

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



Obtención de quitosanas con peso molecular y grado de acetilación controlados

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

Luis-Felipe Alberto Sánchez Zárate

ASESOR: Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

Lima, noviembre de 2019

RESUMEN

La quitina es un polisacárido estructural que se encuentra en algunos crustáceos, insectos, hongos y levaduras. La desacetilación de la quitina produce quitosana, la cual ha sido estudiada por su alto potencial en aplicaciones como el transporte de fármacos, la absorción de iones metálicos, membranas e ingeniería de tejidos. La quitosana es un copolímero lineal conformado por unidades N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. Las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la quitosana están determinadas principalmente por tres parámetros: el grado de acetilación (DA) y el peso molecular (Mw).

La gran mayoría de estudios reportados se han realizado con quitosanas extraídas de distintas fuentes y por diferentes métodos, por ello es de espera que cada una de estas quitosanas tengan diferentes DA y Mw, y con ello diferentes propiedades. Además, varios estudios no reportan todos los parámetros antes mencionados. Así, en algunos casos, se reportan diferencias en las propiedades con, por ejemplo, solubilidad, viscosidad y ángulo de contacto. Esto genera incongruencia en las propiedades reportadas sobre la quitosana.

Por lo mencionado, es importante contar con muestras de quitosana a medida; es decir, con características estructurales conocidas y que se hayan determinado rigurosamente. En este trabajo se evaluaron métodos que permiten obtener estas quitosanas a medida, con Mw y DA específicos, este se realizó a partir de una quitosana de un DA igual a 10,6% y su posterior reacetilación con anhídrido acético en medio acuoso ácido y con cloruro de acetilo en un líquido iónico en los que se obtuvo valores de DA entre 28 y 89%. Además, se evaluaron formas para reducir el Mw de manera controlada con la aplicación de ultrasonido y la hidrólisis en medio ácido, en los que se obtuvo valores de Mw entre 131 y 1300 kDa. Estos dos parámetros mencionados se determinaron por espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, cromatografía de permeación en gel y viscosimetría capilar.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a mi familia, a mi novia y amigos. Por el constante apoyo en la realización de esta tesis.

A mi asesor, el Dr. Javier Nakamatsu, por todo el apoyo, la confianza y los consejos que me ha brindado antes y durante el desarrollo de esta tesis. Agradezco el haberme permitido ser miembro de su laboratorio y grupo de investigación Modificación de Materiales (MODMAT).

A Mariela Elgegren, Jorge Ayarza, Jimmy Cánepa, Alonso Donayre, Álvaro Castañeda, Stephanie Mogollón Veliz y Diego Córdova por su amistad, ayuda y consejos. Por el compañerismo, las vivencias y hacer del trabajo en el laboratorio un lugar agradable.

A Jose Carlos Ugaz y al centro de espectroscopía de resonancia magnética Nuclear (CERMN-PUCP) por su ayuda en los análisis de resonancia magnética nuclear, y a Milka Cahahuanca por su ayuda en los análisis de espectroscopía infrarroja.

A la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) por el apoyo económico brindado en los proyectos 2017-1-0028 "Establecer un procedimiento para la elaboración de quitosanas con grado de acetilación y peso molecular 'a medida'" y 2018-1-0022 "Procesos para formar, membranas, pellets, películas y micropartículas de quitina y quitosana a partir de soluciones con solventes no convencionales", relacionado con este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. QUITOSANA.....	1
1.1.1. Introducción.....	1
1.1.2. Composición y estructura química de la quitosana.....	2
1.1.3. Obtención de quitosana a partir de quitina.....	3
1.1.4. Acetilación de quitosana.....	4
1.1.5. Reducción del peso molecular de la quitosana.....	7
1.1.6. Caracterización.....	9
1.1.7. Propiedades.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
4.1. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES.....	17
4.1.1. Reactivos.....	17
4.1.2. Equipos.....	17
4.1.3. Materiales.....	18
4.2. METODOLOGÍA.....	19
4.2.1. Caracterización de la quitosana.....	19
4.2.1.1. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	19
4.2.1.2. Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹ H-RMN).....	19
4.2.1.3. Análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	20
4.2.1.4. Análisis por viscosimetría capilar.....	20
4.2.2. Acetilación de la quitosana.....	21
4.2.2.1. Acetilación con anhídrido acético.....	21
4.2.2.2. Acetilación con cloruro de acetilo.....	22
4.2.3. Control del peso molecular de la quitosana.....	23
4.2.3.1. Reducción del peso molecular de la quitosana con ultrasonido.....	23
4.2.3.2. Reducción del peso molecular de la quitosana en medio ácido.....	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA	24
5.1.1. Determinación del grado de acetilación de la quitosana por FT-IR	24
5.1.2. Determinación del grado de acetilación de la quitosana por ¹ H-RMN	30
5.1.3. Análisis del peso molecular y su distribución de la quitosana por GPC.....	32
5.1.4. Análisis de la viscosidad intrínseca.....	36
5.2. ACETILACIÓN DE LA QUITOSANA.....	42
5.2.1. Acetilación con anhídrido acético.....	42
5.2.2. Acetilación con cloruro de acetilo en [AMIM]Cl	48
5.3. CONTROL DEL PESO MOLECULAR DE LA QUITOSANA.....	52
5.3.1. Reducción del peso molecular en medio ácido	52
5.3.2. Reducción del peso molecular por ultrasonido.....	53
5.4. PREPARACIÓN DE QUITOSANAS 'A MEDIDA'	55
5.4.1. Grado de acetilación 'a medida'	55
5.4.2. Peso molecular 'a medida'	57
5.4.3. Efecto del ultrasonido en el grado de acetilación	58
5.4.4. Influencia del peso molecular y el grado de acetilación en el volumen hidrodinámico de la quitosana	59
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
6.1. CONCLUSIONES.....	65
6.2. RECOMENDACIONES.....	66
7. BIBLIOGRAFÍA.....	67
8. ANEXOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Estructura de la quitina, (b) estructura de la quitosana, y (c) unidades constituyentes.....	2
Figura 2. Esquema de la reacción de desacetilación de la quitina.....	4
Figura 3. Reacción de acetilación de quitosana (bajo DA) con anhídrido acético.....	5
Figura 4. Etapas de la reacción de acetilación directa y con adición de otros solventes. ^{21,24,25,27}	7
Figura 5. Mecanismo de la hidrólisis del enlace glucosídico en medio ácido.....	8
Figura 6. Método de acetilación de quitosana con anhídrido acético.....	21
Figura 7. Esquema del procedimiento de la reducción del peso molecular con ultrasonido.....	23
Figura 8. Comparación de los espectros FT-IR de una película de quitosana Sigma Aldrich por ATR (rojo) y transmisión (negro) de 4000 a 400 cm ⁻¹	26
Figura 9. Espectro FT-IR de una película de quitosana Sigma Aldrich por ATR (rojo) y transmisión (negro) de 2000 a 400 cm ⁻¹	28
Figura 10. Espectro FT-IR de la quitosana Sigma Aldrich con líneas base para el cálculo del DA en el rango de 2000 a 400 cm ⁻¹	29
Figura 11. Espectro de ¹ H-RMN de cloruro de quitosana (Sigma Aldrich, lote: STBG5137V) en DCI/D ₂ O a 70 °C y 500 MHz, DA=24,31%.	30
Figura 12. Estructura y desplazamientos químicos en el espectro ¹ H-RMN de la quitosana en D ₂ O/DCI a 70 °C y 500 MHz.....	31
Figura 13. Cromatogramas de estándares de pululano, en solución tampón de NaOAc 0,1 M/HOAc 0,2 M, a un flujo de 0,5 mL/min y 35 °C.	34
Figura 14. Cromatogramas y Mw promedio de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%) (A), y de la quitosana Q-10 (DA=10,66%) (B) comparadas con los estándares de pululano.....	35
Figura 15. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%).	38
Figura 16. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Q-10 (DA=10,66%).	39
Figura 17. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%) en 3 veces la concentración de la solución tampón.....	40

Figura 18. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Q-10 (DA=10,66%) en 3 veces la concentración de la solución tampón.....	41
Figura 19. Estructura de la quitosana (A), producto de acetilación (B) y producto de hidrólisis (C).....	44
Figura 20. Espectros de FT-IR-ATR, en el rango de 2000 a 400 cm^{-1} , de quitosana Sigma Aldrich (A), quitosana acetilada (B), y quitosana acetilada luego del tratamiento con KOH (C). Reacción con Anh/GlcN=30.....	45
Figura 21. Espectro FT-IR-ATR de la quitosana acetilada con Anh/GlcN=30 con líneas base para el cálculo del DA.	46
Figura 22. Espectro de FT-IR de películas en el rango de 2000 a 400 cm^{-1} de quitosana Sigma Aldrich acetiladas con Anh/GlcN de 1 (DA=30,17%) y 15 (DA=50,63%).....	47
Figura 23. Espectros de ^1H -RMN de cloruro de quitosanas (Q-10, DA=10,66%) acetiladas a distintas razones Anh/GlcN.	48
Figura 24. Espectros de FT-IR-ATR de quitosana control (A), después de la reacción de acetilación (B) y luego del tratamiento con KOH (C). Reacción con AcCl/GlcN=6.....	49
Figura 25. Espectro FT-IR-ATR de la quitosana acetilada con AcCl/GlcN=6 con líneas base para el cálculo del DA.	50
Figura 26. Espectro FT-IR-ATR de la quitosana acetilada con AcCl/GlcN=2 con líneas base para el cálculo del DA.	51
Figura 27. Cromatogramas de quitosana disuelta, almacenada hasta 42 días, a 50 °C.....	53
Figura 28. Cromatogramas de las quitosanas expuestas a ultrasonido a 9 min y a secuencia de intervalos de 3 min.	54
Figura 29. Variación del grado de acetilación en función de la razón Anh/GlcN en los productos de la acetilación, a partir de quitosanas Sigma Aldrich (azul) y Q-10 (negro).....	56
Figura 30. Variación del peso molecular en función del tiempo de exposición al ultrasonido de la quitosana Sigma Aldrich.....	58
Figura 31. Esquema de acetilación y reducción del Mw de la quitosana Sigma Aldrich.....	59
Figura 32. Comparación de los cromatogramas de las quitosanas	

con diferentes grados de acetilación.	60
Figura 33. Relación entre el grado de acetilación, el peso molecular promedio en peso y peso molecular de la cadena más abundante de los productos acetilados con distintas razones Anh/GlcN, a partir de quitosana Q-10.	61
Figura 34. Relación entre el grado de acetilación y el peso molecular promedio en peso de los productos acetilados con anhídrido acético, en un rango cercano a 50%, a partir de quitosana Sigma Aldrich.	63
Figura 35. Relación entre la viscosidad y el grado de acetilación de los productos acetilados a distintas razones Anh/GlcN a partir de la quitosana Q-10.	64



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Asignación de las señales de la quitosana por FT-IR.....	25
Tabla 2. Estándares de pululano PSS utilizados para la curva de calibración para del GPC. Datos reportados por el fabricante.	33
Tabla 3. Valores de las constantes K y α según DA de la quitosana en 0,2 M HOAc/0,1 M NaOAc a 30 °C. Tomado de Wang et al (1991). ⁵³	36
Tabla 4. Grados de acetilación resultantes de la acetilación de las quitosanas Sigma Aldrich y Q-10 tratadas a distintas razones Anh/GlcN.	43
Tabla 5. Efecto del tiempo en el peso molecular y el índice de polidispersión de la quitosana a 4, 20 y 50 °C.	53
Tabla 6. Resultados del peso molecular promedio en peso de la reducción por ultrasonido de 42 a 123 min.	55



ABREVIATURAS

A	β -2-acetamida-D-glucopiranososa
AcCl/GlcN	Relación de moles de Cloruro de acetilo y moles de unidades desacetiladas
Anh/GlcN	Relación de moles de anhídrido acético y moles de unidades desacetiladas
[AMIM]Cl	Cloruro de 1-alil-3-metilimidazol
ASTM	American Society for Testing Materials
D	β -2-amina-D-glucopiranososa
DA	Grado de acetilación
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de permeación en gel
GlcN	D-glucosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
h	Hora
HOD	Agua semi deuterada
HOAc	Ácido acético
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de protón
min	Minuto
M_p	Peso molecular de la cadena más abundante
M_n	Peso molecular promedio en número
M_w	Peso molecular promedio en peso
M_w	Peso molecular
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
η_{inh}	Viscosidad inherente
η_{red}	Viscosidad reducida
η_r	Viscosidad relativa
η_{sp}	Viscosidad específica
NaOAc	Acetato de sodio
PDI	Índice de polidispersión (M_w/M_n)

s	Segundo
t	Tiempo
TMSP	Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d ₄
v/v	Relación volumen/volumen
w/v	Relación peso/volumen
w/w	Relación en peso



1. MARCO TEÓRICO

1.1. Quitosana

1.1.1. Introducción

Un grupo importante de los biopolímeros naturales son los polisacáridos, como la celulosa, el almidón, el glucógeno o la quitina, los cuales cumplen distintas funciones en la naturaleza. El almidón y el glucógeno tienen la función de almacenar energía en especies vegetales y animales, respectivamente, mientras que la celulosa y la quitina cumplen una función estructural. Algunos de estos biopolímeros también han tenido un papel importante en el desarrollo del hombre como, por ejemplo, la celulosa en la producción del papel.

La quitina ocupa el segundo lugar en la lista de los biopolímeros más abundantes en el planeta, ya que cumple un rol estructural en muchas especies del reino fungi y animal (crustáceos e insectos), proporcionando rigidez.¹ La quitina natural existe en tres formas cristalinas que se diferencian según su forma de empaquetamiento, estas son la α , β y γ . La α -quitina se encuentra en los caparazones de cangrejos, langostas y paredes celulares de hongos; la β -quitina, en calamares y la γ -quitina, de la cutícula de insectos. En el caso de la α -quitina, las cadenas están dispuestas en un arreglo anti-paralelo; en la β -quitina, en paralelo y en la γ -quitina, en una mezcla de la α y β .^{2,3} La extracción de quitina de la cutícula seca de crustáceos e insectos es de 72% y 64% en peso, respectivamente, mientras que de la masa seca de los hongos se puede extraer un 25% en peso.⁴ De los grupos mencionados, la fuente principal de quitina son los crustáceos, debido a su amplio consumo en la industria alimentaria. Aproximadamente, solo el 40% en masa de cangrejos, camarones y langostas es comestible, por lo que se generan anualmente entre 6 y 8 millones de toneladas de desperdicios de caparazones de estas especies.⁵

La quitina fue descrita y aislada por primera vez en 1811 por H. Braconnot, en un estudio de varias especies de hongos. Años después, en 1859, C. Rouget descubrió la quitosana tratando a la quitina en una solución caliente de hidróxido de potasio concentrado. Pero no fue sino hasta 1894 que F. Hoppe-Seyler le dio el nombre de quitosana. Desde su primera aparición, la quitosana ha sido objeto de estudio para diferentes aplicaciones en distintas ramas de la ciencia e ingeniería.⁶ Con este biopolímero, se busca desarrollar aplicaciones en

el transporte de fármacos,⁷ absorción de iones metálicos,⁸ la actividad antibacteriana,⁹ membranas¹⁰ e ingeniería de tejidos (andamios).¹¹

1.1.2. Composición y estructura química de la quitina y la quitosana

La quitina (a) es un polímero lineal conformado por solo unidades N-acetil-β-D-glucosamina (A), mientras que la quitosana (b) es un copolímero lineal conformado por unidades de N-acetil-β-D-glucosamina (A) y β-D-glucosamina (D),¹² como se observa en la figura 1. El grado de acetilación (DA) hace referencia al porcentaje de unidades N-acetil-β-D-glucosamina presentes a lo largo del polímero.¹³

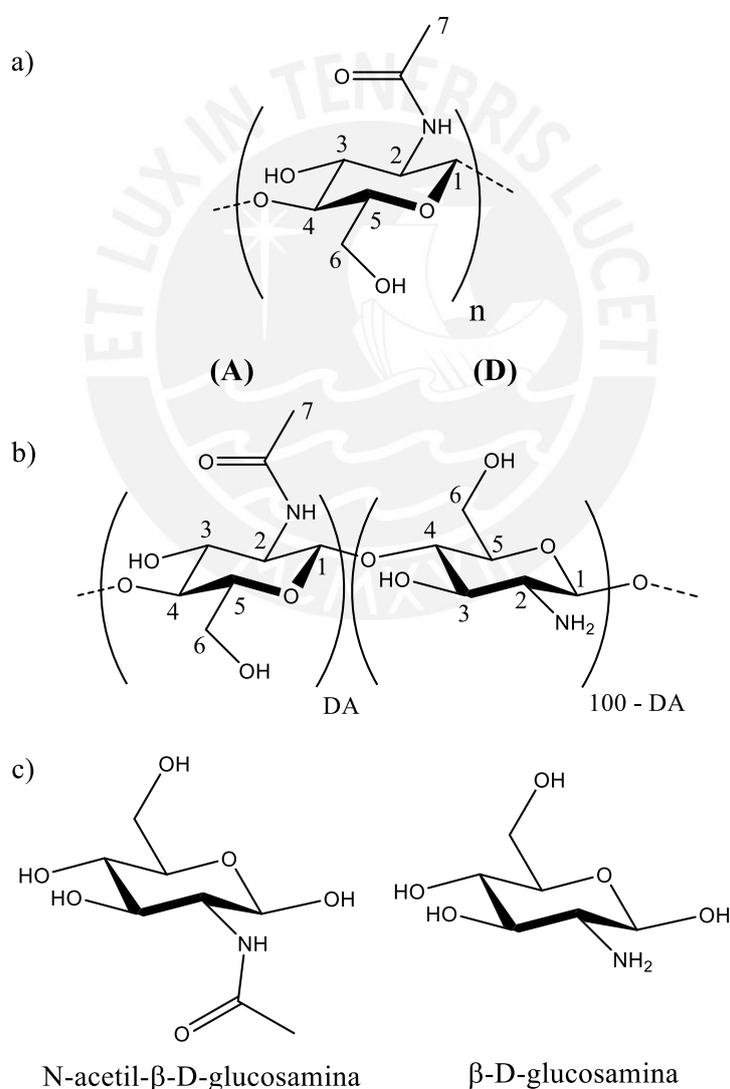


Figura 1. (a) Estructura de la quitina, (b) estructura de la quitosana, y (c) unidades constituyentes.

1.1.3. Obtención de quitosana a partir de la desacetilación de quitina

La quitosana es el principal producto de la desacetilación de la quitina; por ello, primero se debe extraer la quitina. Como se mencionó previamente (ver 1.1.1, introducción), la principal fuente de quitina son los caparazones de crustáceos. Sin embargo, dependiendo de la fuente de extracción, primero se deberá pasar por los siguientes procesos: desproteínización, desmineralización y decoloración, en ese orden. Debido a que en los caparazones de crustáceos, a diferencia de las cutículas de insectos y paredes celulares de hongos, existe una alta concentración de material inorgánico, la desmineralización es importante.^{14,15} En la desproteínización y decoloración se degradan las proteínas y los pigmentos en una solución alcalina de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, a una concentración entre 1-10% (w/v) y a una temperatura entre 30-100 °C, mientras que en la desmineralización se elimina principalmente el carbonato de calcio, entre otras sales metálicas presentes, en una solución de ácido clorhídrico a una concentración entre 20-25% (w/v) y a una temperatura de 15 °C.^{16,17}

Posteriormente, la quitina ya purificada es transformada en quitosana mediante un tratamiento en medio alcalino, generalmente con hidróxido de sodio o hidróxido de potasio concentrado, entre 40-50% (w/w), para su desacetilación (ver figura 2). Asimismo, las condiciones varían según el grado de acetilación (DA) y el peso molecular deseado, ya que con un mayor tiempo de tratamiento la quitosana se degrada más y, a su vez, se reduce más el DA.²

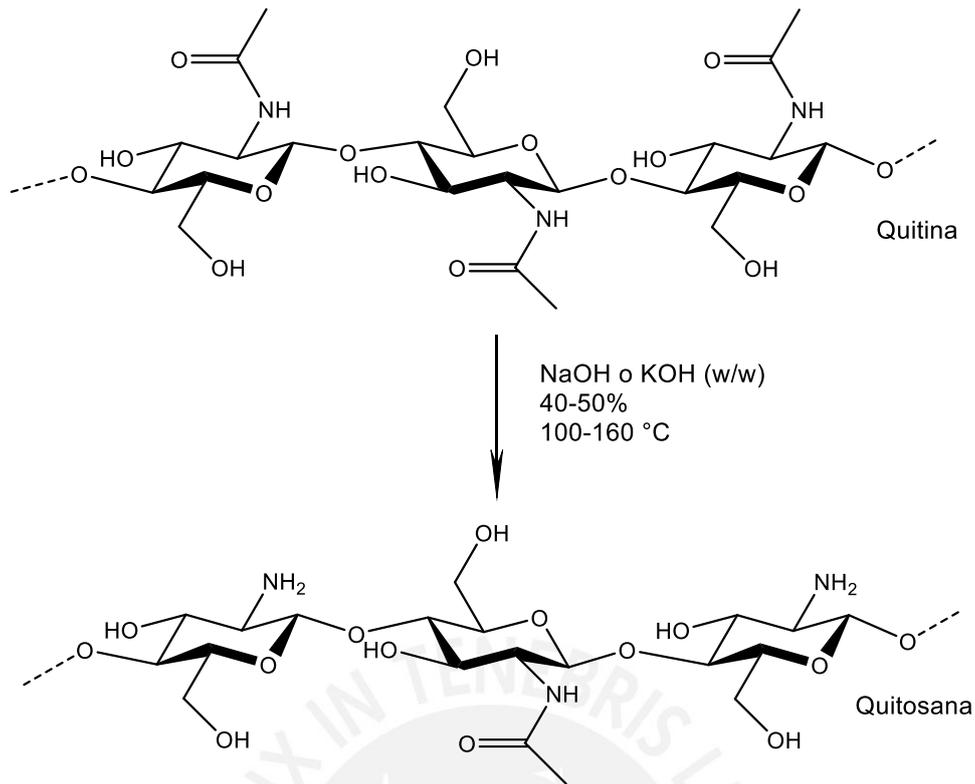


Figura 2. Esquema de la reacción de desacetilación de la quitina.

1.1.4. Acetilación de quitosana

En la búsqueda por mejorar sus propiedades para cada tipo de aplicación, la quitosana ha sido derivatizada de distintas formas. Inicialmente, se emplearon métodos con condiciones fuertes con distintos anhídridos carboxílicos, ácido clorhídrico concentrado y altas temperaturas de reacción.¹⁸ A diferencia de los anhídridos carboxílicos de cadenas largas de carbonos, como el lauroílo o palmitoílo, la acilación de la quitosana con anhídrido acético no requiere de condiciones tan extremas (ver figura 3).

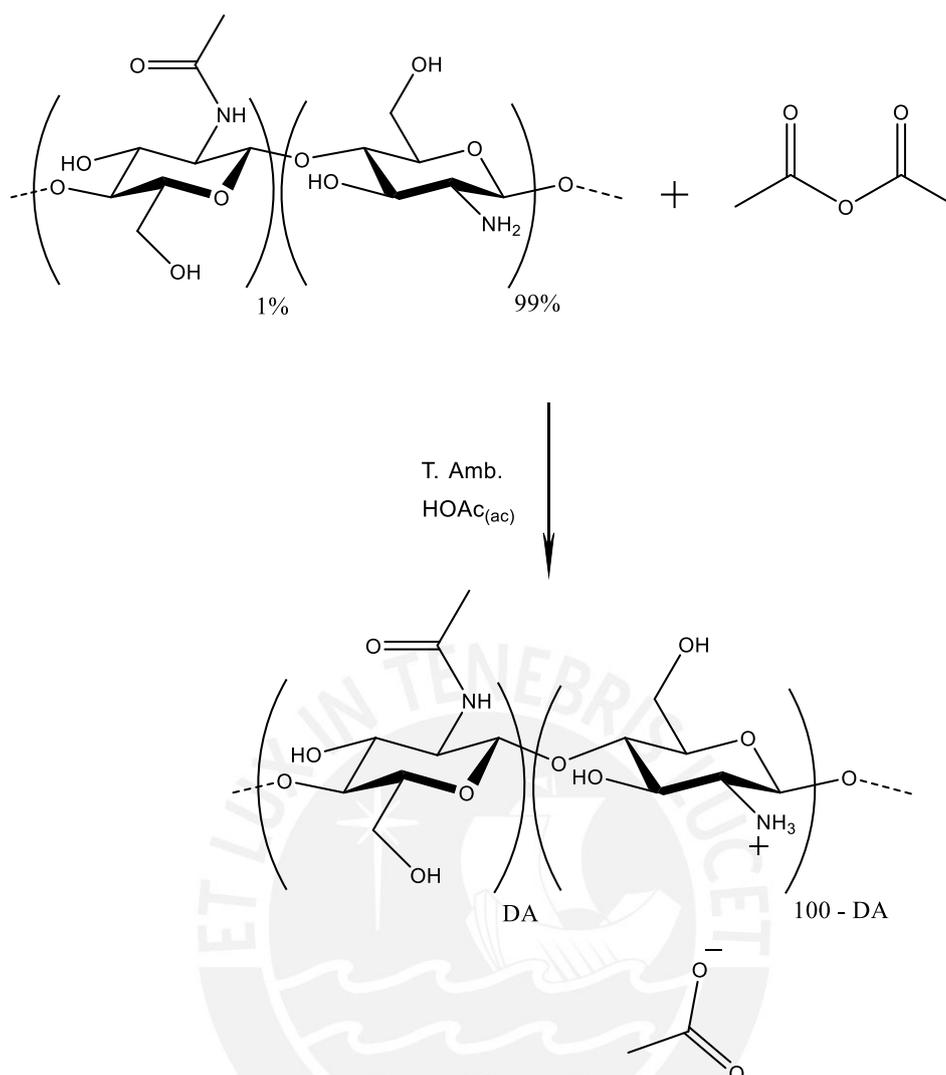


Figura 3. Reacción de acetilación de quitosana (bajo DA) con anhídrido acético.

