes de la quitosana. Tampoco hay necesidad de obtener una curva de calibración ni de tener una muestra de referencia.³⁸

En este trabajo se utilizó las dos primeras, ya que son métodos no invasivos, simples y rápidos para analizar: la primera en solución y la otra, en pastilla con KBr o en forma de *film* a partir de su solución en ácido acético. Ambas son analizadas según el área de los picos a partir de una línea base; no obstante, los picos tan amplios en el FT-IR no permiten calcular los DDA tan altos como sí lo hace el RMN (cercaos al 100%), por tanto el FT-IR solo se usará de forma cualitativa para corroborar la conversión de los grupos funcionales. Asimismo, el análisis por RMN en fase líquida presenta la desventaja de la insolubilidad de la quitina; por ello, solo se puede analizar el DDA de la quitosana.

El análisis por RMN estará basado en la norma ASTM F2260-03(08)³⁹, la cual valida el grado de desacetilación en el rango de 50 a 99% de desacetilación de cloruro de quitosana en medio acuoso deuterado. La norma relaciona mediante ecuaciones las señales integradas de 3 protones de la quitosana para determinar el DDA. Dichas ecuaciones tienen mayor representatividad si las señales mencionadas son correctamente identificadas, delimitadas y cuantificadas en el espectro ¹H-RMN. Éstas distinguen a los dos tipos de unidades poliméricas por separado y permiten encontrar la proporción de cada uno en la muestra, promediando las señales de dos protones por monómero (referenciados de la figura 11):

$$\text{Proporción de unidades desacetiladas } D = \frac{H_1D + H_2D}{2} \quad (1)$$

$$\text{Proporción de unidades acetiladas } A = \frac{H_1A + \frac{H_7}{3}}{2} \quad (2)$$

De esta manera, se vinculan los resultados de (1) y (2) para obtener el grado desacetilación.

$$DDA(\%) = \frac{D}{D + A} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.2 Propiedades

La quitosana mantiene las propiedades de la quitina, pues es biodegradable, biocompatible, no tóxica y tiene habilidad de adsorción.^{15,40} Al ser derivada de la quitina, la quitosana está conformada por las unidades β -2-acetamida-D-glucopiranososa (**A**) y β -2-amina-D-glucopiranososa (**D**), con proporciones variables (ver figura 11, ítem 1.3.1), lo cual amplía significativamente sus propiedades al mejorar su solubilidad y reactividad.⁴¹

La presencia de los grupos amino indica que el pH altera sustancialmente la carga y las propiedades de la quitosana: a bajo pH, la carga positiva en los grupos $-\text{NH}_3^+$ convierten a la quitosana en un polielectrolito catiónico soluble en agua, pero cuando el pH es mayor que 6.0, se pierde la carga y, con ello, su solubilidad. Entonces, como el valor del pH es altamente dependiente del DDA, la solubilidad de la quitosana es dependiente del método de desacetilación usado.^{3,15}

Los parámetros como el peso molecular (M_w), la polidispersión (M_w/M_n), el grado de acetilación (DA) o desacetilación (DDA), el patrón de acetilación (PA) y las impurezas contenidas (proteínas, metales pesados) son importantes pues describen la relación entre la microestructura, las propiedades y la actividad, especialmente en el campo de las aplicaciones biomédicas.¹⁵

1.3.3 Aplicaciones

La quitosana ha generado gran impacto en el sector industrial por tener las propiedades mencionadas y por ser un recurso natural disponible en gran cantidad. El DDA y el peso molecular de la quitosana comercial abarcan los rangos de 70 a 95% y de 10 a 1000 kDa.⁴² El peso molecular de la quitosana determina la aplicación del producto; por ejemplo, los productos derivados de quitosana de alto peso molecular son potencialmente grandes agentes de retención y absorción de humedad, así como estabilizantes de emulsiones debido a su grupo amino activo; por otro lado, aquellos que tienen bajo peso molecular se comportan como agentes antioxidantes por prevenir la formación de grupos carbonilo y así proteger las células de la piel.⁴³ Está reportado que la quitosana compatible con el organismo tiene un DDA no menor que 95% y un peso molecular entre 150 y 300 kDa.⁴⁴

Entre las aplicaciones médicas de la quitosana, una banda de quitosana tópicamente aplicada puede ralentizar la hemorragia sanguínea por su propiedad adhesiva sin causar alergias, además de reducir la infiltración de células inflamatorias.^{45,46} Esta aplicación es similar a la quitosana como adhesivo líquido,

pues la baja tensión superficial y su alta dispersión ayudan al polisacárido a esparcirse en casi cualquier tipo de material. La viscosidad se puede alterar al modificar la concentración del polímero en la solución, según el uso que se le quiera dar.⁴⁷

La amina de la quitosana le otorga carácter catiónico en medio húmedo. Esto permite que el polímero sea aplicable en la industria farmacéutica como transportador de fármacos aniónicos, beneficiado con la mucoadhesividad, el incremento de la permeación y el control de la liberación de la droga.⁴⁸ Además, la quitosana puede aplicarse como removedor de partículas o suspensiones aniónicas, en el tratamiento de agua,⁴⁹ en la industria del papel y en el proceso final de la clarificación del vino.⁵⁰

Del mismo modo, al ser antimicrobiana, su aplicación ha beneficiado a la industria textil (reemplazando resinas acrílicas) para el aumento del tiempo de vida de la prenda,⁵¹ y en la industria plástica, como base de envolturas para la conservación de alimentos, con el valor agregado de limitar la degradación fotoquímica y la oxidación por el bloqueo de los rayos UV.⁵²

1.4 Determinación del peso molecular

Hay varios tipos de métodos conocidos para determinar el peso molecular de cualquier compuesto macromolecular. Los más conocidos son por análisis de grupo terminal, osmometría, análisis de velocidad de sedimentación, MALDI-TOF-MS, dispersión de luz, viscosimetría capilar con baño termostático controlado y cromatografía de permeación de gel (GPC).⁵³⁻⁵⁶ En este trabajo se utilizó los dos últimos métodos, por la facilidad de preparación de la muestra.

La cromatografía por permeación de gel involucra pasar una solución con polímero disuelto a través de una columna tubular empacada con un gel polimérico poroso. El tiempo que demore en atravesar la cadena polimérica en la columna depende de su volumen: mientras más grande sea, menor retención tendrá en los poros del gel y pasará más rápido hacia la salida de la columna. Este análisis necesita de un estándar para comparar los pesos moleculares con los volúmenes de elución.⁵⁶

La quitosana, como cualquier polisacárido, es polidisperso respecto al peso molecular, el cual está referido al promedio de los pesos moleculares. La regularidad de los pesos moleculares de las cadenas poliméricas se rige por el índice de polidispersión (PDI, por sus siglas en inglés), que relaciona el peso

molecular promedio en peso (M_w) con el peso molecular promedio en número (M_n) de la siguiente manera:

$$M_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (4)$$

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (5)$$

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (6)$$

donde w_i es el peso de las moléculas con un peso molecular específico M_i , en una población donde N_i es el número de moléculas. En un polímero polidisperso, el M_w es más grande que el M_n , mientras que en uno monodisperso, el M_w es igual al M_n . Por tanto, mientras más cercano sea el PDI a 1, mayor homogeneidad tendrá el polímero.⁵⁷

Por otro lado, la viscosimetría capilar es una de las técnicas de caracterización de polímeros más utilizadas por la sencillez de su manejo, la simplicidad de su análisis de resultados y por poder determinar la masa molar promedio del polímero, volumen hidrodinámico, entre otros. Comparado con los solventes puros, las soluciones poliméricas tienen alta viscosidad, que depende de la concentración del polímero y de su masa molar. La viscosidad puede medirse incluso en soluciones muy diluidas en las que las cadenas del polímero no estén tan enredadas.⁵⁶

La viscosidad se vincula con el tiempo de fluido de la solución a distintas concentraciones en un volumen fijo a temperatura constante. El peso molecular y la viscosidad intrínseca se relacionan por medio de la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K M_v^\alpha \quad (7)$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, M_v es la masa molar promedio de viscosidad, y K y α son constantes para un sistema polímero/solvente en particular (en el caso de quitosana, también dependen del DDA).^{53,58} La figura 12 muestra las ecuaciones empleadas para el cálculo de la viscosidad intrínseca, donde se empleó el valor promedio de la ordenada de las gráficas de Huggins y Kraemer.

<i>Viscosidad relativa</i>	$\eta_r = \frac{t}{t_0}$
<i>Viscosidad específica</i>	$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$
<i>Viscosidad reducida</i>	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$
<i>Viscosidad inherente</i>	$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_r)}{c}$
<i>Método de Huggins</i>	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)$
<i>Método de Kraemer</i>	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln(\eta_r)}{c} \right)$

Figura 12. Ecuaciones para determinar la viscosidad intrínseca.

1.5 Reacciones con microondas

A fines del siglo XX, el uso de la energía de microondas en síntesis química comenzó a recibir considerable atención y, con el paso del tiempo y el continuo desarrollo, se ha posicionado en los campos de las ciencias de polímeros, la biotecnología y la bioquímica.⁵⁹ La técnica de microondas es conocida por ser un sistema efectivo para llevar a cabo reacciones químicas debido a su instantáneo calentamiento y aumento de energía vibracional al nivel molecular.⁴⁰

Debido a que las microondas pueden transferir energía directamente al reactivo, pueden promover transformaciones que no son generalmente posibles con el calentamiento convencional. Las microondas afectan directamente a las moléculas presentes en la reacción, ya sea por rotación dipolar o conducción iónica. La rotación dipolar es una interacción en la que las moléculas polares se tratan de alinear al cambio rápido del campo eléctrico. Por otro lado, la conducción iónica es la energía transferida por algún ion libre o especies iónicas presentes en las sustancias.⁶⁰

El utilizar el método por microondas en lugar del método convencional reduce en gran medida el tiempo de reacción, pero se consigue baja homogeneización térmica. Esto se debe a que el calentamiento se enfoca únicamente en las moléculas reaccionantes y no por conductividad térmica.^{41,60} Además, las reacciones asistidas por microondas en la química orgánica redujeron el costo y el gasto de energía, haciéndolo un proceso sostenible.^{61,62}

2 OBJETIVOS

Se buscó obtener quitosanas con grados de desacetilación cercanos al 100%, tanto a partir de quitina como de quitosana comercial de DDA medio. Para esto, en primer lugar, se compararon varios métodos de desacetilación y se evaluaron de acuerdo al DDA y a la conservación del peso molecular de las cadenas. Además, se evaluaron las variables de tiempo de reacción y concentración de la base. La determinación del grado de desacetilación requirió el uso de la espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN). Finalmente, para determinar el peso molecular del polímero se utilizó la cromatografía de permeación de gel (GPC) y viscosimetría capilar.



3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, equipos y materiales

3.1.1 Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación previa, a menos que se indique lo contrario.

- Quitina de caparazón de camarón Sigma-Aldrich C9213, lote #061M0110V (grado práctico, escamas gruesas).
- Quitosana de peso molecular medio en polvo Sigma-Aldrich 448877, lote #STBF3507V.
- Perlas de hidróxido de sodio (NaOH) Macron y Movilab.
- Estándares de pululano PSS Polymer Standards Service GmbH (10 kDa – 2000 kDa).
- Agua ultrapura (grado Milli-Q, pH 6,01 y resistividad $18,2 \times 10^6 \Omega\text{-cm}$) obtenida de un sistema de ósmosis inversa y filtración con filtro de fibra hueca con tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ Barnstead D3750 Nanopure.
- Metanol (CH_3OH) 99,93% JT-Baker.
- Merck:
 - Ácido acético glacial (HOAc) para análisis.
 - Acetato de sodio trihidratado ($\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) para análisis.
 - Amoníaco (NH_3) 25%.
 - Cloruro de litio (LiCl) para análisis.
 - N, N -dimetilacetamida (DMA) para análisis.
 - Dióxido de deuterio (D_2O) 99,8%.
 - Cloruro de deuterio (DCI) 20% en D_2O 99%.

3.1.2 Equipos

Todos los equipos utilizados en esta tesis se encuentran en la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Ascend de 500 MHz. El equipo empleó un magneto superconductor de 11,7 T, una sonda CP TCI de 500 MHz, una unidad de temperatura variable BCU I y una consola Bruker Avance III HD. Para el procesamiento de los espectros se utilizó el programa ACD/NMR Processor Academic Edition.
- Espectrofotómetro infrarrojo, Perkin Elmer modelo FT-IR 100. Consta de una fuente de luz láser de He, Ne; detector LiTaO₃ (tantalato de litio) y una barra de carburo de silicio como fuente de radiación. Para el procesamiento de los espectros se utilizó el programa Origin 8.0.
- Cromatógrafo de permeación de gel Malvern Viscotek GPC System con detector de índice de refracción. Se empleó una columna para polímeros catiónicos en medio acuoso Novema Max analytical linear XL, compuesta de una red de copolímeros de acrilato funcionalizado con NH, y con dimensiones de 300 x 8 mm, tamaño de partícula de 10 µm con rango de separación de 5 – 3 000 kDa. Para el procesamiento de los cromatogramas se empleó el programa OmniSEC.
- Microondas Miray doméstico HMM-2590DD, con potencia de 900 W y frecuencia de 2 450 MHz.
- Centrífuga LW Scientific C5 con rotor de 4 espacios.
- Viscosímetro Ubbelohde Technical Glass Products Inc. 1C ($K = 0,02871 \text{ mm}^2/\text{s}^2$), con baño termostático con recirculador Julabo MP.

3.1.3 Materiales

- Reactor de teflón para digestión estándar Savillex de 135 mL.
- Filtros de jeringa Merck-Millipore compuestos de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm y diámetro de 13 y 33 mm.
- Filtros de membrana Merck-Millipore compuestos de membrana de nylon del tipo 0,2 μm GNWP.
- Filtros de papel Whatman 4 con tamaño de poro entre 20 y 25 μm y diámetro de 90 mm.
- Membrana de diálisis *Spectrum Laboratories, Inc* con diámetro de 29 mm y 3,5 kDa como peso molecular mínimo del soluto.



3.2 Metodología

3.2.1 Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se preparó una solución ácida de quitosana al 0,25% (w/v) en ácido acético 1% (v/v), con agitación por una hora a temperatura ambiente. Se decantó la cantidad necesaria para cubrir la superficie de una placa Petri de poliestireno, la cual se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente y otras 24 h a 50°C para que termine de secarse y se formen láminas. Se lavó con 10 mL de solución de metanol 99,93% y amoníaco 25,00% (relación CH₃OH:NH₃ de 30:1, en volumen) por 10 minutos. Luego se enjuagó con 10 mL de metanol puro 3 veces para, finalmente, dejar en vacío para que se elimine el resto del solvente y la película de quitosana se desprenda de la placa, lista para el análisis. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro Perkin Elmer (4 barridos a resolución de 4 cm⁻¹).

Además se prepararon láminas de quitina a partir de una solución al 0,5% (w/v) en solución de LiCl con DMA al 5% (w/v) bajo atmósfera de nitrógeno. La quitina y el LiCl se secaron previamente a 70°C. Se prepararon *films* en placas Petri con el menor volumen posible de la solución y se dejaron evaporar en reposo a 50°C. Luego de unos días, se lavaron con agua y se dejaron secar, nuevamente, a 50°C.

3.2.2 Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN)

De acuerdo a la norma ASTM F2260-03 (2008),³⁹ se disolvió 10 mg de quitosana en 700 µL de D₂O y 120 µL de DCl / D₂O al 2% (v/v) con agitación y calentamiento por 15 min a 40°C, luego 45 min más a temperatura ambiente, para obtener una solución de cloruro de quitosana. La muestra preparada se analizó con un espectrómetro Bruker Ascend de 500 MHz a 70,15°C. Los espectros de RMN se procesaron con el programa ACD/NMR Processor Academic Edition.

3.2.3 Análisis por GPC

Según la norma ASTM F2602-08 (2008),⁶³ como fase móvil se usó una solución *buffer* de HOAc 0,2 M y NaOAc 0,1 M en agua Milli-Q, con el pH ajustado a 4,5. Se filtró con bomba de vacío utilizando un filtro de membrana de 0,20 μm . Las muestras se disolvieron también en el mismo *buffer* a una concentración de 1,5 mg/mL por 1 h a 20°C, luego se pasaron por filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm .

Del mismo modo, se disolvieron los estándares de pululano de PSS de distintos pesos moleculares (10 kDa – 2000 kDa) en concentraciones de 1 mg/mL en el mismo *buffer*.

Las soluciones de muestras y estándares se inyectaron en el cromatógrafo de permeación de gel con un *loop* de 100 μL y un detector de índice de refracción. La cromatografía se realizó por 40 min a un flujo de 0,5 mL/min en columna para polímeros catiónicos en medio acuoso Novema Max analytical linear XL, con rango de 5 a 3 000 kDa, a 35 °C, de manera que se vea una mejor diferencia en el volumen de retención de las distintas muestras.

3.2.4 Análisis por viscosimetría capilar

La viscosimetría capilar se realizó con un viscosímetro Ubbelohde 1C ($K = 0,02871 \text{ mm}^2/\text{s}^2$). Se empleó como solvente una solución *buffer* de HOAc 0,2 M y NaOAc 0,1 M. Las muestras disueltas se filtraron con membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm . Para cada muestra, se realizaron tres diluciones, midiéndose cuatro veces el tiempo de reflujo a cada concentración. Las mediciones se realizaron a 30°C.⁵³ Este análisis se realizó únicamente a los productos más representativos.

3.3 Desacetilación de la quitina

La quitina pasó por distintos procesos químicos para convertirse en quitosana con alto DDA. En la figura 13 se observan los métodos utilizados. El tratamiento previo permitió a los reactivos entrar en contacto entre ellos lo mejor posible. Luego, fueron tres los distintos procedimientos utilizados para desacetilar a la quitina. Finalmente, los productos fueron lavados y secados para ser analizados.

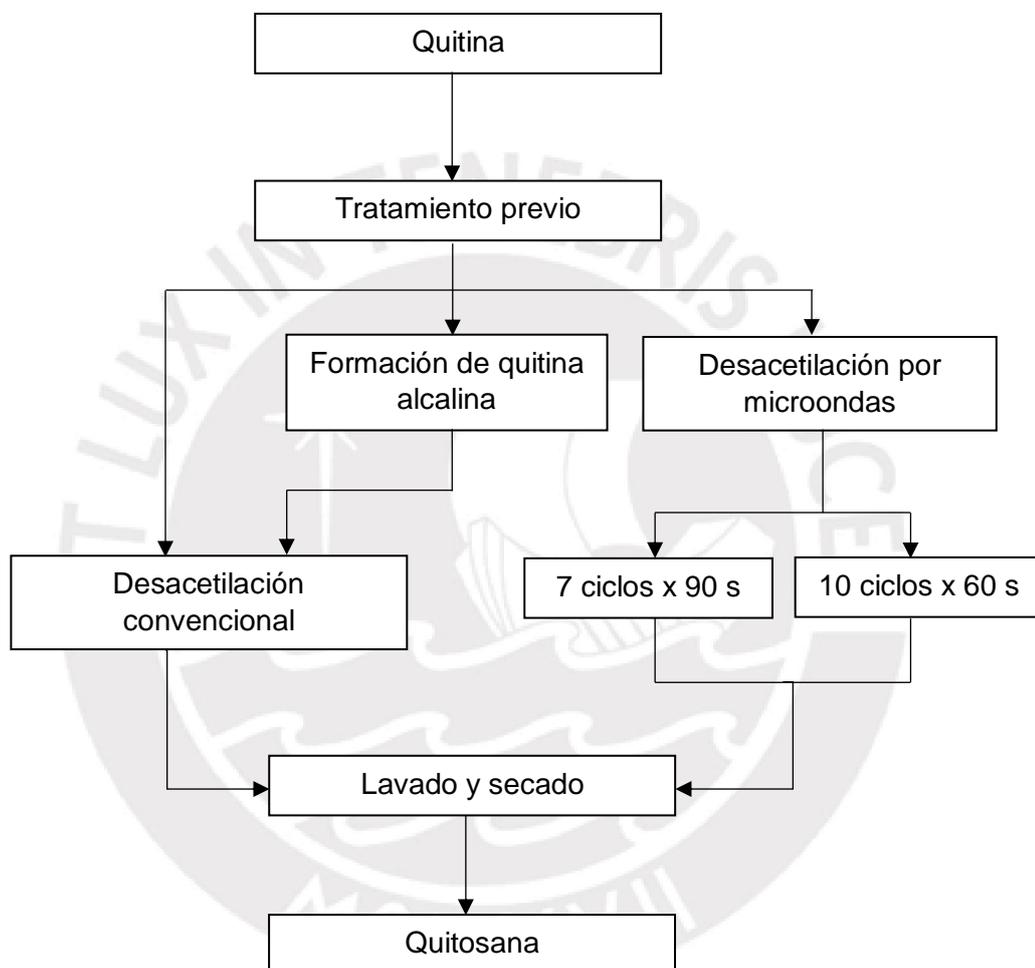


Figura 13. Métodos de desacetilación de quitina.

3.3.1 Tratamiento previo

La quitina se trató en un balón de dos bocas (de 1 L o 250 mL según la cantidad de quitina, 10 g para el primer balón y 1 g para el segundo), al cual se conectaron una pera de adición de 500 mL y una válvula de vidrio con oliva para entrada de gas. Se colocaron las escamas gruesas de quitina en el balón y una solución de hidróxido

de sodio al 50% (w/w) en la pera, con relación de quitina: NaOH(s) de 1:30 en peso. Se aplicó vacío antes y durante la adición lenta de la solución de hidróxido de sodio. La quitina quedó suspendida en la solución con agitación por 24 h. Luego del periodo de humectación, el aire ingresó al sistema y la mezcla fue calentada posteriormente, por conducción o por radiación, según el método deseado.

3.3.2 Desacetilación convencional (por conducción)

En el sistema anterior, la pera de adición fue reemplazada por un condensador de reflujo y la quitina húmeda y mezclada fue calentada por conducción, utilizando una manta de calentamiento. La reacción se dio bajo atmósfera de nitrógeno a 120°C con agitación constante por tiempos variables entre 0,5 y 5 h.

3.3.3 Desacetilación con microondas (por radiación)

La mezcla pre-tratada (de 3.3.1) fue transferida a un reactor de teflón para digestión, que luego fue saturado con nitrógeno. Se realizaron dos procedimientos para la reacción de quitina en el horno de microondas: uno de 7 ciclos de 90 s de calentamiento y otro de 10 ciclos, de 60 s de calentamiento. Ambos tuvieron 10 minutos de enfriamiento en baño de agua con hielo por cada ciclo y el reactor se ubicó siempre en el mismo extremo del plato giratorio para una exposición reproducible a la radiación.

3.3.4 Formación de quitina alcalina

Después del tratamiento previo (3.3.1), se retiró la pera de adición y se agregó cantidad suficiente de hielo en trozos para disminuir la concentración de la base a la mitad. La mezcla se enfrió en baño de hielo con agitación y al vacío. Después de una hora, se acopló un condensador de reflujo al balón de reacción y luego el sistema fue saturado con nitrógeno. El sólido perdió el color amarillento y tomó cierta transparencia en la mezcla (disolución parcial). La mezcla resultante fue desacetilada de la manera convencional (3.3.2).

3.3.5 Lavado y secado

Luego del proceso de desacetilación, los productos fueron lavados con agua desionizada por filtración con embudo Büchner y bomba de agua. Se dejaron en

agua y en agitación por dos días. Una vez eliminado el exceso de base (pH 5), las muestras se secaron a 50 °C por 72 h. Posteriormente, se mantuvieron al vacío a temperatura ambiente con sílica gel durante 2 días para eliminar el agua.

3.4 Desacetilación de la quitosana

En la búsqueda de obtener quitosana de mayor DDA, se trató a una muestra comercial de quitosana, parcialmente desacetilada, por conducción y radiación, para comparar las características de los productos (ver figura 14). Estos procesos permitieron verificar si la posibilidad de desacetilar nuevamente a la quitosana es viable para conseguir un mayor DDA.

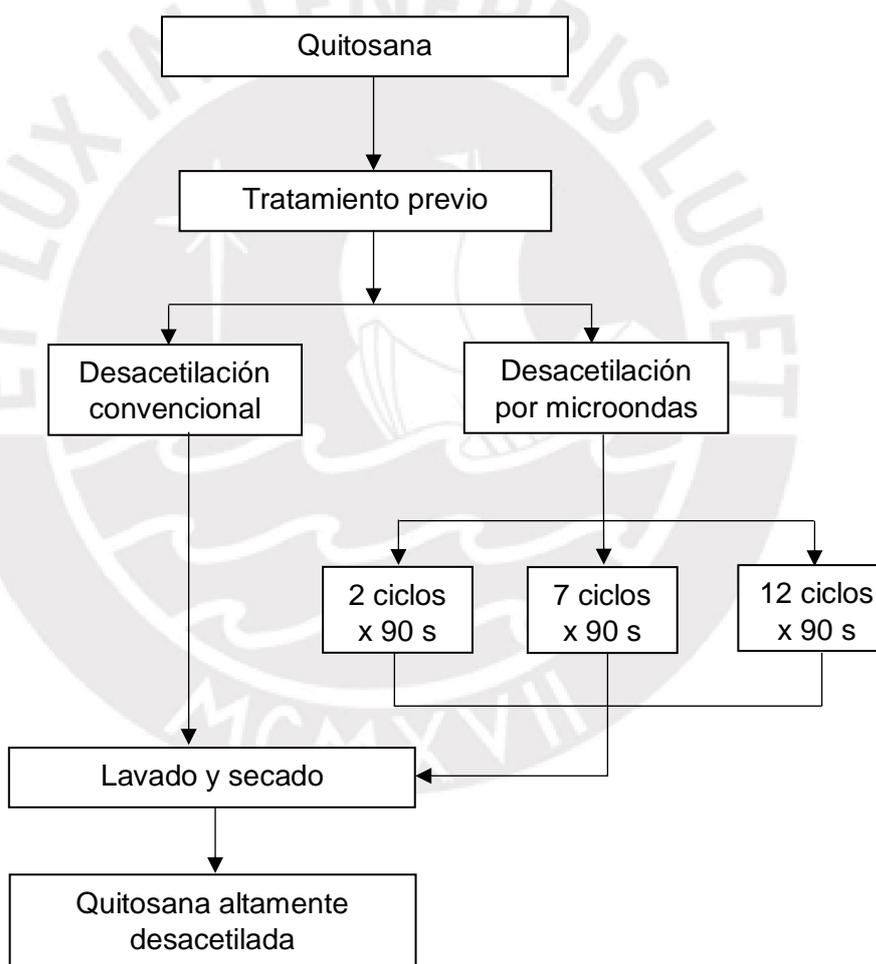


Figura 14. Métodos de desacetilación de quitosana.