Esta reacción de acetilación con anhídrido acético se puede llevar a cabo en medio acuoso ácido y a temperatura ambiente.¹⁹⁻²¹ Se ha estudiado el efecto de la adición de otros solventes a la solución de quitosana para variar el medio de reacción, por ejemplo con metanol,²²⁻²⁵ metanol-piridina^{26,27} y 1,2-propanodiol.^{28,29} La adición de metanol o 1,2-propanodiol evita la formación de dos fases cuando se emplean anhídridos hidrofóbicos. Además, cuando se añade piridina, esta ayuda a la desprotonación de los grupos amina a lo largo de la cadena, lo cual aumenta su reactividad y también ayuda a dispersar a la quitosana en su forma de precipitado hinchado.

Se ha reportado grados de acetilación promedio entre 15 y 89% con el empleo de metanol, 1,2-propanodiol y metanol-piridina. De estas, solo las quitosanas con un DA menor a 50%

fueron solubles. Las quitosanas con mayor DA, son insolubles por la insuficiencia de grupos amino, los cuales vuelven a la quitosana un polielectrolito catiónico en medio ácido.²⁸ Por otro lado, en todos los casos se ha reportado que, durante la reacción de acetilación, los grupos hidroxilos son también acetilados formando ésteres, lo cual es un indicativo de la falta de selectividad en la reacción.³⁰

El proceso de acetilación se puede separar en dos partes: la reacción y el tratamiento post reacción. En la primera, se empieza preparando una solución de quitosana en medio ácido, comúnmente ácido acético entre 2% y 10% (v/v), como se muestra en la Figura 4a. En el caso de la reacción directa, la reacción procede con la adición del anhídrido acético. Mientras que en el caso en el que se usan otros solventes, estos se añaden antes de proceder con la adición del anhídrido acético y con ello iniciar la reacción. En la segunda etapa, el tratamiento posterior a la reacción consta de un proceso de diálisis, en el que se eliminan el ácido acético y los solventes orgánicos presentes. Luego de ello, la solución está lista para el proceso de liofilizado, el cual extrae el agua de la solución por sublimación dejando la quitosana seca. Una vez aislada la quitosana se trata con una solución metanólica alcalina, generalmente de hidróxido de potasio, para la eliminación de los ésteres formados durante la reacción de acetilación.²¹ Finalmente, la quitosana es lavada con metanol repetidas veces para eliminar la base, como se observa en la figura 4b. Cabe resaltar que también se han estudiado métodos de acetilación homogéneos con cloruro de acetilo en líquidos iónicos.^{31,32}

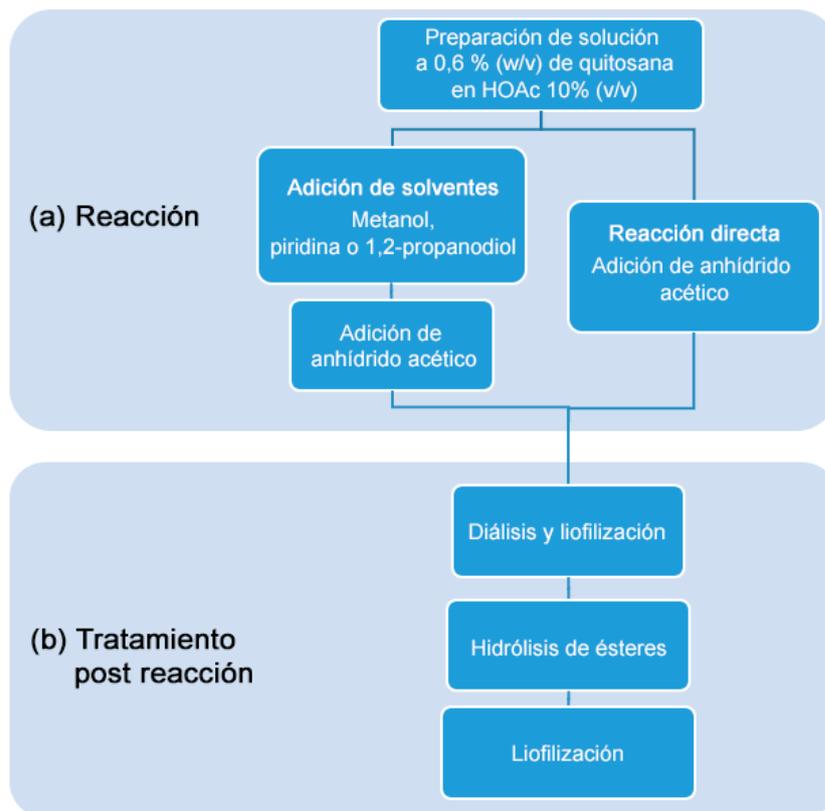


Figura 4. Etapas de la reacción de acetilación directa y con adición de otros solventes.^{21,24,25,27}

1.1.5. Reducción del peso molecular de la quitosana

La quitosana puede hidrolizarse por diversos métodos, entre los que principalmente se encuentran la vía enzimática, la hidrólisis ácida, la aplicación de ultrasonido y la reacción con ácido nitroso. Además, se ha reportado la reducción del peso molecular de la quitosana con aplicación de ondas de microondas y con peróxido de hidrógeno.^{15,33}

Para la hidrólisis por vía enzimática se emplean enzimas conocidas como quitosanasas. Estas se extraen de bacterias, como por ejemplo de la *Streptomyces griseus*. La reducción del peso molecular de la quitosana se logra por un ataque al enlace glucosídico.³⁴ Dependiendo del modo de acción de las quitosanasas estas se pueden separar en tres clases. La primera clase son enzimas capaces de romper los enlaces glucosídicos GlcN-GlcN y GlcNAc-GlcN; las segundas, solo cortan el enlace GlcN-GlcN; y las terceras, los enlaces GlcN-GlcN y GlcN-GlcNAc.^{35,36} Además, se ha hallado actividad de otras enzimas, como las celulasas, capaces de hidrolizar a la quitosana por tener una estructura similar.³⁷

La hidrólisis ácida ha sido ampliamente estudiada con diversos ácidos, debido a que la quitosana es muy sensible en medio ácido.³⁸ Entre los ácidos usados se encuentran, por ejemplo, el ácido clorhídrico, fosfórico, sulfúrico y trifluoroacético, ya que la quitosana no es soluble en medio acuoso a pH neutro, pero si a un pH menor que siete.³⁹⁻⁴³ Esta hidrólisis del enlace glucosídico sigue una reacción de tipo S_N1, en donde el paso limitante de la reacción es la formación del ion carbonio-oxonio, el mecanismo se muestra en la figura 5. En esta se observa como primera etapa la protonación del oxígeno del enlace glucosídico, seguido de la heterólisis del enlace oxígeno – carbono, formándose el ion cíclico carbonio-oxonio. Luego, en la tercera etapa, la reacción con agua forma un hidroxilo en el carbocación y, finalmente, ocurre la regeneración del catalizador hidronio.⁴⁴ Además, la quitosana en medio ácido puede sufrir una desacetilación parcial, lo cual ocurre más lentamente que la hidrólisis del enlace glucosídico.⁴⁵

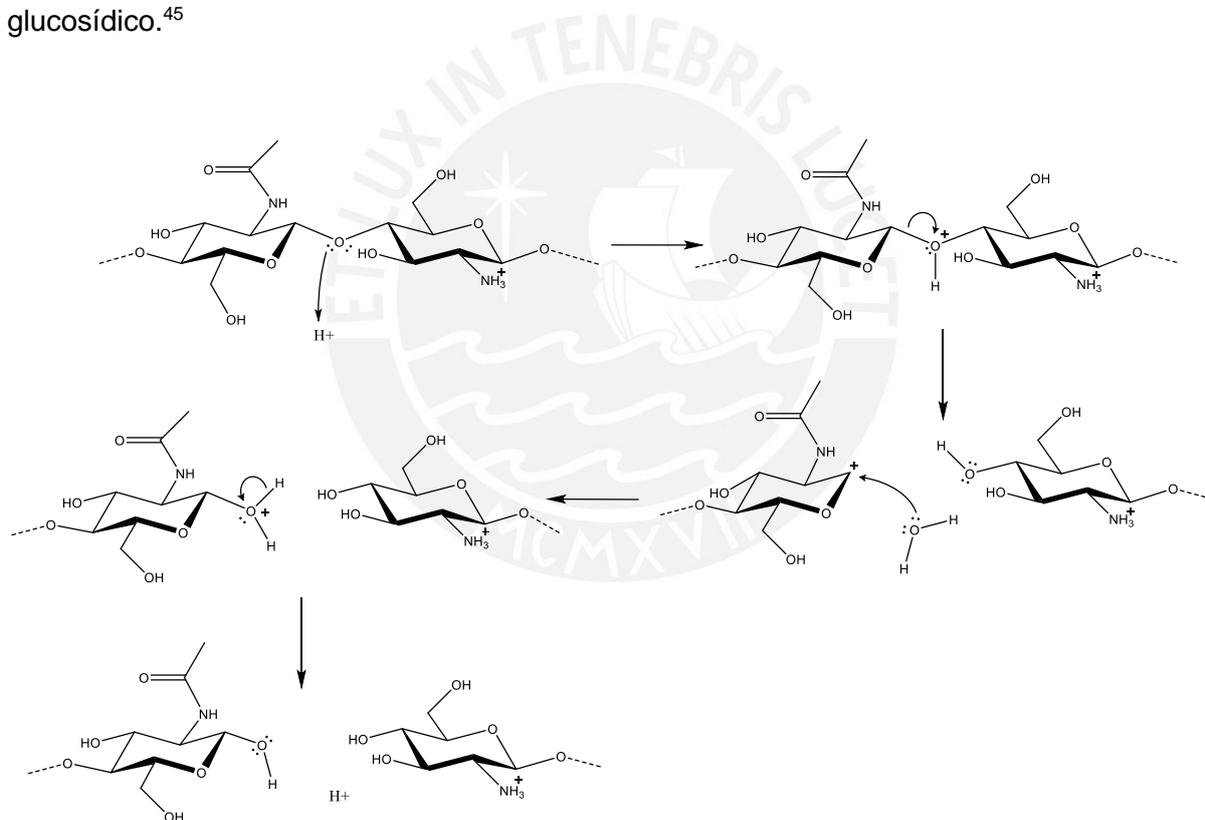


Figura 5. Mecanismo de la hidrólisis del enlace glucosídico en medio ácido.

La reducción del peso molecular de la quitosana por ultrasonido en solución acuosa ácida ha demostrado ser rápida y una alternativa al tratamiento con ácidos fuertes como los mencionados en el párrafo anterior. Se emplea generalmente ácido acético a baja concentración, entre 1-12% (v/v), el cual además sirve como solvente.⁴⁶ Se ha reportado en

la literatura exposiciones a ultrasonido a distintos intervalos de tiempo, temperaturas y concentraciones.⁴⁷

Se ha reportado que la quitosana de alto peso molecular es degradada por ultrasonido sin afectar el grado de acetilación.⁴⁸ Sin embargo, también se ha demostrado que a periodos largos de exposición, la quitosana sí puede perder grupos acetilo, reduciendo así el grado de acetilación.⁴⁹

Por último, la despolimerización oxidativa con ácido nitroso (HONO) concentrado, ha demostrado ser selectivo, ya que la hidrólisis del enlace glucosídico ocurre únicamente entre las unidades GlcN-GlcN y GlcN-GlcNAc o GlcNAc-GlcN. Además, es una reacción rápida y fácil de controlar, ya que se da en una relación de moles de 1:1 (HONO:GlcN). Sin embargo, se forma el 2,5-anhidro-D-manosa como unidades terminales de las cadenas hidrolizadas.⁵⁰

1.1.6. Caracterización

Para poder conocer el grado de acetilación, la distribución de las unidades repetitivas, el peso molecular y el índice de polidispersión, la quitosana se puede caracterizar por varias técnicas analíticas. Por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución se puede determinar el grado de acetilación y el tipo de distribución de las unidades repetitivas en la cadena polimérica. Con el ¹H RMN se puede calcular el grado de acetilación o desacetilación a partir de las ecuaciones (1) a (4), mostradas a continuación, donde H_1D , H_2D , H_1A Y H_7A son las integrales de las señales a 4,87 ppm, 3,20 ppm, 4.55 ppm y 2.01 ppm, respectivamente. Las señales con denominación "D" corresponden a las unidades desacetiladas, y la denominación "A", a las unidades acetiladas.⁵¹ La diferencia en el uso de los términos DDA y DA se asocia al procedimiento de desacetilación y acetilación, respectivamente.

$$\left[\frac{H_1 D + H_2 D}{2} \right] = \text{Proporción de unidades "D" (D)} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\left[\frac{H_1 A + \frac{H_7 A}{3}}{2} \right] = \text{Proporción de unidades "A" (A)} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\left[\frac{A}{D + A} \right] * 100 = \text{Grado de acetilación (DA) (\%)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Se ha reportado en la literatura el uso de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) para hallar el grado de acetilación como un método empírico alternativo. Brugnerotto et. al,⁵² hallaron una relación lineal a partir de los espectros de infrarrojo de varias quitosanas con diferentes grados de acetilación en el rango de 0 a 100%. La ecuación propuesta se muestra a continuación:

$$DA (\%) = 31,92 * \frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 1,22 \quad (r = 0,99) \quad \text{Ecuación 4}$$

en donde A_{1320} es la altura del pico de la señal a 1320 cm^{-1} a la línea base y A_{1420} es la altura del pico de la señal a 1420 cm^{-1} a la línea base. El DA obtenido a partir de la ecuación 4 empleando el espectro en transmitancia posee una diferencia menor de 15% al calculado con el espectro en absorbancia. Además, esta técnica permite la identificación de una posible esterificación en la reacción de acetilación, debido a la aparición de un pico a 1730 cm^{-1} .⁵²

Otra técnica usada comúnmente en la caracterización de polímeros para hallar la masa molecular y el volumen hidrodinámico es la viscosimetría capilar. Con esta técnica se puede hallar la viscosidad intrínseca y con ello la masa molar promedio a través de la ecuación de Mark-Houwink (ecuación 5) que relaciona a ambas. En ella, $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca del polímero, M_v es la masa molar promedio de viscosidad, y tanto K como α son constantes y dependen del sistema; es decir, del solvente-polímero y de la temperatura, para el caso de la quitosana, además depende de su grado de acetilación.⁵³ El exponente α se asocia a la afinidad entre el polímero y el solvente, por lo que a valores grandes de α , se espera un aumento en la viscosidad y resulta en un estiramiento de la cadena.

$$[\eta] = K M_v^\alpha \quad \text{Ecuación 5}$$

Las siguientes ecuaciones son empleadas para el cálculo de la viscosidad intrínseca, mediante el uso del valor promedio de la ordenada según el método de Huggins y kraemer, los cuales hacen uso de la viscosidad reducida e inherente, respectivamente.

<i>Viscosidad relativa</i>	$\eta_r = \frac{t}{t_0}$	<i>Ecuación 6</i>
----------------------------	--------------------------	-------------------

<i>Viscosidad específica</i>	$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$	<i>Ecuación 7</i>
------------------------------	-----------------------------------	-------------------

<i>Viscosidad reducida</i>	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$	<i>Ecuación 8</i>
----------------------------	------------------------------------	-------------------

<i>Viscosidad inherente</i>	$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_r)}{c}$	<i>Ecuación 9</i>
-----------------------------	--------------------------------------	-------------------

<i>Viscosidad intrínseca (metodo de Huggins)</i>	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)$	<i>Ecuación 10</i>
------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------	--------------------

<i>Viscosidad intrínseca (método de Kraemer)</i>	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln(\eta_r)}{c} \right)$	<i>Ecuación 11</i>
------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	--------------------

Finalmente, por cromatografía de permeación en gel (GPC) o también conocida como cromatografía por exclusión de tamaños (SEC), se puede hallar la distribución de las masas molares en función del tamaño, el cual dependerá del volumen hidrodinámico del polímero. Por ello, esta técnica emplea una columna que permite la separación en distintos tiempos de retención; es decir, cuanto más grande sea el volumen hidrodinámico de la cadena del polímero mayor será el tiempo empleado y, por lo tanto, eluyen a volúmenes menores, mientras que las cadenas pequeñas son retenidas en los poros del gel en la columna, por lo que eluyen a tiempos de retención mayores.⁵⁴ Otro dato que se obtiene por esta técnica es el índice de polidispersión (PDI) que es una medida de la dispersión en los tamaños de las cadenas del polímero, y que involucra la relación entre el peso molecular promedio en peso (M_w) y el peso molecular promedio en número (M_n), como se observa en las ecuaciones 12, 13 y 14.

$$M_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad \text{Ecuación 14}$$

donde w_i es el peso del conjunto de moléculas con un peso molecular específico M_i , en una población donde N_i es el número de moléculas totales. Por lo que se espera que el M_w sea mayor que el M_n y por lo tanto a valores de PDI cercanos a 1 se les considera de una población homogénea.⁵⁵ En esta cromatografía, se debe emplear estándares de pululano para la determinación, mediante una curva de calibración, de los pesos moleculares. Este polímero, al igual que la quitosana, es un polisacárido y es disuelto en la misma fase móvil que la quitosana.

1.1.7. Propiedades

A nivel industrial, La quitosana se produce principalmente a partir de la quitina que se encuentra en los caparazones de crustáceos que resultan de desechos de la industria alimenticia. Las propiedades de la quitosana están fuertemente vinculadas al DA y peso molecular.⁵⁶

La quitosana ha sido ampliamente estudiada y actualmente se evalúan diversas aplicaciones por sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas como, por ejemplo, su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioadhesividad, función antitrombogénica, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, no alergénica, fungicida, actividad inmunoadyuvante, no toxicidad, su capacidad como hidratante, espesante, gelificante, filmogénica y antiolesterolémico.⁵⁷

En cuanto a la solubilidad, la quitina es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos y en soluciones acuosas ácidas debido a su alta cristalinidad generada por la compactación de las cadenas y por la abundancia de grupos amida que reducen aún más la interacción con el agua, dificultando la solvatación. Esta insolubilidad hace difícil desarrollar aplicaciones directamente con la quitina. En cambio, la quitosana es muy soluble en soluciones acuosas (pH<7) debido, principalmente, a la protonación de los grupos amino a lo largo de su cadena

(pKa de 6,3). Por un lado, una variación en el DA cambiaría el número de grupos amino libres en la quitosana. Con ello, el número de los grupos amino protonados en medio ácido podría afectar la solubilidad de la quitosana. Por otro lado, se puede aumentar la solubilidad al reducir el tamaño de las cadenas de quitosana, Aunque, con ello la viscosidad también se reduce. Esto la hace más versátil y de mayor interés para potenciales aplicaciones.⁵⁸

La quitosana puede además formar geles por entrecruzamiento, dando lugar a estructuras basadas en enlaces covalentes, con ayuda de agentes de entrecruzamiento, y también por redes de puentes de hidrógeno.⁵⁹ También puede ser precipitada en un medio alcalino, dando como resultado la formación de perlas, fibras u otras formas. Por ello se espera aprovechar estas características en el desarrollo de aplicaciones en sectores industriales como en biomedicina con la fabricación de apósitos, farmacéutica, con el transporte de fármacos y textiles.⁶⁰



2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio fue la generación de quitosanas con grados de acetilación (DA) y pesos moleculares a medida.

Objetivos específicos:

- Obtener quitosanas con DA deseado a partir de la acetilación de quitosanas muy desacetiladas.
- Reducir el peso molecular de la quitosana de manera controlada por ultrasonido y en medio ácido.



3. JUSTIFICACIÓN

A nivel industrial se producen quitosanas no solo con diferentes grados de pureza, sino también con rangos amplios de pesos moleculares (Mw) y grados de acetilación (DA). Al no ser la quitosana un producto que proviene de una sola fuente natural, sus características cambian de acuerdo a la fuente y al proceso por el cual es obtenida. Como se mencionó anteriormente, las propiedades de la quitosana dependen del DA y el Mw, por lo que es muy importante conocerlas. Por lo general, y en el mejor de los casos, los productores de quitosana indican el grado de desacetilación como un rango amplio y no cuantitativo. Además, es común que solo se indique si se trata de un polímero de alto, medio o bajo peso molecular, mientras que los valores de pesos promedios y el índice de polidispersión (PDI), por lo general, no son proporcionados.

Lo ideal es que se analice cada lote producido, en cuanto a peso molecular (y PDI) y grado de desacetilación. Estos son parámetros cruciales que determinan las características y propiedades de la quitosana, como se verá en los resultados del presente trabajo, y esto puede implicar que un producto sea o no adecuado para una aplicación determinada.

La determinación absoluta del peso molecular de un polímero requiere de técnicas costosas y complejas como son los análisis de dispersión de luz o espectrometría de masas. Por ello, generalmente, se utilizan técnicas relativas, que son más simples y rutinarias como la cromatografía de permeación en gel (GPC) y viscosimetría.⁶¹ La desventaja de estas dos técnicas es que no son absolutas, sino que requieren de estándares del polímero a analizar. Sin embargo, es muy difícil conseguir estándares de quitosana, por lo que se debe utilizar a modo de referencia estándares de otro polímero. Si bien existen polímeros con características similares a la quitosana, dado que la quitosana posee una estructura compleja y variada (posibilidad de diferentes valores de DA), no hay un estándar que se le compare totalmente.⁶²

A esto se debe añadir otro grado de complejidad. La quitosana, al disolverse en medio ácido forma un polielectrolito catiónico en el que la densidad y distribución de las cargas afecta directamente la conformación que adopta la cadena polimérica en solución; asimismo, afecta su volumen hidrodinámico. Por ello, en el caso de la quitosana, a diferencia de la mayoría de polímeros, el volumen hidrodinámico depende no solo del Mw, sino también del DA.

Por lo mencionado, es necesario poder desarrollar una metodología para poder disponer de quitosanas con DA y Mw definidos y bien caracterizados. Esto es muy importante, puesto que podrían servir directamente en el desarrollo de aplicaciones especializadas como, por ejemplo, en el campo biomédico, farmacéutico, textil, cosmético y agricultura.⁶⁰



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos, equipos y materiales

4.1.1. Reactivos

Los reactivos usados fueron de grado analítico y no fueron purificados, a menos que se indique lo contrario.

- Quitosana de peso molecular medio en polvo Sigma-Aldrich 448877, lote #STBG5137V
- Quitosana desacetilada (Q-10) producida en un estudio previo por el Grupo de Modificación de Materiales (DA=10,6%, Mw=1 206 400 Da)
- Perlas de hidróxido de sodio de Macron y Movilab
- Estándares de pululano PSS Polymer Standards Service GmbH (10–2000 kDa).
- Agua ultrapura (grado milli-Q pH 6,01 y resistividad de $18,2 \times 10^6 \Omega \text{ cm}$) obtenida de un sistema de osmosis inversa y filtración con filtro de fibra hueca con tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ Barnstead D3750 Nanopure
- Anhídrido acético de Riedel-de-Haën
- Amoniacó concentrado (14,8 M)
- **JT-Baker**
 - Perlas de hidróxido de potasio
 - Metanol 99,93% (v/v) para análisis
 - Etanol absoluto para análisis
- **Merck**
 - Ácido acético glacial (HOAc) para análisis
 - Acetato de sodio trihidratado ($\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) para análisis
 - Cloruro de acetilo (AcCl) para análisis
 - Dióxido de deuterio (D_2O) 99,8%
 - Cloruro de deuterio (DCI) 20% en D_2O 99%
 - Cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio ([AMIM]Cl) >97%

4.1.2. Equipos

Los equipos que se mencionarán a continuación son propiedad de la Pontificia Universidad Católica del Perú, ubicados en la sección química.

- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Ascend de 500 MHz. El equipo posee un imán superconductor de 11,7 T, una sonda CP TCI de 500 MHz, una unidad de temperatura variable BCU I y una consola Bruker Advance III HD. Para el procedimiento de los espectros se utilizó el programa TopSpin 3.5 pl7 con licencia académica.
- Espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer modelo Frontier. Consta de una fuente de luz láser de He-Ne; un detector LiTaO₃ (tantalato de litio), una barra de carburo de silicio como fuente de radiación, un detector MCT y un adaptador de ATR (Universal ATR). Para el procesamiento de los espectros se utilizó el programa OriginPro 2016.
- Cromatógrafo de permeación en gel Malvern Viscotek GPC system con un detector de índice de refracción y un *loop* de 100 μ L. 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 μ m con un rango de separación de 5–3000 kDa. Para el procesamiento de los cromatogramas se empleó el programa OmniSEC versión 4.6.2.
- Viscosímetro Ubbelohde de Technical glass products Inc. 1C ($K= 0,02871 \text{ mm}^2/\text{s}^2$), con un baño termostático con recirculador Julabo MP.
- Sonicador Sonics sonifier VCX 750 ($\nu=20 \text{ kHz}$) con una punta modelo Cv334 630-0219 (diámetro de 13 mm, longitud de 139 mm, amplitud de 40%).
- Liofilizador Labconco modelo 4.5, a 10^{-2} mbar y $-44 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Liofilizador Yamato modelo DC401, a 10-20 Pa y $-45 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.1.3. Materiales

- Membrana de diálisis *Spectrum Laboratories, Inc* con diámetro de 29 mm y un peso molecular de retención de 3,5 kDa.
- Membrana de diálisis *Spectrum Laboratories, Inc* con diámetro de 10 mm y un peso molecular de retención de 1000 kDa.

- Filtros de jeringa Merk-Millipore compuestos de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm y diámetro de 13 y 33 mm.
- Filtro de membrana Merck-Millipore compuestos de membrana de nylon del tipo GNWP con tamaño de poro de 0,2 μm .
- Filtros de papel Whatman 4 de 90 mm de diámetro con tamaño de poro entre 20 a 25 μm .
- Placas petri de poliestireno de 60x15 mm de ISO LAB.
- Tubos de centrifuga de 50 mL, de 30 x 120 mm con base, de ISO LAB.

4.2. Metodología

4.2.1. Caracterización de la quitosana

4.2.1.1. Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Por un lado, se prepararon películas con la quitosana inicial y con los productos de la acetilación solubles en medio ácido. Para ello, se prepararon soluciones con concentración de 0,25% y 1% (w/v) en ácido acético al 1% (v/v). Las soluciones fueron vaciadas en cantidades suficientes para cubrir la placa petri de poliestireno, algunas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 48 h. De esa forma se consiguieron láminas transparentes de quitosana, la cuales, una vez secas, fueron colocadas en una cámara de vacío por 72 a 120 h a temperatura ambiente para facilitar su separación de la placa petri. Las láminas fueron luego lavadas con 15 mL de una solución de metanol y amoníaco al 25% (v/v) (relación $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_3$ de 30:1, en volumen) por 10 minutos. Luego, las películas se lavaron con metanol puro 3 veces, y finalmente se dejaron secar en estufa a 50 °C para eliminar los restos del solvente. Por otro lado, los productos de acetilación insolubles se analizaron por reflectancia total atenuada (FT-IR-ATR). Las mediciones se realizaron con dieciséis barridos a una resolución de 4 cm^{-1} .

4.2.1.2. Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN)

Para este análisis se siguió la norma ASTM F2260-03 (2018):⁵¹ se disolvió 10 mg de quitosana en 700 μL de D_2O y 120 μL de $\text{DCI} / \text{D}_2\text{O}$ al 2% (v/v) con agitación y calentamiento por 15

minutos a 40 °C, seguido de 45 minutos más a temperatura ambiente, para obtener una solución de cloruro de quitosana. Además, se usaron los siguientes parámetros para el análisis:

- Barridos: 64
- Tiempo de adquisición: 4,096 s
- Tiempo de relajación: 5 s
- Pulso: 90°
- Temperatura: 70 °C

4.2.1.3. Análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC)

Para este análisis se siguió la norma ASTM F2602-13 (2013),⁶² la cual indica el uso de una solución tampón con un pH de 4,5, de ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,1 M en agua Milli-Q como fase móvil. Esta solución tampón se filtró al vacío utilizando un filtro de membrana de 0,20 µm. Las muestras y estándares de pululano de PSS de distintos pesos moleculares (10–2000 kDa) se disolvieron en la misma solución tampón a una concentración de 1,5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente, por 1 hora a 20 °C y luego se filtraron con filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 µm.

Las muestras y estándares de pululano se inyectaron en el cromatógrafo, el tiempo de separación fue de 40 minutos a un flujo de 0,5 mL/min en una columna para polímeros catiónicos en medio acuoso Novema Max analytical linear XL, con un rango de 5 a 3000 kDa, a una temperatura de 35 °C.

4.2.1.4. Análisis por viscosimetría capilar

El análisis por viscosimetría capilar se realizó con una solución tampón de ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,1 M en agua Milli-Q, la misma empleada para el análisis por GPC. Las muestras se disolvieron a una concentración de 1,2 mg/mL y luego se filtraron con filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro. Las mediciones de viscosidad se realizaron a 30 °C y se efectuaron tres diluciones, en las que se midió cinco veces el tiempo de flujo para cada concentración.^{53,63}

4.2.2. Acetilación de la quitosana

4.2.2.1. Acetilación con anhídrido acético

La quitosana Sigma Aldrich y la quitosana previamente desacetilada por el Grupo de Modificación de Materiales (Q-10, DA=10%), pasaron por los procesos mencionados en la figura 6. Primero, en el caso de la quitosana Sigma Aldrich, esta se purificó disolviendo la quitosana en una solución al 2% (w/v) con ácido acético al 1% (v/v) y filtrando a presión, debido a la alta viscosidad de la solución. Luego la quitosana se precipitó en una solución de NaOH (0,7 M) con etanol (en una relación de 9:1, NaOH 0,7 M:EtOH). Finalmente, se filtraron las perlas de quitosana, se lavaron repetidas veces con agua hasta alcanzar un pH neutro y se liofilizaron, para luego ser usadas en la reacción de acetilación.

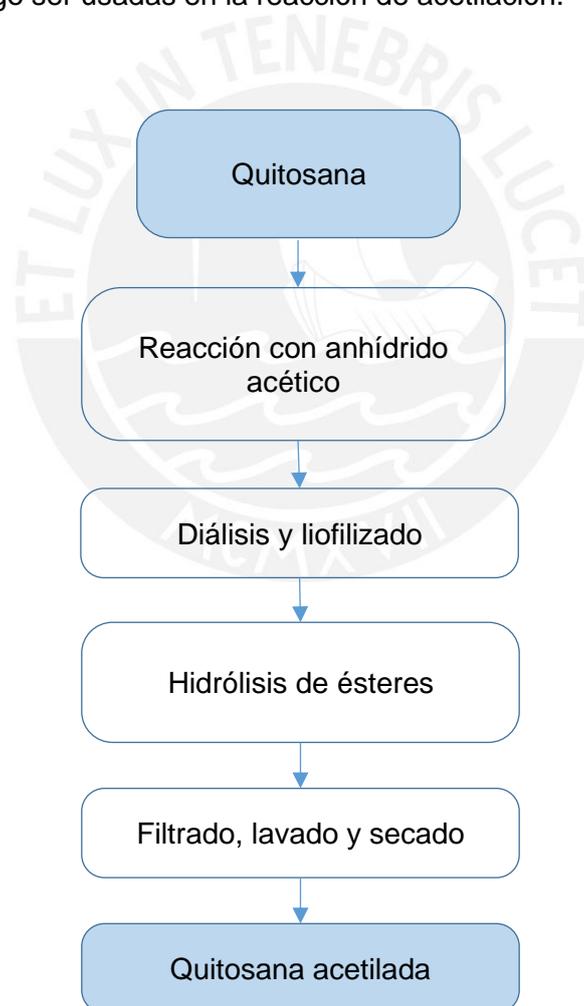


Figura 6. Método de acetilación de quitosana con anhídrido acético.

Segundo, se prepararon soluciones con la quitosana Sigma Aldrich purificada (DA=24,3%, Mw=1632 kDa) y con la quitosana Q-10 (DA=10,7%, Mw=1206 kDa) a una concentración de 0,6% (w/v) con ácido acético al 10% (v/v). Además, se preparó una solución control, a la cual no se le hizo reaccionar con el anhídrido acético. Luego, a temperatura ambiente y bajo agitación, se añadió una cantidad de anhídrido acético en función a una razón de moles de anhídrido/moles de amina libre (Anh/GlcN) entre 0 y 25. Después de 5 horas de reacción, se trasvasó la solución a una membrana de diálisis y se dejó 4 días en agua destilada, con cambios de agua cada 12 horas. Una vez eliminado el ácido acético de la solución, se liofilizó, para luego tratar a la quitosana acetilada con una solución de KOH al 5% (w/v) en metanol por 5 horas, para conseguir la hidrólisis de los ésteres formados a partir de los grupos hidroxilo. Finalmente, la quitosana se filtró al vacío, se lavó con agua destilada y luego con metanol, y se dejó secar en estufa a 50 °C.^{19,21,27}

4.2.2.2. Acetilación con cloruro de acetilo

Se prepararon soluciones de quitosana en un vial con el líquido iónico cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio ([AMIM]Cl) a una razón de moles de [AMIM]Cl y moles de quitosana de 42. Estas soluciones se dejaron por 12 horas bajo atmósfera de nitrógeno, a 85 °C (baño de silicona) y con agitación. Además, se preparó una solución control, a la cual no se le hizo reaccionar con el cloruro de acetilo. Después, se dejó enfriar la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente. Luego, se añadió el cloruro de acetilo a dos razones (2 y 6) de moles de cloruro de acetilo/moles de amina libre en la quitosana (AcCl/GlcN), para así obtener quitosanas con distintos DA. La solución se calentó a 75 °C durante 6 horas bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación. Finalizada la reacción, se aisló la quitosana al añadir agua milli-Q en una relación de volumen de 3:1 (agua:solución), luego se centrifugó y se lavó con agitación con agua milli-Q y metanol, 3 veces con cada solvente. También, se disolvió el producto en ácido acético 1%, luego se dializo por 4 días y se liofilizo. Posteriormente, se hizo el tratamiento post reacción con la solución metanólica de KOH 5% (w/v) por 5 horas. Finalmente, se lavó con metanol 3 veces y se deja secar en estufa a 50 °C.^{31,32}

4.2.3. Control del peso molecular de la quitosana

4.2.3.1. Reducción del peso molecular de la quitosana con ultrasonido

Se prepararon soluciones de 20 mL de quitosana Sigma Aldrich y quitosanas acetiladas a una concentración de 1,5% (w/v) con una solución tampón de ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,1 M en agua Milli-Q (pH=4,5). A estas soluciones se les aplicó ultrasonido a un tiempo de 9 minutos seguidos y 9 minutos en 3 intervalos de 3 minutos con descansos de 8 minutos en baño de hielo (ver figura 7).⁶⁴ Además, este procedimiento se extendió hasta los 123 minutos (41 veces 3 min) y con descansos en baño de hielo. Se hizo el análisis por GPC durante el desarrollo de cada experimento.

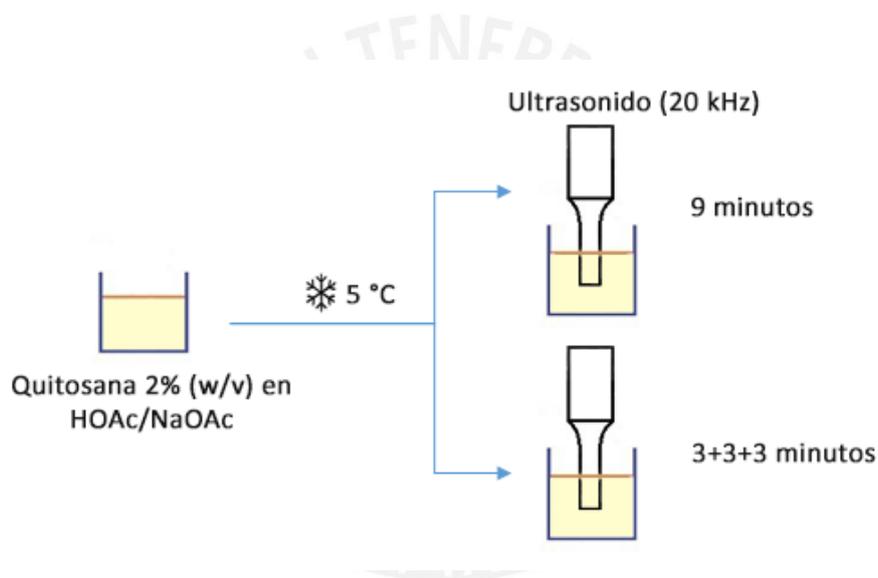


Figura 7. Esquema del procedimiento de la reducción del peso molecular con ultrasonido.

4.2.3.2. Reducción del peso molecular de la quitosana en medio ácido

Se prepararon soluciones de 150 mL de quitosana Sigma Aldrich a una concentración de 1,5 mg/mL con una solución tampón (pH=4,5) de ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,1 M en agua Milli-Q. Se evaluó la reducción del peso molecular de la quitosana en medio ácido separando la solución en tres partes iguales y exponiéndolas a distintas temperaturas, 4, 20 y 50 °C, por un periodo de un mes y medio. Se hizo un análisis por GPC cada 14 días por 4 semanas y luego cada 7 días por 2 semanas para cada temperatura.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la muestra

5.1.1. Determinación del grado de acetilación de la quitosana por FT-IR

Esta técnica brindó información sobre los grupos funcionales y el grado de acetilación (ver tabla 1). Para el análisis por FT-IR de la quitosana de partida de Sigma Aldrich (DA=24,31%), así como de las quitosanas acetiladas y solubles en medio ácido, se emplearon películas delgadas, mientras que las quitosanas muy acetiladas e insolubles se analizaron por reflectancia total atenuada (FT-IR-ATR). Por este último, la quitosana se puede medir directamente, mientras que por transmisión se debe conseguir una película delgada y con poca rugosidad.^{65,66}

En la figura 8, se observan los espectros IR de la quitosana Sigma Aldrich por transmisión y por ATR. En la medición por transmisión, todas las longitudes de onda atraviesan a la muestra, mientras que por ATR se realiza un análisis superficial de la muestra, en donde la profundidad de penetración del haz está en función de la longitud de onda y de la diferencia entre el índice de refracción de la quitosana y el cristal del equipo. El resultado en el espectro de ATR (ver figura 8, espectro rojo) es una disminución en la intensidad de las bandas a mayores números de onda y un aumento de la intensidad a menores números de onda.

Hay estudios empíricos para el cálculo del DA a partir de espectros por transmisión, en los cuales se considera una relación entre las intensidades de los picos a 1417 y 1313 cm^{-1} para el cálculo. Por lo mencionado, en lo posible, se opta por usar un análisis por transmisión debido a que refleja mejor la composición de la quitosana (afectado por el DA), ya que el haz atraviesa toda la película. Es por ello que en este estudio se optó por emplear la espectroscopía FT-IR por transmisión, en lugar de ATR para el análisis de las quitosanas acetiladas y solubles, mientras que las insolubles fueron analizadas por ATR para hallar una aproximación del DA.

Tabla 1. Asignación de las señales de la quitosana por FT-IR.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3450	Estiramiento O-H, C-N del grupo amida y N-H del grupo amina
2919 – 2868	Estiramiento C-H (carbonos sp ³)
1730	Estiramiento C=O del grupo éster
1655	Estiramiento C=O de la amida
1580	Flexión N-H del grupo amida
1420	Flexión N-H de la amina
1380	Flexión C-H del -CH ₃ del grupo amida
1320	Estiramiento C-N del grupo amida
1154	Tensión asimétrica C-O-C del enlace glucosídico
1080 – 896	Señales correspondientes a la estructura piranósica

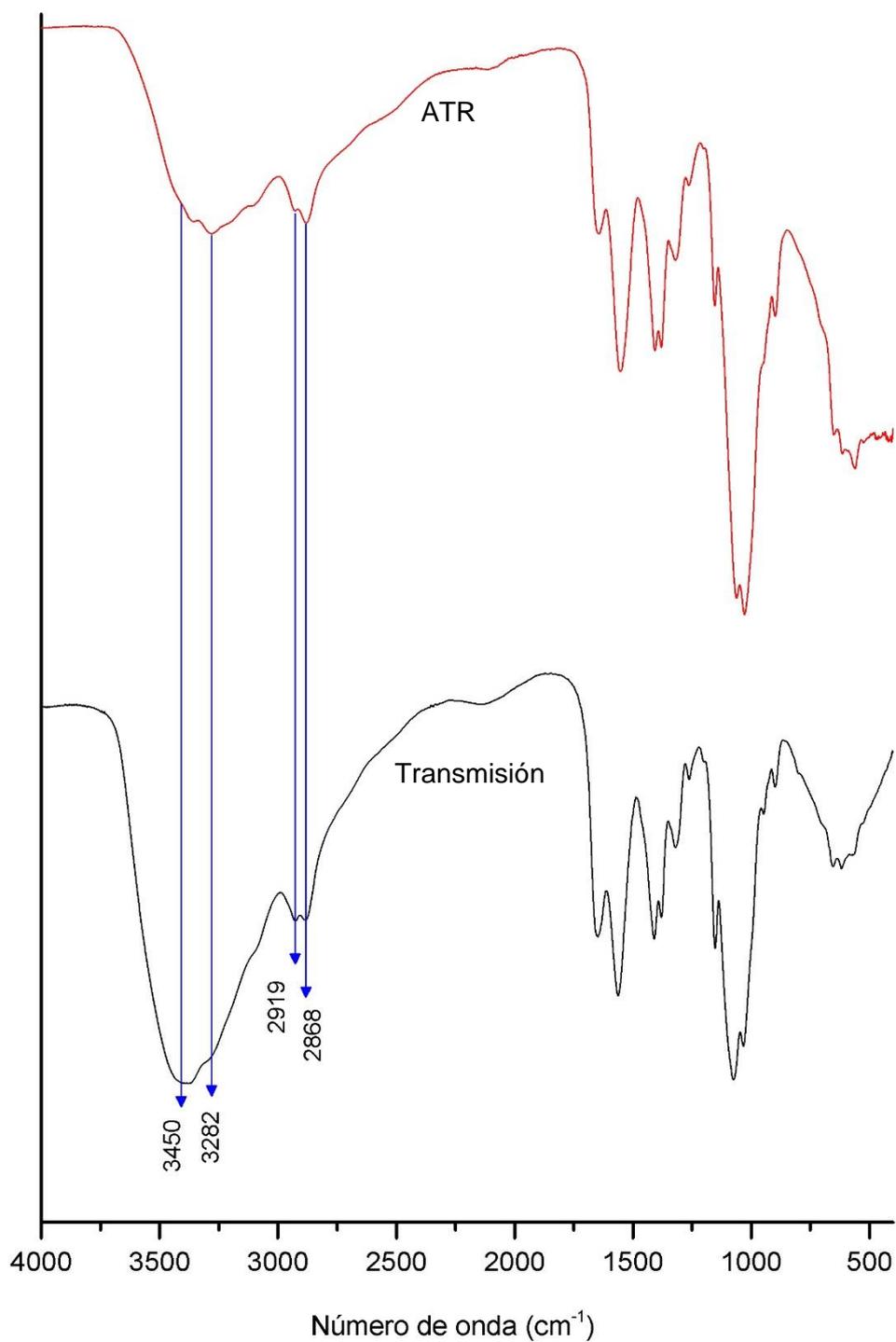


Figura 8. Comparación de los espectros FT-IR de una película de quitosana Sigma Aldrich por ATR (rojo) y transmisión (negro) de 4000 a 400 cm^{-1} .

En la figura 8 se puede apreciar que, por un lado, las señales a más de 3000 cm^{-1} no varían significativamente, debido a que la banda a 3450 cm^{-1} agrupa las vibraciones pertenecientes a los grupos hidroxilos (OH), vibraciones intermoleculares CO–NH del grupo amida y las

vibraciones N–H intramoleculares de los grupos amina.⁶⁷ Además, las señales a 2868 y 2919 cm^{-1} se deben a las vibraciones de enlaces carbono sp^3 con hidrogeno (C–H).³⁸

Por otro lado, los cambios más notorios están en el rango comprendido entre 1400 y 1700 cm^{-1} que se pueden apreciar mejor en la figura 9, que cubre los números de onda entre 2000 y 400 cm^{-1} . Estos se deben al grado de acetilación de la quitosana, así como a las vibraciones CO–NH de la amida como es el caso de la banda ancha a 1655 cm^{-1} , la cual se solapa con una señal menos intensa a 1630 cm^{-1} . Esta señal ancha se divide en dos por la influencia de puentes de hidrógeno o la presencia de un enol en el resto de la amida, en el caso de una alta acetilación ($\text{DA} > 70\%$).^{68,69} Siguiendo con la asignación de las bandas, la que se encuentra a 1580 cm^{-1} se debe a la flexión del enlace N–H de la amida secundaria.^{68,70,71}

La absorción a 1380 cm^{-1} resulta de la vibración de flexión C–H en el CO–CH₃, lo cual indica la presencia de unidades acetiladas en la cadena de quitosana. Esta señal disminuye en intensidad a medida que el grado de acetilación disminuye.⁷¹ De igual forma la señal a 1313 y a 1417 cm^{-1} resulta del estiramiento del C–N de la amida de los residuos acetilados y de la flexión de los N–H de los residuos no acetilados, respectivamente. Por otra parte, las señales menores a 1200 cm^{-1} 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 terminar, la señal a 1154 cm^{-1} se asocia a la tensión asimétrica del puente que forma el enlace glucosídico (C–O–C).^{44,69} De igual forma, las señales a 1080 y 1029 cm^{-1} corresponden a estiramientos de los grupos alifáticos en su esqueleto, propios de su estructura piranósica, además de indicar a la unidad acetilada, ya que se relaciona con el estiramiento de C=O de la amida.⁷¹ Por último, la señal que se encuentra a 896 cm^{-1} se relaciona a la tensión C–H de los carbonos anoméricos en la quitosana.³⁸

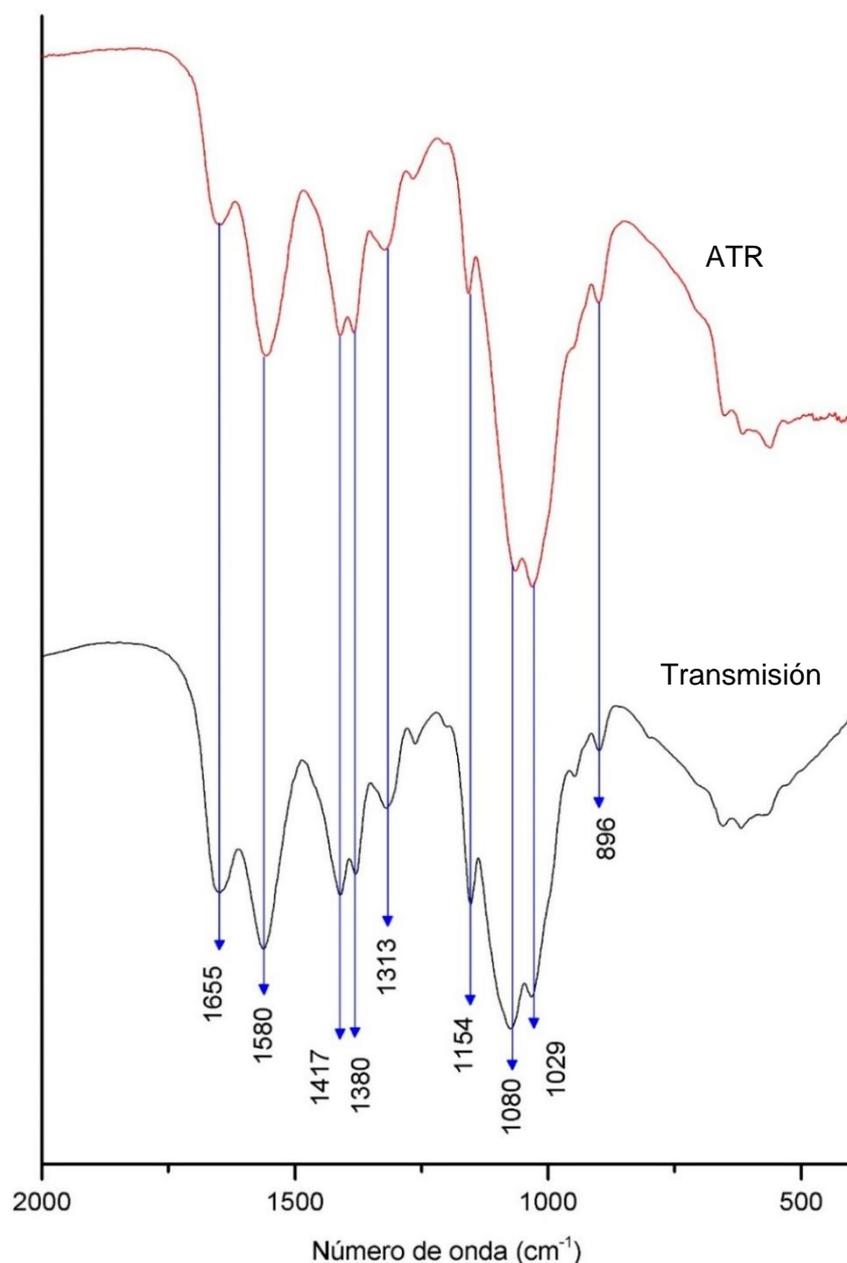


Figura 9. Espectro FT-IR de una película de quitosana Sigma Aldrich por ATR (rojo) y transmisión (negro) de 2000 a 400 cm^{-1} .