3.4.1 Tratamiento previo

Se utilizó dos clases de quitosana como un sustrato de partida: quitosana Aldrich en polvo y quitosana en escamas, producida a partir de quitina por alguno de los métodos anteriores (3.3).

La quitosana se trató en un balón de dos bocas de 250 mL conectado a una pera de adición de 500 mL y a una válvula de vidrio con oliva para entrada de gas. Se dispuso de 1 g de quitosana en el balón y una solución de hidróxido de sodio 50% (w/w) en la pera, con la relación de quitosana:NaOH_(s) de 1:30 en peso. Al igual que con la quitina, se aplicó vacío para eliminar el aire y la solución de hidróxido de sodio se agregó lentamente con agitación constante. Con el vacío mantenido, se dejó agitando por 24 h para mejorar la humectación de la base. Después de este periodo, el aire ingresa al sistema hasta la adición de nitrógeno. Luego, la mezcla fue calentada por conducción o por radiación.

3.4.2 Desacetilación convencional (por conducción)

De forma similar a lo descrito en 3.3.2, se retiró la pera de adición y se insertó un condensador de reflujo para iniciar la desacetilación de la quitosana a 120°C con atmósfera de nitrógeno y agitación constante por 2,5 y 5 h para la quitosana en forma de escamas, y por 5 h para la quitosana en polvo (comparando la concentración de la solución de NaOH a 50 y 25% (w/w)).

3.4.3 Desacetilación con microondas (por radiación)

De manera similar a lo explicado en el punto 3.3.3, la mezcla se transfirió a un reactor de teflón para digestión, luego se cerró adecuadamente y se llenó de nitrógeno. La exposición a la radiación de microondas para la quitosana consistió en ciclos de 1,5 min de calentamiento en horno convencional y 10 min de enfriamiento en baño de agua con hielo. Los ciclos variaron según el tipo de quitosana: 7 ciclos para las escamas y 2, 7 y 12, para la quitina en polvo. El reactor se ubicó siempre en el mismo extremo del plato giratorio para una radiación homogénea.

3.4.4 Lavado y secado

Las muestras fueron lavadas con agua desionizada por filtración al vacío con papel filtro de flujo rápido, y se dejaron en agua con agitación por 2 días. Luego de asegurar la eliminación de la base (al alcanzar un pH = 5), las muestras se colocaron en tubos y fueron centrifugadas hasta eliminar la mayor cantidad de agua. Después se secaron a 50 °C por 72 horas. Finalmente, se mantuvieron al vacío con sílica gel durante 2 días a temperatura ambiente para eliminar el agua.



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de muestras

4.1.1 Análisis de composición molecular por FT-IR

La quitina Aldrich, la quitosana Aldrich (80,59% de DDA) y la quitosana más desacetilada (99,85% de DDA) fueron convertidas en películas lo suficientemente delgadas para ser analizadas por transmisión (FT-IR). Esta técnica brindó la información de los grupos funcionales y su transformación según el DDA de la muestra.

En la figura 15 se presentan los espectros de las muestras mencionadas: la quitina Aldrich, la quitosana Aldrich (80,59%), y la quitosana con el DDA a 99,85%. En la figura 15 A se puede apreciar que las señales no varían de forma notoria en el rango mayor que $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$. La banda ancha a $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ estaría agrupando a las vibraciones de estiramiento de grupos libres OH, la vibración intermolecular CO – NH del grupo amida y la vibración NH – H intramolecular de los grupos amina.^{64,65} De igual manera, las señales referidas a las vibraciones de enlaces C (sp^3) – H de grupos CH_2 y CH_3 se mantienen en el rango entre $2\ 850$ y $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$.

Por otra parte, en el rango de $1\ 400$ a $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ (figura 15 B) se observan cambios en las bandas según el DDA del producto. En el espectro de quitina (negro), las bandas a $1\ 655$ y a $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ representan a la vibración del enlace CO – NH de amida de α -quitina, dividida en dos componentes por la influencia de enlace de hidrógeno o la presencia de un enol.¹⁵ Además, la banda a $1\ 560\ \text{cm}^{-1}$ simboliza la vibración del enlace N – H de la amida secundaria de α -quitina.^{15,55,66} Por el contrario, en el caso de la β -quitina, la literatura indica que las bandas de la amida aparecen a $1\ 630$ y $1\ 562\ \text{cm}^{-1}$, donde la primera aparece como banda única.¹⁵

Al comparar los espectros se observa que mientras más desacetilada es la quitosana, menos intensas son las señales a $1\ 560$, $1\ 630$ y $1\ 655$, y más intensa es la banda a $1\ 585\ \text{cm}^{-1}$, la cual muestra la presencia de grupos amina (vibración de flexión NH – H de la amina).⁶⁵ Este caso se nota claramente en el espectro (rojo) de la quitosana con mayor desacetilación, en el que la banda a $1\ 585\ \text{cm}^{-1}$ es la única que aparece en esa región. En el caso de la quitosana con DDA = 80,59%, se superponen las bandas del carbonilo y de la amina (banda ancha entre $1\ 560$ y $1\ 585\ \text{cm}^{-1}$).

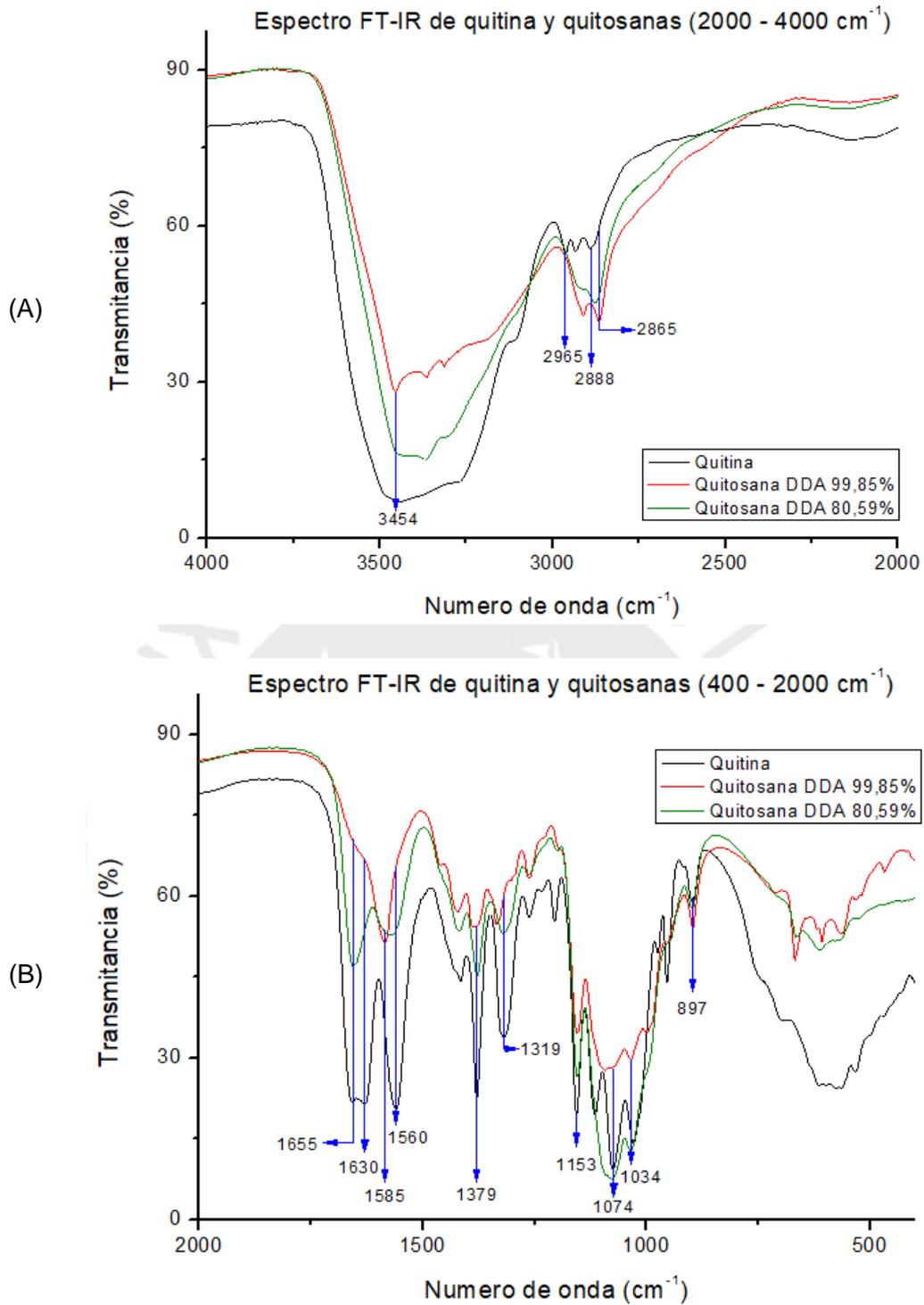


Figura 15. Espectro de FT-IR de película de la quitina, la quitosana Aldrich (80,59%) y la quitosana más desacetilada (99,85%) separados en dos rangos según el número de onda: (A) 2000 a 4000 cm^{-1} y (B) 400 a 2000 cm^{-1} .

La absorbancia a 1379 cm^{-1} resulta de la combinación de $-\text{CH}_3$ y $\text{C} - \text{CH}_3$, indicativo de falta de desacetilación. Esta señal debería perderse en el espectro (rojo) de la quitosana con mayor DDA a menos que haya grupos acetamida remanentes.^{55,65} Del mismo modo, en el mismo espectro ya no se aprecia absorbancia a 1319 cm^{-1} (indicativo de glucosamina acetilada), que sí se nota en el espectro (negro) de la quitina y también se aprecia en el espectro (verde) de la quitosana parcialmente desacetilada.⁶⁵

Por último, las señales menores a 1200 cm^{-1} (figura 15 B) componen la huella digital del anillo D-glicosídico, por las deformaciones, vibraciones y estiramientos de los enlaces covalentes del anillo de glucopiranososa y por los enlaces glicosídicos, aunque algunas señales indican la acetilación de la glucosamina. Para el caso de la quitosana con desacetilación media (espectro verde), la señal del estiramiento del enlace $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ (1153 cm^{-1}) es más intensa que en el espectro (rojo) de la quitosana con mayor DDA, lo cual se debería al efecto de las condiciones durante la desacetilación, que también produce el rompimiento de las cadenas del polímero.⁵⁵ De igual manera, las señales definidas a 1074 , 1034 y 897 cm^{-1} indican a la glucosamina acetilada, ya que se relacionan con el estiramiento del $\text{C} = \text{O}$.⁵⁵ El resto de señales representaron a los grupos alifáticos, comunes en cadenas con anillos D-glicosídico.

Finalmente, vale decir que, además de los enlaces covalentes, hay gran posibilidad de tener muchas interacciones en esta macromolécula (tanto inter como intramolecular) que dan lugar a señales en la figura 15; por ejemplo, siendo quitina, se puede generar enlaces entre grupos hidroxilo, hidrógeno de la amida con el oxígeno del hidroxilo, o el hidrógeno de la amina o del hidroxilo con el carbonilo del grupo acetamida (ver figura 3, 1.2.2). Las interacciones disminuyen al convertirse en quitosana por la pérdida de grupos carbonilo; sin embargo, los grupos amina forman enlaces de hidrógeno en mayor proporción.⁶⁶

4.1.2 Análisis químico estructural y determinación del grado de desacetilación (DDA) de la quitosana por RMN

Se empleó la norma ASTM F2260-03 (2008) para el análisis de la quitosana por ^1H -RMN. Este método está validado para determinar el grado de desacetilación en el rango de 50 a 99% de desacetilación de cloruro de quitosana en medio acuoso deuterado. Las muestras fueron analizadas a 70°C para reducir la viscosidad de la misma y desplazar la señal del protón del agua a un área fuera de interés del análisis. En el espectro ^1H -RMN de las muestras de quitosana mostrado en la figura 16 y anexo 1, se asignaron los desplazamientos de los protones de los monómeros (figura 17) y las integraciones.

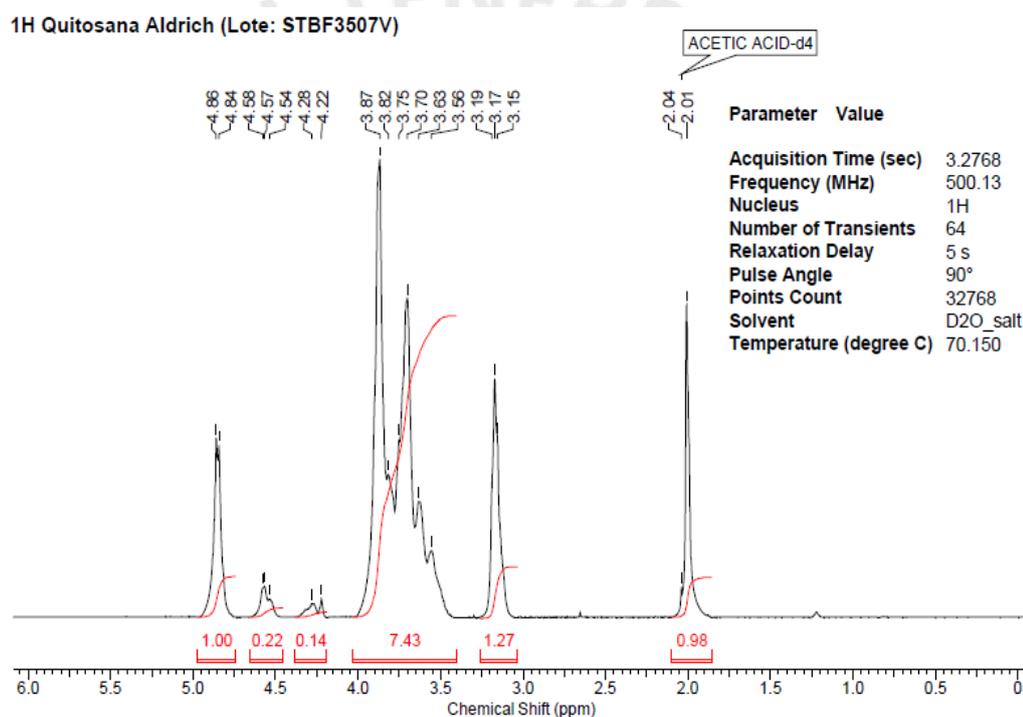


Figura 16. Espectro ^1H -RMN de cloruro de quitosana (Aldrich, Lote: STBF3507V) en $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz. DDA = 80,59%.

valores altos para las quitosanas con alto DDA. A lo largo de los análisis, los desplazamientos de los hidrógenos no variaron, únicamente sus integrales; por ello, el espectro de la quitosana Aldrich (figura 16) sirvió de base para el análisis de DDA de todas las muestras.

Los desplazamientos de la quitosana fueron comparados con los de cada monómero (D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina), por separado, a las mismas condiciones de análisis (figura 18). Las señales H1A y H3A tuvieron menor desplazamiento químico que las desacetiladas correspondientes. Asimismo, el protón de la D-glucosamina (H2D) se desplaza a 2,98 ppm, distinto al 3,60 ppm de la N-Acetil-D-glucosamina (H2A). En el espectro de quitosana mostrado anteriormente (figura 17), solo se aprecia claramente el H2D a 3,17 ppm (diferencia de desplazamiento por el éter cercano en lugar de alcohol), pues el H2A se desplaza igual que los protones del multiplete. Gracias a ello, se confirmó la proporción de integración aproximada de 1 (0,64) a 1 de H2D con el H1D.

En ambas unidades repetitivas de la quitosana, el protón 1 (H1D y H1A) fue el más desprotegido por ser el único que tiene a un carbono acetal. La alta electronegatividad de los oxígenos enlazados generó doble efecto desprotector al hidrógeno 1, provocando la disminución de la densidad electrónica del mismo y eliminando cualquier efecto de apantallamiento. Esto resultó en el desplazamiento de las señales H1D y H1A a alrededor de 4,8 y 4,5 ppm, respectivamente.¹⁵ En el caso del protón H1A, se integró las señales cercanas entre 4,54 y 4,58 ppm, debido a que representan al mismo protón, con la mínima diferencia de desplazamiento e integración por la influencia de la unidad repetitiva siguiente, ya sea acetilada o desacetilada.⁵⁷

Finalmente, las señales de los protones H5 y H6 de ambos monómeros tuvieron un desplazamiento similar (3,46 ppm) pues estuvieron bajo el efecto inductivo de un solo grupo hidroxilo, y la señal del protón H7, que refiere a los 3 protones del acetilo, estuvo desplazado a la izquierda más de lo normal para un carbono sp^3 .

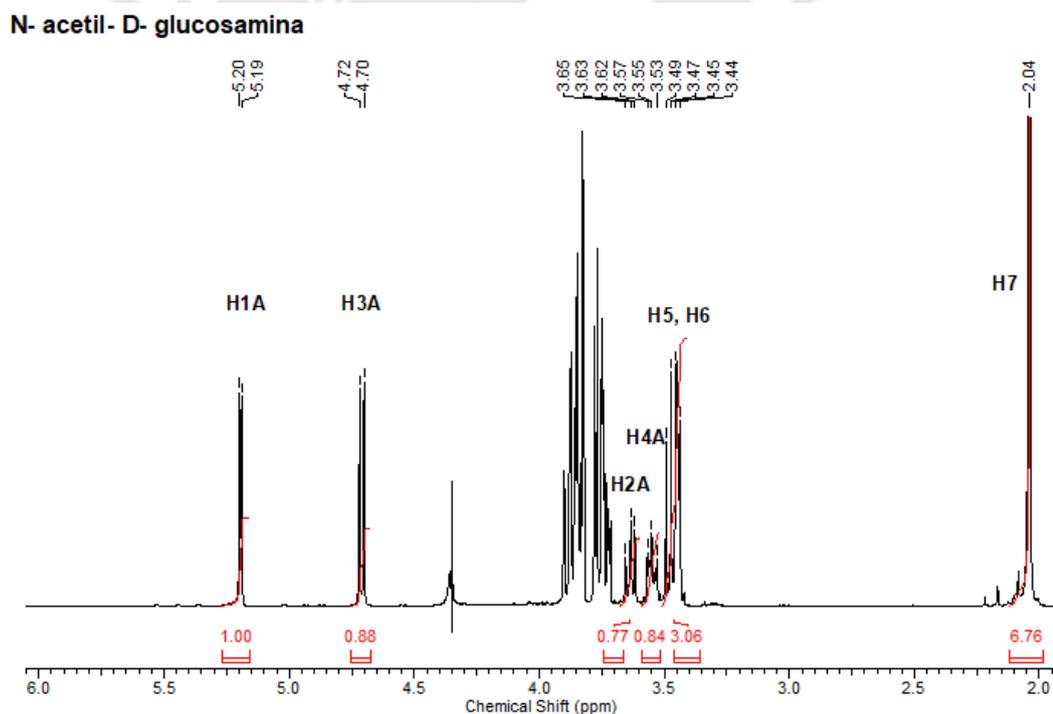
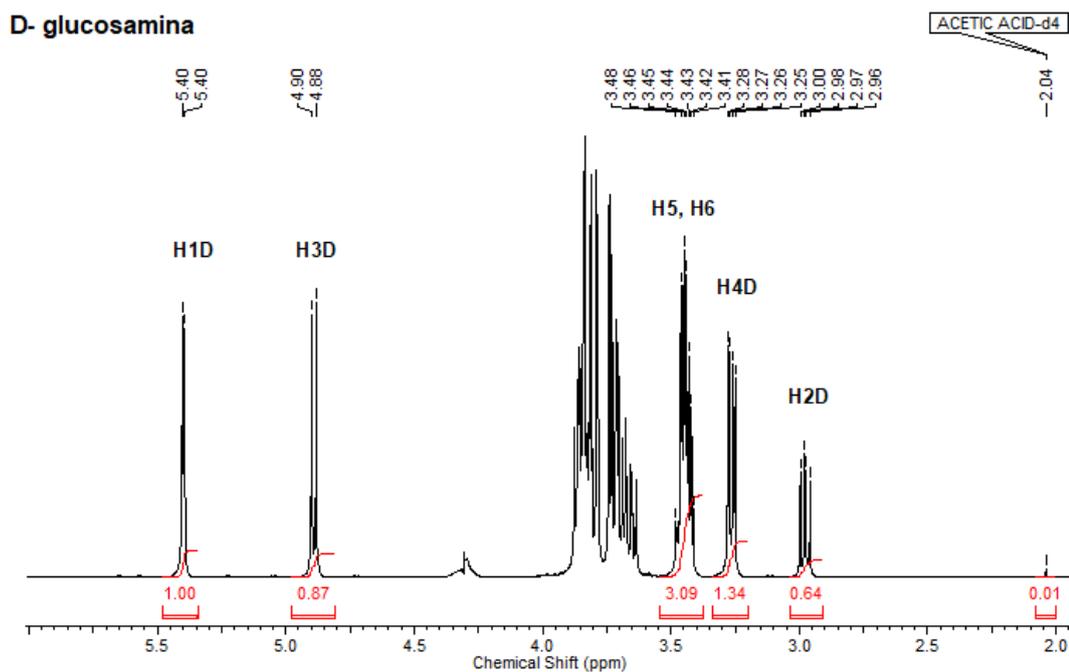


Figura 18. Espectros ^1H -RMN de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz.

A continuación, en la figura 19, se presentan dos espectros de ^1H -RMN de quitosana desacetilada de distinto DDA (82,72% y 97,41%). En ellos se verifica que

la variación de integración de las 4 señales indicadas (H1D, H1A, H2D y H7, de mayor a menor según el desplazamiento) diferencia el DDA de cada polímero. Se observa que las señales correspondientes a la unidad acetilada a 2,01 (H7) y 4,58 ppm (H1A) son menores, comparados a la señal de la unidad desacetilada 4,86 ppm (H1D), a medida que el polímero es más desacetilado según las ecuaciones 1 – 3 (sección 1.3.1).

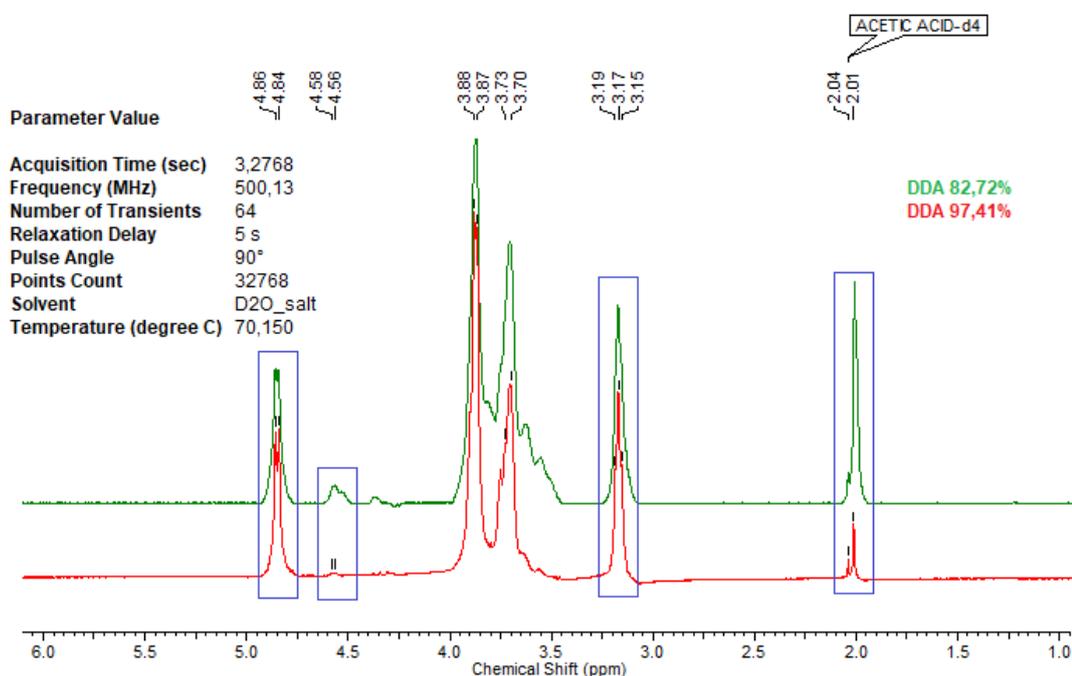


Figura 19. Espectros ^1H -RMN de dos muestras de cloruro de quitosana en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz. $\text{DDA}_1 = 82,72\%$ (verde) y $\text{DDA}_2 = 97,41\%$ (rojo).

4.1.3 Análisis del peso molecular promedio por cromatografía de permeación en gel (GPC)

El análisis por GPC sirvió para determinar la distribución de masas molares de las muestras de quitosana. En primer lugar, se realizó una curva de calibración convencional empleando estándares de pululano (PSS Polymer Standards Service) disueltos en el *buffer*. Se emplearon siete estándares en el rango de 10 – 2 000 kDa, cuyo PDI certificó la uniformidad de las cadenas poliméricas en beneficio de una correcta curva de calibración para las muestras analizadas (tabla 4). Se usó pululano por la falta de estándares de quitosana y por ser similar en cuanto a estructura: unidades de β -D-glucopiranososa (Figura 1b, ítem 1.2.1).

Tabla 4. Pesos moleculares de los estándares de pululano PSS utilizados para la curva de calibración de GPC.

Estándar	M_p^* (kDa)	M_n (kDa)	M_w (kDa)	PDI**
2 000k	2 350	1 720	2 560	1,49
700k	708	636	805	1,27
350k	337	310	348	1,12
200k	194	184	200	1,09
110k	107	100	113	1,13
50k	47,1	45,5	48,8	1,07
10k	9,6	9,2	10	1,09

* M_p = peso molecular de la cadena más abundante.

**PDI = índice de polidispersión (M_w/M_n).

El procesamiento de los cromatogramas de las muestras de quitosana en el programa OmniSEC se adaptó a una interpolación de la curva de calibración convencional de primer orden para determinar los parámetros de las distribuciones (curva de mejor aproximación según el fabricante).⁶⁷ De esta manera, la medición por GPC permitió determinar los pesos moleculares de las quitosanas relativos a los estándares de pululano.

Como se observa en la figura 20, las cadenas más grandes salen de la columna con un menor volumen de elución como es de esperar, ya que tienen menor

interacción con los poros del material empacado dentro de la columna y no quedan retenidos mucho tiempo.

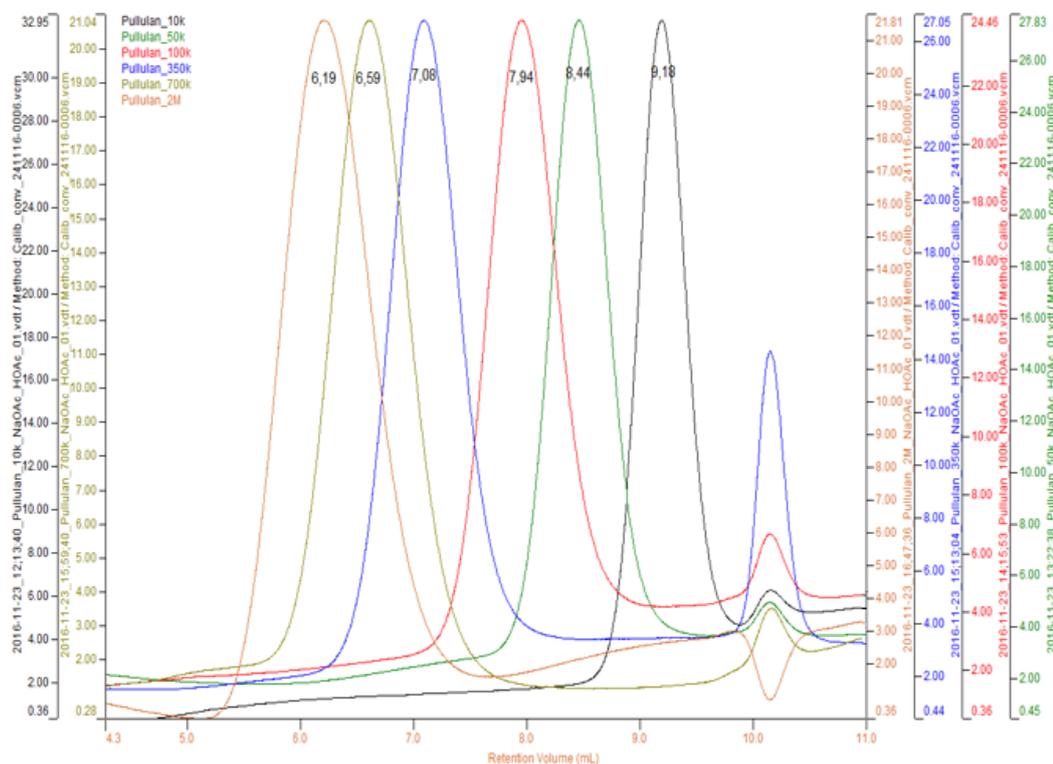
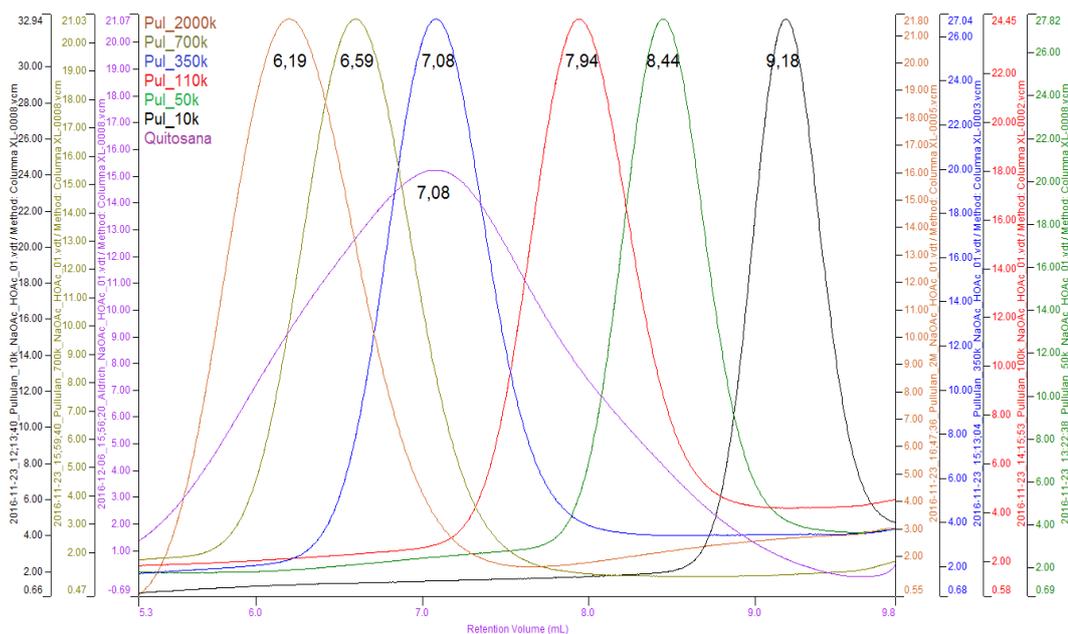


Figura 20. Cromatogramas de estándares de pululano (fase móvil HOAc 0,2 M y NaOAc 0,1 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C).

El pico a 10,15 mL apareció en todos los cromatogramas, tanto de muestras como de estándares. Incluso apareció al correr únicamente *buffer*. Este pico implica el tiempo de retención de todas las moléculas de la muestra o, en otras palabras, indica que no hay más volumen a analizar. Esta banda es causada por el solvente y puede aumentar con el incremento de la concentración.⁶⁸

Los cromatogramas de las muestras, en este caso de la quitosana Aldrich (figura 21), tienen mayor amplitud que la de los estándares. Es decir, el tamaño de sus cadenas no es tan parecido entre sí como el de los estándares. Los pesos moleculares de los productos de la desacetilación se presentan en el anexo 2.



	V retención (mL)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	M _n (kDa)	PDI*
Quitosana Aldrich	7,08	886	408	169	5,25

Figura 21. Cromatograma y pesos moleculares promedio de la quitosana Aldrich (DDA = 80,59%), comparada con los estándares de pululano (fase móvil HOAc 0,2 M y NaOAc 0,1 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C). *PDI = índice de polidispersión (M_w/M_n).

4.1.4 Análisis del peso molecular por viscosimetría capilar

Los estudios de Wang et al. reportan que, para la quitosana disuelta en un *buffer* de 0,2 M HOAc / 0,1 M NaOAc a 30°C, las constantes de Mark-Houwink (K y α) dependen del DDA del polímero de acuerdo a la tabla 5.⁶⁹ En este análisis, los valores de las constantes fueron utilizados según la cercanía de los DDA reales de cada muestra con los de esta tabla. De esta manera, por ejemplo, a partir de las ecuaciones mostradas en la figura 12 (sección 1.4), se realizó la viscosimetría capilar de la quitosana Aldrich de DDA = 80,59% (figura 22).

Tabla 5. Valores de K y α para quitosana según el DDA en 0,2 M HOAc / 0,1 M NaOAc a 30°C. Tomado de Wang et al. (1991).⁶⁹

DDA (%)	K ($\times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$)	α
69	0,104	1,12
84	1,424	0,96
91	6,589	0,88
100	16,800	0,81

Quitosana Aldrich					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	$1,24 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-3}$	$0,89 \times 10^{-3}$	$0,78 \times 10^{-3}$
t_{promedio} (s)	33,78	77,05	68,10	61,94	57,52
η_r	-	2,28	2,02	1,83	1,70
η_{sp}	-	1,28	1,02	0,83	0,70
η_{red}	-	1 033,01	983,21	941,28	906,63
η_{inh}	-	664,99	678,49	684,57	686,68
K = $1,424 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$			$\alpha = 0,96$		
$[\eta] = 712,595 \text{ mL/g}$			$M_v = 864 580 \text{ g/mol}$		

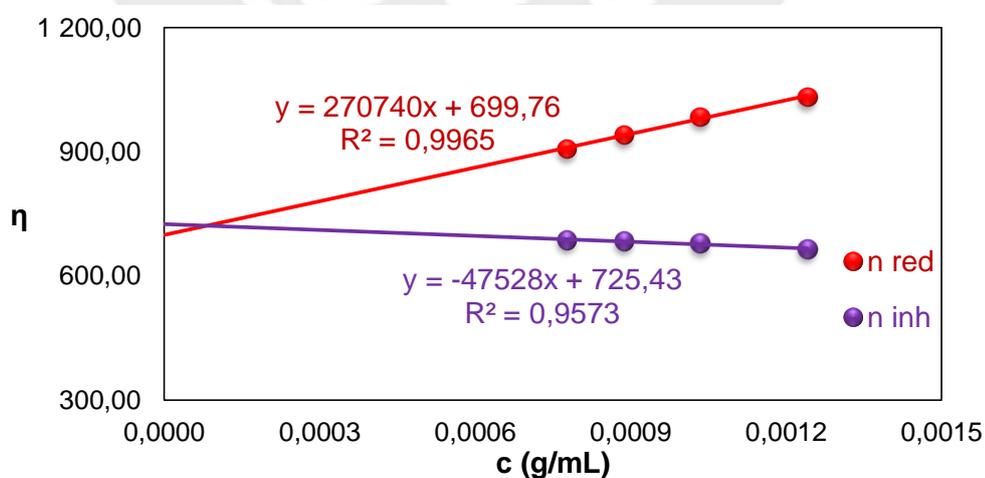
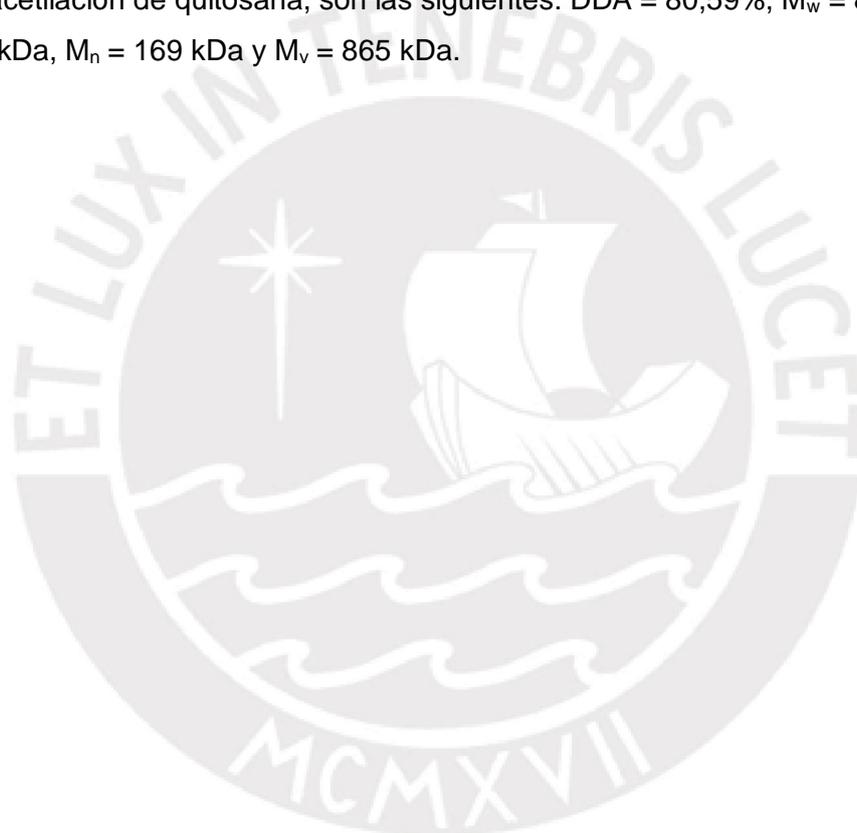


Figura 22. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Aldrich (DDA = 80,59%).

El peso molecular resulta 865 kDa con valores de K y α relacionados a un DDA cercano al real de la quitosana Aldrich. Este peso, al compararlo con los resultados por GPC (figura 21, ítem 4.1.3), se asemeja bastante al M_w (886 kDa). Esto se da porque el M_w tiene mayor influencia de las cadenas con mayor peso molecular, mientras que el M_n , de las cadenas de menor peso molecular. Además, la viscosidad (y M_v) de una solución diluida está definida por las cadenas de mayor peso molecular del polímero. Por lo tanto, el M_v tiende a tener valores más cercanos al M_w que al M_n . Esto se diferencia más cuando el PDI es mucho mayor que 1.⁷⁰

En resumen, las características de la quitosana Aldrich, polímero de partida en la desacetilación de quitosana, son las siguientes: DDA = 80,59%, M_w = 886 kDa, M_p = 408 kDa, M_n = 169 kDa y M_v = 865 kDa.



4.2 Desacetilación de la quitina

4.2.1 Tratamiento previo

El tiempo de agitación fue estipulado para asegurar el contacto total de la muestra con la solución (humectación). La reacción heterogénea y las características físicas del sustrato (escamas irregulares y poco densas) dificultan el contacto entre los reactantes. Para beneficiar dicho contacto, se hizo vacío con intención de eliminar el aire atrapado en las partículas del polímero. En caso no se elimine, no permitiría la reacción total y produciría que, en ciertas zonas, las cadenas permanezcan como quitina (sin desacetilar, esto es, insolubles). Además, se evitó la reacción del oxígeno, pues interfiere como catalizador en el mecanismo oxidativo de la degradación alcalina, además de la posible formación de grupos carbonilo en los carbonos C3 y C6 de la acetil glucosamina, y en el C2 de la glucosamina.⁷¹ Para validar esto, se realizaron pruebas sin vacío en las cuales se encontraron residuos sólidos insolubles al final de la reacción, la cual fue más agresiva (mayor DDA, menor M_p).

La quitina no se disolvió, pero al hidratarse se hinchó y aumentó la viscosidad de la mezcla de reacción, dificultando la agitación. En este punto, la mezcla se tornó amarillenta.

4.2.2 Desacetilación convencional (por conducción)

Al terminar la reacción, el producto tuvo apariencia blanquecina e hinchada por su hidratación. La baja densidad de las escamas de quitina, sumado a la agitación poco uniforme por la gran cantidad de escamas con respecto al volumen de la mezcla, impidió un mezclado correcto con la solución básica. Además, la forma física del sustrato dificultó la interacción total de la quitina con la base porque las escamas se conforman de fibras de quitina aglomeradas. Es por ello que, con intención de determinar si el volumen fue una variable, se realizó reacciones en balón de 250 mL con las cantidades reducidas en escala de diez (sección 3.3.1), con los mismos parámetros de reacción.

A la vista, hubo mejor combinación del sólido con la fase líquida por el menor tamaño del recipiente de reacción, ya que hubo mucho más sólido sumergido y siempre estuvo en el centro de agitación. No obstante, al final se observó poca diferencia (menor a 1%) en cuanto al DDA de los productos, según se observa en la tabla 6. En cuanto a los pesos moleculares, estos sí varían a pesar de corresponder

a muestras producidas por un mismo método. Esto podría deberse a las diferencias de condiciones de reacciones o a las condiciones físicas de la muestra seleccionada para el análisis (heterogeneidad de forma del sustrato). Por esto, los resultados para las reacciones llevadas a cabo por el mismo método, variando el tamaño del reactor, se presentan con valores máximos y mínimos. Se puede notar que a mayor escala de reacción, hubo mayor ruptura de cadenas (menor peso molecular).

Tabla 6. Efecto de volumen de reactor en el DDA y los pesos moleculares de los productos de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w). Se realizaron 3 pruebas por reactor.

Reactor	Valor	DDA (%)	M_p (kDa)*	M_n (kDa)	M_w (kDa)	PDI**
250 mL	Mínimo	96,12	213,089	115,860	367,816	3,18
	Máximo	97,35	283,625	154,109	597,540	3,88
1 L	Mínimo	96,95	182,230	114,976	353,966	3,08
	Máximo	97,41	238,439	119,174	400,246	3,36

* M_p es el peso molecular de la cadena más abundante.

**PDI = índice de polidispersión (M_w/M_n)

Si bien se mantuvieron iguales las condiciones y las proporciones entre reactivos, la única disparidad es la proporción del volumen del balón de reacción con el volumen de la mezcla utilizada, ya que, como se dijo antes, las cantidades se redujeron en la décima parte. Esto hace pensar que el mayor tiempo de calentamiento necesario para estabilizar la temperatura de todo el sistema en el reactor de mayor contenido podría ser la causa de la mayor ruptura de cadenas comparada con la reacción en el envase más pequeño. Sin embargo, la diferencia de los valores no es considerable. Por ello, se presume que el tamaño del recipiente de reacción no es un punto fundamental a tomar en cuenta.

Por otro lado, fue importante determinar otras variables de reacción que afectan las características de la quitosana producida, ya que al modificar la concentración de NaOH, el tiempo de reacción, la temperatura o el ratio quitina-NaOH, el resultado se ve afectado. El fin de estas comparaciones fue encontrar la mejor vía para limitar la

ruptura de cadenas del polímero mientras se consigue un mayor grado de desacetilación.

Se evaluaron diferentes tiempos de reacción: 5, 2,5, 1 y 0,5 h. En primer lugar, según los resultados mostrados en la tabla 7, la masa molecular promedio disminuyó de acuerdo al aumento de tiempo de reacción, tal como se esperaba. Lo más resaltante es el incremento en la ruptura de cadenas cuando el tiempo de reacción pasa de 1 a 2,5 h. Es necesario menos de media hora para que la base rompa las cadenas del polímero aunque con mucha más disparidad de tamaños, de acuerdo a la desviación estándar del M_p y del PDI.

Tabla 7. Efecto de los tiempos de reacción en el DDA y los pesos moleculares de los productos de desacetilación convencional de la quitina con 50% NaOH (w/w).

Tiempo (h)	DDA (%)		M_p (kDa)		M_n (kDa)		M_w (kDa)		PDI	
	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
0,5	90,38	0,09	509	35,80	320	6,55	1140	103,98	3,57	0,28
1	93,31	0,75	437	29,95	283	9,35	1181	43,70	4,18	0,16
2,5	96,95	0,25	262	16,50	169	2,00	586	14,50	3,46	0,13
5	97,20	0,16	205	23,93	117	2,36	377	19,22	3,21	0,12

\bar{X} : promedio; s: desviación estándar. Las reacciones de 1 y 2,5 h fueron por duplicado y las de 0,5 y 5 h se repitieron 3 veces.

En cuanto a la desacetilación, el DDA también aumenta con el tiempo de reacción, si bien el cambio no es sustancial luego de 2,5 h. Cabe destacar, que a las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones, media hora es suficiente para que la quitosana producida tenga valores altos de desacetilación. Esto difiere a lo expuesto por algunas investigaciones que utilizan tiempos de reacción prolongados,⁷²⁻⁷⁵ pues la proporción de quitina a NaOH fue 1:30, mayor a las reportadas. Esta condición interviene en el DDA así como la concentración y la temperatura. Esto supone que en una reacción sin parámetros específicos, alta concentración de NaOH y altas temperaturas son suficientes para desacetilar en gran medida a la quitina, tal como lo expuso Chang et al.⁷⁶ Entonces, la reacción y la degradación del polímero se dan a partir de la cantidad de iones hidróxido, aceleradas por la energía administrada. Estos iones intercambian protones de

forma dispareja con los grupos amida y con los átomos de oxígeno, que forman los enlaces glicosídicos.

4.2.3 Desacetilación con microondas (por radiación)

Para todas las reacciones con microondas, siempre se usaron tiempos bajos de reacción pues se producían explosiones con emisión de luz conforme avanzaba la reacción. Esto es debido a que se llevó a cabo en un horno microondas doméstico, en donde la falta de control de presión, temperatura y el calentamiento de solventes orgánicos suelen inducir violentas explosiones vistas como luminiscencia o arcos eléctricos dentro de la cavidad.⁷⁷ A partir del tercer ciclo, la luz se emitía a tiempos de exposición mayores a 30 s. Se comparó la reacción con microondas en dos secuencias distintas pero con un tiempo neto de reacción similar: (A) 7 ciclos de 1,5 min de calentamiento y 10 min de enfriamiento, y (B) 10 ciclos de 1 min en caliente y 10 min de enfriamiento (tabla 8).

Tabla 8. Efecto de los periodos de reacción en el DDA y el M_p de los productos de la desacetilación de quitina con microondas en 2 secuencias con 50% NaOH (w/w).

Método	DDA (%)		M_p (kDa)		PDI	
	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
(A) 7 ciclos x 1,5 min	83,32	0,38	489	16,00	3,44	0,35
(B) 10 ciclos x 1 min	79,10	2,18	730	11,00	4,33	0,32

\bar{X} : promedio; s: desviación estándar. Las reacciones se realizaron por duplicado.

Con el método A se consigue un DDA de poco más de 80% y un M_p de alrededor de 500 kDa. Entretanto, con el método B, el DDA es similar al anterior y el M_p es mayor a 700 kDa. De igual forma que lo descrito en la sección 4.2.2, en ambos casos hay menor ruptura de cadenas cuando menos DDA se logra, pero el peso molecular del método B se diferencia por más de 200 kDa del A, corroborando la menor degradación cuando hay menor tiempo continuo de radiación (ciclos de 1 minuto). Asimismo, según indica el PDI, los productos del primer método son más homogéneos que los del segundo, coincidiendo con la mayor similaridad de tamaño

de cadenas cuando éstas tienen valores más bajos, tal como se describió en la sección anterior.

Experimentalmente, la pérdida de muestra por la adhesión de la solución al balón al trasvasar la mezcla y la falta de homogeneidad en los métodos con microondas sin agitación de la quitina en forma de escamas pueden ser causal de error en los valores reportados y en su confrontación con el método convencional, ya que ni el volumen de la solución ni la totalidad de quitina son iguales a los de la sección 4.2.2. No obstante, los resultados de uno y otro método se diferencian tanto que minimizan estos errores.

Para el caso del método B, el de mejor resultados en la desacetilación de quitina con microondas, se tiene menor degradación de las cadenas poliméricas con respecto a los resultados del método convencional de 0,5 h (tabla 7, sección 4.2.2); sin embargo, los valores de DDA obtenidos por radiación no son tan altos como por conducción. De esta manera, el menor uso de energía reduce rupturas de las cadenas pero no alcanza el DDA de las calentadas convencionalmente.

4.2.4 Quitina alcalina

Esta alternativa está basada en la disolución de la quitina en medio alcalino a baja temperatura, lo cual es beneficioso para disolver y separar las cadenas, y así mejorar el acceso del reactivo. Una vez enfriado el medio, la quitina se disolvió al agitarla en vacío en no más de 10 minutos, lo que permitió la formación de una solución viscosa.

Esta prueba demostró que una concentración de álcali del 25% (w/w) es suficiente para desacetilar la quitina por este método, a diferencia del método convencional con la misma concentración alcalina, que no consiguió la desacetilación suficiente como para hacerlo soluble en medio ácido. La baja solubilidad de la quitina en la mayoría de solventes comunes se debe a la interacción intramolecular de los grupos hidroxilo y acetamida, que forman la red cristalina, de manera que no hay espacio suficiente para que el reactivo pueda ubicarse adecuadamente entre la red. En cambio, la característica de la quitina alcalina es la reducción de la cristalinidad a partir de la baja temperatura, ya que permite la expansión del volumen de agua difundida en la matriz de la quitina. Así, los enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua se estabilizan y forman redes hexagonales, cuyo volumen deforma la matriz de quitina al debilitar sus enlaces intramoleculares y, por lo tanto, permite

que los grupos acetamida tengan mayor exposición para reaccionar con los iones de la base situados entre las cadenas.^{11,32}

Se realizó la desacetilación a partir de la quitina alcalina a 2,5 y 5 h. Los resultados mostrados en la tabla 9 indican poca diferencia de DDA (entre 80 y 82%), lo que implica que el tiempo de reacción no es un parámetro principal luego de 2,5 h. Se puede destacar que, sin importar que el tiempo de reacción se duplique, tanto el DDA como el peso molecular mantuvieron valores similares. Además, los resultados del peso molecular, en ambos casos, comprobaron que por este método se reduce la ruptura de las cadenas del polímero, ya que en el método convencional (tabla 7, ítem 4.2.2) los pesos moleculares a los mismos tiempos fueron entre 200 – 260 kDa, mientras que, en la forma de quitina alcalina, los M_p no bajaron de 500 kDa.

Tabla 9. Efecto del tiempo de reacción en el DDA y el M_p de los productos de desacetilación de quitina alcalina con 25% NaOH (w/w).