La importancia de las señales a 1417 y 1313 cm^{-1} se asocia al cálculo del DA (ver ecuación 4; 1.1.6. caracterización) en el que la reducción de la intensidad de la señal a 1419 cm^{-1} y el aumento de la señal a 1320 cm^{-1} indican un aumento en el DA. El espectro FT-IR (ver figura 10) y el cálculo del DA de la quitosana Sigma Aldrich con las líneas base según la ecuación 4 propuesta por Brugnerotto et. al.⁵² se muestra a continuación:

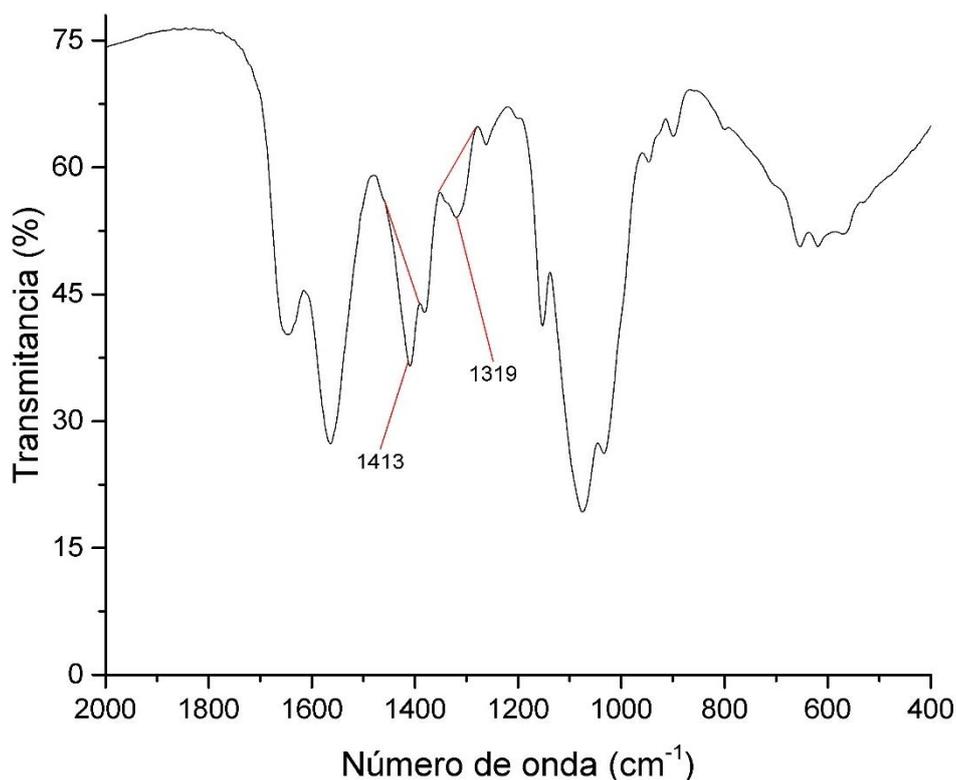


Figura 10. Espectro FT-IR de la quitosana Sigma Aldrich con líneas base para el cálculo del DA en el rango de 2000 a 400 cm^{-1} .

$$DA (\%) = 31,92 * \frac{8,29}{8,71} - 1,22$$

$$DA = 29,16\%$$

Los espectros y el cálculo del DA de la quitosana Sigma Aldrich por FT-IR-ATR con transmitancia y absorbancia se muestra en el anexo 1. Los cálculos resultaron en valores aproximados, debido a que, por ser ATR, la penetración del haz en la muestra depende de la longitud de onda, lo que genera una variación en la intensidad relativa de las señales.⁵² Otro punto importante es que, aunque en la ecuación 4 (1.1.6. caracterización) se menciona la altura de la absorbancia de la señal, se halló que no hay mucha diferencia al emplear la transmitancia. Por ello, se optó por usar solo los espectros de transmitancia para el cálculo del DA. El espectro FT-IR y el cálculo del DA de la quitosana Q-10 se muestra en el anexo 2.

5.1.2. Determinación del grado de acetilación de la quitosana por ^1H -RMN

Se siguió la norma de la ASTM, F2260-03 (2012) para el análisis de la quitosana por ^1H -RMN. Este método es válido para la determinación del grado de acetilación comprendido entre 1 a 50 % de acetilación de cloruro de quitosana en medio acuoso ácido deuterado. Las muestras fueron analizadas a 70 °C para reducir su viscosidad y poder desplazar las señales de los hidrógenos del solvente (agua) a un área fuera de interés para análisis. Debido a que la señal del solvente se solapa con la señal del protón H3 de la unidad desacetilada (ver figura 11), no se considera esta señal para el cálculo del grado de acetilación. En el espectro ^1H -RMN de la muestra de quitosana Sigma Aldrich mostrada en la figura 11, se asignaron los desplazamientos de los protones y sus integrales para el cálculo del grado de acetilación.

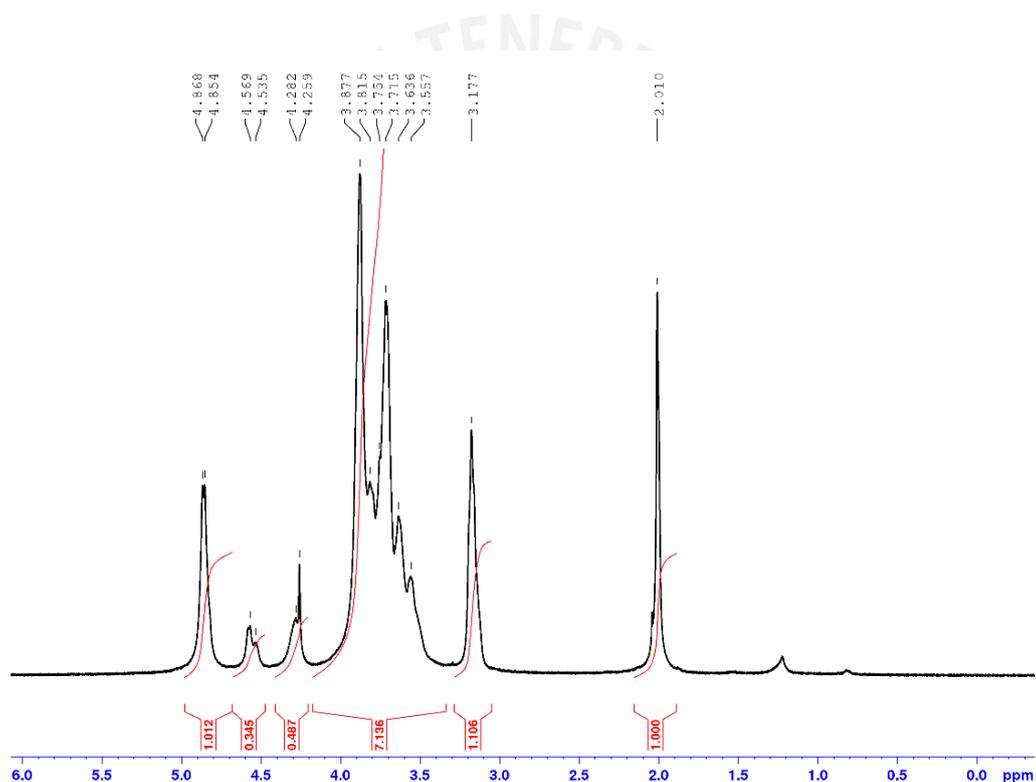


Figura 11. Espectro de ^1H -RMN de cloruro de quitosana (Sigma Aldrich, lote: STBG5137V) en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70 °C y 500 MHz, $\text{DA}=24,31\%$.

Protón	δ (ppm)	
	D	A
H1	4,84 – 4,86 (doblete)	4,54 – 4,58 (doblete)
H2	3,15 – 3,19 (tripleto)	3,56 – 3,87 (multiplete)
H3	4,22 – 4,28 (doblete)	
H4 – H6	3,56 – 3,87 (multiplete)	
H7	–	2,01 (singuleto)

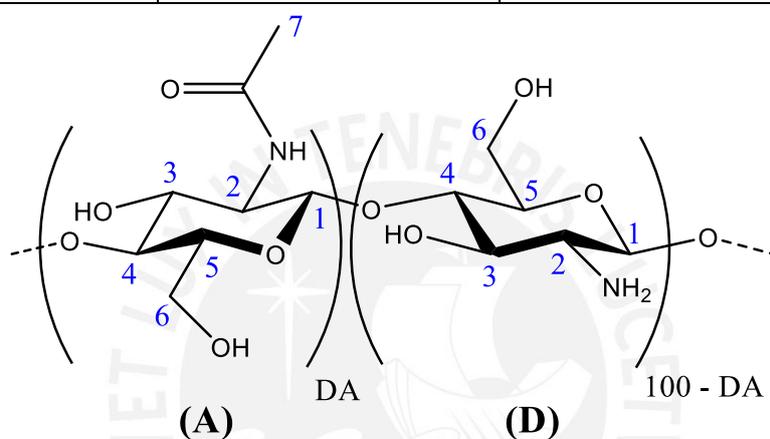


Figura 12. Estructura y desplazamientos químicos en el espectro ^1H -RMN de la quitosana en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ a $70\text{ }^\circ\text{C}$ y 500 MHz.

A diferencia de la norma, en la que se usa TMS como referencia, la referencia usada para los espectros de las quitosanas fue la señal del ácido acético que se encuentra presente en la solución, la cual aparece a 2,01 ppm.⁵¹ Además, no se usó la señal del solvente (D_2O) como referencia, debido a que se optó por suprimir esta señal selectivamente, por presaturación y así mejorar la relación señal/ruido en el espectro.⁷² Los espectros cuantitativos fueron ajustados según el desplazamiento químico del protón del ácido acético a 2,01 ppm. Esto fue necesario, para que así se pudiera comparar los cambios en las intensidades de los picos H1A y H1D (ver figura 12). La importancia de estas señales también se asocia al cálculo del grado de acetilación (ver ecuaciones 1-4) en el que los valores grandes de la integral de la señal H1A se relacionan a quitosanas con un alto DA. A lo largo de los análisis, los desplazamientos de los protones no variaron, únicamente sus integrales; por ello, el espectro de la quitosana Sigma Aldrich (ver figura 11) se empleó como referencia para el ajuste del eje del desplazamiento químico de todas las muestras de quitosanas

acetiladas. El cálculo del DA de la quitosana Q-10 (ver anexo 3) y de la quitosana Sigma Aldrich se muestra a continuación:

$$\text{Proporción de unidades desacetiladas: } \left[\frac{1,012 + 1,106}{2} \right] = 1,059$$

$$\text{Proporción de unidades acetiladas: } \left[\frac{0,345 + \frac{1,000}{3}}{2} \right] = 0,340$$

$$\left[\frac{0,340}{1,059 + 0,340} \right] * 100\% = 24,31\%$$

Los valores obtenidos del DA de la quitosana Sigma Aldrich mediante las técnicas de $^1\text{H-RMN}$ (24,31%) y FT-IR (29,16%) difieren debido a que en el cálculo en el caso de la espectroscopía IR se emplea un modelo empírico, hallado a partir de una relación de alturas de las señales a una línea base, y la ecuación se obtiene a partir de muchas muestras de quitosanas con diferentes grados de acetilación de varios estudios previos, mientras que por la técnica de $^1\text{H-RMN}$, el DA se calcula en función de las áreas de las señales y por lo tanto, independiente de otras muestras de quitosana.

5.1.3. Análisis del peso molecular y su distribución de la quitosana por GPC

La distribución de las masas molares de las quitosanas de partida y de las acetiladas fueron determinadas por el análisis por GPC. Primero, se realizó una curva de calibración convencional con estándares de pululano (PSS, Polymer Standar Service) disueltos en la solución tampón de pH=4,5 (NaOAc/HOAc). Se emplearon siete estándares en el rango de 10 – 2500 kDa, cuyos bajos índices de polidispersión (PDI) certificaron la uniformidad en la distribución de los tamaños de sus cadenas (ver tabla 2). Se empleó pululano por la falta de estándares comerciales de quitosana y por tener cierta semejanza en cuanto a su estructura por estar conformada por unidades de $\beta\text{-D-glucopiranososa}$; sin embargo, el pululano es un polisacárido neutro y, por lo tanto, no forma un polielectrolito catiónico, como sí ocurre en el caso de la quitosana. Así, el análisis por GPC de una muestra de quitosana da como resultado un valor de peso molecular de pululano que ocupa el mismo volumen.

Tabla 2. Estándares de pululano PSS utilizados para la curva de calibración para del GPC. Datos reportados por el fabricante.

Pululano	M_p (kDa)*	M_w (kDa)	M_n (kDa)	PDI**
PSS-Pul10K	9,6	10	9,2	1,09
PSS-Pul50K	47,1	48,8	45,5	1,07
PSS-Pul110K	107	113	100	1,13
PSS-Pul200K	194	200	184	1,09
PSS-Pul400K	337	348	310	1,12
PSS-Pul800K	708	805	636	1,27
PSS-Pul2.5M	2350	2560	1720	1,49

* M_p =peso molecular de la cadena más abundante.

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

Con el programa OmniSEC se realizó la curva de calibración convencional (primer orden) y la interpolación con un ajuste lineal (curva de mejor aproximación según el fabricante de la columna usada).⁷³ De esta manera, se pudieron determinar los pesos moleculares de las quitosanas acetiladas relativos a los estándares de pululano según su volumen de retención.

En la figura 13, se observa que las cadenas más grandes eluyen de la columna a un menor volumen de retención, como es de esperar, ya que no ingresan a las cavidades porosas más pequeñas del material empacado a lo largo de la columna. Es decir, que este comportamiento es debido al volumen hidrodinámico en solución y, por ende, al tamaño de las cadenas del polímero.

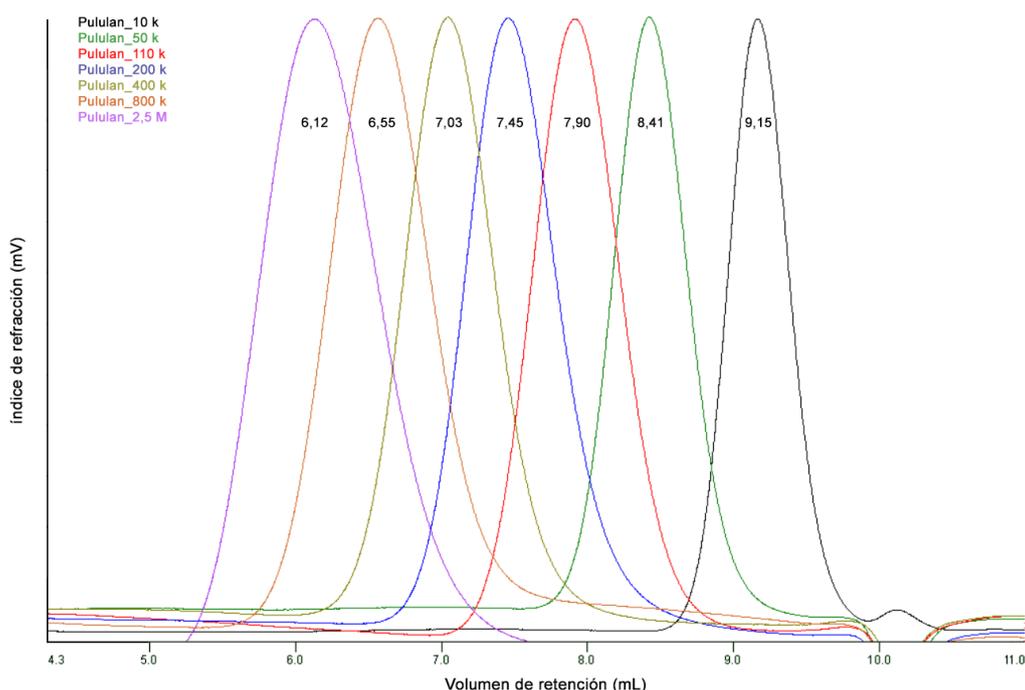
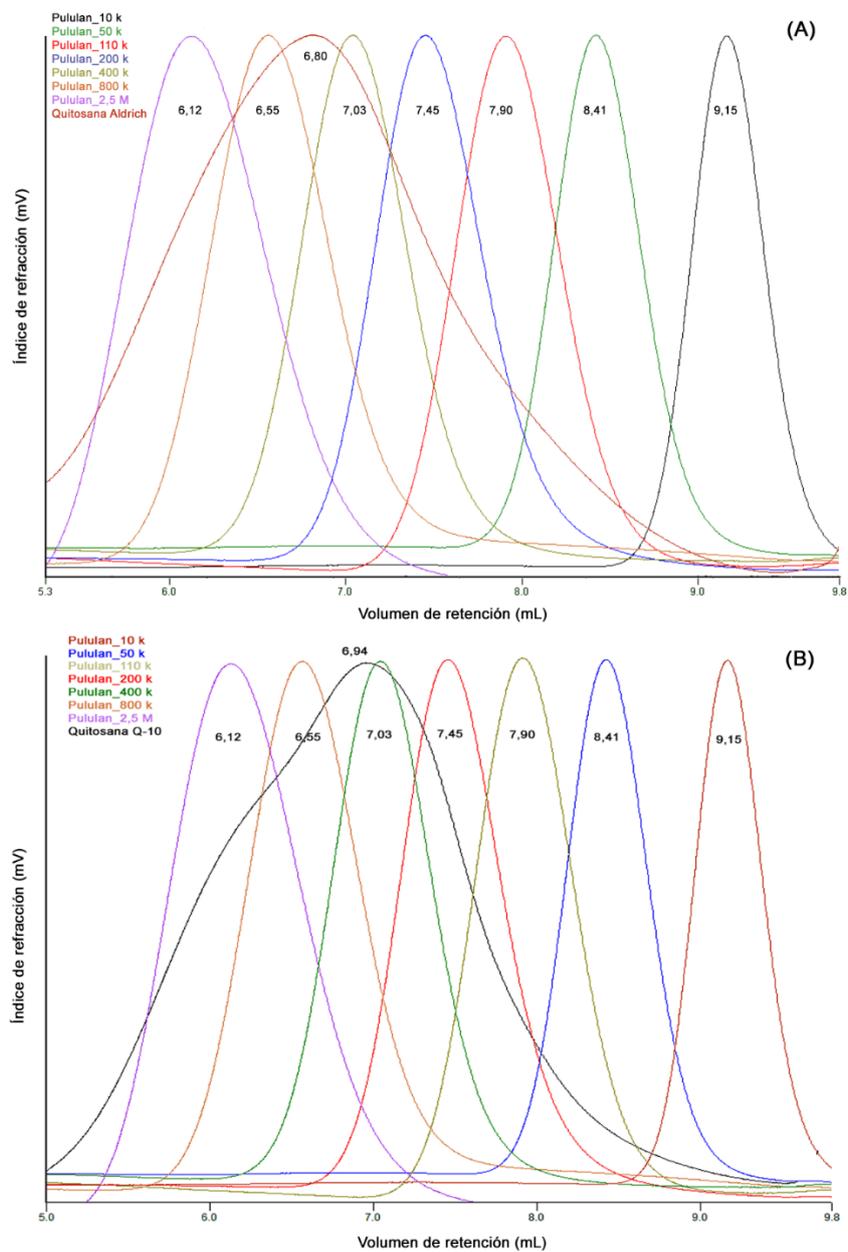


Figura 13. Cromatogramas de estándares de pululano, en solución tampón de NaOAc 0,1 M/HOAc 0,2 M, a un flujo de 0,5 mL/min y 35 °C.

En la misma figura 13, se observa un pico a 10,15 mL, el cual apareció en todos los cromatogramas sin excepción. Este pico apareció también al inyectar únicamente la solución tampón. Este pico es un efecto del solvente y se le conoce como señal fantasma, estas señales son comunes cuando se emplean detectores de índice de refracción. Pueden variar de intensidad con el incremento de la concentración y el tiempo de almacenado de la solución tampón.^{74,75}

En la figura 14, se muestran los cromatogramas de la quitosana Sigma Aldrich inicial, la quitosana Q-10 y los estándares de pululano; en esta figura se observa que la quitosana Sigma Aldrich (cromatograma superior) posee un mayor ancho de banda que la de los estándares. De igual forma, se observa en el caso de la quitosana Q-10 (cromatograma inferior). Es decir, que existe una mayor dispersión de pesos moleculares en la quitosana Sigma Aldrich inicial y de la quitosana Q-10. El índice de polidispersión (PDI) es una medida de esta dispersión de población respecto de los pesos moleculares de las cadenas de quitosana. Mientras este valor de PDI se aleje de 1, se entiende por ello que existe una mayor dispersión, como se observa en el caso del PDI de la quitosana Sigma Aldrich inicial, cuyo valor es de 7,221 y del caso de la quitosana Q-10, cuyo valor es de 4,667, a comparación de

los valores del PDI mostrados en la tabla 2 para los estándares de pululano, los cuales son cercanos a 1.



Quitosana	Volumen de retención (mL)	M _w (kDa)	M _n (kDa)	M _p (kDa)	*PDI
Sigma Aldrich	6,80	1632,0	233,6	582,6	7,221
Q-10	6,94	1206,4	259,4	455,7	4,667

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

Figura 14. Cromatogramas y Mw promedio de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%) (A), y de la quitosana Q-10 (DA=10,66%) (B) comparadas con los estándares de pululano.

5.1.4. Análisis de la viscosidad intrínseca

El estudio por viscosimetría capilar de la quitosana se realizó con una solución tampón de 0,2 M HOAc / 0,1 M NaOAc a 30 °C, condiciones reportadas en un estudio por Wang et al. En ese estudio se demostró que las constantes de Mark-Houwink (K y α , de la ecuación 5) dependen del grado de acetilación de la quitosana, como se observa en la tabla 3.⁵³

Tabla 3. Valores de las constantes K y α según DA de la quitosana en 0,2 M HOAc/0,1 M NaOAc a 30 °C. Tomado de Wang et al (1991).⁵³

DA (%)	K ($\times 10^{-3}$ cm ³ /g)	α
31	0,104	1,12
16	1,424	0,96
9	6,589	0,88
0	16,800	0,81

Con estos datos, Wang et al propusieron dos ecuaciones para obtener las constantes K y α , para cualquier DA en el rango estudiado,⁵³ las cuales son las siguientes:

$$K = 1,64 \times 10^{-30} (100 - DA)^{14} \quad (r = 0,992) \quad \text{Ecuación 15}$$

$$\alpha = -1,02 \times 10^{-2} (100 - DA) + 1,82 \quad (r = 0,996) \quad \text{Ecuación 16}$$

Las constantes para cada quitosana se muestran a continuación:

Quitosana Sigma Aldrich

$$K = 1,64 \times 10^{-30} (100 - 24,31)^{14}$$

$$K = 0,332 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$$

$$\alpha = -1,02 \times 10^{-2} (100 - 24,31) + 1,82$$

$$\alpha = 1,05 \text{ mL/g}$$

Quitosana Q-10

$$K = 1,64 \times 10^{-30}(100 - 10,66)^{14}$$

$$K = 3,438 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$$

$$\alpha = -1,02 \times 10^{-2}(100 - 10,66) + 1,82$$

$$\alpha = 0,91 \text{ mL/g}$$

Para el caso de las quitosanas acetiladas (DA>31%), las cuales se alejan de los valores de la tabla 3, se aproximó usando las constantes K y α correspondientes a un DA=31%. Las constantes K y α se asocian a la conformación de las cadenas de quitosana en solución y en la interacción entre las cadenas de la quitosana. Esto se ve reflejado en los valores de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de la quitosana Sigma Aldrich y de la quitosana Q-10 (ver figuras 15 y 16), los cuales fueron 636,4 mL/g y 736,7 mL/g, respectivamente. También, haciendo uso de la ecuación de Mark-Howink (ecuación 5) se halló los pesos moleculares de viscosidad (M_v) de la quitosana Sigma Aldrich y de la quitosana Q-10, los cuales fueron 962,5 kDa y 721,4 kDa, respectivamente. Se puede observar que la viscosidad de la quitosana Sigma Aldrich es menor que el de la quitosana Q-10, esto se podría deber a la existencia de un mayor número de unidades amina protonadas a lo largo de la cadena, los cuales hacen que la cadena se extienda.

Además, se puede apreciar que los M_v hallados, comparados a los valores de peso molecular obtenidos por GPC, se encuentra entre el M_w y el M_n , $M_w=1632 > M_v=962 > M_n=233$ kDa (quitosana Sigma Aldrich) y $M_w=1206 > M_v=721 > M_n=259$ kDa (quitosana Q-10). Debido a que el M_w es un promedio ponderado de todos los pesos de las cadenas de la quitosana, posee un valor más cercano al M_v .

Qitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%)					
[Qitosana] (g/mL)	Solvente	1,232 x 10 ⁻³	1,027 x 10 ⁻³	8,800 x 10 ⁻⁴	7,700 x 10 ⁻⁴
t promedio (s)	33,87	70,08	62,82	57,80	54,15
η _r	-	2,07	1,85	1,71	1,60
η _{sp}	-	1,07	0,85	0,71	0,60
η _{red}	-	867,80	832,42	802,84	777,41
η _{inh}	-	590,20	601,64	607,32	609,26

[η]=636,38 mL/g

K=0,332x10⁻³ cm³/g	α=1,05 mL/g	M_v=962,5 kDa
-------------------------------------------------	--------------------	--------------------------------

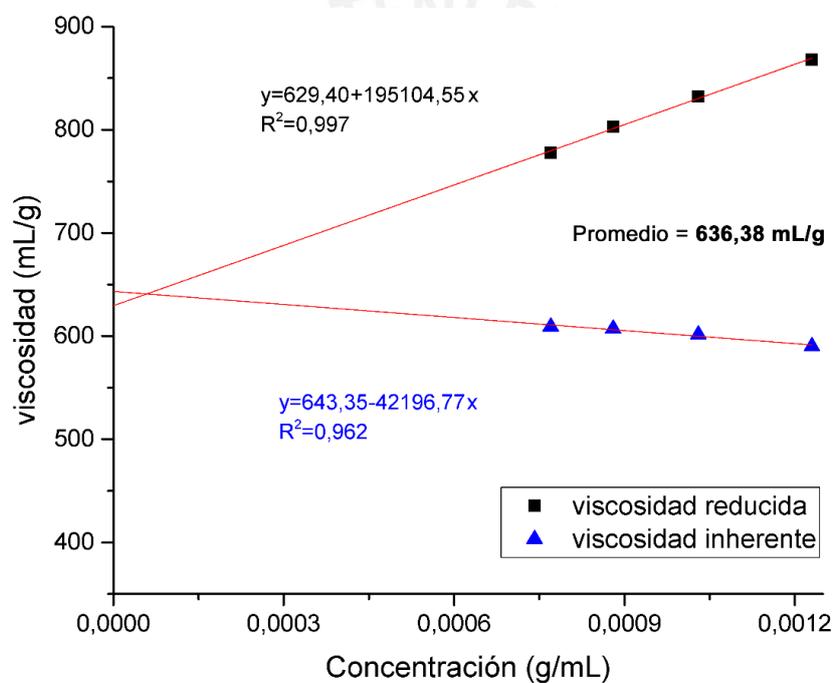


Figura 15. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%).

Qitosana Q-10 (DA=10,66%)					
[Qitosana] (g/mL)	Solvente	1,216 x 10 ⁻³	1,013 x 10 ⁻³	8,686 x 10 ⁻⁴	7,600 x 10 ⁻⁴
t promedio (s)	34,08	77,83	68,77	62,51	58,24
η_r	-	2,28	2,02	1,83	1,71
η_{sp}	-	1,28	1,02	0,83	0,71
η_{red}	-	1055,65	1004,58	960,44	932,79
η_{inh}	-	679,10	692,86	698,41	705,08

$[\eta]=736,67$ mL/g		
$K=3,438 \times 10^{-3}$ cm ³ /g	$\alpha=0,91$ mL/g	$M_v=721,4$ kDa

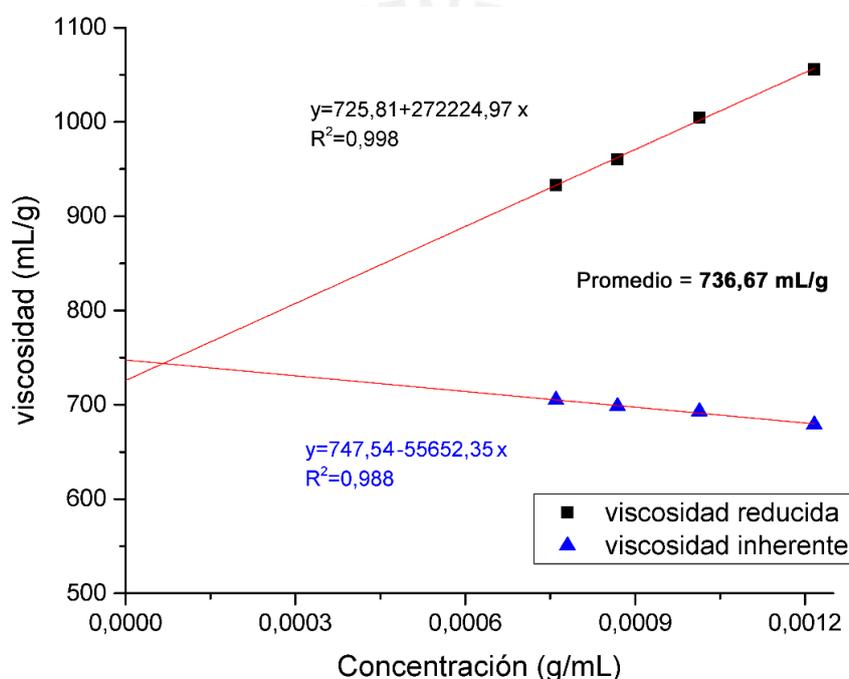


Figura 16. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la qitosana Q-10 (DA=10,66%).

La qitosana es un polielectrolito catiónico en solución, por lo que las cargas a lo largo del esqueleto afectan la conformación de la cadena dependiendo de la fuerza iónica del medio. Por ello la fuerza iónica es otro factor a tener en cuenta en la caracterización de la viscosidad intrínseca. Se observó que con el incremento de la fuerza iónica (ver figuras 17 y 18), a tres veces la concentración de la solución tampón, la viscosidad intrínseca de la qitosana Sigma Aldrich se redujo de 636,4 a 379,4 mL/g y se obtuvo una reducción del M_v de 962,5 a 588,1 kDa. Mientras que para la qitosana Q-10, la reducción fue de 736,7 a 631,6 mL/g y

la reducción en el M_v fue de 721,4 a 609,2 kDa. Esto es debido a que se produce un mayor efecto de apantallamiento en la quitosana Q-10, que suprime la repulsión electrostática entre las cargas a lo largo de la cadena en sus abundantes unidades desacetiladas.⁷⁶

Quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%)-concentrado					
[Quitosana] (g/mL)	Solvente	$1,216 \times 10^{-3}$	$1,013 \times 10^{-3}$	$8,686 \times 10^{-4}$	$7,600 \times 10^{-4}$
t_{promedio} (s)	37,18	58,62	54,37	51,56	49,55
η_r	-	1,58	1,46	1,39	1,33
η_{sp}	-	0,58	0,46	0,39	0,33
η_{red}	-	474,22	456,33	445,21	437,68
η_{inh}	-	374,43	375,09	376,40	377,84
$[\eta]=379,41 \text{ mL/g}$					
$K=0,332 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$		$\alpha=1,05 \text{ mL/g}$		$M_v=588,1 \text{ kDa}$	

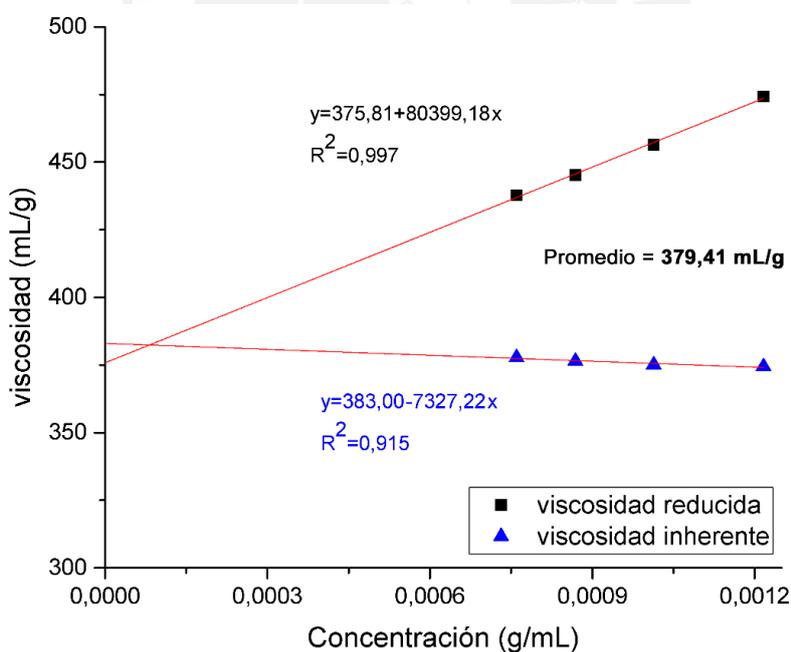


Figura 17. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%) en 3 veces la concentración de la solución tampón.

Qitosana Q-10 (DA=10,66%)-concentrado					
[Qitosana] (g/mL)	Solvente	$1,212 \times 10^{-3}$	$1,010 \times 10^{-3}$	$8,657 \times 10^{-4}$	$7,575 \times 10^{-4}$
t_{promedio} (s)	37,18	77,53	68,75	63,30	59,54
η_r	-	2,09	1,85	1,70	1,60
η_{sp}	-	1,09	0,85	0,70	0,60
η_{red}	-	895,49	840,64	811,50	793,84
η_{inh}	-	606,37	608,58	614,65	621,56

$[\eta]=631,62 \text{ mL/g}$		
$K=0,332 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$	$\alpha=1,05 \text{ mL/g}$	$Mv=609,2 \text{ kDa}$

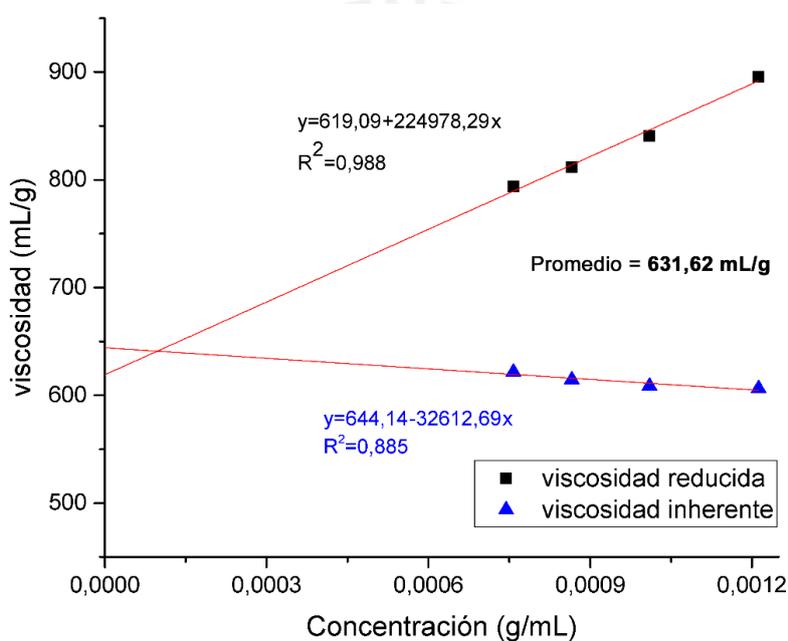


Figura 18. Resultados de viscosimetría capilar, y gráficas de viscosimetría reducida e inherente de la qitosana Q-10 (DA=10,66%) en 3 veces la concentración de la solución tampón.

5.2. Acetilación de la quitosana

5.2.1. Acetilación con anhídrido acético

Para este estudio se partió de la quitosana Sigma Aldrich (DA=24,31%, Mw=1632 kDa) y de la quitosana Q-10 desacetilada por el Grupo de Modificación de Materiales (DA=10,66%, Mw=1206 kDa). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, ya que se buscó preservar el tamaño de las cadenas, minimizando el efecto de la hidrólisis del enlace glucosídico por el aumento de la temperatura en medio ácido (ver 5.3.1). La reacción se llevó a cabo a distintas razones de moles de anhídrido acético/moles de amina libre en la quitosana (Anh/GlcN), como se observa en la tabla 4. En esta se muestra los DA hallados por la acetilación de la quitosana Sigma Aldrich, la cual se estudió hasta una razón Anh/GlcN de 15, mientras que para el caso de la quitosana Q-10, hasta una razón Anh/GlcN de 25. Además, se preparó una solución en paralelo a las soluciones de reacción como una solución de control, la cual pasó por el mismo proceso que las otras muestras, pero no se le añadió anhídrido acético, con el objetivo de comparar el efecto en el Mw por la exposición de la quitosana al medio ácido en el mismo tiempo que la reacción de acetilación.

Durante la reacción, los grupos hidroxilo en la cadena de la quitosana (ver figura 19A) compiten con los grupos amina por el anhídrido acético, por lo que también se generan ésteres (ver figura 19B). Estos ésteres fueron hidrolizados selectivamente con un tratamiento con KOH a 5% (w/v) en metanol por 5 horas posteriormente a la reacción de acetilación (ver figura 19C).

Tabla 4. Grados de acetilación resultantes de la acetilación de las quitosanas Sigma Aldrich y Q-10 tratadas a distintas razones Anh/GlcN.

Quitosana Sigma Aldrich		Quitosana Q-10	
Anh/GlcN	DA (%) [*]	Anh/GlcN	DA (%) [*]
0	24,31	0	10,66
1	30,17	-	-
2	32,71	-	-
5	37,87	5	28,55
9	43,53	-	-
10	46,15	10	36,29
12	48,69	-	-
14 ^{**}	50,47	-	-
15 ^{**}	50,63	15	42,52
-	-	20	46,69
-	-	25 ^{**}	50,60

* DA medido a partir de ¹H-RMN, espectros en Anexo 4

** Parcialmente insolubles

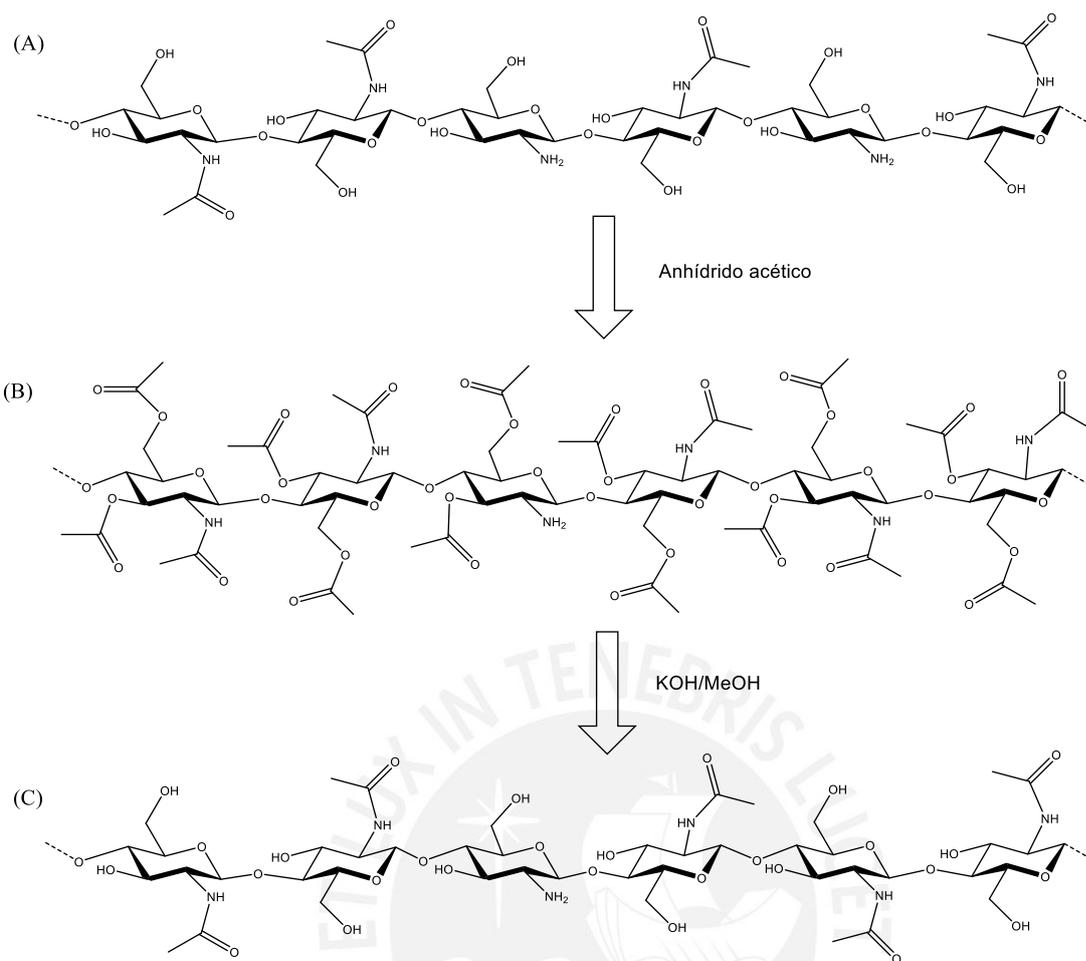


Figura 19. Estructura de la quitosana (A), producto de acetilación (B) y producto de hidrólisis (C).

En la figura 20, se observan los espectros de FT-IR-ATR de la quitosana Sigma Aldrich (espectro rojo), la quitosana acetilada y sin el tratamiento con KOH (espectro verde), y la quitosana acetilada y con el tratamiento con KOH (espectro negro). La razón Anh/GlcN usada para esta reacción fue de 30, lo que resultó en una quitosana insoluble por su alto DA, el cual se estimó a partir de su espectro por FT-IR-ATR. En los espectros de la figura 18, las señales menores a los 2000 cm^{-1} presentan la mayor variación, ya que en esta zona se observa el efecto del DA en las intensidades de los picos. La banda a 1655 cm^{-1} , la que se asocia al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de la amida aumenta en intensidad (ver espectro negro) respecto de la quitosana Sigma Aldrich inicial (ver espectro rojo), mientras que la banda a 1580 cm^{-1} disminuye su intensidad por el aumento de grupos acetilo en la quitosana.⁶⁹ Además, se observa en la figura 20 (ver espectro verde) la presencia de un pico a 1730 cm^{-1} , el cual es característico en ésteres por el estiramiento $\text{C}=\text{O}$, por lo que indica la esterificación de los hidroxilos de la quitosana. En la misma figura se compara el antes (espectro verde) y después del tratamiento con KOH (espectro negro), lo cual demuestra que la hidrólisis de los ésteres

es completa después del tratamiento con la base. Es de notar que no se observa la presencia de anhídrido acético (no reaccionado), ya que no se observan sus picos a 1832 y 1761 cm^{-1} . Esto se debe al proceso de diálisis, el cual eliminó tanto el anhídrido acético que no reaccionó, como el ácido acético de la solución.

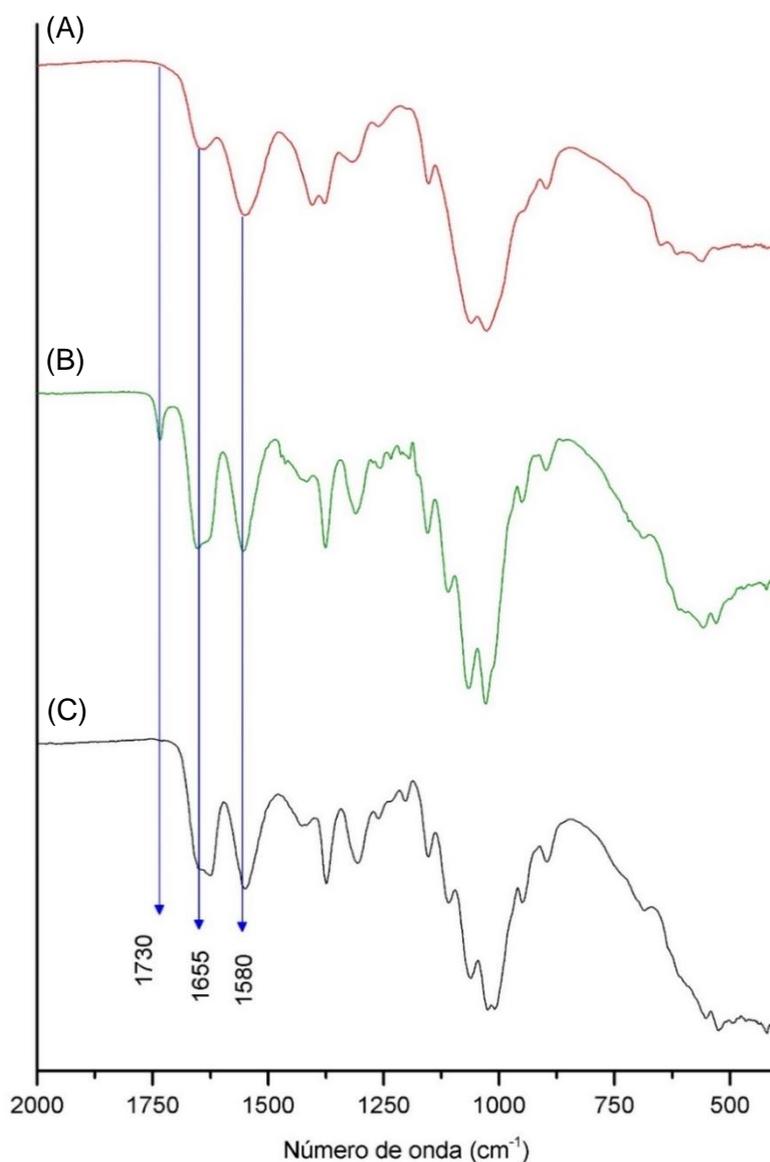


Figura 20. Espectros de FT-IR-ATR, en el rango de 2000 a 400 cm^{-1} , de quitosana Sigma Aldrich (A), quitosana acetilada (B), y quitosana acetilada luego del tratamiento con KOH (C). Reacción con Anh/GlcN=30.

Se calculó el grado de acetilación de la quitosana acetilada a una razón de Anh/GlcN de 30 empleando una fórmula usada para espectros por transmisión (ver ecuación 4, 1.1.6. caracterización), reportada por Brugnerotto et. al.⁵² Sin embargo, como la quitosana acetilada resultó ser insoluble, se realizó el cálculo a partir del espectro por ATR (comparación entre

absorbancia y transmitancia en anexo 5). El DA obtenido por esta aproximación fue de 98,10%. El cálculo y el espectro (ver figura 21) con la línea base se observan a continuación:

$$DA (\%) = 31,92 * \frac{6,323}{2,032} - 1,22$$

$$DA = 98,10\%$$

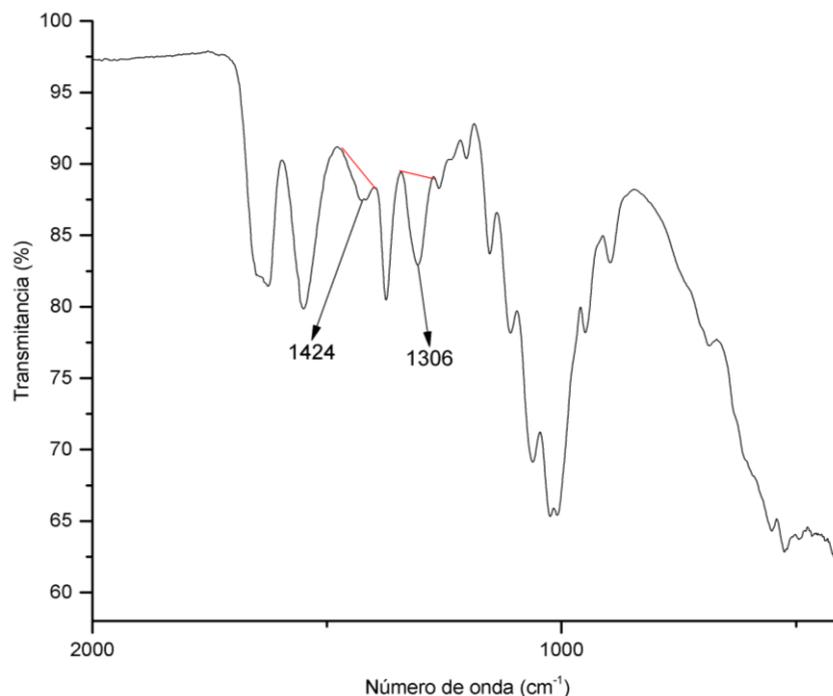


Figura 21. Espectro FT-IR-ATR de la quitosana acetilada con Anh/GlcN=30 con líneas base para el cálculo del DA.

En la figura 22 se observan los espectros FT-IR por transmisión de dos quitosanas acetiladas de Sigma Aldrich con Anh/GlcN de 1 y 15. En estos, las señales a más de 3000 cm⁻¹ no varían significativamente; sin embargo, las señales a menos de 2000 cm⁻¹ presentan la gran variación, principalmente, entre 1700 y 1500 cm⁻¹ que, como ya se discutió antes, comprende a las señales de las vibraciones correspondientes a las unidades acetiladas y desacetiladas. En este rango se aprecia el aumento de la intensidad del pico a 1655 cm⁻¹ (espectro rojo) por el aumento de las unidades acetiladas en la quitosana.