Tiempo (h)	DDA (%)	M_p (kDa)	PDI
5	82,98	735	3,92
	82,72	683	4,36
2,5	82,51	555	4,09
	80,33	638	4,22

Además, si se comparan los resultados de la quitina alcalina con 25% (w/w) de base (tabla 9) con los productos por radiación con base a 50% en peso (tabla 8, ítem 4.2.3), los DDA son similares al rondar el 80% en ambos casos, y los M_p se asemejan al método B con valores alrededor de 700 kDa. Por lo tanto, en términos de concentración básica, se mejoró el procedimiento por lograr resultados de DDA y M_p similares. Además, con la solución alcalina a 25% (w/w) no hay desacetilación por el método convencional. Por ende, este método supera a los anteriores a partir de mejorar la superficie de contacto.

4.2.5 Tratamiento posterior de muestras de quitina

El producto obtenido a partir de la quitina fue un sólido hidratado, incoloro. Todas las muestras se dejaron por días en agua para asegurar el lavado de NaOH que pudiera quedar absorbido. Luego, se secó a 50°C y con sílica gel por varios días para eliminar el agua.

En la figura 23 se muestra el resumen de los resultados por los 3 métodos distintos de desacetilación de quitina: el método por conducción con 4 tiempos de reacción distintos, el método por radiación con 2 ciclos de calentamiento (con un tiempo neto de reacción similar) y el método convencional con pretratamiento de quitina alcalina con 2 tiempos de reacción.

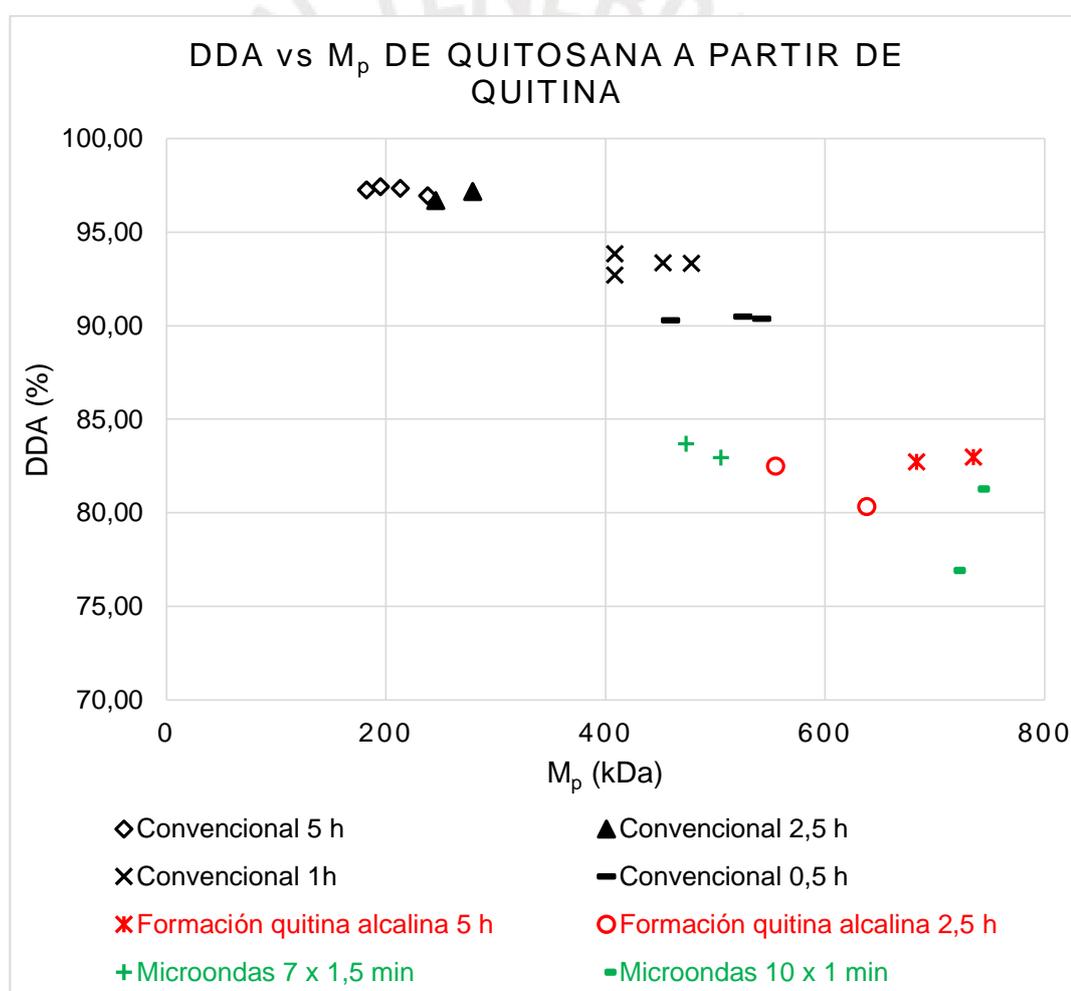


Figura 23. DDA (%) y M_p (kDa) de los productos obtenidos por los distintos métodos de desacetilación de quitina.

En la figura 23, los resultados del método convencional (negro) tienen mayor desacetilación y mayor degradación. A mayor tiempo de reacción, se obtiene mayor desacetilación, pero menor peso molecular. A partir de la reacción a 1 h, el peso molecular se ve más afectado (diferencia de 200 kDa aprox. entre los M_p de las reacciones a 1 y 2,5 h). Los productos con tiempo de reacción a 0,5 y 1 h tienen el DDA variando entre 90 y 95%, mientras que el peso molecular, entre 400 y 550 kDa. La diferencia de media hora entre estos dos fue suficiente para mejorar el DDA en 3% y perder 70 kDa del peso molecular, en promedio. Estas variaciones son menores al comparar las reacciones entre 2,5 y 5 h, ya que, en promedio, se diferencian en 0,25% de DDA y 57 kDa de M_p . Por lo tanto, las primeras horas de reacción son las principales para la desacetilación de la quitina.

Por otro lado, los productos de las reacciones con microondas (verde) difieren bastante entre ellos en cuanto al peso molecular, puesto que el de 7 ciclos x 1,5 minutos (método A) logra cerca de 500 kDa, mientras que el de 10 ciclos x 1 minuto (método B) consigue valores cercanos a 750 kDa. Sus DDA varían poco: de 83 a 80%, aunque los valores de DDA del método A son más cercanos entre sí. Del mismo modo, los resultados de la desacetilación de la quitina alcalina (rojo) tienen valores similares de DDA, entre 80 y 85%. El de mayor tiempo de reacción consigue pesos moleculares con menor dispersión que el de 2,5 h, pero casi sin diferencias con los resultados de la reacción a 5 h: el DDA varía en 2% y el M_p en 113 kDa, en promedio; por lo tanto, el efecto de mayor tiempo no es significativo.

En general, a mayor DDA se obtiene menor peso molecular. Al comparar los productos obtenidos por los métodos evaluados, se observa que el método que consigue mayor DDA (97,35%) es el método convencional con mayor tiempo de reacción, 5 h. Por otra parte, los métodos que no degradan tanto a las cadenas poliméricas son el método B por radiación (741 kDa) y el de la quitina alcalina (735 kDa). Entre ellos, el primero beneficia en el tiempo de reacción y la energía aplicada, mientras que el segundo evita concentraciones muy altas del álcali. También, pese a que la desacetilación por microondas del método A consigue menor peso molecular que los otros mencionados (200 kDa menos aproximadamente), es capaz de producir quitosana con un DDA cercano al de la formación de quitina alcalina.

Un punto medio entre el DDA ganado y el M_p perdido es el método de desacetilación convencional por 0,5 h, que conserva las cadenas relativamente largas (alrededor de 500 kDa, comparables a las de la desacetilación por

microondas de 7 x 1,5 min) y a la vez consigue 90% de DDA. El mismo método a 1 h también equilibra los valores de DDA y M_p pero tiene menor M_p que el de 0,5 h sin mejorar significativamente el DDA (3%).

Finalmente, se intentó combinar los métodos al formar quitina alcalina en un balón con hielo hasta conseguir la concentración de la base en 25% (w/w) en vacío y agitación por 1 h, y decantarla en un reactor de teflón para digestión e irradiarla, luego, con microondas según el método B. El producto fue insoluble en ácido. Esto podría deberse a la baja concentración de base que no es suficiente para desacetilar a la quitina, tal como en el método convencional y a la menor difusión de los iones pues no hay agitación en este tipo de calentamiento.

4.3 Desacetilación de la quitosana

Con estas pruebas se trató de obtener una quitosana con un DDA cercano a 100%, y se evaluó el cambio en el peso molecular que ello conlleva. Para esto, se partió de quitosana Aldrich (DDA = 80,59%, M_p = 408 kDa).

4.3.1 Tratamiento previo

Para la desacetilación de quitosana, es necesario recordar que la proporción de polímero – álcali se mantuvo (1 – 30 en peso), como en la quitina, a pesar de tener menor cantidad de grupos acetamida disponibles para la reacción.

Se generó vacío para remover el aire atrapado en las partículas de quitosana y facilitar el acceso del reactivo al sustrato, pues éste es insoluble en medio básico.

4.3.2 Desacetilación convencional (por conducción)

En primer lugar, se compara la concentración de la base (25 y 50%, en peso) para la desacetilación de la quitosana comercial sin modificar la proporción en peso de la base con el polímero (1 – 30 en peso). Los resultados presentados en la tabla 10 muestran que, para ambos casos, el DDA obtenido es similar (en ambos el aumento es del 18%). Sin embargo, sí se observa una diferencia importante en el peso molecular del producto: la quitosana desacetilada con la mayor concentración de base pierde entre 75 y 79% del peso molecular, y con la menor concentración, entre 8 y 29% del peso molecular inicial. Esto se da por el mayor volumen de mezcla, ya que la cantidad sólida del NaOH es la misma, lo que cambia es el

volumen de agua. A menor concentración de base, más agua agregada en la reacción. Debido a que las moléculas están en continuo movimiento aleatorio en la solución, éstas tienen fuerzas de cohesión bajas entre sí. Al aumentar la temperatura, las moléculas aumentan su velocidad (energía cinética), la distancia media entre ellas aumenta y las fuerzas de cohesión disminuyen. Por lo tanto, si el volumen es mayor, más difícil es la difusión de los iones hidroxilo entre las cadenas del polímero.

Tabla 10. Efecto de la concentración de la base en el DDA y el M_p de los productos de la desacetilación convencional de quitosana Aldrich (DDA = 80,59% y M_p = 408 kDa).

% NaOH en agua (w/w)	DDA (%)	M_p (kDa)	PDI
50	99,85	84	2,74
	99,03	104	2,54
25	98,48	375	4,39
	98,47	319	4,82
	98,59	290	4,85

4.3.3 Desacetilación con microondas (por radiación)

La reacción se llevó a cabo en reactores especiales de teflón, por lo que el trasvase a estos depósitos generó pérdidas por la adhesión al balón donde se hizo el pretratamiento. Se hizo la comparación de número de ciclos, con tiempo de irradiación 90 s por ciclo.

Se probaron secuencias de 2, 7 y 12 ciclos bajo las mismas condiciones de base, 50% NaOH (w/w), ratio sustrato/base en peso, 1/30, y tiempo de reacción por secuencia, 90 s (figura 24). Los valores de DDA de las 3 secuencias varían entre 97% y 99%, y los pesos moleculares obtenidos están entre 250 y 350 kDa. A medida que aumenta el número de secuencias, aumenta el DDA y disminuye el M_p ; no obstante, los valores no tienen gran diferencia. Por lo tanto, la desacetilación por radiación en 2 secuencias es suficiente para conseguir un alto DDA a partir de quitosana comercial con las condiciones de reacción mencionadas. Estos

resultados difieren con la literatura, en la que necesitan mucho más tiempo (de 10 min a 3 h) para conseguir un DDA mayor que 90% de quitina desacetilada con NaOH entre 30% y 60% (w/v), usando microondas con más potencia (1400 W) que el usado en este trabajo (900 W).^{40,78}

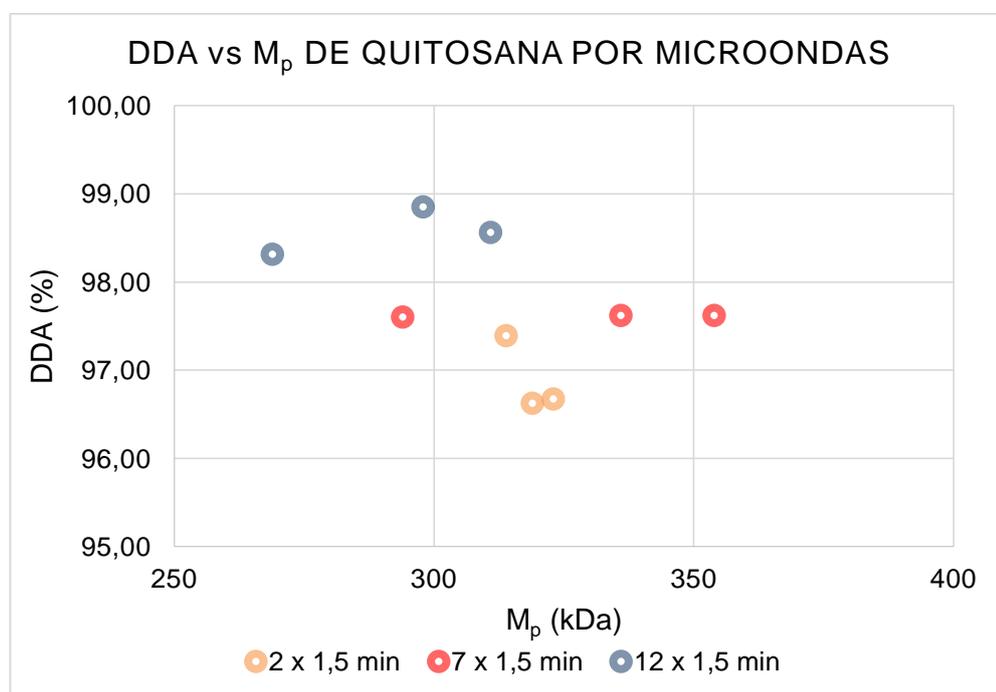


Figura 24. DDA (%) y M_p (kDa) de quitosana Aldrich en polvo por microondas de 90 s por ciclo. Valores iniciales: DDA = 80,6%, M_p = 408 kDa.

4.3.4 Tratamiento posterior de muestras de quitosana

Las muestras se dejaron por un par de días en agua para asegurar la eliminación del NaOH que pudo quedar absorbido en el soluto. Debido a que la presentación de la quitosana fue como partículas, el tratamiento final fue distinto al de la quitina. Luego de conseguir la neutralización, se centrifugó para sedimentar los productos. Posteriormente, se decantó la mayor cantidad de agua y el resto se eliminó por un filtrado lento con papel filtro. Finalmente, se secó en estufa a 50°C y en un reservorio con sílica gel a temperatura ambiente y al vacío.

A modo de resumen, en la figura 25 se aprecian los resultados en conjunto de todos los métodos de desacetilación de la quitosana Aldrich (en polvo). Se observa que la diferencia entre los productos de mayor (método convencional en base al 50%, en peso) y menor (método de microondas de 2 ciclos por 90 s) DDA es 3%. Además, si

bien el método convencional a 50% (w/w) de base acerca el DDA al 100%, lo hace a costa de la degradación del sustrato (reducción de 77% de peso molecular inicial). Por otro lado, se evidencia que cualquiera sea la secuencia de ciclos de calentamiento en la reacción con microondas, se consiguió desacetilar la quitosana casi en su totalidad y con una reducción del peso molecular de solo 23%. Finalmente, partiendo de quitosana, la reacción convencional con baja concentración de base (25%) por 5 h equiparó los resultados obtenidos por los métodos por microondas, tanto en DDA como en M_p , con reducción de 15% de peso molecular.

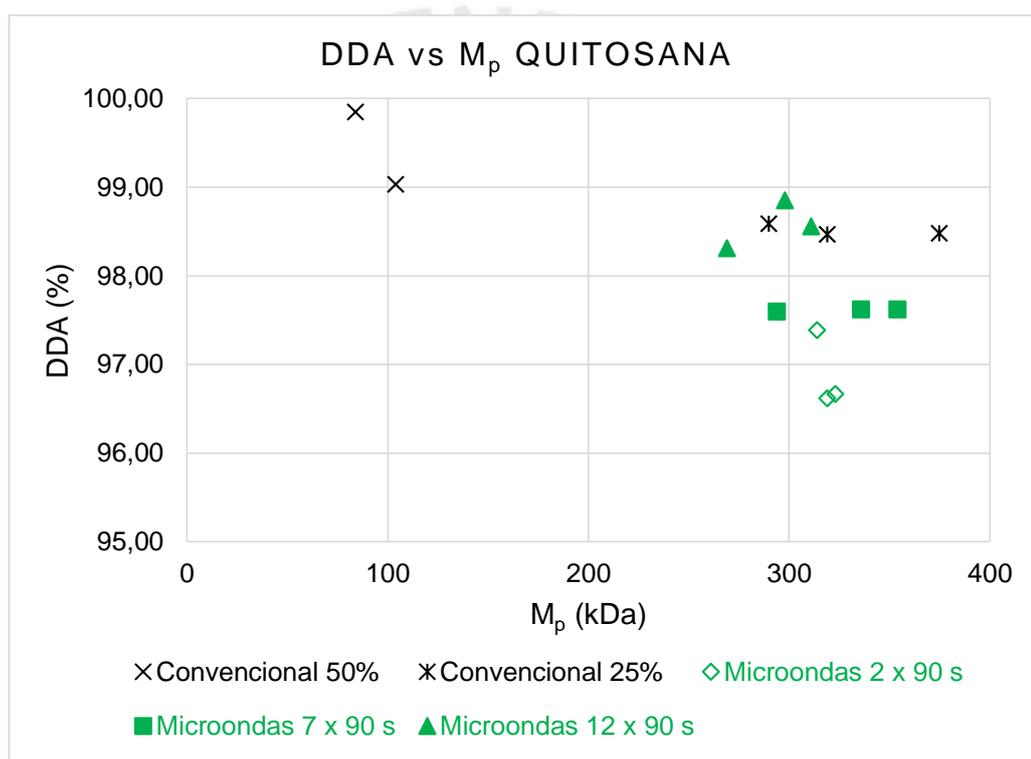


Figura 25. DDA (%) y M_p (kDa) de los productos obtenidos por los métodos de desacetilación de quitosana Aldrich. Valores iniciales: DDA = 80,6%, M_p = 408 kDa.

Como último punto, la figura 26 muestra todas las desacetilaciones de la quitina y quitosana. En los anexos 3 y 4 se presentan los valores exactos de estos productos. En el caso de quitina, los 3 métodos logran desacetilarla por encima de 75%, la desacetilación convencional (negro en la figura) consigue DDA mayor a 90%, pero con pesos moleculares menores a 550 kDa, dispersos entre los 4 tiempos utilizados. Por el contrario, los métodos por radiación (verde) y mediante la formación de quitina alcalina (rojo) no superaron el 85%, pero mantuvieron pesos moleculares mayores a 400 kDa. Ambas reacciones son las mejores en cuanto a la conservación del peso molecular: la primera en cuanto a la conservación de energía y tiempo de reacción, y la segunda en cuanto a la menor concentración de la base.

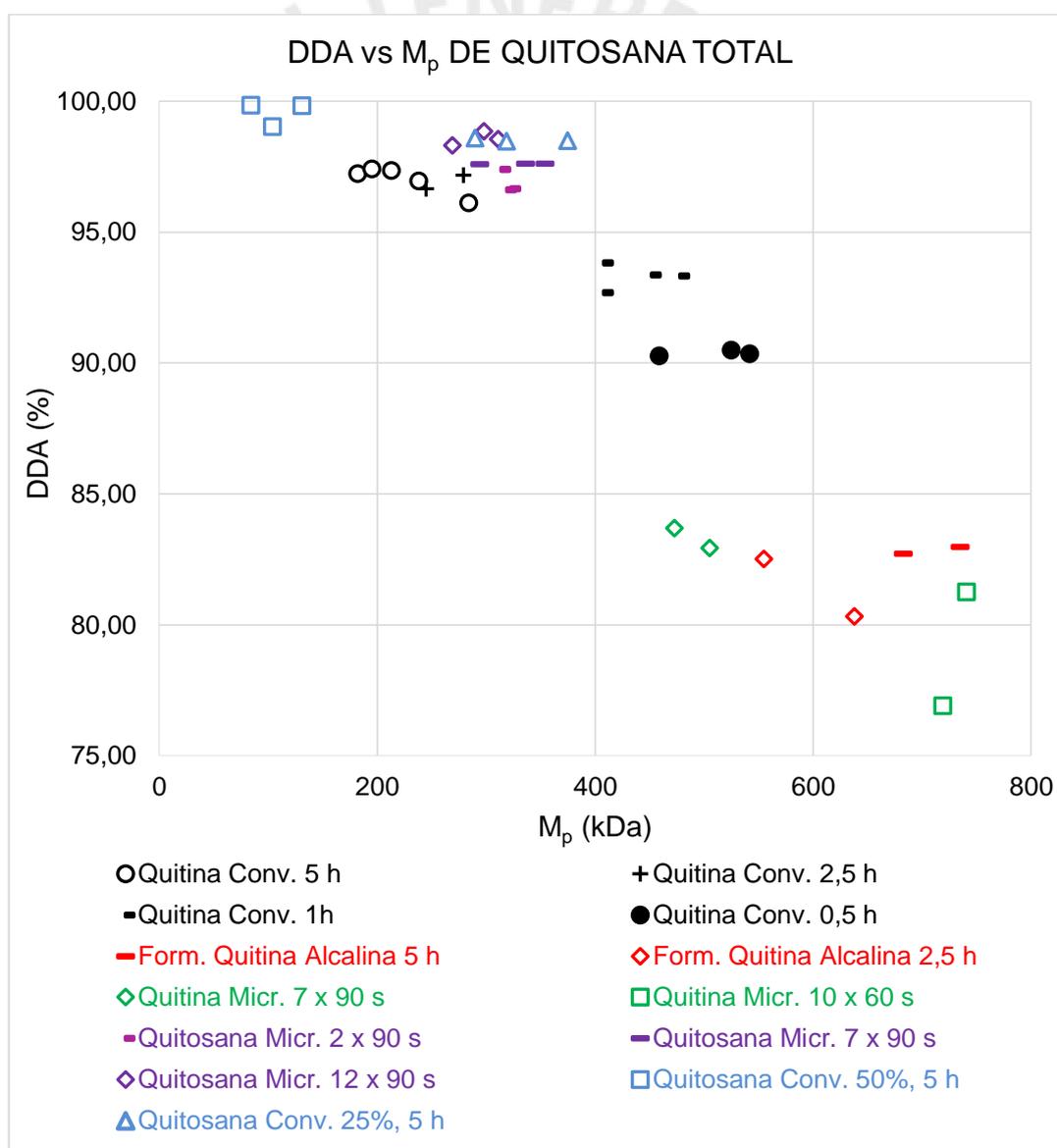


Figura 26. DDA (%) y M_p (kDa) de los productos de todos los métodos realizados.

En el caso de la quitosana, todos los procedimientos logran una desacetilación mayor que 95%; sin embargo, en todos los casos se produce una reducción de peso molecular (menor que 400 kDa). El producto tiene peso molecular muy bajo (menor que 200 kDa) tras el método convencional (azul en la figura) con 50% NaOH a partir de 2,5 h, y alcanza alrededor de 320 kDa con la mitad de concentración de base. Por otro lado, la quitosana desacetilada con microondas (morado) en 2, 7 y 12 secuencias tiene resultados similares (entre 269 y 375 kDa), muy cercanos al método convencional con NaOH al 25%. El último método mencionado implica la posibilidad de que la quitina también sea desacetilada, en cierta medida, a la misma concentración (base al 25% en peso), pero no lo suficiente como para ser soluble en soluciones de ácidos débiles. De todos los resultados, las desacetilaciones convencionales de quitina a 0,5 y 1 h lograron un DDA notoriamente alto (> 90%) sin pérdida excesiva del peso molecular (> 400 kDa) en una sola etapa.

Los productos de todas las reacciones superan el 75% de DDA, puesto que la relación entre el sustrato, quitina o quitosana, y el NaOH fue elevada (en todas de 1 a 30 (w/w)) comparado con las pruebas de Yaghobi, N. et al.,⁷⁵ las cuales consiguieron un DDA menor que 90% con relación cercana de 1 a 25 (w/w) a T = 90°C en 5 h de reacción. Esto no concuerda con lo que expone Chang et al.,⁷⁶ cuando dice que la relación entre el sustrato y la base tiene menor efecto en el DDA que la temperatura de reacción y la concentración de la base.

La reacción a media hora consigue alto DDA, al igual que las otras de mayor tiempo de reacción. Incluso, a condiciones similares, Chang et al.⁷⁶ reportó que bastaron 5 minutos de reacción para obtener DDA mayor que 50%. Por el contrario, no hay necesidad de someter al sustrato al calor por tanto tiempo (de 5 a 21 h) y concentración de base entre 40 y 60%, como lo menciona la literatura.^{40,75} Más aún cuando el tiempo sí es importante en relación al peso molecular, ya que degrada las cadenas por la mayor exposición que tienen frente a la base.

Por último, todos los productos de quitosana están desacetilados en más del 75%. Esto es posible por la alta concentración de NaOH (50% en peso) en todos los casos, excepto en la formación de quitina alcalina. Más aún, la desacetilación de la quitosana se ve favorecida por la alta proporción entre el sustrato y el reactivo (1 – 30).

4.3.5 Segunda desacetilación convencional (por conducción) y con microondas (por radiación)

Se hizo la comparación de la desacetilación de ambos tipos de quitosana (comercial Aldrich en polvo y la obtenida a partir de quitina Aldrich en escamas) por el método convencional a 50% NaOH (w/w) y 5 h de reacción. Como se puede apreciar en la tabla 11, hubo mayor diferencia de DDA en la quitosana en polvo (18,5%) que en las escamas (3,7%); sin embargo, los valores que alcanzan son suficientes para afirmar que llegaron al mayor DDA posible. En cuanto al peso molecular, las pérdidas son del 80% y 56% del peso inicial de la quitosana en polvo y en escamas, respectivamente. Esto podría deberse a la forma física de ambas, ya que el polvo tiene mayor superficie de contacto con la base que la escama, por ende la reacción fue más agresiva y las cadenas se rompieron en mayor cantidad.

Tabla 11. Efecto del método de desacetilación en el DDA y el M_p en los productos de quitosana en polvo y en escamas, con NaOH 50% (w/w).

Quitosana	Método	DDA (%)	M_p (kDa)	PDI*
Polvo	Microondas	80,6 → 97,6	408 → 336	4,35
		80,6 → 97,6	408 → 354	4,27
	Convencional	80,6 → 99,9	408 → 84	2,74
		80,6 → 99,0	408 → 104	2,54
Escamas	Microondas	96,1 → 98,8	295 → 197	2,51
		96,1 → 99,2	295 → 262	3,45
	Convencional	96,1 → 99,8	295 → 131	2,52

*PDI corresponde al producto final.

Por otro lado, en la misma tabla se comparó los dos tipos de quitosana a disposición: en polvo (Aldrich) y en escamas (desacetiladas de quitina Aldrich), mediante el método convencional a 5 h y el de microondas de 7 ciclos por 90 s de reacción cada uno, sin modificar la concentración de NaOH (50% w/w). Los valores de DDA son muy similares (alrededor de 98%), pero la desacetilación con microondas genera, en ambos tipos de quitosana, menor degradación del producto, aunque con mayor polidispersión. Esto es favorecido por la eficiencia del mecanismo a partir del menor tiempo y energía utilizados.

Vale mencionar como punto aparte que, en la búsqueda de un mayor DDA, se planteó lograr mejor superficie de contacto a partir de la disolución de la quitosana en medio ácido; sin embargo, no hubo resultados favorables.

Por otra parte, se eligieron 7 muestras de quitosana representativas, de acuerdo a la figura 26 (ítem 4.3.4), para analizarlas por viscosimetría capilar y comparar los resultados de peso molecular. De la desacetilación de quitosana a partir de quitina se tomaron los productos por los métodos por conducción en 0,5 y 1 h, por radiación en 10 ciclos por 1 min, y por formación de quitina alcalina en 5 h. Además, los productos de la desacetilación de quitosana elegidos fueron los del método convencional con base al 50% (w/w) en 5 h, y con microondas de 7 y 12 ciclos por 1,5 min.

La figura 27 muestra el peso molecular por viscosimetría capilar de una de ellas (668 kDa), producto a partir de la desacetilación de la quitina por el método convencional con NaOH 50% (w/w) por 0,5 h. Las gráficas de viscosimetría de los demás productos elegidos se presentan en el anexo 5.

Finalmente, la tabla 12 muestra los resultados del peso molecular de la cadena más abundante por GPC y los de viscosidad, teniendo en cuenta los valores de K y α reportado por Wong, para las muestras estudiadas utilizando el mismo *buffer*. En ella se observa un patrón, donde el peso molecular obtenido por viscosimetría es mayor siempre. La figura 28 relaciona los valores de esta tabla para observar mejor el cumplimiento de la tendencia.

Desacetilación convencional de quitosana, 0,5 h					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	1,21 x 10 ⁻³	1,01 x 10 ⁻³	0,86 x 10 ⁻³	0,76 x 10 ⁻³
t _{promedio} (s)	33,72	87,60	76,17	68,54	63,00
η _r	-	2,60	2,26	2,03	1,87
η _{sp}	-	1,60	1,26	1,03	0,87
η _{red}	-	1 322,83	1 250,65	1 196,75	1 150,29
η _{inh}	-	790,34	809,52	822,07	827,97
K = 6,589 x 10 ⁻³ cm ³ /g			α = 0,88		
[η] = 880,555 mL/g			M _v = 668 234 g/mol		

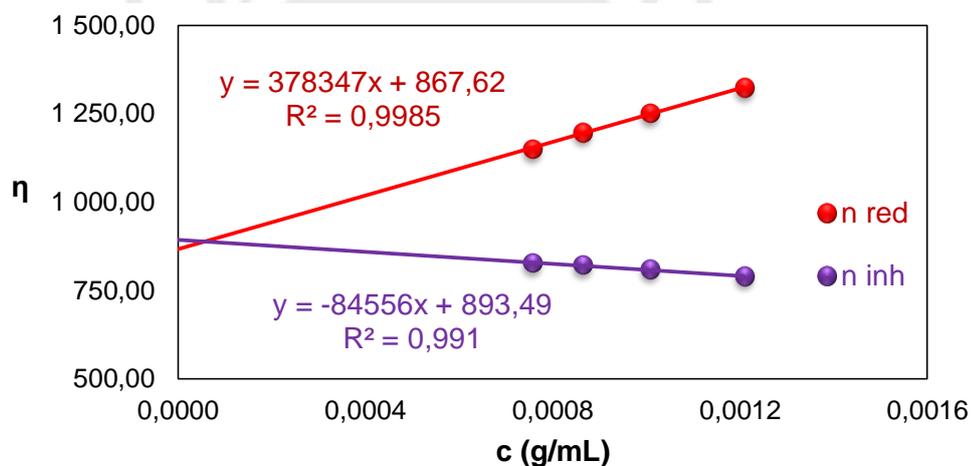


Figura 27. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de una muestra de quitosana desacetilada (DDA = 90,36%) a partir de quitina por el método convencional por 0,5 h, [NaOH]= 50% (w/w).

Tabla 12. Viscosidad intrínseca, peso molecular por viscosimetría (M_v) y peso molecular del pico del cromatograma de GPC (M_p) de las quitosanas obtenidas por diferentes métodos de desacetilación.

Sustrato	Método de desacetilación	[NaOH] (w/w, %)	$[\eta]$ (mL/g)	M_v (kDa)	M_p (kDa)
Quitina	Convencional 0,5 h	50	880,56	668	542
Quitina	Convencional 1 h	50	1 012,07	783	658
Quitina	Microondas 10 x 60 s	50	861,04	1 053	741
Quitina alcalina	Convencional 5 h	25	705,95	856	735
Quitosana	Convencional 5 h	50	178,93	94	84
Quitosana	Microondas 7 x 90 s	50	580,35	401	354
Quitosana	Microondas 12 x 90 s	50	536,79	364	298

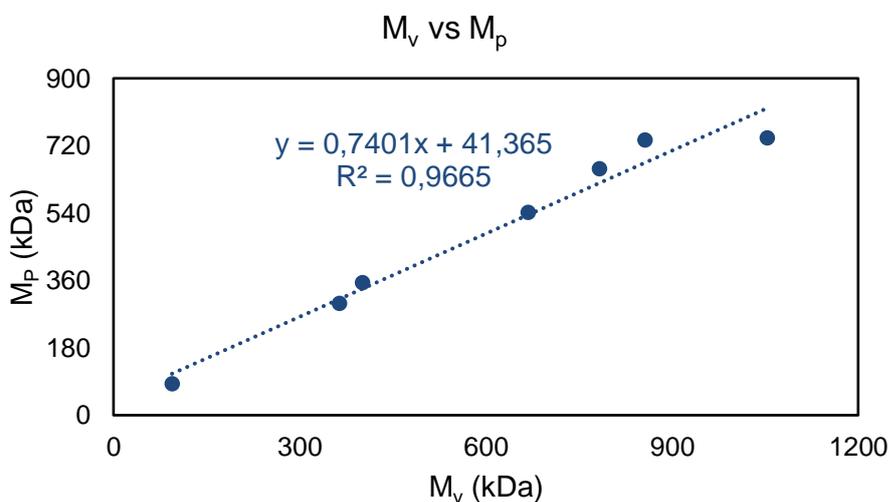


Figura 28. Línea de tendencia entre los pesos moleculares por viscosimetría (M_v) y del pico máximo del cromatograma de GPC (M_p).

Es importante recordar que el análisis por GPC está referido a la retención del volumen tanto de las muestras de quitosana como de los estándares de pululano. Así, los valores obtenidos por este análisis explican el comportamiento de la quitosana a partir del pululano. Al ser polímeros distintos pueden generar diferencias en cuanto al volumen, pues el pululano tiene enlaces glicosídicos $C_1 - O$

– C₄ y C₁ – O – C₆, mientras que la quitosana solo tiene enlaces del primer tipo. Esto indicaría un ligero doblar del pululano que podría cambiar el volumen analizado.

Otro punto a tomar en cuenta asociado con el volumen es la diferencia de grupos funcionales. La amina de la quitosana, comparada con el sustituyente hidroxilo del pululano, se protona en medio ácido. Esto podría generar repulsión electrostática entre las cadenas, de manera que varíe el volumen que ocupan las mismas. Si la quitosana tiene alto DDA, habrá más puntos de repulsión en la cadena. Esto permitiría tener a las cadenas más estiradas.



5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se concluye que los parámetros fundamentales para alcanzar un alto grado de desacetilación de la quitina fueron la concentración de la base y la relación en peso sustrato – base. Por el contrario, ni el tiempo de reacción ni la temperatura resultaron ser parámetros determinantes para la desacetilación de la quitina a altas temperaturas, cuando la concentración de base fue alta (50% w/w).

La ventaja principal del calentamiento con microondas fue el ahorro de tiempo de reacción y energía, en comparación con el método convencional. Los resultados de los dos periodos de calentamiento (7 ciclos por 90 s y 10 ciclos por 60 s) con microondas de la quitina, con un tiempo de reacción total similar, no se diferenciaron en gran medida en cuanto al grado de desacetilación. No obstante, el polímero se degradó más cuando hubo ciclos de calentamiento más prolongados.

Cualquiera sea el método de calentamiento (convencional o con microondas), se logró un mayor grado de desacetilación pero a costa de un mayor degradación del polímero. Las reacciones con microondas y por formación de quitina alcalina degradaron en menor medida a las cadenas, pero desacetilaron menos.

Finalmente, a las condiciones estudiadas, se obtuvieron productos con grado de desacetilación muy cercano al 100%. En su mayoría, la literatura reporta grados de desacetilación entre 70 y 90%. Para ello no fue necesario realizar dos o más reacciones de desacetilación, con concentración de NaOH al 50% (w/w), a una misma muestra de quitina.

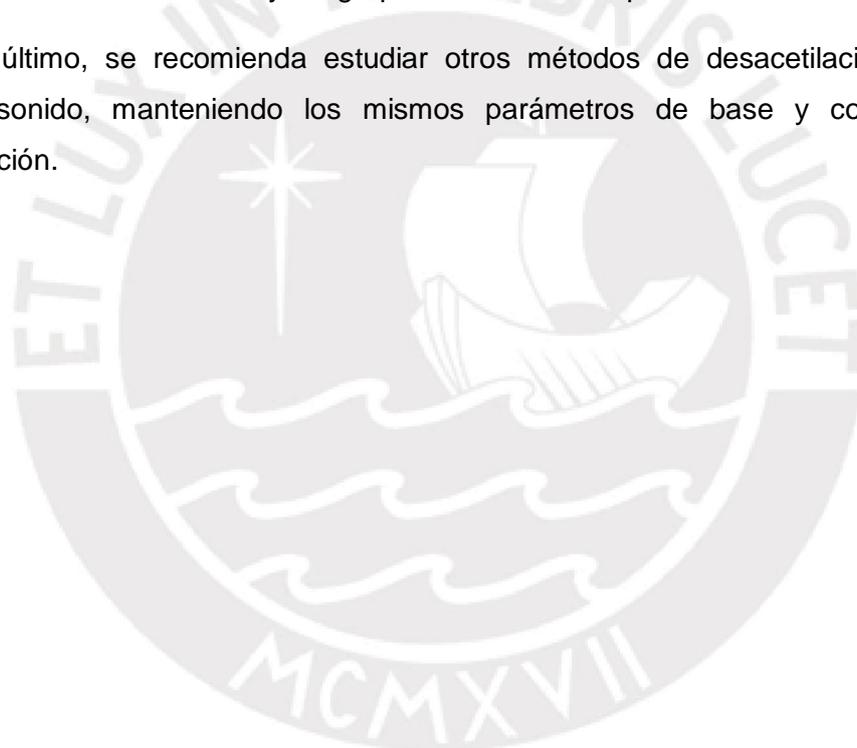
5.2 Recomendaciones

El primer punto a recomendar es la evaluación del método convencional con menor proporción de base – polímero y menor concentración de NaOH (no menor o igual a 25% (w/w)).

Además, en el caso de la desacetilación con microondas, se recomienda realizarlo en un equipo donde se pueda controlar la temperatura y la potencia con exactitud, y que tenga sistema de agitación para comprobar los resultados obtenidos en el horno convencional de cocina.

También se recomienda realizar los mismos métodos con quitina en otro tipo de presentación (en polvo, por ejemplo), pues parte de la dificultad de la desacetilación es el aspecto físico del material, el cual restringe en algunos casos mayor interacción entre la base y los grupos acetamida del polímero.

Por último, se recomienda estudiar otros métodos de desacetilación como por ultrasonido, manteniendo los mismos parámetros de base y condiciones de reacción.



6 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ghorbel-Bellaaj, O.; Younes, I.; Maâlej, H.; Hajji, S.; Nasri, M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51* (5), 1196–1201.
- (2) Alves, N. M.; Mano, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43* (5), 401–414.
- (3) Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34* (7), 641–678.
- (4) Islam, M. S.; Khan, S.; Tanaka, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, *49* (1–2), 103–110.
- (5) Kumar, M. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, *46* (1), 1–27.
- (6) Wurtsbaugh, W. A.; Vincent, W. F.; Vincent, C. L.; Carney, H. J.; Richerson, P. J.; Lazzaro, X.; Alfaro, R. Nutrientes y su limitación del crecimiento del fitoplancton. In *El lago Titicaca: Síntesis del conocimiento actual*; ORSTOM, HISBOL, Eds.; La Paz, Bolivia, 1991; pp 161–175.
- (7) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (8), 981–1014.
- (8) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68* (6), 1013–1051.
- (9) Hsu, S. H.; Whu, S. W.; Tsai, C. L.; Wu, Y. H.; Chen, H. W.; Hsieh, K. H. Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *J. Polym. Res.* **2004**, *11* (2), 141–147.
- (10) Kaya, M.; Mujtaba, M.; Ehrlich, H.; Salaberria, A. M.; Baran, T.; Amemiya, C. T.; Galli, R.; Akyuz, L.; Sargin, I.; Labidi, J. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *176*, 177–186.
- (11) Feng, F.; Liu, Y.; Hu, K. Influence of alkali-freezing treatment on the solid

- state structure of chitin. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339 (13), 2321–2324.
- (12) Cho, Y. W.; Jang, J.; Park, C. R.; Ko, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* **2000**, 1 (4), 609–614.
- (13) Gardner, K. H.; Blackwell, J. Refinement of the structure of β -chitin. *Biopolymers* **1975**, 14, 1581–1595.
- (14) Saito, Y.; Putaux, J. L.; Okano, T.; Gaill, F.; Chanzy, H. Structural aspects of the swelling of β chitin in HCl and its conversion into α chitin. *Macromolecules* **1997**, 30 (13), 3867–3873.
- (15) Kumirska, J.; Czerwicka, M.; Kaczynski, Z.; Bychowska, A.; Brzozowski, K.; Thöming, J.; Stepnowski, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs* **2010**, 8 (5), 1567–1636.
- (16) Agulló, E.; Rodríguez, M. S.; Ramos, V.; Albertengo, L. Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol. Biosci.* **2003**, 3 (10), 521–530.
- (17) Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31 (7), 603–632.
- (18) Kurita, K.; Tomita, K.; Tada, T.; Ishii, S.; Nishimura, S. -I; Shimoda, K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1993**, 31 (2), 485–491.
- (19) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*; 2014.
- (20) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*; 2016.
- (21) Arbia, W.; Arbia, L.; Adour, L.; Amrane, A. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods -a review. *Food Technol. Biotechnol.* **2013**, 51 (1), 12–25.
- (22) Wang, S. L.; Liang, T. W. Microbial reclamation of squid pens and shrimp shells. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, 43 (6), 3445–3462.
- (23) Sjaifullah, A.; Santoso, A. B. Autolytic isolation of chitin from white shrimp (*Penaeus Vannamei*) waste. In *Procedia Chemistry*; Elsevier Ltd., 2016; Vol. 18, pp 49–52.

- (24) Kusuma, H.S., Al-sa'bani, A.F., Darmokoesoemo, H. N,O-Carboxymethyl chitosan: an innovation in new natural preservative from shrimp shell waste with a nutritional value and health orientation. *Procedia Food Sci.* **2015**, 3, 35–51.
- (25) PRODUCE. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2014. *Igarss* No. 1, 1–196.
- (26) Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* **2003**, 4 (1), 12–18.
- (27) Kjartansson, G. T.; Zivanovic, S.; Kristbergsson, K.; Weiss, J. Water prawns (*Macrobrachium Rosenbergii*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3317–3323.
- (28) Flores, R.; Barrera-Rodríguez, S.; Shirai, K.; Durán-De-Bazúa, C. Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 104 (6), 3909–3916.
- (29) Chaussard, G.; Domard, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (2), 559–564.
- (30) Sashiwa, H.; Aiba, S. I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29 (9), 887–908.
- (31) Jaworska, M. M.; Kozlecki, T.; Gorak, A. Review of the application of ionic liquids as solvents for chitin. *J. Polym. Eng.* **2012**, 32 (2), 67–69.
- (32) Liu, Y.; Liu, Z.; Pan, W.; Wu, Q. Absorption behaviors and structure changes of chitin in alkali solution. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 72 (2), 235–239.
- (33) Rathke, T. D.; Hudson, S. M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1994**, C34 (3), 375–437.
- (34) Morganti, P. New horizon in cosmetic dermatology. *J. Appl. Cosmetol.* **2016**, 34 (1–2), 15–24.
- (35) Chávez, A.; Colina, M.; Valbuena, A.; López, A. Evaluation of the processes for the chemical production of chitosan from crabs waste. Pilot and industrial scale. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2012**, 13 (3), 77–88.
- (36) Chou, S. F.; Lai, J. Y.; Cho, C. H.; Lee, C. H. Relationships between surface roughness/stiffness of chitosan coatings and fabrication of corneal keratocyte spheroids: effect of degree of deacetylation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, 142, 105–113.

- (37) Habiba, U.; Joo, T. C.; Siddique, T. A.; Salleh, A.; Ang, B. C.; Afifi, A. M. Effect of degree of deacetylation of chitosan on adsorption capacity and reusability of chitosan/polyvinyl alcohol/TiO₂ nano composite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1133–1142.
- (38) Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A. N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M. D.; Gupta, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *32* (6), 1149–1158.
- (39) ASTM F2260 - 03 (Reapproved 2008). Standard test method for determining degree of deacetylation in chitosan salts by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR), 2008.
- (40) Lertwattanaseri, T.; Ichikawa, N.; Mizoguchi, T.; Tanaka, Y.; Chirachanchai, S. Microwave technique for efficient deacetylation of chitin nanowhiskers to a chitosan nanoscaffold. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (3), 331–335.
- (41) Fuentes, S.; Retuert, J.; González, G. Preparation and properties of chitosan hybrid films from microwave irradiated solutions. **2008**, *2*, 1511–1514.
- (42) Moura, C. M. de; Moura, J. M. de; Soares, N. M.; Pinto, L. A. de A. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: used to produce biofilm. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2011**, *50* (4), 351–355.
- (43) Jimtaisong, A.; Saewan, N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2014**, *36* (1), 12–21.
- (44) Custódio, C. A.; Cerqueira, M. T.; Marques, A. P.; Reis, R. L.; Mano, J. F. Cell selective chitosan microparticles as injectable cell carriers for tissue regeneration. *Biomaterials* **2015**, *43* (1), 23–31.
- (45) Burkatovskaya, M.; Castano, A. P.; Demidova-Rice, T. N.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16* (3), 425–431.
- (46) Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Wu, Y. B.; Lee, S. T.; Shyong, J. Y.; Huang, R. N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* **2001**, *22* (2), 165–173.
- (47) Mati-Baouche, N.; Elchinger, P. H.; De Baynast, H.; Pierre, G.; Delattre, C.;

- Michaud, P. Chitosan as an adhesive. *Eur. Polym. J.* **2014**, *60*, 198–213.
- (48) Bernkop-Schnürch, A.; Dünnhaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81* (3), 463–469.
- (49) Yang, R.; Li, H.; Huang, M.; Yang, H.; Li, A. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water Res.* **2016**, *95* (2015), 59–89.
- (50) Chorniak, J. A clearer understanding of fining agents - WineMaker Magazine <https://winemakermag.com/26-a-clearer-understanding-of-fining-agents> (accessed May 3, 2017).
- (51) Canepa S.P.A. Partnership between Canepa and Italdenim <http://www.canepa.it/en/news/post?id=75> (accessed May 3, 2017).
- (52) Polymer Solutions Incorporated (PSI). Chitosan-based plastic wrap may help reduce food waste <https://www.polymersolutions.com/blog/chitosan-based-plastic-wrap/> (accessed May 3, 2017).
- (53) Costa, C. N.; Teixeira, V. G.; Delpech, M. C.; Souza, J. V. S.; Costa, M. A. S. Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *133*, 245–250.
- (54) Santos, Z. M. Dos; Pereira, M. R.; Fonseca, J. L. C. Rheology and dynamic light scattering of octa-ethyleneglycol- monododecylether/chitosan solutions. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98* (1), 321–330.
- (55) Shen, Z.; Kamdem, D. P. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 289–296.
- (56) Koltzenburg, S.; Maskos, M.; Nuyken, O. *Polymer Chemistry*, 1st ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Alemania, 2017.
- (57) Varum, K. M.; Smidsrod, O. Chitosans. In *Food polysaccharides and their applications*; Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2006; pp 497–520.
- (58) Lewandowska, K. Miscibility and physical properties of chitosan and polyacrylamide blends. *J. Mol. Liq.* **2015**, *209*, 301–305.
- (59) Jacob, J. Microwave assisted reactions in organic chemistry: a review of recent advances. *Int. J. Chem.* **2012**, *4* (6), 29–43.

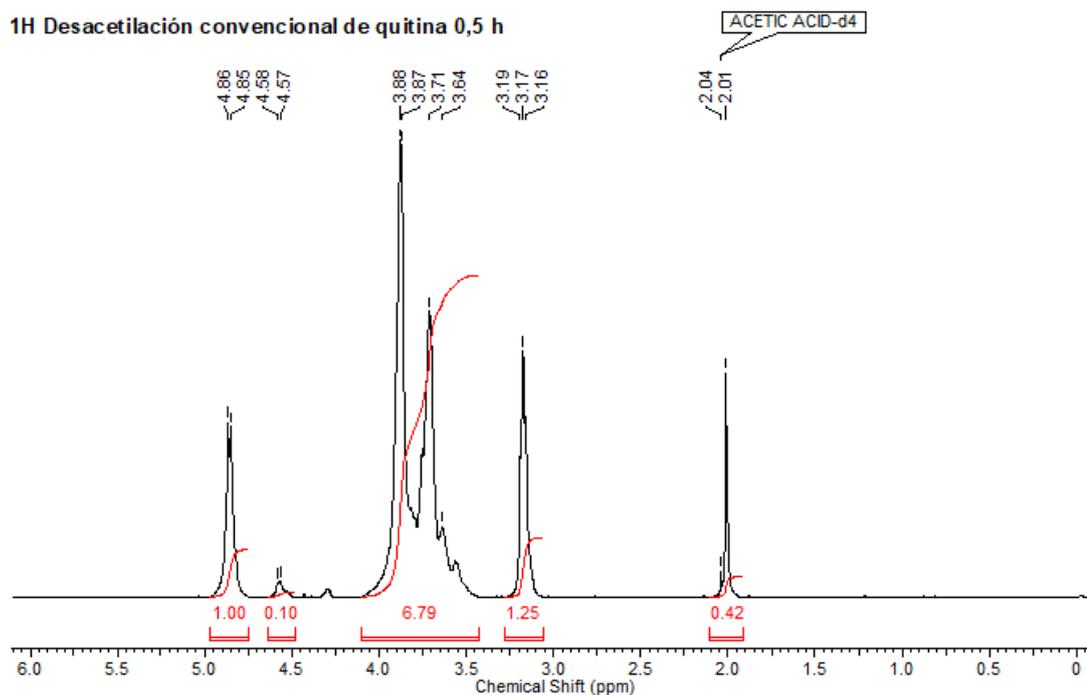
- (60) Hayes, B. L. Introduction to microwave chemistry. In *Microwave synthesis: chemistry at the speed of light*, CEM Publishing: North Carolina, USA, 2002; pp 11–28.
- (61) Neochoritis, C. G.; Zarganes-Tzitzikas, T.; Tsoleridis, C. A.; Stephanidou-Stephanatou, J.; Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Choli-Papadopoulou, T. One-pot microwave assisted synthesis under green chemistry conditions, antioxidant screening, and cytotoxicity assessments of benzimidazole schiff bases and pyrimido[1,2-A]benzimidazol-3(4H)-ones. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (1), 297–306.
- (62) Wang, S.-L.; Cheng, C.; Wu, F.-Y.; Jiang, B.; Shi, F.; Tu, S.-J.; Rajale, T.; Li, G. Microwave-assisted multi-component reaction in water leading to highly regioselective formation of benzo[f]azulen-1-ones. *Tetrahedron* **2011**, *67* (25), 4485–4493.
- (63) ASTM F2602 - 08. Standard test method for determining the molar mass of sodium alginate by size exclusion chromatography with multi-angle light scattering detection (SEC-MALS), 2008.
- (64) Ibrahim, M.; Alaam, M.; El-Haes, H.; Jalbout, A. F.; Leon, A. De. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclética Química* **2006**, *31* (3), 15–21.
- (65) Mejía, I. M.; Hernández, C. J. Physicochemical characterization of chitosan for its application as a metal biosorbent. *REVCUNI*. 2007, p 1–5, Vol 11.
- (66) Zakaria, Z.; Izzah, Z.; Jawaid, M.; Hassan, A. Effect of degree of deacetylation of chitosan on thermal stability and compatibility of chitosan. **2012**, *7* (4), 5568–5580.
- (67) Polymer Standards Service. App de selección de columna GPC/SEC PSS <http://www.psscolumselector.com/> (accessed Jun 30, 2017).
- (68) Bloustine, J.; Berejnov, V.; Fraden, S. Measurements of protein-protein interactions by size exclusion chromatography. *Biophys. J.* **2003**, *85* (4), 2619–2623.
- (69) Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* **1991**, *13* (5), 281–285.
- (70) López C, F. Peso molecular. In *Fundamentos de Polímeros*; Mérida,

Venezuela, 2004; pp 31–42.