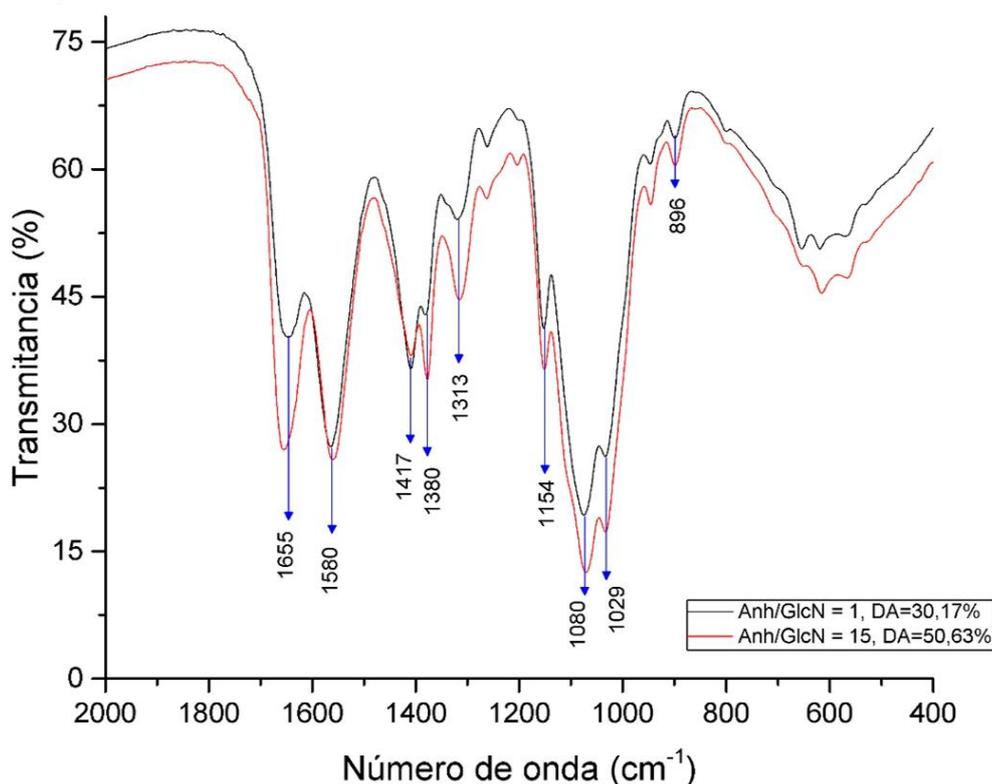


Figura 22. Espectro de FT-IR de películas en el rango de 2000 a 400 cm^{-1} de quitosana Sigma Aldrich acetiladas con Anh/GlcN de 1 (DA=30,17%) y 15 (DA=50,63%).

Un efecto similar en la variación de las intensidades de las señales se observa en la figura 23, en la que se muestra los espectros de RMN de las quitosanas Q-10 acetiladas a distintas razones de Anh/GlcN, las cuales van de 0 (solución control) a 25, en intervalos de 5. En el caso del pico H1A ($\delta=4,55$ ppm), se observa un aumento en la intensidad de la señal con el aumento de la razón Anh/GlcN, la cual indica la acetilación por el aumento de las unidades acetiladas (A). Por el contrario, en el caso del pico H1D ($\delta=4,85$ ppm), se observa una disminución de la señal con el aumento de la razón Anh/GlcN, la cual indica la disminución de las unidades desacetiladas (D). El rendimiento promedio hallado en función de las moles, ya que el peso molecular se halla en función de la proporción de las unidades acetiladas, fue de 98.2%.

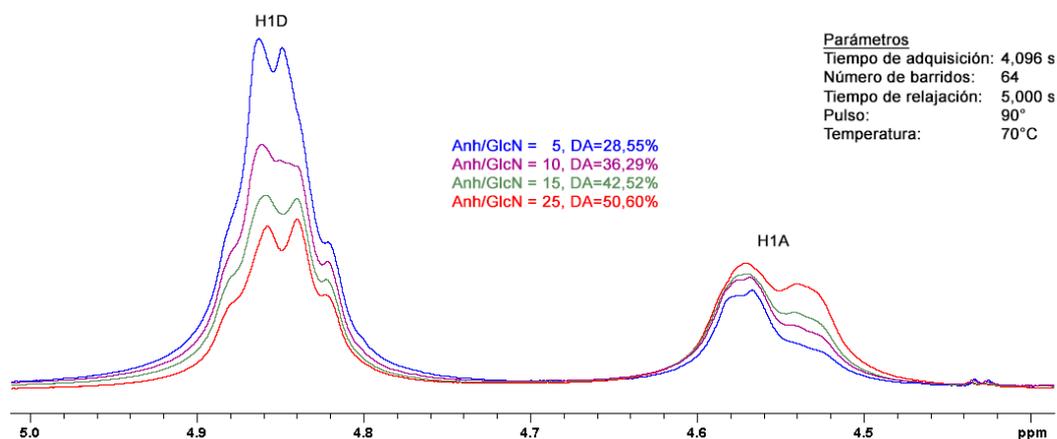


Figura 23. Espectros de ^1H -RMN de cloruro de quitosanas (Q-10, DA=10,66%) acetiladas a distintas razones Anh/GlcN.

5.2.2. Acetilación con cloruro de acetilo en [AMIM]Cl

Como demostró Liu et al, durante la reacción entre el cloruro de acetilo y la quitosana en el líquido iónico, cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio ([AMIM]Cl), se forma ácido clorhídrico y este puede generar la reducción del tamaño de la quitosana en tiempos prolongados de reacción que, a su vez, reducen el rendimiento de recuperación de la quitosana.⁷⁷ Por ese motivo, se mantuvo el mismo tiempo de reacción de 6 horas en todas las reacciones. Además, se preparó una solución control, a la cual no se le añadió el cloruro de acetilo, con el objetivo de comparar el comportamiento de la quitosana en el líquido iónico. Todos los productos de las reacciones resultaron insolubles en medio acuoso ácido, por lo que se optó por un análisis por FT-IR-ATR para aproximar el DA.

En el proceso de disolución de la quitosana en el líquido iónico, se observó que la quitosana se hincha y se torna del color anaranjado del líquido iónico; sin embargo, no se disuelve por completo. También se observó, al precipitar la quitosana después de la reacción, que esta fue difícil de separar del líquido iónico y que, incluso después del tratamiento post reacción con KOH, la coloración persistió.

Como se observa en la figura 24, se preparó una muestra control, a la cual no se le hizo reaccionar con el cloruro de acetilo (Ver figura 24A). También se aprecia que el cloruro de acetilo reaccionó con los grupos hidroxilos, debido a la presencia del pico a 1730 cm^{-1} (ver figura 24B) y con los grupos amina a lo largo de las cadenas de la quitosana, por el aumento

del pico a 1318 cm^{-1} (amida) y la disminución del pico a 1418 cm^{-1} (amina) (ver figura 24C). En esta reacción se empleó una razón de $\text{AcCl}/\text{GlcN}=6$ y el DA de la quitosana control (A) hallado usando la ecuación 4, a partir de su espectro por FT-IR-ATR, fue de 24,41%. El rendimiento promedio hallado en función de los moles fue de 26.5%.

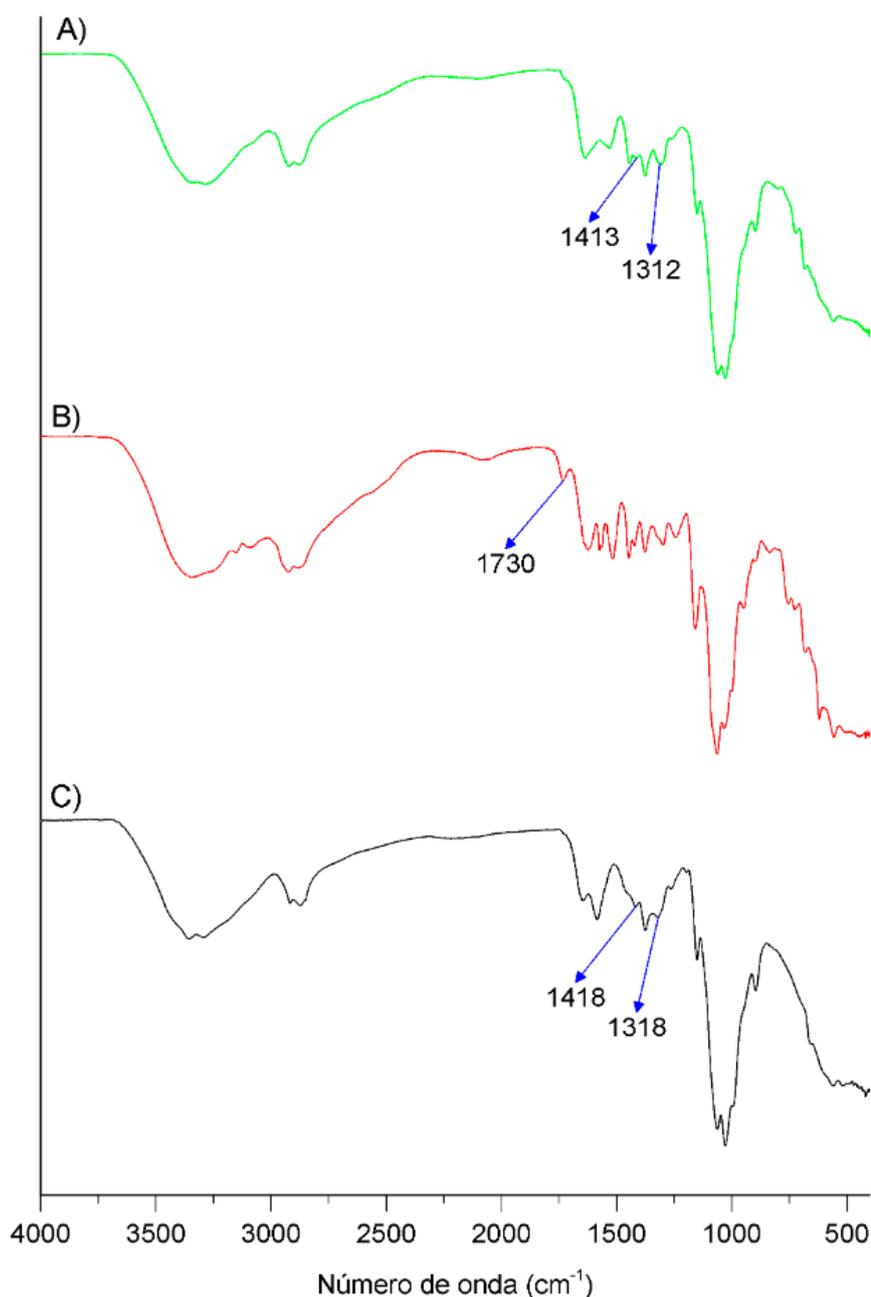


Figura 24. Espectros de FT-IR-ATR de quitosana control (A), después de la reacción de acetilación (B) y luego del tratamiento con KOH (C). Reacción con $\text{AcCl}/\text{GlcN}=6$.

El DA aproximado del producto (C) hallado usando la ecuación 4 fue de 96,56%. El cálculo y el espectro con la línea base de la quitosana acetilada con una razón AcCl/GlcN=6 (figura 25), se observan a continuación:

$$DA (\%) = 31,92 * \frac{3,481}{1,136} - 1,22$$

$$DA = 96,56\%$$

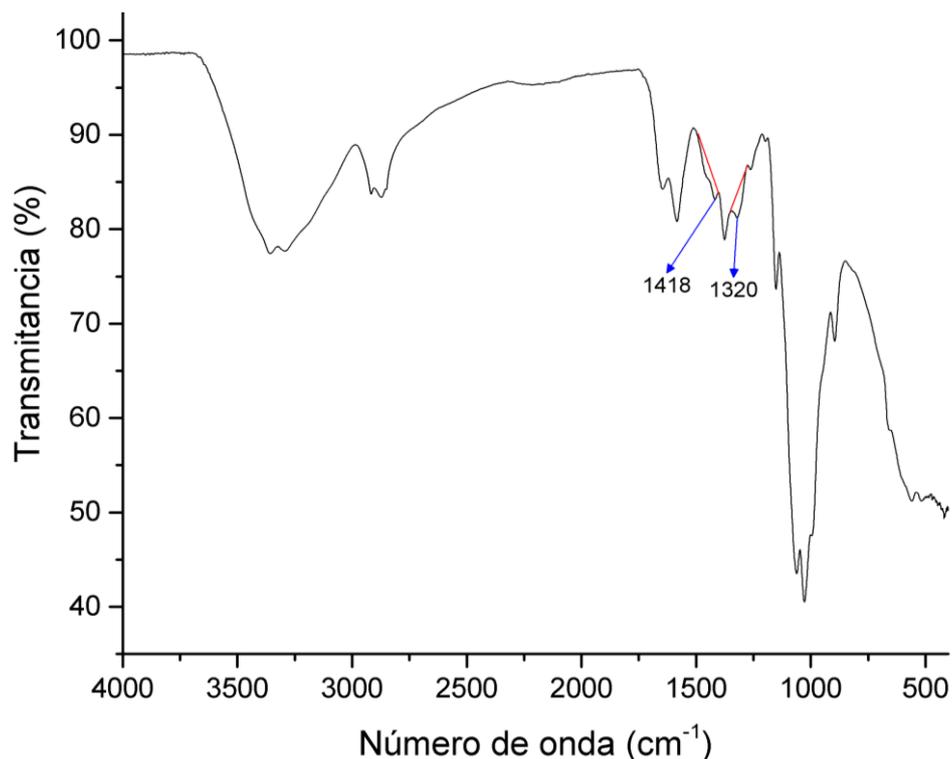


Figura 25. Espectro FT-IR-ATR de la quitosana acetilada con AcCl/GlcN=6 con líneas base para el cálculo del DA.

Para la razón de AcCl/GlcN=2, el DA hallado usando la ecuación 4 fue de 65,27%. El cálculo y el espectro con la línea base (figura 26) se observan a continuación:

$$DA (\%) = 31,92 * \frac{2,608}{1,252} - 1,22$$

$$DA = 65,27\%$$

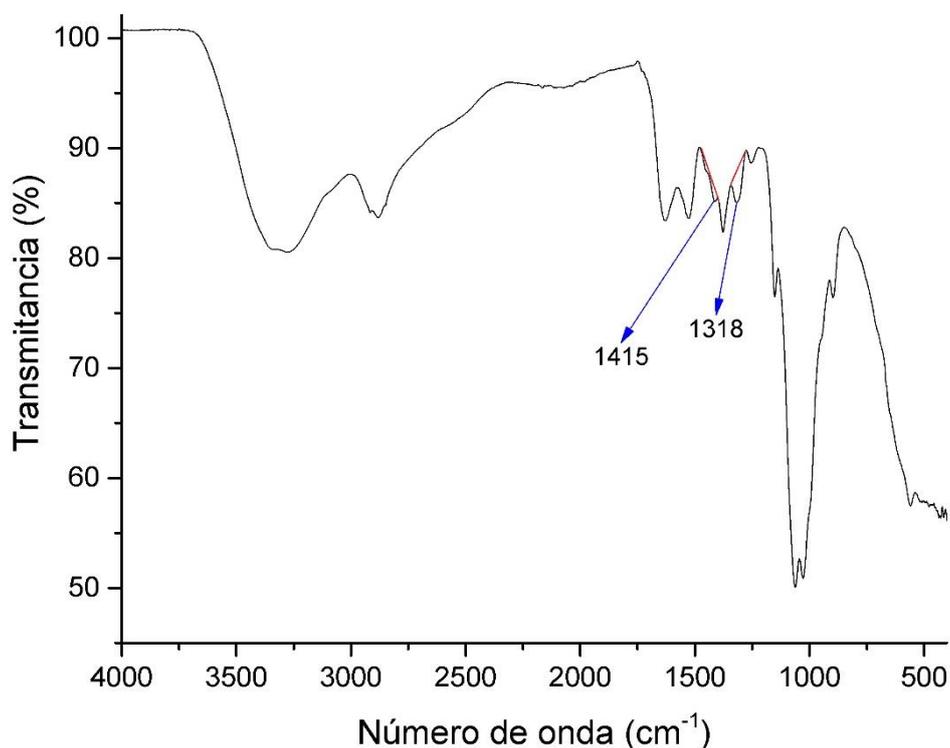


Figura 26. Espectro FT-IR-ATR de la quitosana acetilada con AcCl/GlcN=2 con líneas base para el cálculo del DA.

La reacción con cloruro de acetilo en el líquido iónico [AMIM]Cl demostró ser más eficiente para la acetilación que con el método con anhídrido acético, ya que la reacción entre la quitosana y el cloruro de acetilo en un medio como el del líquido iónico [AMIM]Cl se le podría considerar ideal, esto debido a que la quitosana no se encuentra disuelta en un medio ácido, como si ocurre en la reacción con anhídrido acético y por ello los grupos amina de la quitosana no se encuentran protonados, lo que facilita su reacción con el cloruro de acetilo.

Por un lado, con una razón AcCl/GlcN=6, se pudo llegar a acetilar a un valor mayor de DA=90%, comparado al valor de DA con anhídrido acético a una razón cercana igual a 5, el cual fue de un DA=28,5%. Por otro lado, por la alta reactividad del cloruro de acetilo, la manipulación de este requiere un mayor cuidado, a diferencia del anhídrido acético. Incluso las condiciones de la reacción como una atmósfera de nitrógeno, para evitar la hidratación del líquido iónico y reacciones paralelas por la humedad del ambiente, y calentamiento a 78 °C, lo vuelven más difícil de manejar, a diferencia de la baja temperatura (temperatura ambiente) de la reacción con el anhídrido acético.

Otro punto importante a mencionar es la purificación del producto obtenido en el líquido iónico, el cual requiere de más etapas, como centrifugar, disolver, dializar, lavar repetidas veces con metanol y liofilizar, a diferencia del método con anhídrido acético, el cual posee menos pasos en el tratamiento post reacción. Como consecuencia se obtiene un menor rendimiento (26,4%) que con el método con anhídrido acético (98,2%).

5.3. Control del peso molecular de la quitosana

5.3.1. Reducción del peso molecular en medio ácido

En el estudio de la reducción del peso molecular de la quitosana en medio acuoso ácido, se variaron dos parámetros, el tiempo y la temperatura de almacenamiento. La quitosana Sigma Aldrich se disolvió en la solución tampón de ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,1 M (pH= 4,5). Esta solución se dividió en tres partes iguales y se almacenó en viales a 4, 20 y 50 °C, como se observa en la tabla 5. El estudio se extendió hasta los 42 días de almacenamiento de la quitosana en esta solución ácida. Además, se observa que la masa molecular de la quitosana Sigma Aldrich se reduce en mayor proporción con el aumento de la temperatura en el mismo periodo de tiempo. También, se observa una mayor disminución en el índice de polidispersión (PDI) con el aumento de la temperatura en los primeros 14 días de exposición de la quitosana en la solución ácida.

En la figura 27, se observan el desplazamiento de las curvas en los cromatogramas a distintas temperaturas y tiempos de exposición. El desplazamiento es hacia la derecha partiendo de la quitosana inicial indicada como 0D (cero días), hasta 42D (cuarenta y dos días). Esto se debe a que, al reducirse el tamaño de las cadenas de la quitosana y con ello el volumen hidrodinámico de estas, las cadenas pueden interactuar más tiempo con las cavidades del material empacado en la columna y esto genera un mayor volumen de retención.

Tabla 5. Efecto del tiempo en el peso molecular y el índice de polidispersión de la quitosana a 4, 20 y 50 °C.

Tiempo (días)	4 °C		20 °C		50 °C	
	M _w (kDa)	PDI	M _w (kDa)	PDI	M _w (kDa)	PDI
0	1587,3	6,066	1587,3	6,066	1587,3	6,066
14	1203,0	5,075	1070,0	4,844	690,9	4,102
28	1104,5	4,991	914,1	4,628	549,6	3,734
35	1043,0	4,516	868,8	4,350	510,0	3,928
42	998,34	4,300	810,0	3,302	404,4	4,147

*cromatogramas GPC en Anexo 6

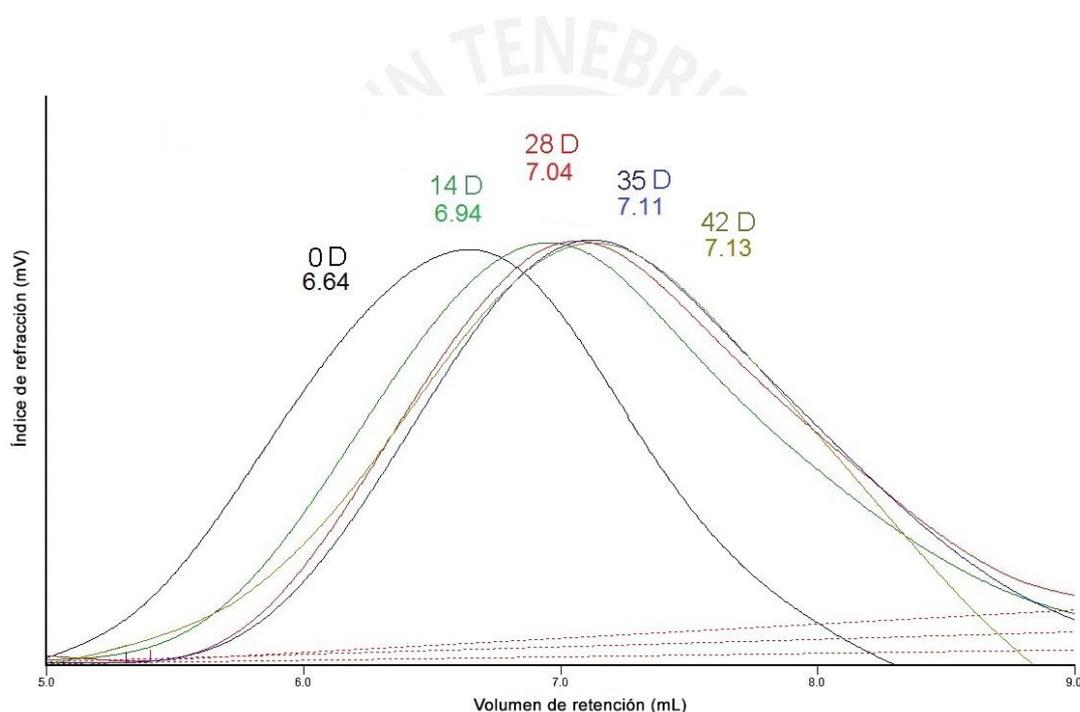


Figura 27. Cromatogramas de quitosana disuelta, almacenada hasta 42 días, a 50 °C

5.3.2. Reducción del peso molecular por ultrasonido

Se estudió la reducción del peso molecular de la quitosana Sigma Aldrich con la aplicación de ultrasonido en intervalos cortos de 3 minutos, con descansos de 10 minutos en baño de hielo, y a periodos largos de 9 minutos seguidos. Esta diferencia se aprecia en la figura 28, en la que se obtiene, luego de 9 minutos seguidos, un peso molecular de 858 kDa. Por el

contrario, en el caso de la aplicación de ultrasonido en intervalos con enfriamiento y agitación previa a cada exposición se consiguió un peso molecular de 623 kDa. Esto se puede observar también con el desplazamiento de los volúmenes de retención en los cromatogramas, los cuales se van desplazando hacia la derecha e indican una reducción en el tamaño del polímero y un aumento en la interacción con los poros en la columna.

Tratamiento (min)	0	3	3+3	3+3+3	9
Ancho medio (mL)	1,73	1,67	1,63	1,58	1,63
M _w (kDa)	1632	1046	755	623	858

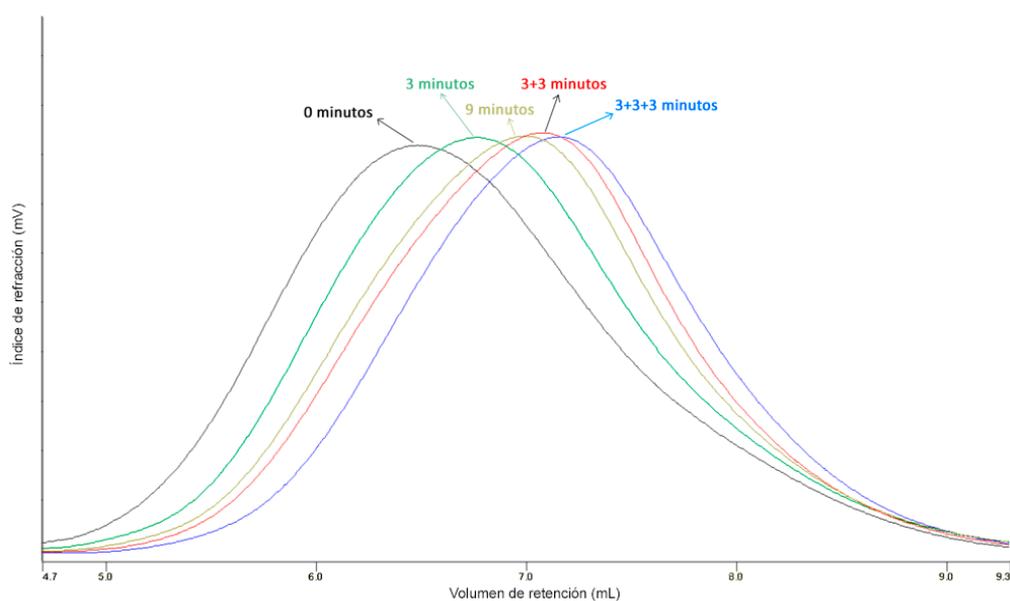


Figura 28. Cromatogramas de las quitosanas expuestas a ultrasonido a 9 min y a secuencia de intervalos de 3 min.