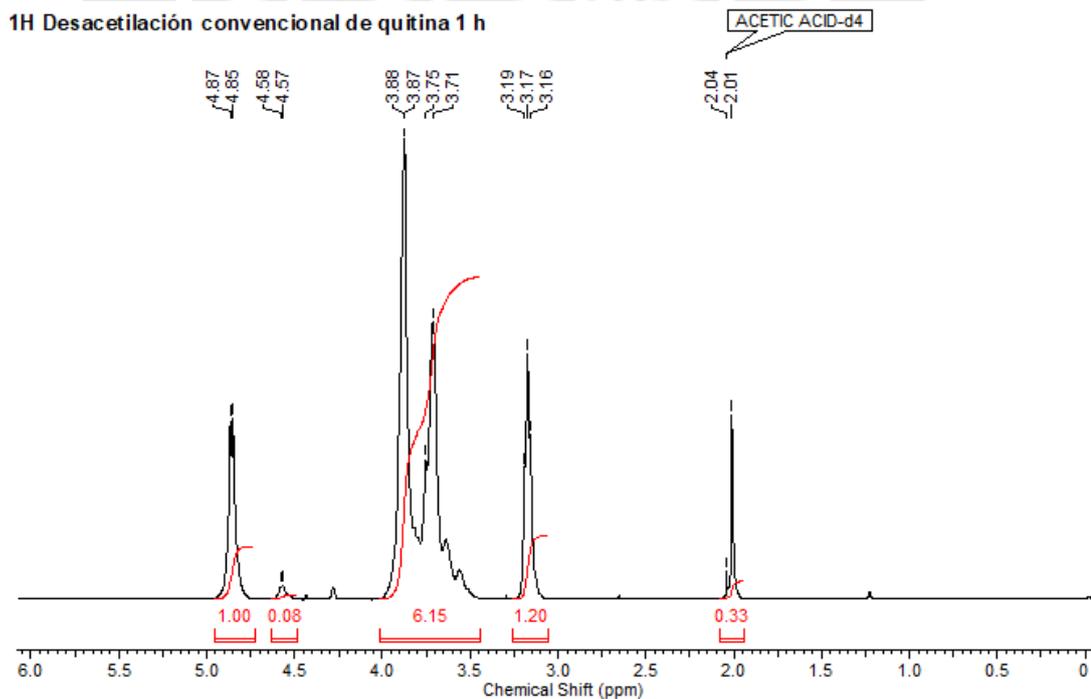
- (71) Lamarque, G.; Cretenet, M.; Viton, C.; Domard, A. New route of deacetylation of α - and β -chitins by means of freeze–pump out–thaw cycles. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1380–1388.
- (72) Liu, T. G.; Li, B.; Huang, W.; Lv, B.; Chen, J.; Zhang, J. X.; Zhu, L. P. Effects and kinetics of a novel temperature cycling treatment on the N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77* (1), 110–117.
- (73) Viarsagh, M. S.; Janmaleki, M.; Falahatpisheh, H. R.; Masoumi, J. Chitosan preparation from Persian Gulf shrimp shells and investigating the effect of time on the degree of deacetylation. *J. Paramed. Sci.* **2010**, *1* (2), 2–7.
- (74) Phongying, S.; Aiba, S. ichi; Chirachanchai, S. Direct chitosan nanoscaffold formation via chitin whiskers. *Polymer (Guildf)*. **2007**, *48* (1), 393–400.
- (75) Yaghobi, N.; Mirzadeh, H. Enhancement of chitin's degree of deacetylation by multistage alkali treatments. *Iran. Polym. J.* **2004**, *13* (2), 131–136.
- (76) Chang, K. L. B.; Tsai, G.; Lee, J.; Fu, W.-R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Reseach* **1997**, *303*, 327–332.
- (77) Mavandadi, F.; Pilotti, Å. The impact of microwave-assisted organic synthesis in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2006**, *11* (3–4), 165–174.
- (78) Mahdy Samar, M.; El-Kalyoubi, M. H.; Khalaf, M. M.; Abd El-Razik, M. M. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Ann. Agric. Sci.* **2013**, *58* (1), 33–41.

ANEXOS

Anexo 1. Espectros ^1H -RMN de quitosana en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500 MHz.

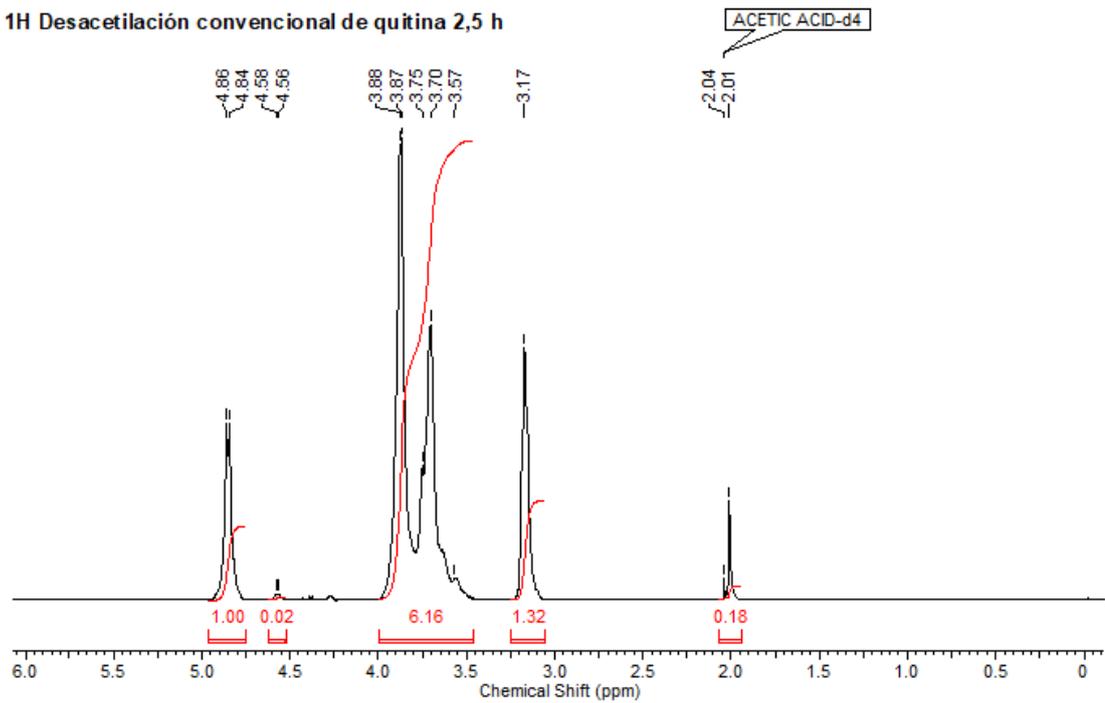


Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 0,5 h.



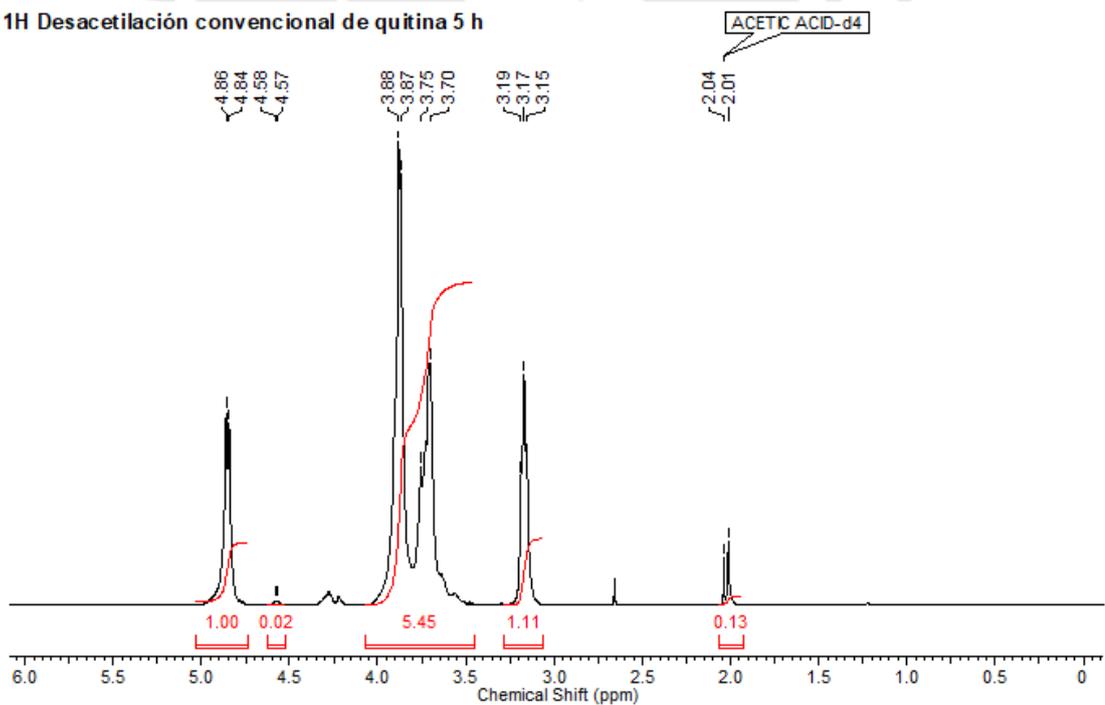
Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 1 h.

1H Desacetilación convencional de quitina 2,5 h



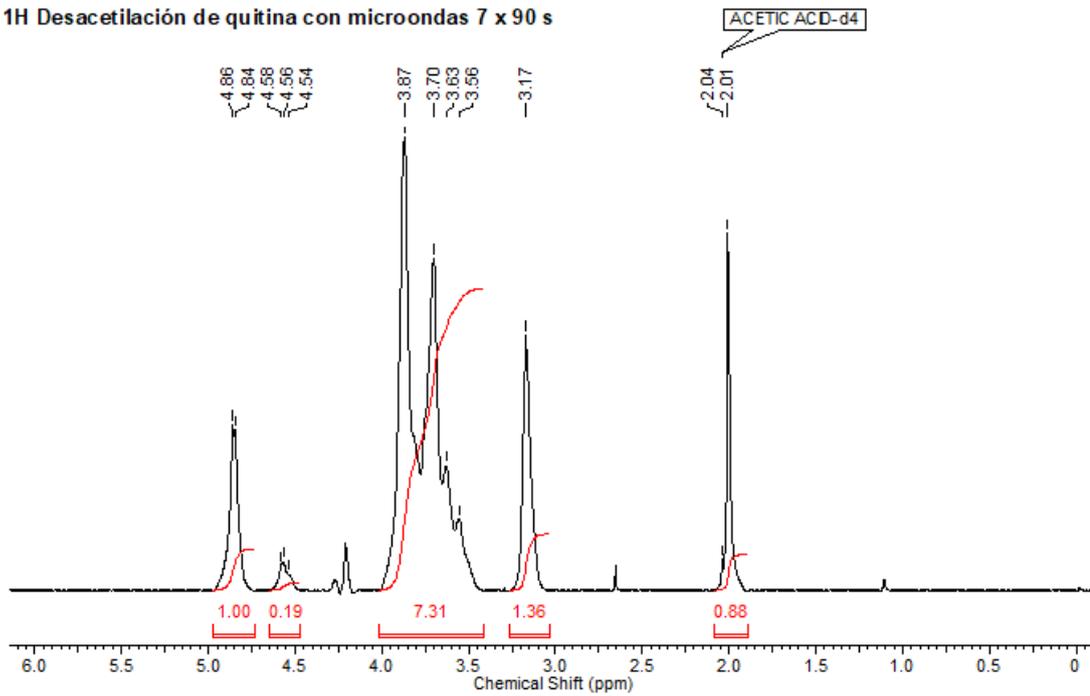
Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 2,5 h.

1H Desacetilación convencional de quitina 5 h



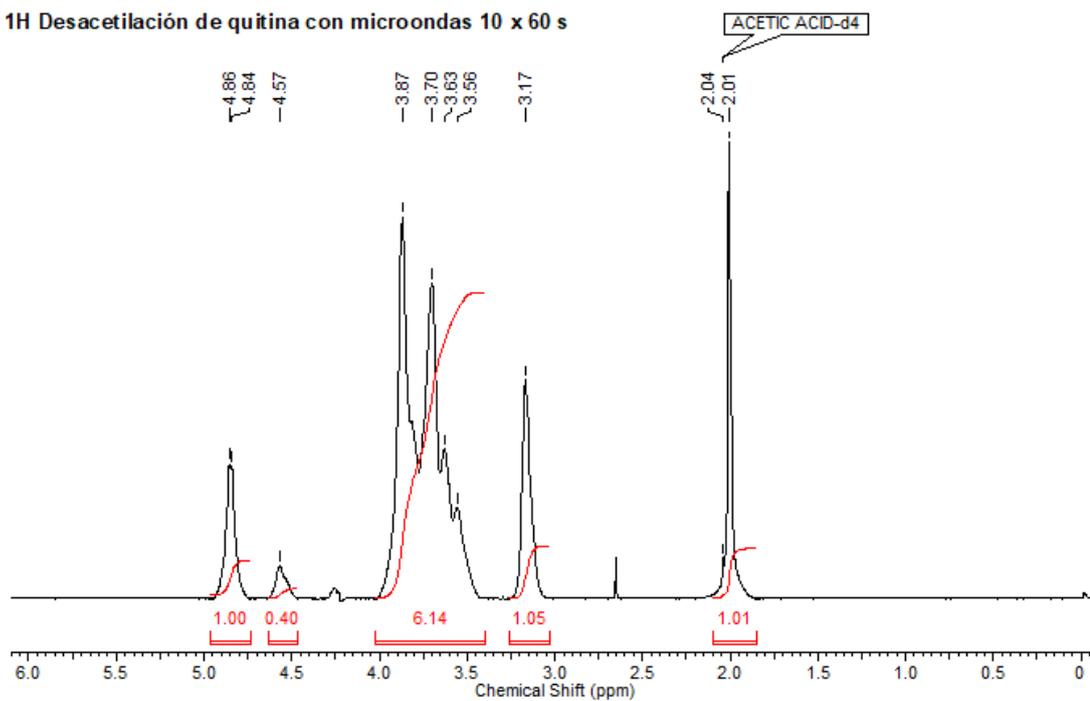
Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 5 h

1H Desacetilación de quitina con microondas 7 x 90 s



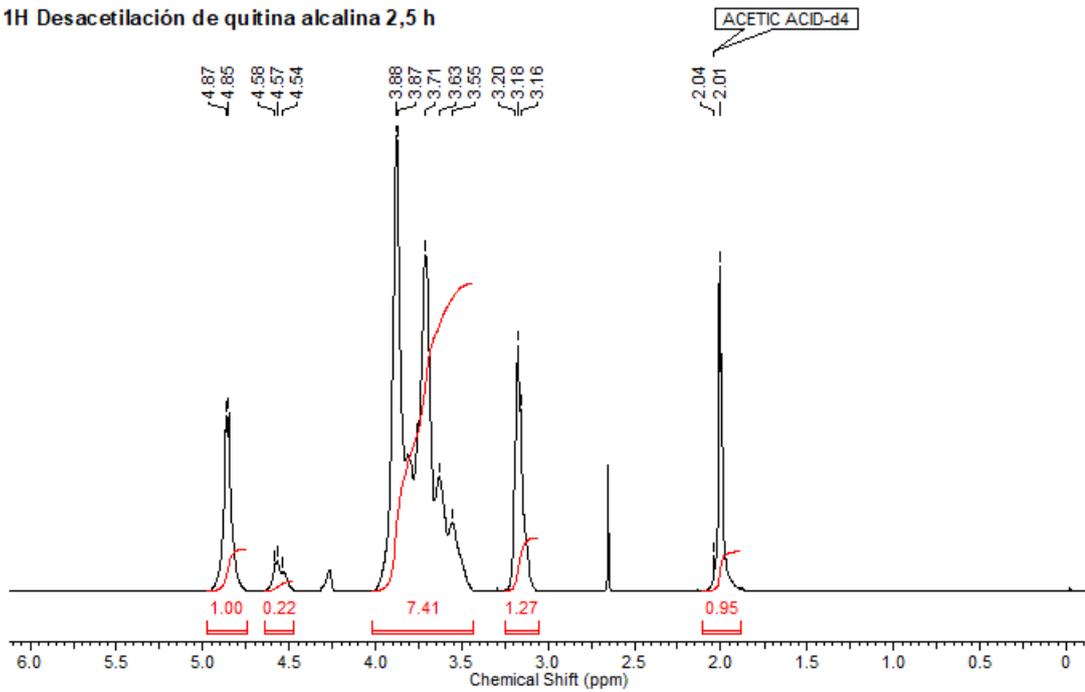
Producto de la desacetilación con microondas de 7 secuencias por 90 s de quitina con 50% NaOH (w/w).

1H Desacetilación de quitina con microondas 10 x 60 s



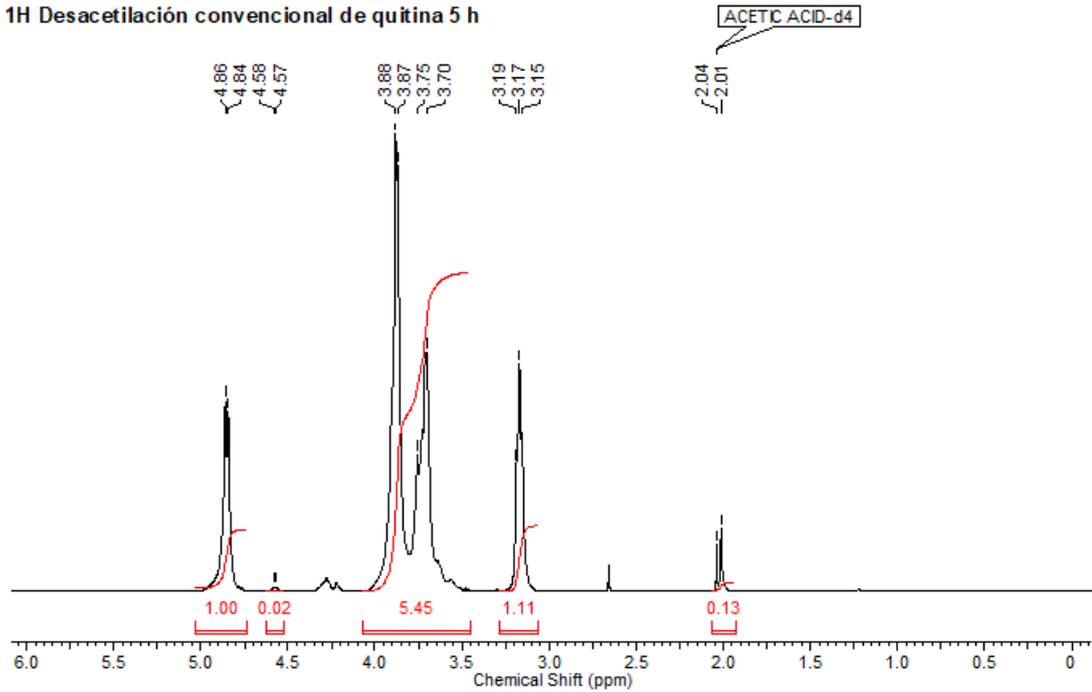
Producto de la desacetilación con microondas de 10 secuencias por 60 s de quitina con 50% NaOH (w/w).

1H Desacetilación de quitina alcalina 2,5 h



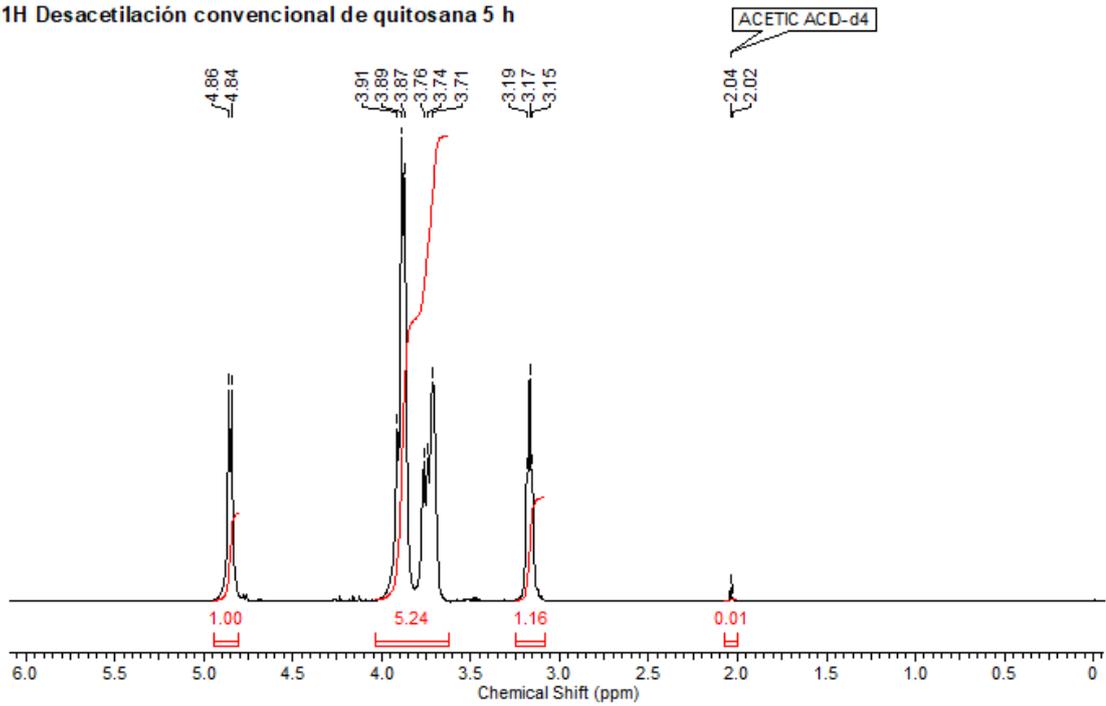
Producto de la desacetilación convencional de quitina alcalina con 25% NaOH (w/w) a 2,5 h.

1H Desacetilación convencional de quitina 5 h



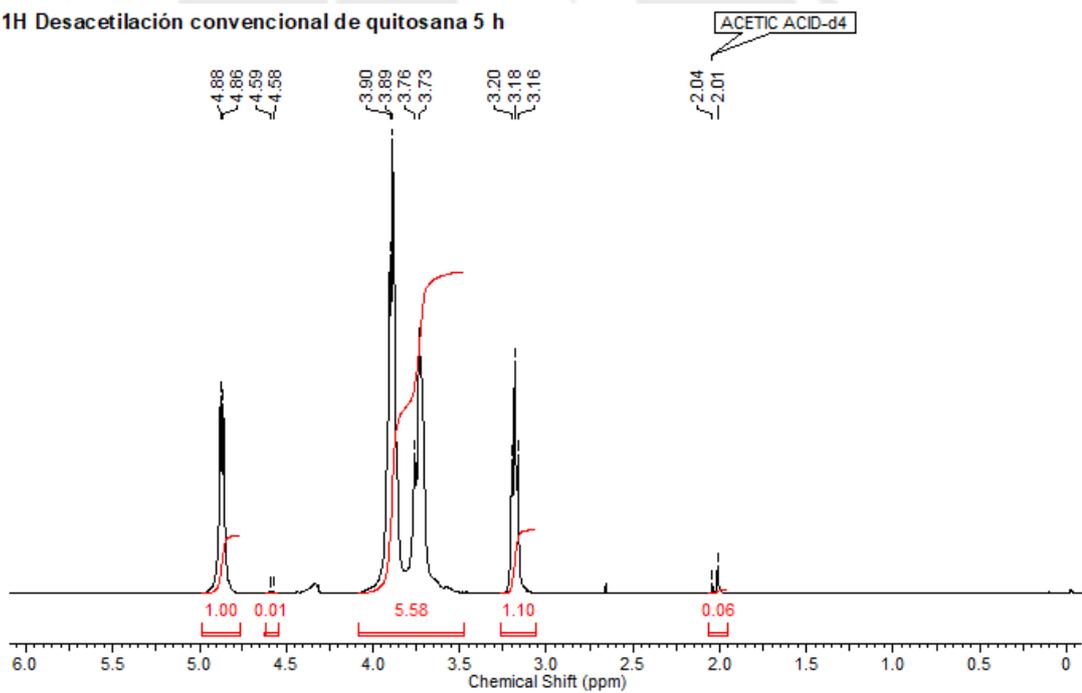
Producto de la desacetilación convencional de quitina alcalina con 25% NaOH (w/w) a 5 h.

1H Desacetilación convencional de quitosana 5 h



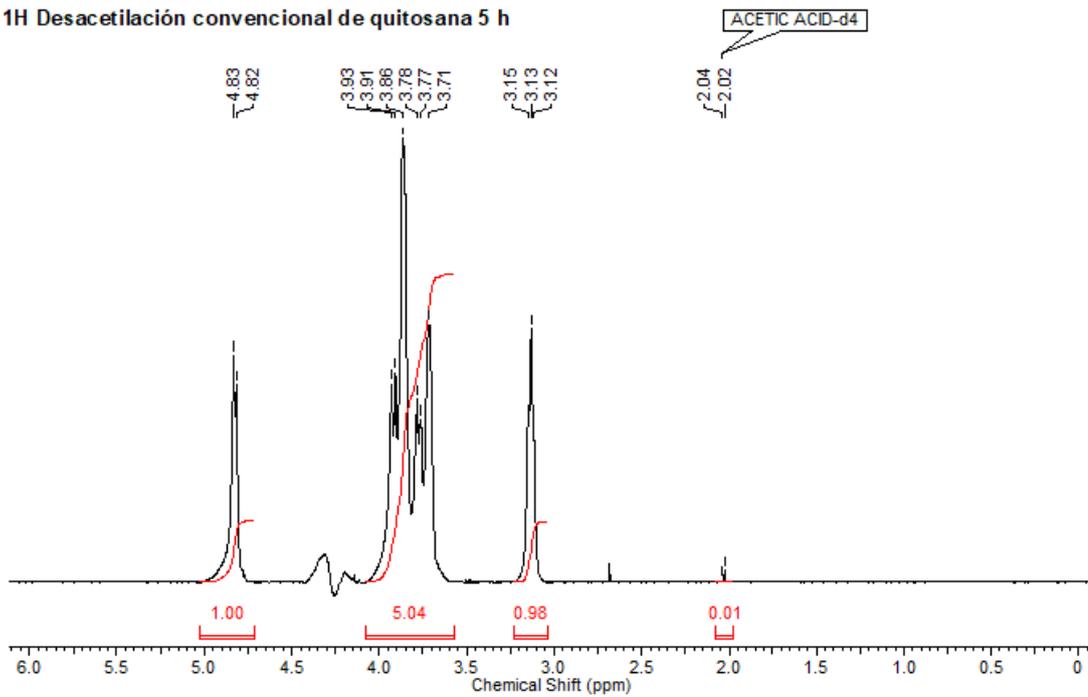
Producto de la desacetilación convencional de quitosana con 50% NaOH (w/w) a 5 h.

1H Desacetilación convencional de quitosana 5 h



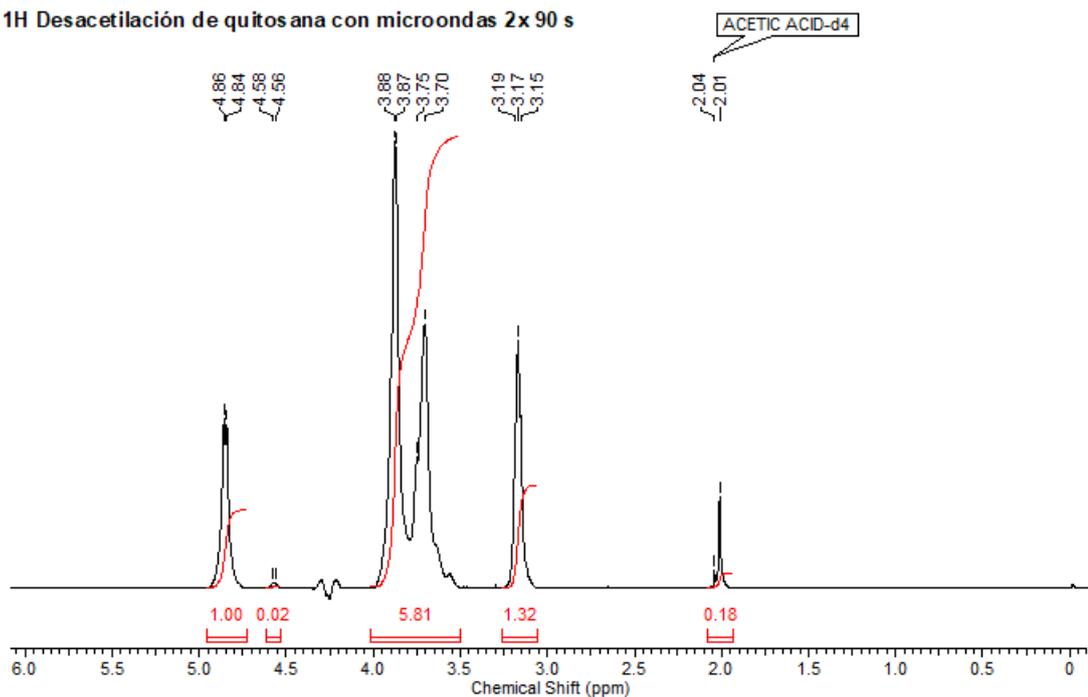
Producto de la desacetilación convencional de quitosana con 25% NaOH (w/w) a 5 h.

1H Desacetilación convencional de quitosana 5 h



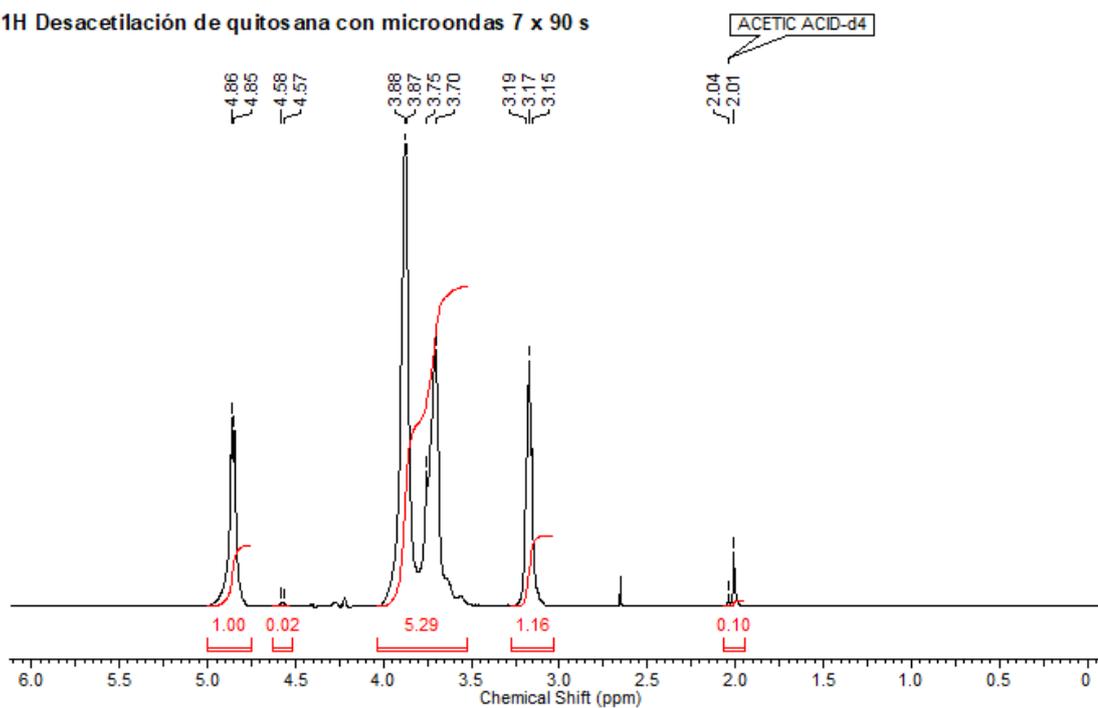
Producto de la desacetilación convencional de quitosana en escamas con 50% NaOH (w/w) a 5 h.

1H Desacetilación de quitosana con microondas 2x 90 s



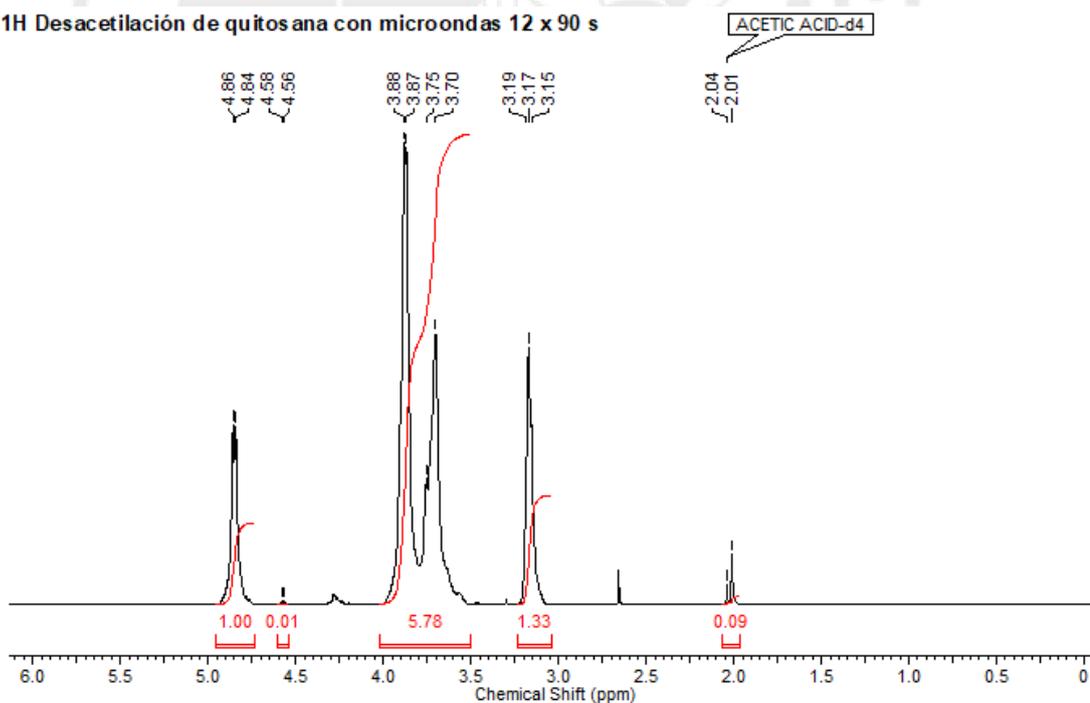
Producto de la desacetilación con microondas de 2 secuencias por 90 s de quitosana con 50% NaOH (w/w).

1H Desacetilación de quitosana con microondas 7 x 90 s



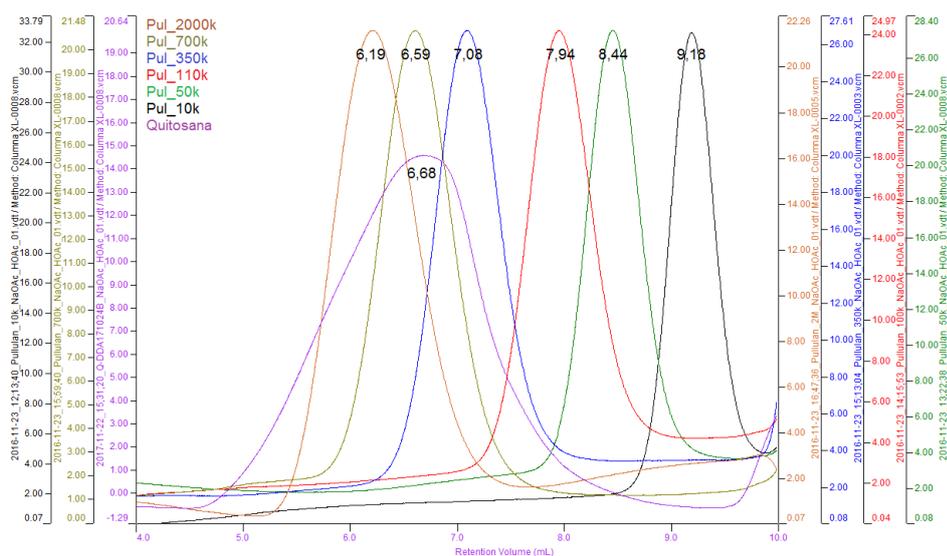
Producto de la desacetilación con microondas de 7 secuencias por 90 s de quitosana con 50% NaOH (w/w).

1H Desacetilación de quitosana con microondas 12 x 90 s



Producto de la desacetilación con microondas de 12 secuencias por 90 s de quitosana con 50% NaOH (w/w).

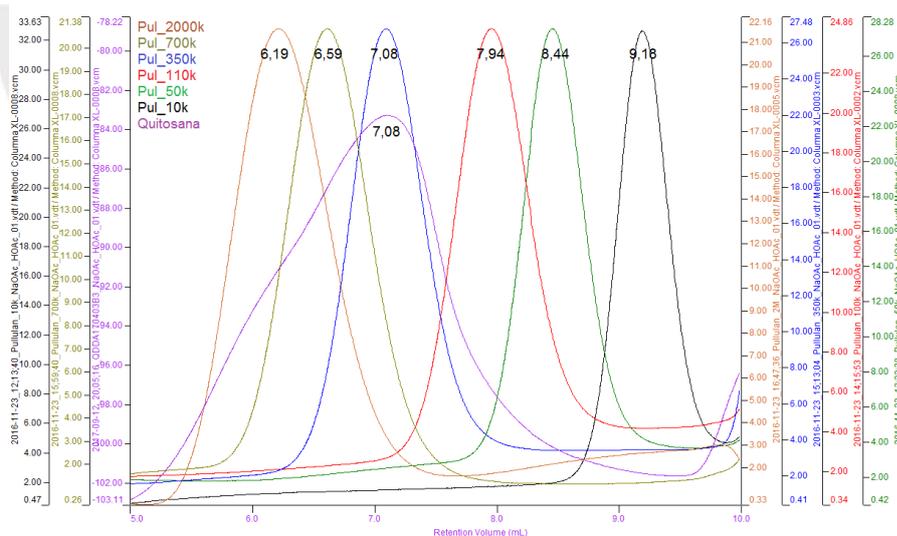
Anexo 2. Cromatogramas de GPC y pesos moleculares relacionados.



Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI*
6,679	478	1 819	780	3,808

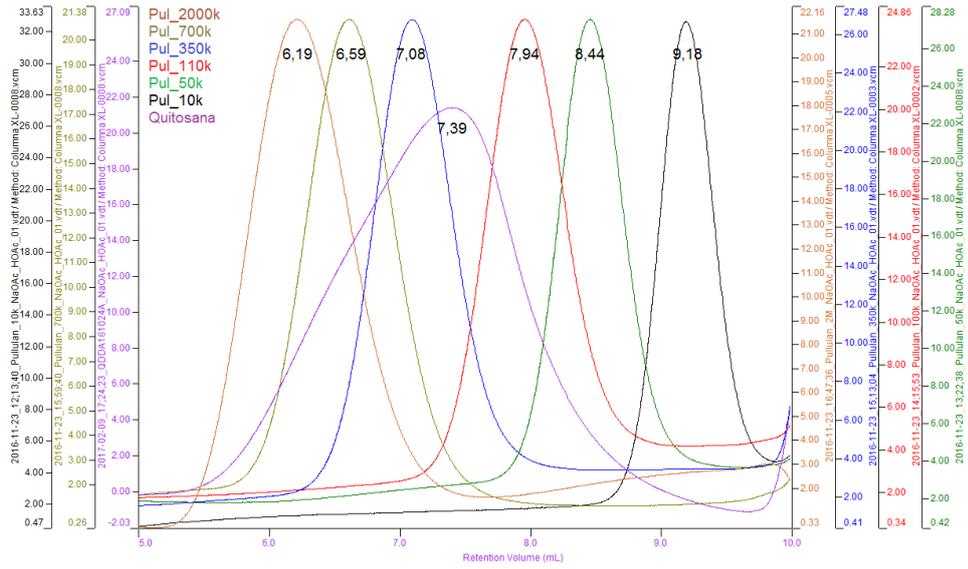
Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 0,5 h.

*PDI = Índice de polidispersión (M_w/M_n)



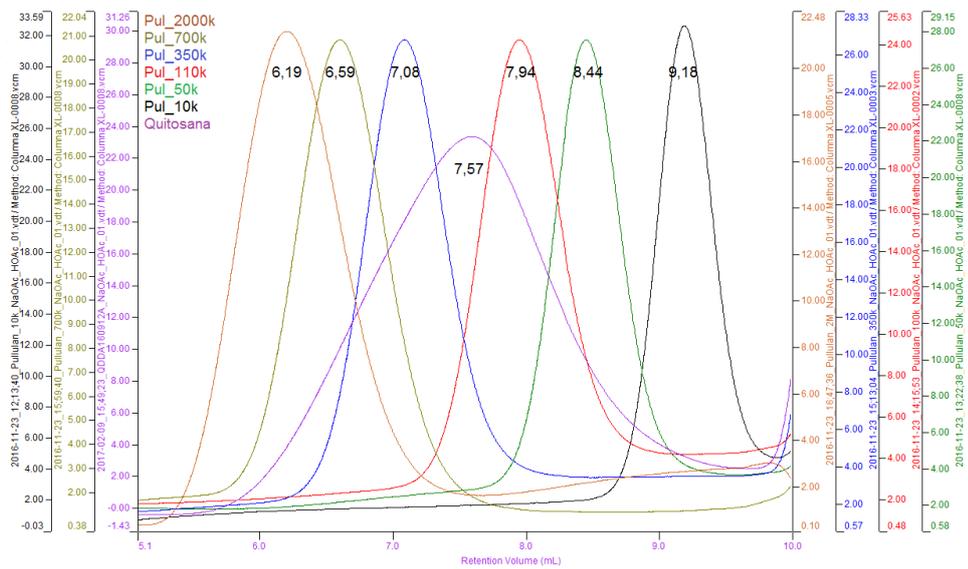
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,075	280	1 114	408	3,980

Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 1 h.



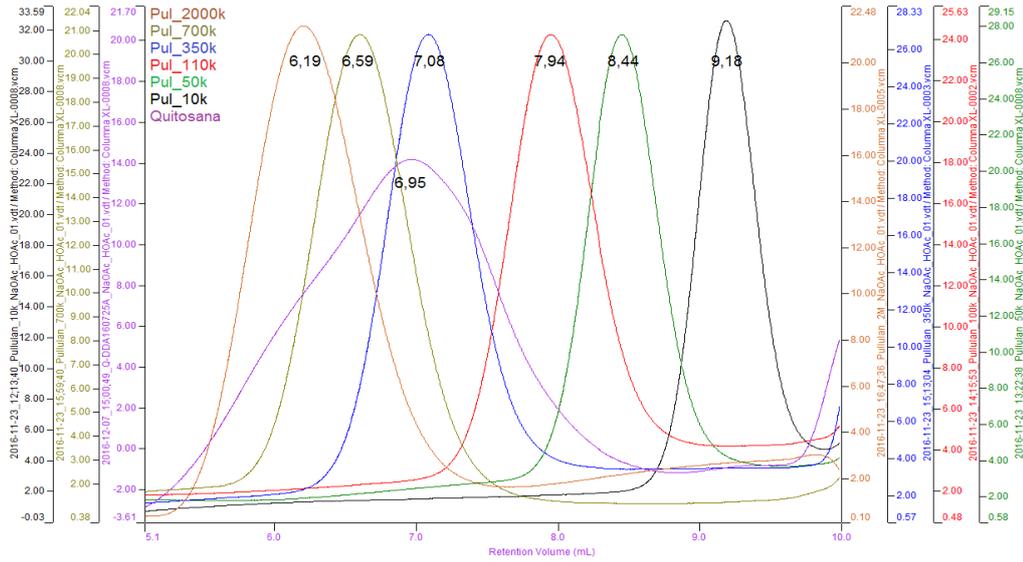
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,388	172	572	245	3,329

Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 2,5 h.



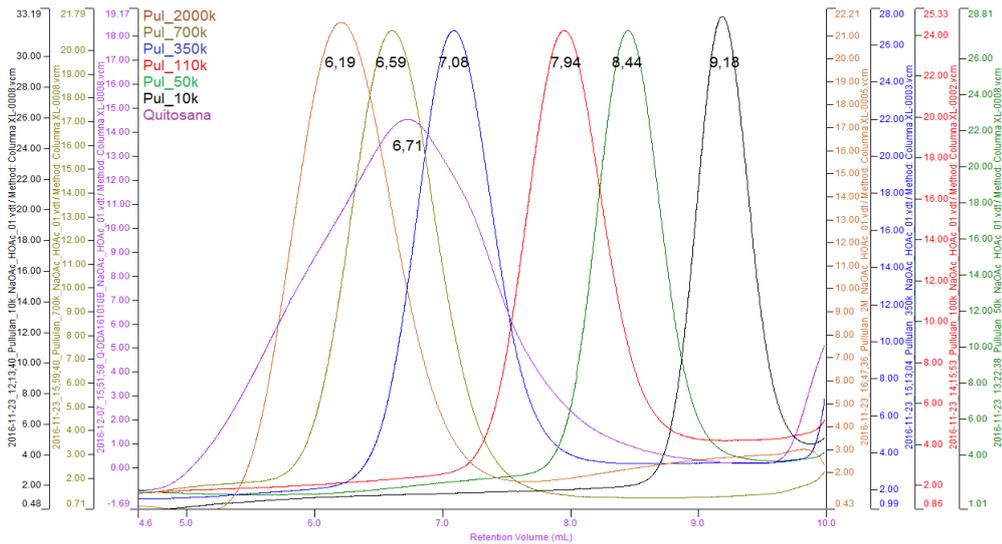
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,571	115	354	182	3,079

Producto de la desacetilación convencional de quitina con 50% NaOH (w/w) a 5 h



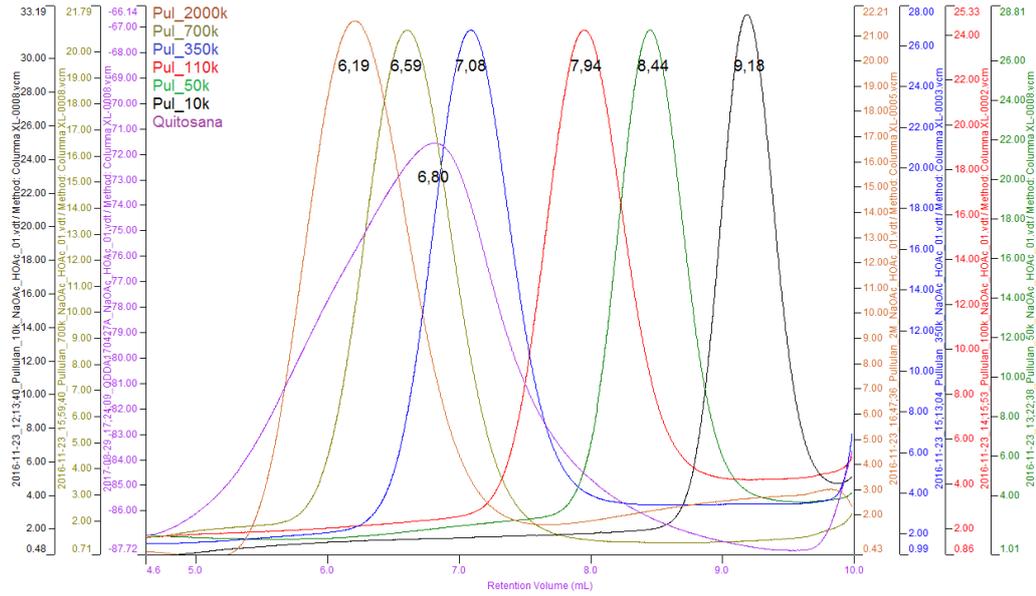
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
6,946	360	1 113	505	3,094

Producto de la desacetilación con microondas de 7 secuencias por 90 s de quitina con 50% NaOH (w/w).



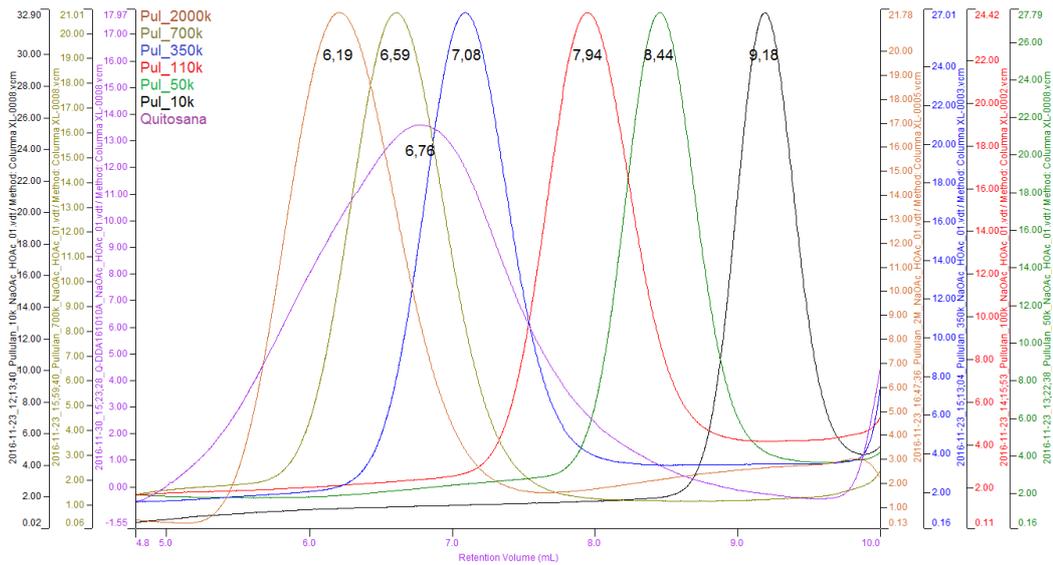
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
6,713	366	1 468	741	4,009

Producto de la desacetilación con microondas de 10 secuencias por 60 s de quitina con 50% NaOH (w/w).