En el caso de una exposición prolongada al ultrasonido, como se observa en el caso de los 9 minutos seguidos (figura 28), la falta de una buena agitación durante el proceso podría generar una mayor reducción del peso molecular de la quitosana en las proximidades de la punta del sonicador; sin embargo, las cadenas de quitosana que se encuentran lejos de la punta o cerca de las paredes del vaso, no sufren el efecto del ultrasonido con la misma intensidad, debido a que la solución es viscosa. Esto se puede apreciar con el cálculo del ancho de los picos a la mitad de la altura a partir de los cromatogramas (ver tabla en figura 28), ya que el ancho de los picos indica la dispersión de la muestra. El ancho del pico para la reducción del peso molecular luego de 3 aplicaciones de 3 minutos de ultrasonido fue de 1,58 mL (color azul), mientras que el ancho del pico luego de la aplicación de ultrasonido por 9

minutos continuos (color mostaza) fue de 1,63 mL. Esta diferencia se debe a que probablemente solo se cortaron las cadenas del polímero cercanas a la punta de sonicador, mientras que las cadenas lejanas a la punta y de mayor peso molecular no se vieron afectadas considerablemente.

Además, se estudió la reducción del M_w a tiempos de exposición al ultrasonido mayores a 9 minutos, con periodos de 3 minutos y descansos en baño de hielo. Los resultados desde los 42 hasta los 123 minutos se observan en la tabla 6. En cuanto al rendimiento de recuperación de la quitosana, se obtuvo 83,2%, para un ensayo de 3 minutos aplicado 6 veces y con baños de hielo entre cada aplicación. Esto se debe a las pérdidas de las cadenas más pequeñas en los trasvases y en el proceso de diálisis.

Tabla 6. Resultados del peso molecular promedio en peso de la reducción por ultrasonido de 42 a 123 min.

Tiempo (min)	42	51	60	72	84	93	102	111	123
M_w (kDa)	285	236	218	185	171	158	150	146	131

La reducción del tamaño de las cadenas de quitosana con la aplicación de ultrasonido demostró ser más eficiente en cuestión de tiempo y energía, ya que, a diferencia del método por hidrólisis ácida, en el que se obtuvo un M_w cercano a 404 kDa a 50 °C por 42 días, con la aplicación de ultrasonido se obtuvo con 42 minutos (en intervalos de 3 min) un M_w cercano a 285 kDa. Sin embargo, en el método con ultrasonido se debe tener un mayor cuidado en el proceso de enfriamiento entre aplicación, ya que se registró una variación promedio de 40,6 °C entre las temperaturas, antes y después de la aplicación de ultrasonido. Mientras que con el método de hidrólisis el proceso es más simple.

5.4. Preparación de quitosanas ‘a medida’

5.4.1. Grado de acetilación ‘a medida’

Los valores del grado de acetilación (DA) obtenidos por $^1\text{H-RMN}$ de la acetilación de la quitosana (ver tabla 4) muestran una relación exponencial creciente. Esta tendencia se observó tanto en la acetilación de la quitosana Sigma Aldrich y la quitosana Q-10, como se

observa en la figura 29. La primera (curva de tendencia a la izquierda), es descrita por la siguiente ecuación:

$$y = 61,93 - 35,39e^{(-0,079x)} \quad \text{Ecuación 17}$$

y la segunda (curva de tendencia a la derecha) es descrita por la siguiente ecuación:

$$y = 62,44 - 73,98e^{(-0,052x)} \quad \text{Ecuación 18}$$

donde, para ambas ecuaciones, $y = \text{Grado de acetilación}$ y $x = \text{razón } \left(\frac{\text{Anh}}{\text{GlcN}}\right)$. Estas ecuaciones se pueden usar para estimar el DA en función de la razón Anh/GlcN usada en reacciones de acetilación con anhídrido acético y en las que se emplee una quitosana de partida de un DA cercano a la quitosana Sigma Aldrich o a la quitosana Q-10.

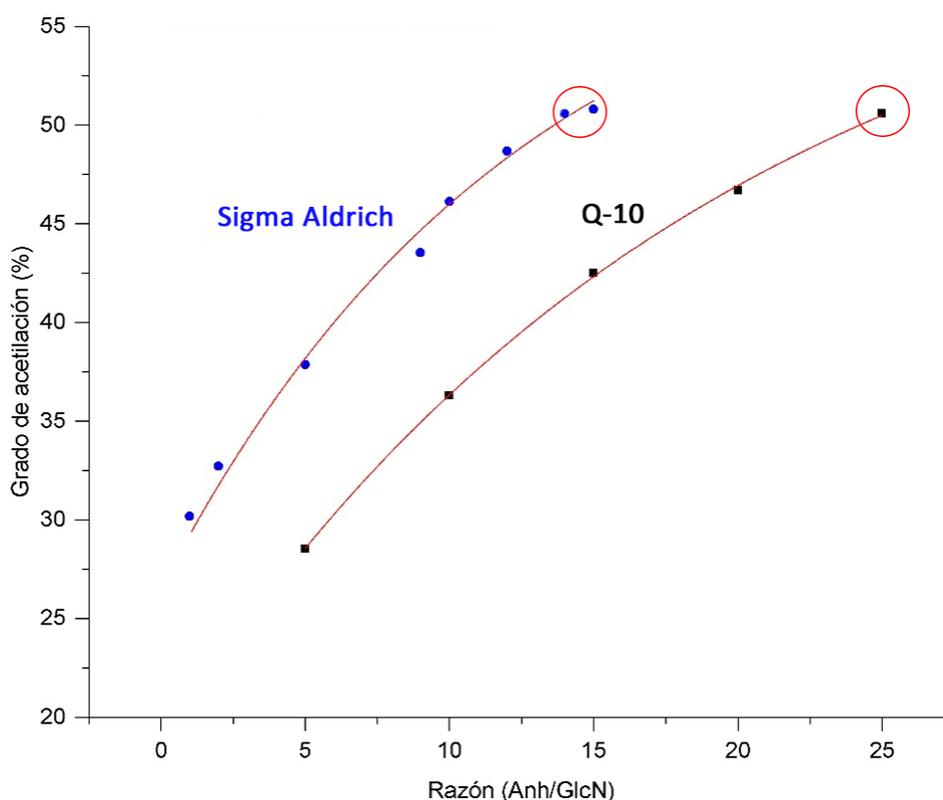


Figura 29. Variación del grado de acetilación en función de la razón Anh/GlcN en los productos de la acetilación, a partir de quitosanas Sigma Aldrich (azul) y Q-10 (negro).

Se comprobó la precisión de la ecuación 18 con una reacción de acetilación, en la que se usó una razón Anh/GlcN de 7,06 y cuyo DA teórico esperado fue de 32%. El DA hallado por ¹H-RMN fue de 33,18%. El error obtenido fue de 3,68% al comparar el valor teórico y el experimental. Además, se calculó la variación del grado de acetilación para la quitosana Sigma Aldrich y Q-10 a una misma razón Anh/GlcN, y se halló un incremento de 14 y 18%, respectivamente, por lo que, conociendo el DA de la quitosana inicial, esta ecuación se podría usar como referencia para una estimación del DA en función de la razón Anh/GlcN.

Durante la reacción de acetilación, se halló que el peso molecular de la quitosana control (sin reaccionar con anhídrido acético), se redujo de Mw=1206 a 1179 kDa, por lo que se deduce que se produjo una reducción del peso molecular de 2,3%, debido al tiempo que se encontró en medio ácido.

5.4.2. Peso molecular ‘a medida’

Se estudió la reducción del peso molecular (Mw) a tiempos mayores que 9 minutos con intervalos de 3 minutos y con enfriamiento en baño de hielo entre cada aplicación de ultrasonido, ver figura 30. En esta figura se muestra el ajuste exponencial con los datos de la tabla 6, a partir de los 42 minutos hasta los 123 minutos, en donde la reducción del Mw presenta una tendencia exponencial decreciente con el aumento del tiempo. El Mw obtenido fue de 131 kDa a los 123 minutos y la curva de tendencia es descrita por la siguiente ecuación:

$$y = 122114,77 - 554627,39e^{(-0,02974x)} \quad \text{Ecuación 19}$$

donde $y = \text{Peso molecular promedio en peso}$ y $x = \text{tiempo}$. Esta ecuación se puede usar para estimar el Mw de la quitosana en función del tiempo total de exposición al ultrasonido (sin contar el tiempo del proceso de enfriamiento entre cada aplicación de ultrasonido).

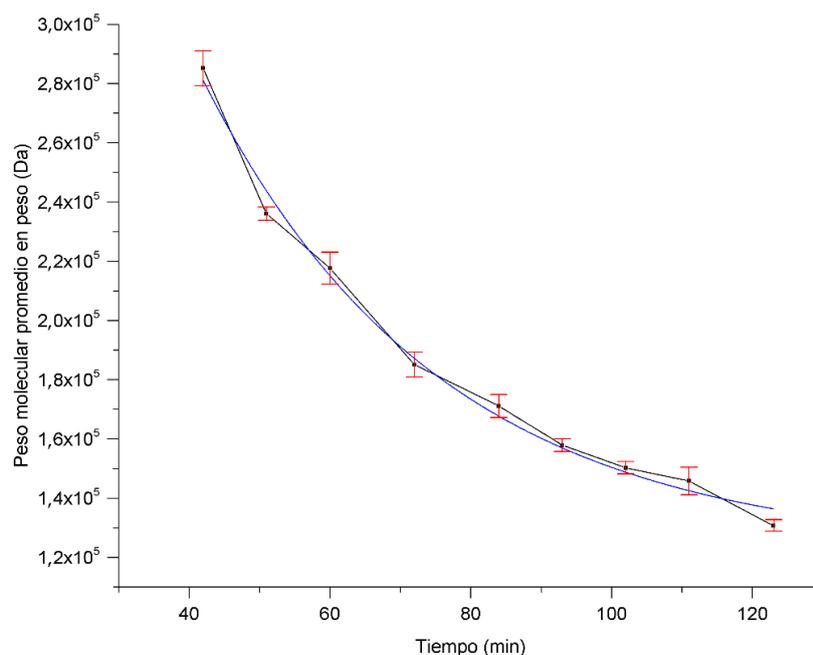


Figura 30. Variación del peso molecular en función del tiempo de exposición al ultrasonido de la quitosana Sigma Aldrich.

5.4.3. Efecto del ultrasonido en el grado de acetilación

Se estudió también la influencia de la aplicación de ultrasonido en el grado de acetilación (DA). Como se observa en la figura 31, se acetiló la quitosana Sigma Aldrich a una razón de anh/GlcN de 10 y se aplicó ultrasonido por 9 minutos seguidos a la quitosana inicial y a la acetilada. La reducción del peso molecular (Mw) después de la aplicación de ultrasonido en ambos casos fue de 43,3% y 55,3%, respectivamente. Como se explicó anteriormente, la diferencia del Mw de la quitosana inicial (1632 kDa) y la quitosana acetilada (1712 kDa) no se debe a un aumento en el número de las unidades repetitivas, sino a un cambio de conformación, y con ello de su volumen hidrodinámico. Por lo tanto, se asume que el número de unidades no cambia por la reacción y sus condiciones.

Además, en la figura 31, se observa que la variación en el grado de acetilación para la quitosana inicial y de la quitosana acetilada, luego de la exposición a 9 minutos prolongados de ultrasonido fue de 0,41% y 0,87%, respectivamente. Sin embargo, existe evidencia en la literatura sobre la desacetilación por aplicación de ultrasonido a tiempos mayores a 40 minutos continuos en solución básica de hidróxido de sodio.⁴⁹

Cálculo de la variación del DA luego de la aplicación de ultrasonido:

Quitosana inicial

$$\left| \frac{24,4 - 24,3}{24,3} \right| * 100 = 0,41\%$$

Quitosana acetilada

$$\left| \frac{45,7 - 46,1}{46,1} \right| * 100 = 0,87\%$$

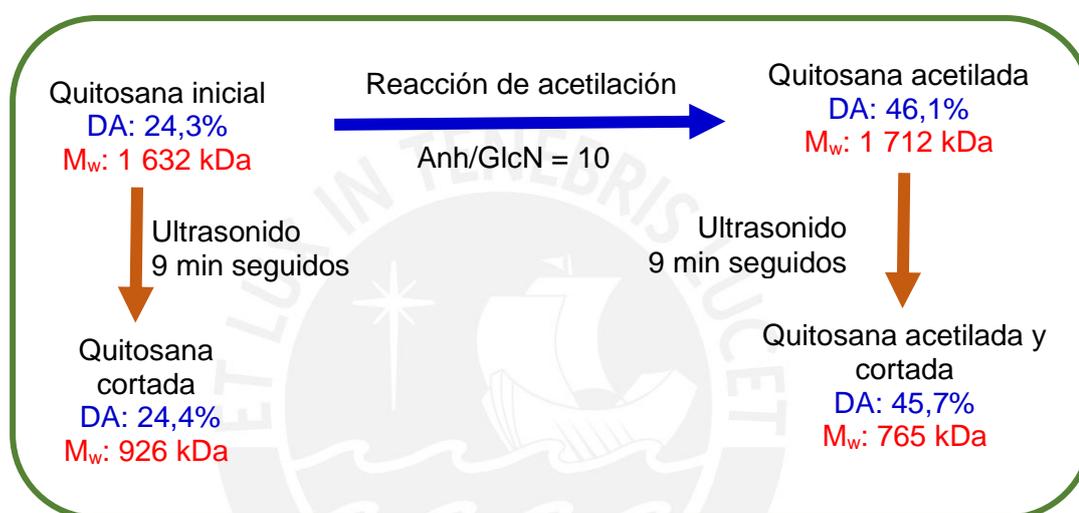


Figura 31. Esquema de acetilación y reducción del Mw de la quitosana Sigma Aldrich.

Además, se repitió el experimento con ligeras variaciones, como enfriamiento entre cada aplicación de 3 minutos, alcanzándose los 18 minutos totales de exposición al ultrasonido con otro lote de quitosana Sigma Aldrich (espectros ¹H-RMN en anexo 7), en los que se obtuvo un DA igual a 27,46% (inicial), 27,26% (9 minutos) y 27,62% (18 minutos). Esto indica que la aplicación de ultrasonido no afecta significativamente al DA.

5.4.4. Influencia del peso molecular y el grado de acetilación en el volumen hidrodinámico de la quitosana

Se halló que el peso molecular (M_w) de los productos acetilados a distintos grados de acetilación (DA), partiendo del mismo lote de quitosana, presentaban diferencias en el peso molecular promedio en peso, debido a que el volumen hidrodinámico depende de la

conformación que adopta la quitosana en solución, y esta conformación, a su vez, varía en función de la proporción de unidades acetiladas y desacetiladas (DA).

En la figura 32, se observa los cromatogramas de las quitosanas resultantes de la acetilación de Q-10 (10,56%) con distintas razones Anh/GlcN que dieron como resultado valores de DA hasta 50,6%. En esta comparación, se puede observar que las quitosanas de diferentes grados de acetilación poseen volúmenes de retención cercanos, que van desde 6,85 hasta 7,04 mL.

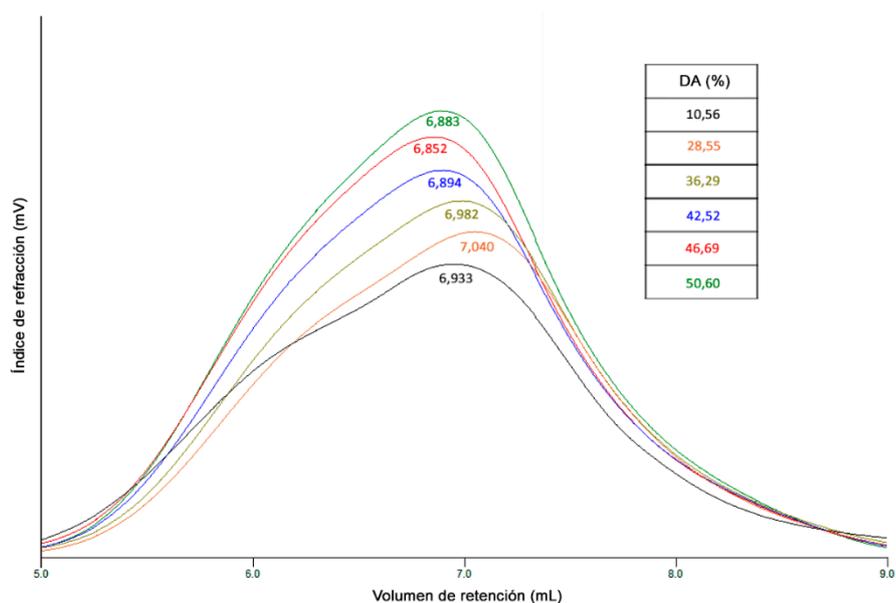


Figura 32. Comparación de los cromatogramas de las quitosanas con diferentes grados de acetilación.

En la figura 33, se muestra los valores del M_w obtenidos de los cromatogramas de GPC de la figura anterior y el DA de las muestras acetiladas. En esta figura se muestra el peso molecular de la cadena más abundante (M_p) y el peso molecular promedio en peso (M_w). Debido a que el M_w es un promedio ponderado en función del peso de las cadenas de polímero (ver ecuación 12), se cumple que el $M_w > M_p$ para una misma muestra. Se observa que, aparentemente, hay una reducción del M_w al pasar de un DA=10,6 a 28,55% y, por otro lado, el M_w se incrementa casi linealmente hasta llegar a la muestra con DA=46,69%. En el caso del M_p se observa un comportamiento similar, pero, con una disminución menor al pasar de un DA de 10,6 a 28,55% y un incremento hasta al llegar a un DA=46,69%.

Cabe recordar que en el análisis por GPC los M_w son calculados a partir del volumen hidrodinámico del polímero de en solución. En general, el volumen hidrodinámico puede variar no solo por un cambio en el número de unidades en la cadena sino también por un cambio en la conformación de la misma. En el caso de la quitosana, la conformación de las cadenas en solución y su volumen hidrodinámico dependen de la proporción entre sus dos unidades repetitivas (DA), pues las dos unidades presentan interacciones distintas, como puentes de hidrógeno, repulsiones por cargas positivas y fuerzas de London.

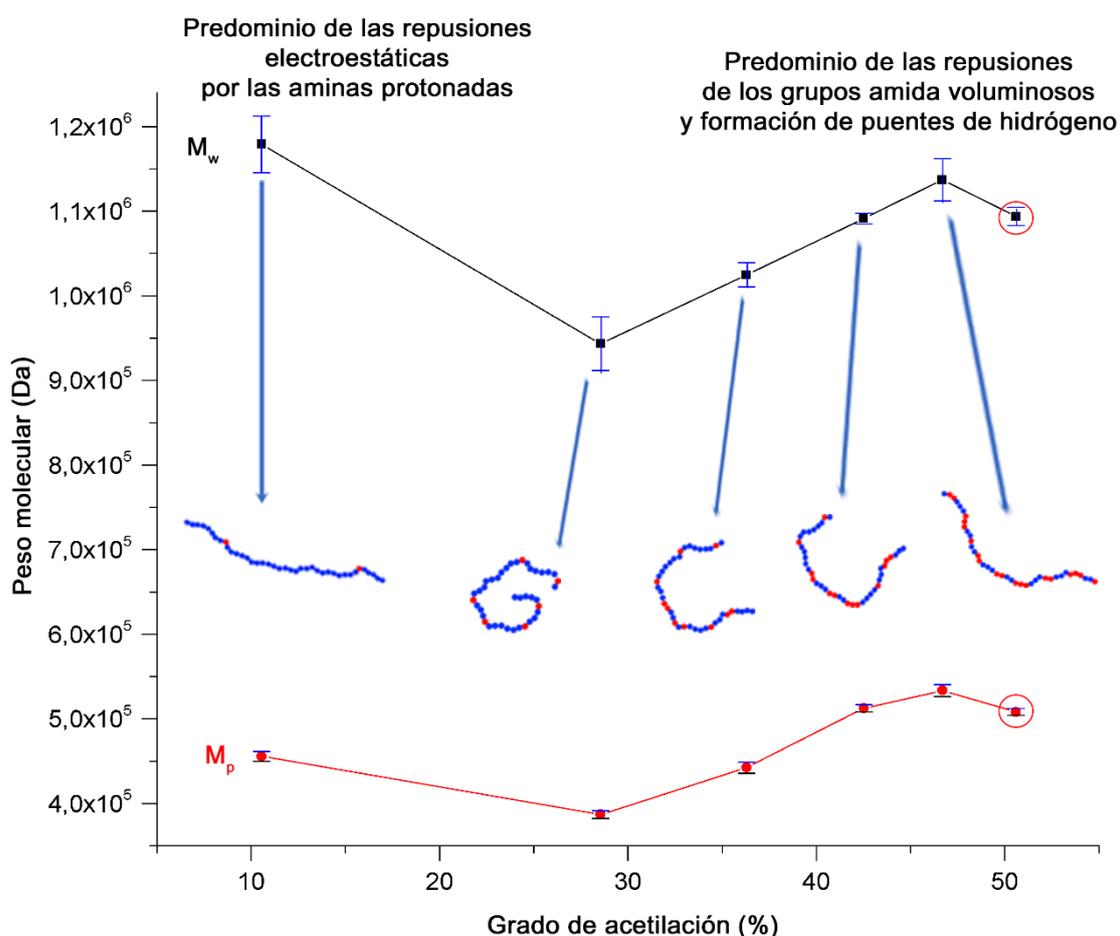


Figura 33. Relación entre el grado de acetilación, el peso molecular promedio en peso y peso molecular de la cadena más abundante de los productos acetilados con distintas razones Anh/GlcN, a partir de quitosana Q-10.

El alto valor del M_w de la quitosana inicial (DA=10,6%, $M_w=1206,4$ kDa), en comparación con las muestras acetiladas, se debe al efecto de repulsión de las cargas positivas de los grupos amina protonados a lo largo de la cadena (ver figura 33). Sin embargo, se observa una reducción en el M_w al acetilar la quitosana inicial a un DA=28,6% ($M_w=943$ kDa) y, a medida que aumenta el DA de 36,3% a 46,7%, el M_w aumenta gradualmente de 1024 kDa hasta los

1137 kDa. Este aumento en el Mw está relacionado al efecto de las repulsiones estéricas de los grupos amida (voluminosos) vecinos, debido al incremento de las unidades acetiladas a lo largo de la cadena de la quitosana. Por lo mencionado, la rotación de la quitosana se ve bloqueada por las unidades acetiladas vecinas y, en menor medida, por la formación de puente de hidrógeno intramolecular.

De acuerdo con esto, las variaciones del Mw no necesariamente corresponde a un acortamiento o extensión de las cadenas de la quitosana, sino que se puede deber a un cambio de conformación por la modificación del DA. Un comportamiento similar del Mw en función del DA para quitosanas en un rango de DA=15 a 55% fue reportado por Gámiz-González, et al,⁷⁸ y Chen, et al,⁷⁹. Ambos reportaron el incremento del Mw con el aumento del DA, a excepción de la quitosana con un DA cercano 0%, la cual presentaba el mayor Mw.

Además, en la figura 33 se observa que a DA cercanos a 50% (círculos rojos), hay una disminución del Mw, que se podría asociar a que la quitosana se vuelve parcialmente soluble. Como se explicó en el marco teórico, la solubilidad de la quitosana se debe a dos factores. El primero es la disminución de las unidades desacetiladas (aminas libres), las cuales son protonadas en medio ácido favoreciendo la solubilidad. El segundo es el incremento de las unidades acetiladas, las cuales generan el agrupamiento de las cadenas de la quitosana por la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, dificultando así su solvatación. La pérdida de solubilidad ocasiona al momento del filtrado previo a la inyección al GPC, que las cadenas con un DA mayor a 50% sean retenidas en el filtro y por lo tanto, no son analizadas y el valor del Mw no es confiable.

Para estimar el máximo DA soluble que se puede conseguir con la tendencia mostrada en la figura 29, se midió el Mw por GPC de cuatro quitosanas acetiladas con un DA estimado (con la ecuación 17) entre 46,13 y 49,39%, estos resultados se muestran en la figura 34. Se puede observar claramente que al llegar a un DA de 49,39% se produce una disminución del Mw (círculo rojo). Este comportamiento se observó de forma similar en la figura 33, para la muestra con un DA=50,6%, por lo que el problema de solubilidad ocurre entre 48 a 49%.

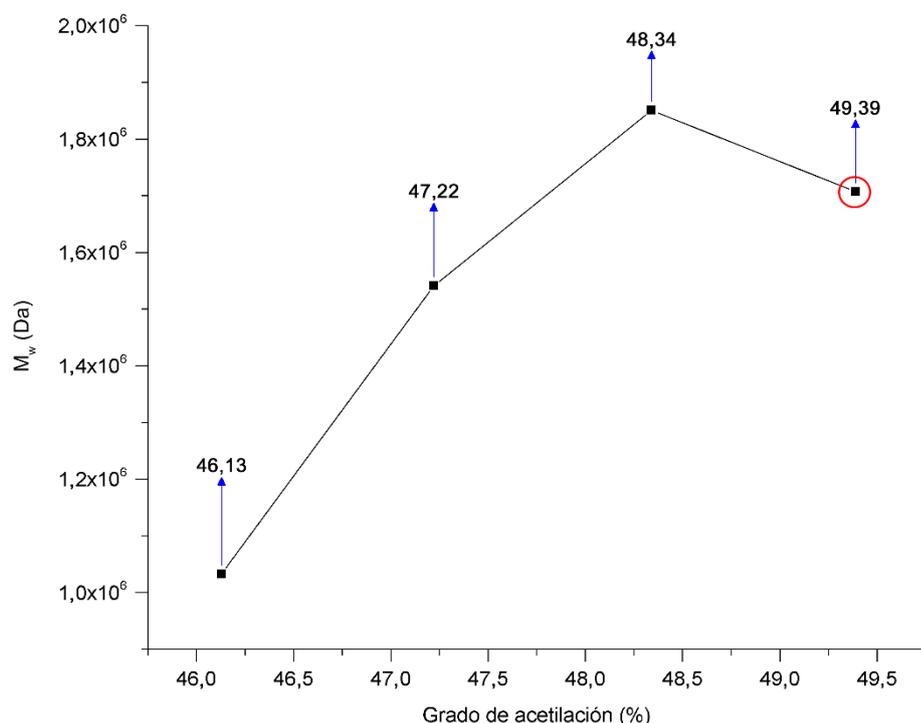


Figura 34. Relación entre el grado de acetilación y el peso molecular promedio en peso de los productos acetilados con anhídrido acético, en un rango cercano a 50%, a partir de quitosana Sigma Aldrich.