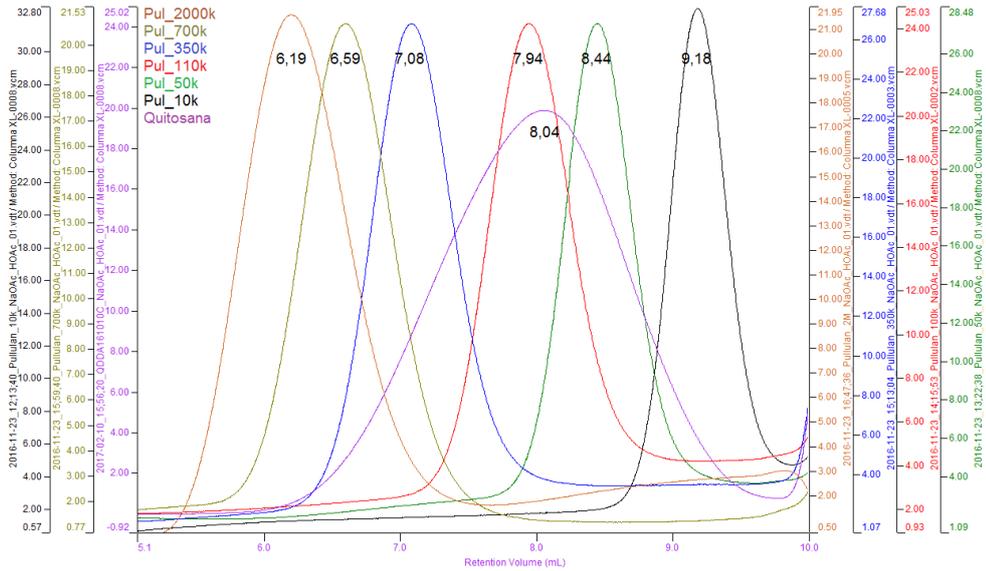
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
6,804	355	1 495	638	4,216

Producto de la desacetilación convencional de quitina alcalina con 25% NaOH (w/w) a 2,5 h.



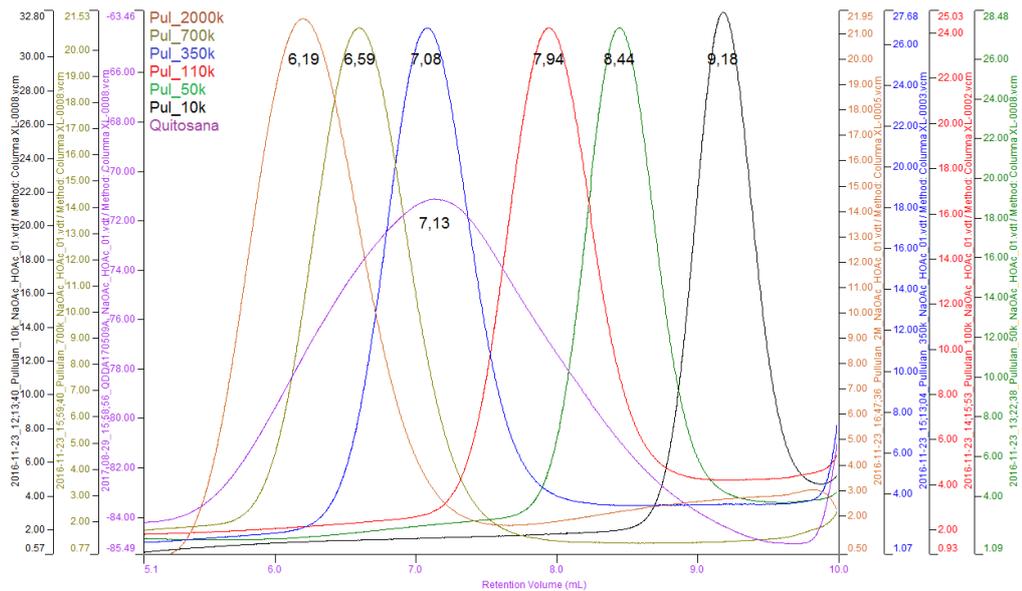
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
6,763	314	1 369	683	4,359

Producto de la desacetilación convencional de quitina alcalina con 25% NaOH (w/w) a 5 h.



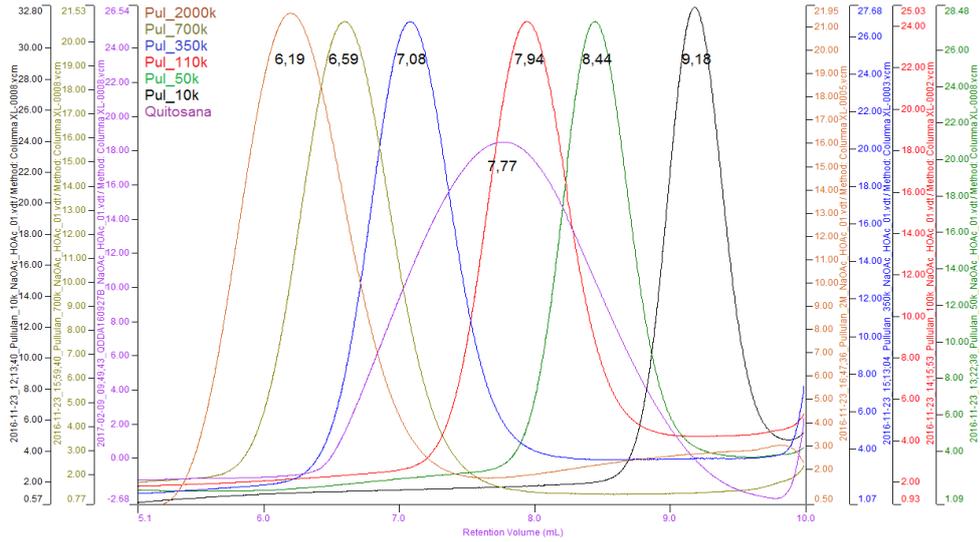
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
8,042	61	167	84	2,742

Producto de la desacetilación convencional de quitosana con 50% NaOH (w/w) a 5 h.



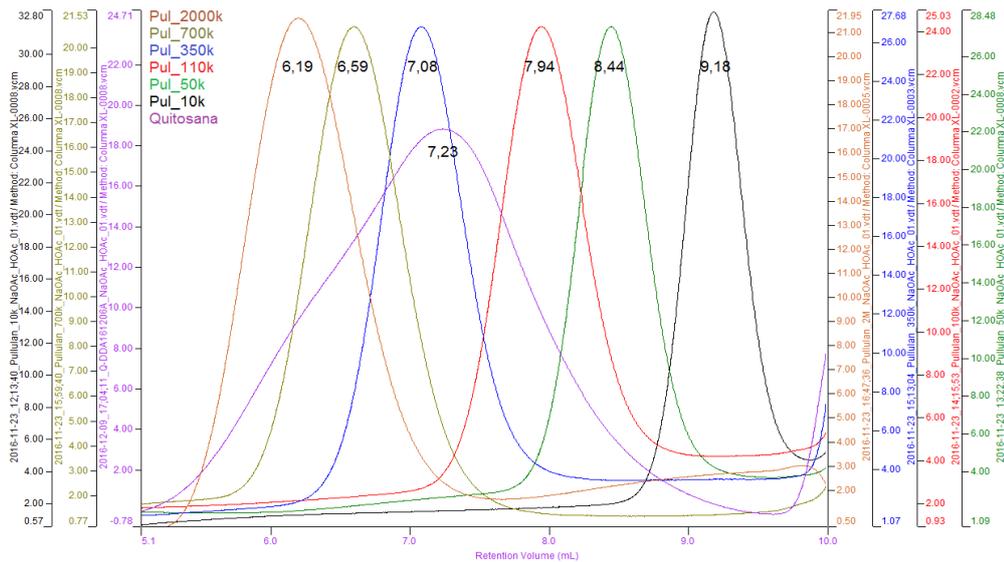
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,129	154	676	375	4,385

Producto de la desacetilación convencional de quitosana con 25% NaOH (w/w) a 5 h.



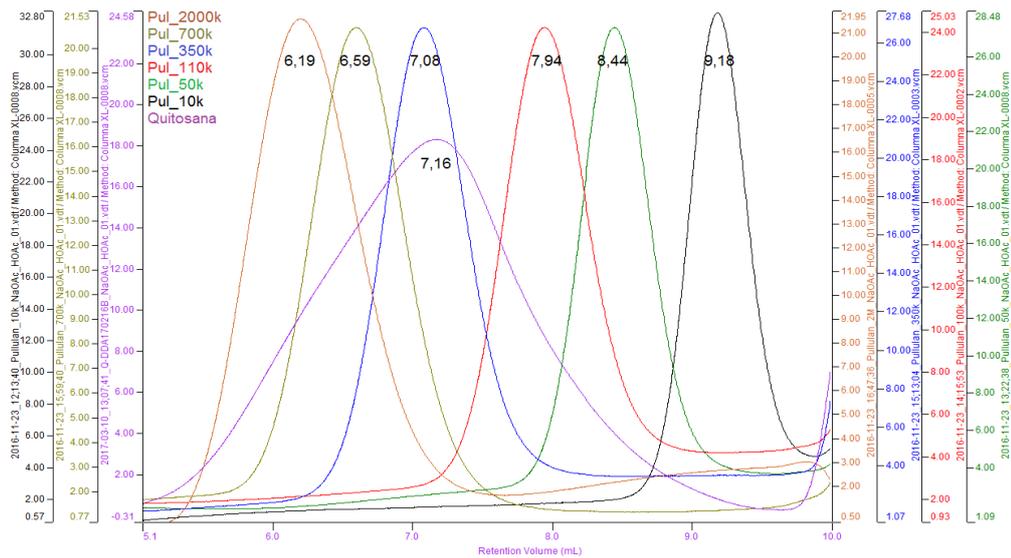
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,771	75	189	131	2,520

Producto de la desacetilación convencional de quitosana en escamas con 50% NaOH (w/w) a 5 h.



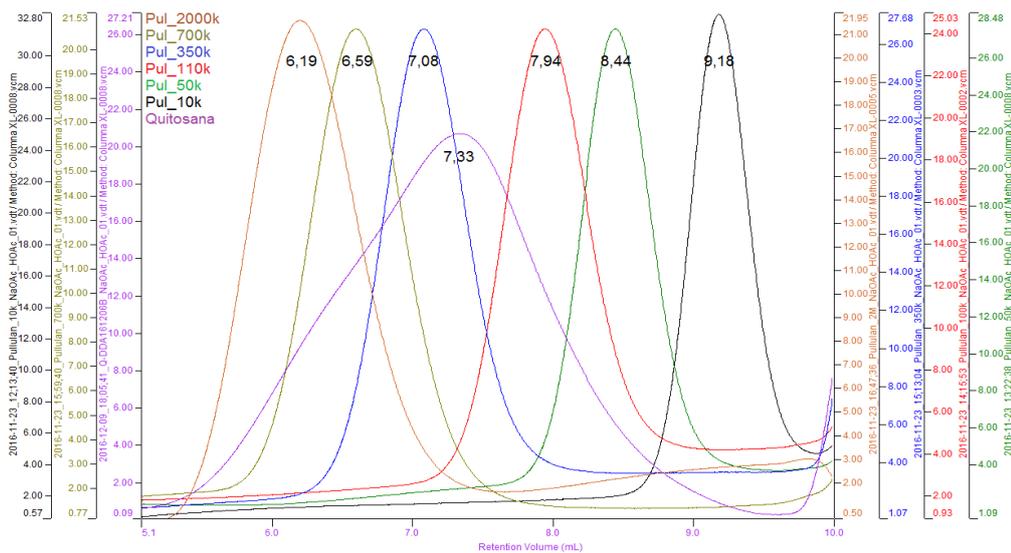
Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,229	183	789	319	4,311

Producto de la desacetilación con microondas de 2 secuencias por 90 s de quitosana con 50% NaOH (w/w).



Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,163	186	795	354	4,268

Producto de la desacetilación con microondas de 7 secuencias por 90 s de quitosana con 50% NaOH (w/w).



Pico (mL)	M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _p (kDa)	PDI
7,329	164	639	269	3,901

Producto de la desacetilación con microondas de 12 secuencias por 90 s de quitosana con 50% NaOH (w/w).

Anexo 3. Valores de DDA y M_P de los productos de todos los métodos de desacetilación de quitina.

Método de desacetilación de quitina	M_P (kDa)	DDA (%)
Convencional 5 h, 50% NaOH (w/w)	284	96,12
	213	97,35
	182	97,24
	238	96,95
	195	97,41
Convencional 2,5 h, 50% NaOH (w/w)	245	96,67
	279	97,17
Convencional 1 h, 50% NaOH (w/w)	408	92,69
	452	93,37
	478	93,33
	408	93,83
Convencional 0,5 h, 50% NaOH (w/w)	542	90,36
	459	90,28
	525	90,49
Formación de quitina alcalina 5 h, 25% NaOH (w/w)	735	82,98
	683	82,72
Formación de quitina alcalina 2,5 h, 25% NaOH (w/w)	555	82,51
	638	80,33
Con microondas 7 ciclos de 90 s, 50% NaOH (w/w)	505	82,94
	473	83,70
Con microondas 10 ciclos de 60 s, 50% NaOH (w/w)	741	81,27
	719	76,92

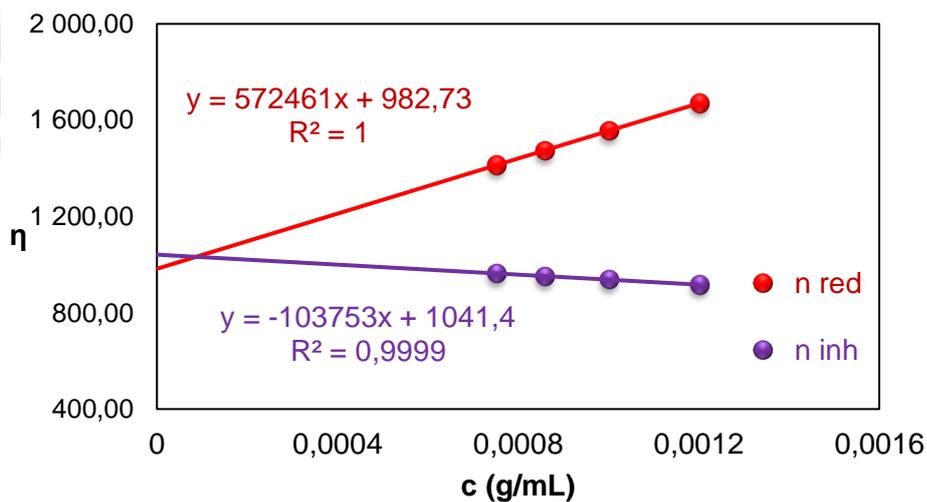
Anexo 4. Valores de DDA y M_p de los productos de todos los métodos de desacetilación de quitosana. Valores iniciales: DDA = 80,6%, M_p = 408 kDa.

Método de desacetilación de quitosana	M_p (kDa)	DDA (%)
Convencional 5 h, 50% NaOH (w/w)	84	99,85
	104	99,03
	131	99,83
Convencional 2,5 h, 50% NaOH (w/w)	375	98,48
	319	98,47
	290	98,59
Con microondas 2 ciclos de 90 s, 50% NaOH (w/w)	314	97,39
	323	96,67
	319	96,62
Con microondas 7 ciclos de 90 s, 50% NaOH (w/w)	294	97,60
	336	97,62
	354	97,62
Con microondas 12 ciclos de 90 s, 50% NaOH (w/w)	298	98,85
	311	98,56
	269	98,31

Anexo 5. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente.

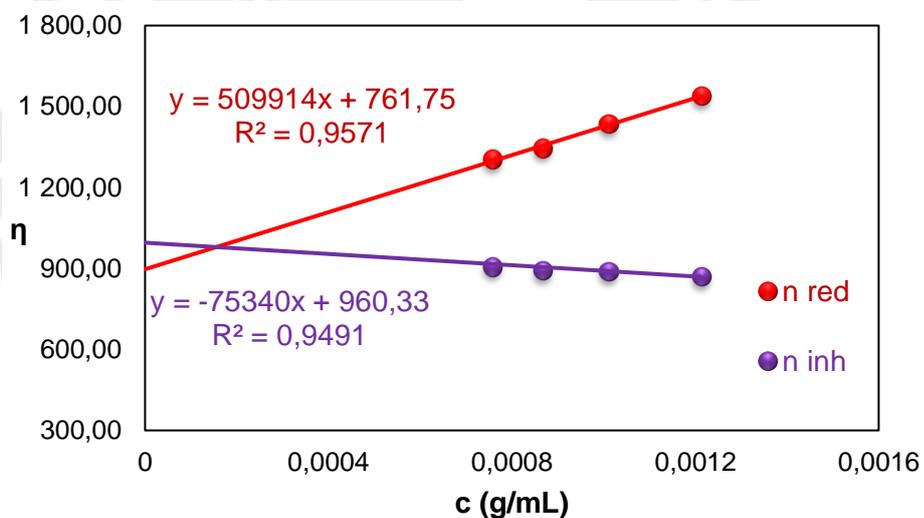
Producto de la desacetilación convencional de quitina por 1 h. [NaOH]= 50% (w/w).

Desacetilación convencional de quitina, 1 h					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	$1,20 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-3}$	$0,86 \times 10^{-3}$	$,75 \times 10^{-3}$
t_{promedio} (s)	33,78	101,49	86,30	76,43	69,58
η_r	-	3,00	2,55	2,26	2,06
η_{sp}	-	2,00	1,55	1,26	1,06
η_{red}	-	1 670,18	1 554,58	1 472,73	1 412,86
η_{inh}	-	916,68	937,89	952,47	963,38
$K = 6,589 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$			$\alpha = 0,88$		
$[\eta] = 1 012,07 \text{ mL/g}$			$M_v = 782 751,21 \text{ g/mol}$		



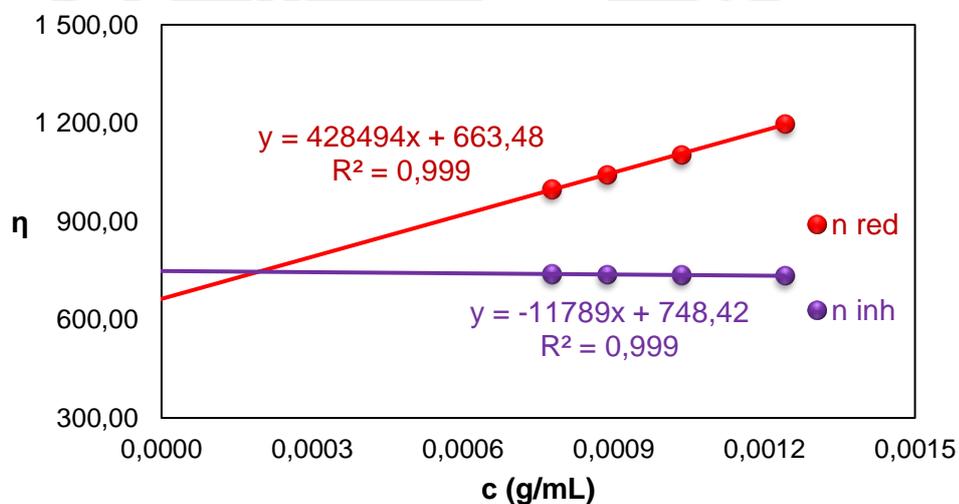
Producto de la desacetilación con microondas de quitina en 10 ciclos por 60 s.
 [NaOH]= 50% (w/w).

Desacetilación por microondas de quitina, 10 x 60 s					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	1,21 x 10 ⁻³	1,01 x 10 ⁻³	0,86 x 10 ⁻³	0,76 x 10 ⁻³
t_{promedio} (s)	33,72	96,52	82,59	73,32	66,95
η_r	-	2,86	2,45	2,17	1,99
η_{sp}	-	1,86	1,45	1,17	0,99
η_{red}	-	1 537,19	1 435,64	1 344,83	1 302,63
η_{inh}	-	868,45	887,22	890,49	905,44
K = 1,424 x 10⁻³ cm³/g			α = 0,96		
[η] = 861,040 mL/g			M_v = 1 052 954,80 g/mol		



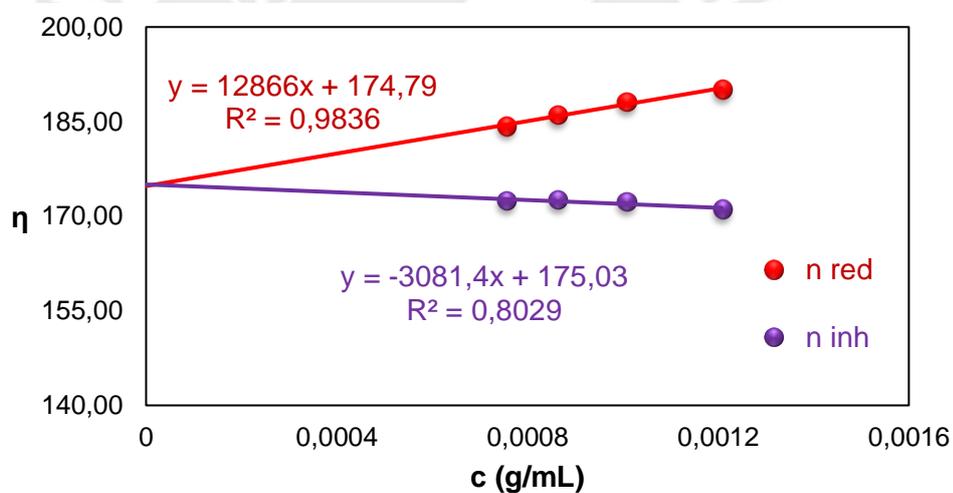
Producto de la desacetilación convencional de quitina alcalina por 5 h. [NaOH]= 25% (w/w).

Desacetilación de quitina alcalina, 5 h					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	1,24 x 10 ⁻³	1,03 x 10 ⁻³	0,89 x 10 ⁻³	0,78 x 10 ⁻³
t _{promedio} (s)	33,81	84,00	72,35	65,01	59,97
η _r	-	2,48	2,14	1,92	1,77
η _{sp}	-	1,48	1,14	0,92	0,77
η _{red}	-	1 196,95	1 102,98	1 041,71	998,01
η _{inh}	-	733,84	736,15	738,06	739,27
K = 1,424 x 10 ⁻³ cm ³ /g			α = 0,96		
[η] = 705,95 mL/g			M _v = 856 183,03 g/mol		



Producto de la desacetilación convencional de quitosana por 5 h. [NaOH]= 50% (w/w).

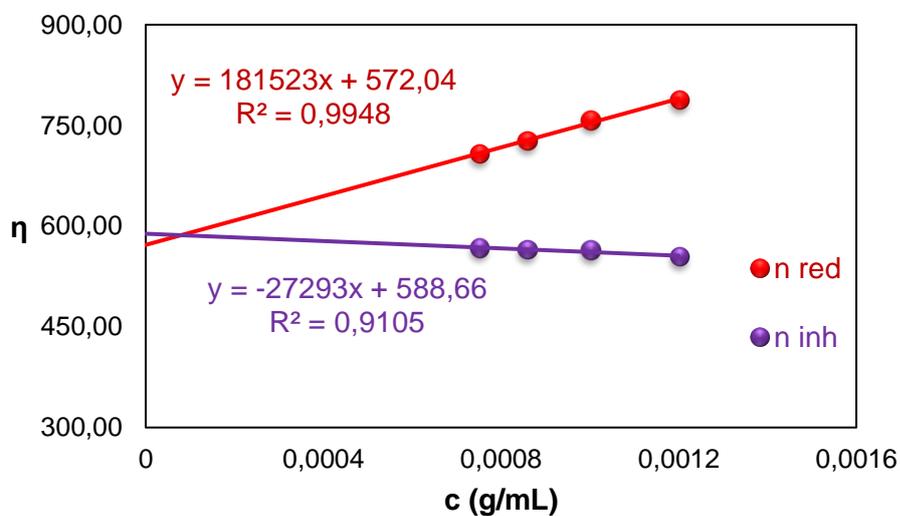
Desacetilación convencional de quitosana, 5 h					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	1,21 x 10 ⁻³	1,01 x 10 ⁻³	0,86 x 10 ⁻³	0,76 x 10 ⁻³
t _{promedio} (s)	33,72	41,44	39,97	39,02	38,28
η _r	-	1,23	1,19	1,16	1,14
η _{sp}	-	0,23	0,19	0,16	0,14
η _{red}	-	190,08	188,12	186,05	184,21
η _{inh}	-	171,09	172,23	172,58	172,41
K = 16,800 x 10 ⁻³ cm ³ /g			α = 0,81		
[η] = 174,910 mL/g			M _v = 91 176,55 g/mol		



Producto de la desacetilación con microondas de quitosana en 7 ciclos por 90 s.

[NaOH]= 50% (w/w).

Desacetilación por microondas de quitosana, 7 x 90 s					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	$1,20 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-3}$	$0,86 \times 10^{-3}$	$0,75 \times 10^{-3}$
t_{promedio} (s)	33,72	65,60	59,25	54,72	51,60
η_r	-	1,95	1,76	1,62	1,53
η_{sp}	-	0,95	0,76	0,62	0,53
η_{red}	-	787,98	757,32	726,80	707,15
η_{inh}	-	554,63	563,79	564,97	567,34
$K = 16,800 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$			$\alpha = 0,81$		
$[\eta] = 580,350 \text{ mL/g}$			$M_v = 400\ 810,55 \text{ g/mol}$		



Producto de la desacetilación con microondas de quitosana en 12 ciclos por 90 s.

[NaOH]= 50% (w/w).

Desacetilación por microondas de quitosana, 12 x 90 s					
	[Q en buffer] (g/mL)				
	Solvente	$1,23 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$0,88 \times 10^{-3}$	$0,77 \times 10^{-3}$
t_{promedio} (s)	33,78	61,68	56,27	52,55	49,89
η_r	-	1,83	1,67	1,56	1,48
η_{sp}	-	0,83	0,67	0,56	0,48
η_{red}	-	672,35	650,41	633,44	621,24
η_{inh}	-	490,18	498,54	503,76	507,98
$K = 16,800 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$			$\alpha = 0,81$		
$[\eta] = 536,785 \text{ mL/g}$			$M_v = 363\,998,93 \text{ g/mol}$		