En la figura 35, se puede observar la relación entre el DA y la viscosidad intrínseca, en el que se aprecia una disminución de la viscosidad intrínseca hasta alcanzar un DA=36,29%. A un DA>36,29%, la viscosidad intrínseca varía poco, con una tendencia ligeramente creciente y finalmente, a valores de DA>46,69%, la quitosana se vuelve parcialmente soluble, por lo que el resultado, como se observa en la figura 35 (círculo rojo). Por ello, presenta una menor viscosidad intrínseca. Este comportamiento se podría explicar por la conformación que adoptan las cadenas de quitosana en solución, debido a dos efectos que compiten para la determinación de la conformación de la quitosana en solución. El primero se relaciona con el aumento de la población de los grupos amina, los cuales al estar protonados en una solución ácida, generan un estiramiento de la cadena por la repulsión electrostática entre estos grupos con carga positiva. El segundo se relaciona con el aumento de los grupos acetamida, los cuales al tratarse de grupos voluminosos y en menor medida por la formación de puentes de hidrógeno con las unidades acetiladas vecinas a lo largo de la cadena, impiden una rotación libre por repulsión.^{76,80}

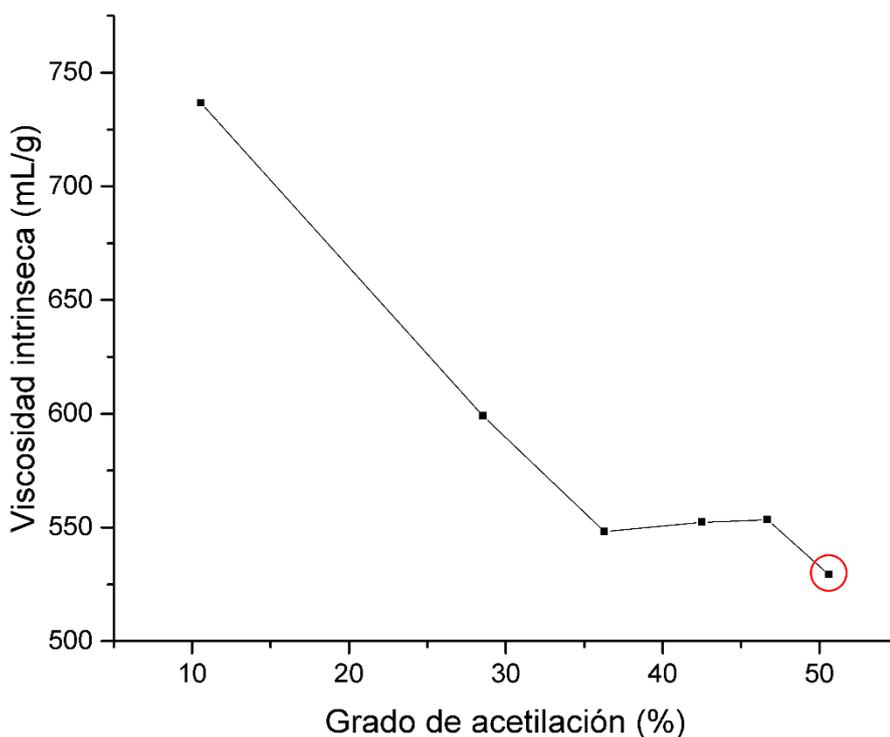


Figura 35. Relación entre la viscosidad y el grado de acetilación de los productos acetilados a distintas razones Anh/GlcN a partir de la quitosana Q-10.

Según la norma empleada (ASTM F2602) para la caracterización del Mw por GPC, el incremento del índice de refracción (dn/dc) es independiente del grado de acetilación (DA) en soluciones tampón de acetato, en el rango comprendido entre 1% y 40%.^{62,81,82} Por ello, las quitosanas que presentan un DA mayor a 40%, podrían generar resultados no precisos.

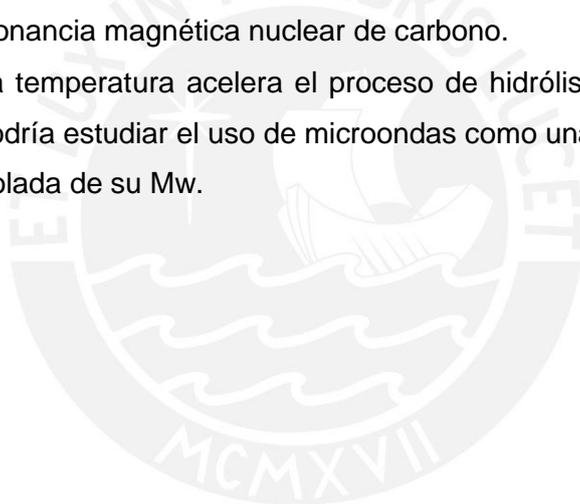
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- En este trabajo de investigación, se compararon los métodos de acetilación de la quitosana con anhídrido acético en medio acuoso ácido y con cloruro de acetilo en líquido iónico. Pese a la alta eficiencia del cloruro de acetilo para acetilar, con el que a una razón molar de cloruro de acetilo/glucosamina libre (AcCl/GlcN) de 6 se alcanzó un grado de acetilación (DA) de 96,6%, se obtuvo un rendimiento bajo de 26,4%, mientras que, para la reacción con anhídrido acético, se requirió una mayor razón molar de anhídrido acético/glucosamina libre (Anh/GlcN) de 30 para alcanzar un DA de 98,1%, y se obtuvo un rendimiento de 98,2%. Por ende, la reacción con anhídrido acético resultó ser, en términos de rendimiento, más eficiente para la acetilación de la quitosana.
- También se pudo demostrar que se puede controlar la acetilación de la quitosana con la cantidad del reactivo utilizado, es decir, con la relación molar de anhídrido acético a unidades de glucosamina libre en el polímero (razón Anh/GlcN). Por consiguiente, en este estudio se dedujeron ecuaciones que relacionan la razón molar Anh/GlcN y el grado de acetilación obtenido.
- Este estudio permitió demostrar que se puede controlar la reducción del peso molecular (Mw) de la quitosana por hidrólisis en medio ácido a diferentes temperaturas y tiempos, y por la aplicación de ultrasonido, en función del tiempo del tratamiento. La reducción del Mw de 1587,3 a 404 kDa por hidrólisis en medio ácido requiere de 42 días a 50 °C, por otro lado aplicando ultrasonido se logró la misma reducción del Mw en sólo 22,75 min. Por ende, la reducción con ultrasonido resultó ser más eficiente en términos de tiempo y energía, además, se encontró una ecuación que relaciona el tiempo de tratamiento con el Mw final.
- Asimismo, se demostró también que la aplicación de ultrasonido por tiempos cortos no afecta al grado de acetilación de la quitosana tratada, los cambios producidos para tratamientos continuos de 18 minutos fue menor que 1%.
- El análisis por cromatografía por permeación en gel (GPC) de las quitosanas preparadas en este trabajo indica que el volumen hidrodinámico no es afectado sólo por el Mw, sino también por el DA. Esto se debería al cambio en la conformación de la quitosana en solución que resulta de las interacciones de las unidades acetiladas y desacetiladas (que dependen del DA).

6.2. Recomendaciones

- Debido a que el Mw de la quitosana en solución se reduce con el tiempo cuando se encuentra disuelta en un medio ácido y, en mayor medida, con el aumento de la temperatura, se recomienda guardar las soluciones a baja temperatura, entre 4 a 10°C, o conservarla en estado sólido, si la solución no se fuera a usar antes de los 7 días de preparada.
- Es muy probable que el volumen hidrodinámico (entre otras propiedades) cambie, no sólo según la proporción de unidades (DA) sino también por la distribución de las mismas a lo largo de la cadena de la quitosana. Por lo mencionado anteriormente, para un mejor entendimiento del comportamiento de la quitosana en solución es recomendable determinar la secuencia de las unidades repetitivas, lo que podría hacerse por resonancia magnética nuclear de carbono.
- Debido a que la temperatura acelera el proceso de hidrólisis en medio ácido de la quitosana, se podría estudiar el uso de microondas como una alternativa más para la reducción controlada de su Mw.



7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kaplan, D. L. *Macromolecular Systems - Materials Approach*, 1 st ed.; Christiane Messerschmidt, R., Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 1998. pp 96-118
- (2) Nwe, N.; Furuike, T.; Tamura, H. *Chitosan from Aquatic and Terrestrial Organisms and Microorganisms: Production, Properties and Applications*; Johnson, B. M., Berkel, Z. E., Eds.; Nova Science Publishers: Hauppauge, New York, 2011. pp 29-50
- (3) 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.
- (4) Campana-Filho, S. P.; De Britto, D.; Curti, E.; Abreu, F. R.; Cardoso, M. B.; Battisti, M. V.; Sim, P. C.; Goy, R. C.; Signini, R.; Lavall, R. L. Extração, Estrutura e Propriedades de α e β -Quitina. *Quim. Nova* **2007**, *30* (3), 644–650.
- (5) FAO. El Estado Mundial de La Pesca y La Acuicultura 2016. *Contrib. a la Segur. Aliment. y la Nutr. para todos. Roma.* **2016**, 224.
- (6) Muzzarelli, R. A. A. *Chitin*, 1st ed.; Pergamon Press Inc.: New York, 1977, pp 309.
- (7) Oh, J. K.; Lee, D. I.; Park, J. M. Biopolymer-Based Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34* (12), 1261–1282.
- (8) Shajahan, A.; Shankar, S.; Sathiyaseelan, A.; Narayan, K. S.; Narayanan, V.; Kaviyaran, V.; Ignacimuthu, S. Comparative Studies of Chitosan and Its Nanoparticles for the Adsorption Efficiency of Various Dyes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1449–1458.
- (9) Wu, C. S.; Hsu, Y. C.; Liao, H. T.; Cai, Y. X. Antibacterial Activity and in Vitro Evaluation of the Biocompatibility of Chitosan-Based Polysaccharide/Polyester Membranes. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 438–447.
- (10) Thakur, V. K.; Thakur, M. K. Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2* (12), 2637–2652.
- (11) Levengood, S. K. L.; Zhang, M. Chitosan-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (21), 3161–3184.
- (12) Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.* **2015**, *2* (3), 204–226.

- (13) Alsharabasy, A. Semi-Synthesis of Chitosan with High Molecular Weight and Enhanced Deacetylation Degree. *Polym. Sci.* **2016**, *02* (02), 1–8.
- (14) Liu, S.; Sun, J.; Yu, L.; Zhang, C.; Bi, J.; Zhu, F.; Qu, M.; Jiang, C.; Yang, Q. Extraction and Characterization of Chitin from the Beetle *Holotrichia Parallela* Motschulsky. *Molecules* **2012**, *17* (4), 4604–4611.
- (15) Erdogan, S.; Kaya, M.; Akata, I. Chitin Extraction and Chitosan Production from Cell Wall of Two Mushroom Species (*Lactarius Vellereus* and *Phyllophora Ribis*). *AIP Conf. Proc.* **2017**, 1809.
- (16) Brück, W.; Slater, J.; Carney, B. Chitin and Chitosan from Marine Organisms. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*; S. K. Kim, Ed.; CRC Press: Florida, 2010; pp 11–23.
- (17) Zhang, M.; Haga, A.; Sekiguchi, H.; Hirano, S. Structure of Insect Chitin Isolated from Beetle Larva Cuticle and Silkworm (*Bombyx Mori*) Pupa Exuvia. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27* (1), 99–105.
- (18) Brimacombe, J. S.; Webber, J. M. *Mucopolysaccharides: chemical structure, distribution and isolation.*; Elsevier: Amsterdam, 1964. pp 18
- (19) Hirano, S.; Ohe, Y. A Facile N-Acylation of Chitosan with Carboxylic Anhydrides in Acidic Solutions. *Carbohydr. Res.* **1975**, *41* (1), C1–C2.
- (20) Hirano, S.; Ohe, Y. Chitosan Gels - Novel Molecular Aggregation of Chitosan in Acidic Solutions on A Facile Acylation. *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39* (6), 1337–1338.
- (21) Kubota, N.; Eguchi, Y. Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility. *Polym. J.* **1997**, *29* (2), 123–127.
- (22) Aiba, S. I. Studies on Chitosan: 1. Determination of the Degree of N-Acylation of Chitosan by Ultraviolet Spectrophotometry and Gel Permeation Chromatography. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8* (3), 173–176.
- (23) Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. N-Acylation in Chitosan and the Rate of Its Enzymic Hydrolysis. *Biomaterials* **1989**, *10* (8), 574–576.
- (24) Hirano, S.; Ohe, Y.; Ono, H. Selective N-Acylation of Chitosan. *Carbohydr. Res.* **1976**, *47* (2), 315–320.
- (25) Roberts, G. A. F.; Wood, F. A. A Study of the Influence of Structure on the Effectiveness of Chitosan as an Anti-Felting Treatment for Wool. *J. Biotechnol.* **2001**, *89* (2–3), 297–304.
- (26) Kurita, K.; Koyama, Y.; Nishimura, S.; Kamiya, M. Facile Preparation of Water-Soluble

- Chitin from Chitosan. *Chem. Lett.* **1989**, 18 (9), 1597–1598.
- (27) Kurita, K.; Chikaoka, S.; Kamiya, M.; Koyama, Y. Studies on Chitin. 14. N-acetylation Behavior of Chitosan with Acetyl Chloride and Acetic Anhydride in a Highly Swelled State. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61 (3), 927–930.
- (28) Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* **2001**, 2 (3), 765–772.
- (29) Sorlier, P.; Viton, C.; Domard, A. Relation between Solution Properties and Degree of Acetylation of Chitosan: Role of Aging. *Biomacromolecules* **2002**, 3 (6), 1336–1342.
- (30) Sashiwa, H.; Kawasaki, N.; Nakayama, A.; Muraki, E.; Yamamoto, N.; Aiba, S. I. Chemical Modification of Chitosan. 14:1 Synthesis of Water-Soluble Chitosan Derivatives by Simple Acetylation. *Biomacromolecules* **2002**, 3 (5), 1126–1128.
- (31) Liu, L.; Zhou, S.; Wang, B.; Xu, F.; Sun, R. Homogeneous Acetylation of Chitosan in Ionic Liquids. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 129 (1), 28–35.
- (32) Silva, S.; Mano, J.; Reis, R. Ionic Liquids in the Processing and Chemical Modification of Chitin and Chitosan for Biomedical Applications. *Green Chem.* **2017**, 19 (5), 1208–1220.
- (33) Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Guo, Z.; Wang, P.; Li, C.; Li, Z.; Li, P. Salt-Assisted Acid Hydrolysis of Chitosan to Oligomers under Microwave Irradiation. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340 (13), 2150–2153.
- (34) Ohtakara, A. Chitosanase from *Streptomyces Griseus*. In *Methods in enzymology*; Academic Press, 1988; Vol. 161, pp 505–510.
- (35) Shinya, S.; Fukamizo, T. Interaction between Chitosan and Its Related Enzymes: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 104, 1422–1435.
- (36) Fukamizo, T.; Ohkawa, T.; Ikeda, Y.; Goto, S. Specificity of Chitosanase from *Bacillus Pumilus*. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1994**, 1205 (2), 183–188.
- (37) Xia, W.; Liu, P.; Liu, J. Advance in Chitosan Hydrolysis by Non-Specific Cellulases. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99 (15), 6751–6762.
- (38) Agulló, E.; Mato, R.; Peniche, C.; Tapia, C.; Heras, Á.; San Román, J.; Argüelles, W.; Goycoolea, F.; Mayorga, A.; Nakamatsu, J.; et al. *Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones*, 1ra ed.; Pastor, A., Ed.; Fondo Editorial de la Pontificia universidad Católica del Perú: Lima, 2004.

- (39) Yan, X.; Evenocheck, H. M. Chitosan Analysis Using Acid Hydrolysis and HPLC/UV. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (2), 1774–1778.
- (40) Novikov, V. Y. Acid Hydrolysis of Chitin and Chitosan. *Russ. J. Appl. Chem.* **2004**, *77* (3), 484–487.
- (41) Zamani, A.; Jeihanipour, A.; Edebo, L.; Niklasson, C.; Taherzadeh, M. J. Determination of Glucosamine and N -Acetyl Glucosamine in Fungal Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (18), 8314–8318.
- (42) Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, G. Fragmentation of Chitosan by Acids. *Sci. World J.* **2013**, *2013*.
- (43) Jia, Z.; Shen, D. Effect of Reaction Temperature and Reaction Time on the Preparation of Low-Molecular-Weight Chitosan Using Phosphoric Acid. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49* (4), 393–396.
- (44) Einbu, A.; Grasdalen, H.; Vårum, K. M. Kinetics of Hydrolysis of Chitin/Chitosan Oligomers in Concentrated Hydrochloric Acid. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (8), 1055–1062.
- (45) Einbu, A.; Vårum, K. M. Depolymerization and De-N-Acetylation of Chitin Oligomers in Hydrochloric Acid. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (1), 309–314.
- (46) Savitri, E.; Juliastuti, S. R.; Handaratri, A.; Sumarno; Roesyadi, A. Degradation of Chitosan by Sonication in Very-Low-Concentration Acetic Acid. *Polym. Degrad. Stab.* **2014**, *110*, 344–352.
- (47) Chen, R. H.; Chang, J. R.; Shyur, J. S. Effects of Ultrasonic Conditions and Storage in Acidic Solutions on Changes in Molecular Weight and Polydispersity of Treated Chitosan. *Carbohydr. Res.* **1997**, *299* (4), 287–294.
- (48) Wang, W.; Lin, W. Ultrasonic Degradation of Deacetylated Chitin. *Huaxue Tongbao* **1989**, *9* (5), 41–44.
- (49) Muzzarelli, R. A. A.; Rocchetti, R. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* **1985**, *5* (6), 461–472.
- (50) Allan, G. G.; Peyron, M. Molecular Weight Manipulation of Chitosan I: Kinetics of Depolymerization by Nitrous Acid. *Carbohydr. Res.* **1995**, *277* (2), 257–272.
- (51) ASTM F2260-18. Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR). *ASTM*. 2018.
- (52) Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.;

- Rinaudo, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer (Guildf)*. **2001**, *42* (8), 3569–3580.
- (53) 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.
- (54) Gaborieau, M.; Castignolles, P. Size-Exclusion Chromatography (SEC) of Branched Polymers and Polysaccharides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (4), 1413–1423.
- (55) Varum, K. M.; Smidsrod, O. *Chitosans*; CRC Press, Ed.; CRC Taylor and Francis, Publishers Boca Raton FL, USA: Florida, 2006, pp 497-520.
- (56) Lamarque, G.; Lucas, J. M.; Viton, C.; Domard, A. Physicochemical Behavior of Homogeneous Series of Acetylated Chitosans in Aqueous Solution: Role of Various Structural Parameters. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 131–142.
- (57) Rinaudo, M. Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials. *Polym. Int.* **2008**, *57* (3), 397–430.
- (58) Yi, H.; Wu, L.-Q.; Bentley, W. E.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N.; Payne, G. F. Biofabrication with Chitosan. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 2881–2894.
- (59) Moore, G. K.; Roberts, G. A. F. Chitosan Gels: 1. Study of Reaction Variables. *Int. J. Biol. Macromol.* **1980**, *2* (2), 73–77.
- (60) Hamed, I.; Özogul, F.; Regenstein, J. M. Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *48*, 40–50.
- (61) Kurita, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8* (3), 203–226.
- (62) ASTM F2602-13. Standard Test Method for Determining the Molar Mass of Chitosan and Chitosan Salts by Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light. *ASTM* **2013**, *13*, 9–15.
- (63) 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.
- (64) Czechowska-Biskup, R.; Rokita, B.; Lotfy, S.; Ulanski, P.; Rosiak, J. M. Degradation of Chitosan and Starch by 360-KHz Ultrasound. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *60* (2), 175–184.
- (65) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed.;

- Harris, D., Ed.; Cengage learning: Belmont, **2017**, pp 430 - 472.
- (66) Kendix, E. L.; Prati, S.; Joseph, E.; Sciutto, G.; Mazzeo, R. ATR and Transmission Analysis of Pigments by Means of Far Infrared Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394* (4), 1023–1032.
- (67) 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.
- (68) Kumirska, J.; Czerwicka, M.; Kaczyński, 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.
- (69) Paulino, A. T.; Simionato, J. I.; Garcia, J. C.; Nozaki, J. Characterization of Chitosan and Chitin Produced from Silkworm Crystals. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64* (1), 98–103.
- (70) Zainoha Z.; Zatil I.; Mohammad, A. H. Effect of Degree of Deacetylation of Chitosan on Thermal Stability and Compatibility of Chitosan-Polyamide Blend. *BioResources* **2012**, *7* (4), 5568–5580.
- (71) Shen, Z.; Kamdem, D. P. Development and Characterization of Biodegradable Chitosan Films Containing Two Essential Oils. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 289–296.
- (72) 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.
- (73) NOVEMA Max <https://www.pss-polymer.com/products/columns-for-gpcsecgfc/novema-max/> (accessed Nov 12, 2018).
- (74) Held, D.; Gores, F. Tips & Tricks GPC/SEC: System Peaks or Ghost Peaks in GPC/SEC. *The column* **2019**, *15* (2), 17–21.
- (75) Bloustone, J.; Berejnov, V.; Fraden, S. Measurements of Protein-Protein Interactions by Size Exclusion Chromatography. *Biophys. J.* **2003**, *85* (4), 2619–2623.
- (76) Schatz, C.; Viton, C.; Delair, T.; Pichot, C.; Domard, A. Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (3), 641–648.
- (77) Mine, S.; Izawa, H.; Kaneko, Y.; Kadokawa, J. I. Acetylation of α -Chitin in Ionic Liquids. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (16), 2263–2265.
- (78) Gámiz-González, M. A.; Piskin, A. E.; Pandis, C.; Chatzimanolis-Moustakas, C.;

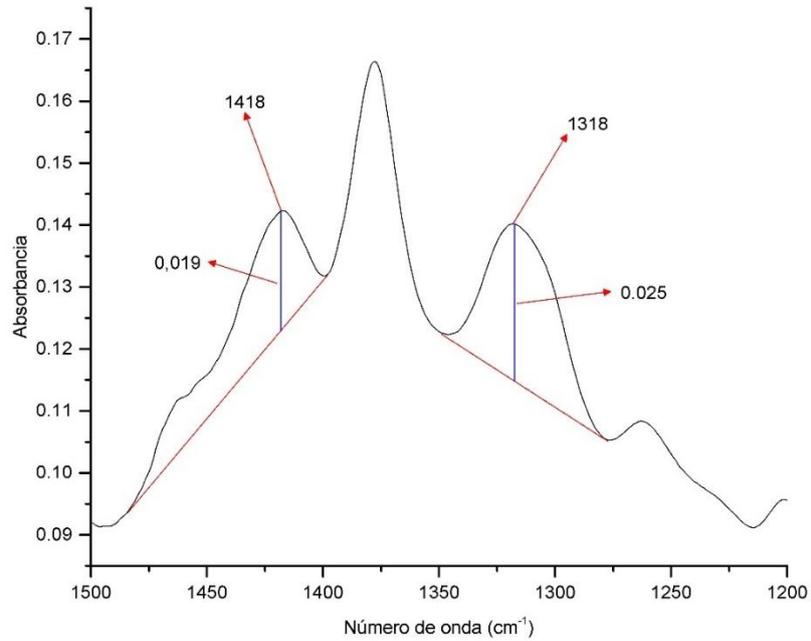
- Kyritsis, A.; Marí, B.; Ribelles, J. L. G.; Vidaurre, A. Determining the Influence of N-Acetylation on Water Sorption in Chitosan Films. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *133*, 110–116.
- (79) Chen, L.; Du, Y.; Tian, Z.; Sun, L. Effect of the Degree of Deacetylation and the Substitution of Carboxymethyl Chitosan on Its Aggregation Behavior. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2005**, *43* (3), 296–305.
- (80) Kasaai, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) Equation Viscometric Constants for Chitosan in Any Solvent–Temperature System Using Experimental Reported Viscometric Constants Data. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (3), 477–488.
- (81) Wyatt, P. J. Light Scattering and the Absolute Characterization of Macromolecules. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272* (1), 1–40.
- (82) Wang, W.; Qin, W.; Bo, S. Influence of the Degree of Deacetylation of Chitosan on Its Mark-Houwink Equation Parameters. *Makromol Chem, Rapid Comm.* **1991**, *561*, 559–561.



8. Anexos

Anexo 1. Cálculo del DA de la quitosana Sigma Aldrich a partir de espectros de FT-IR-ATR.

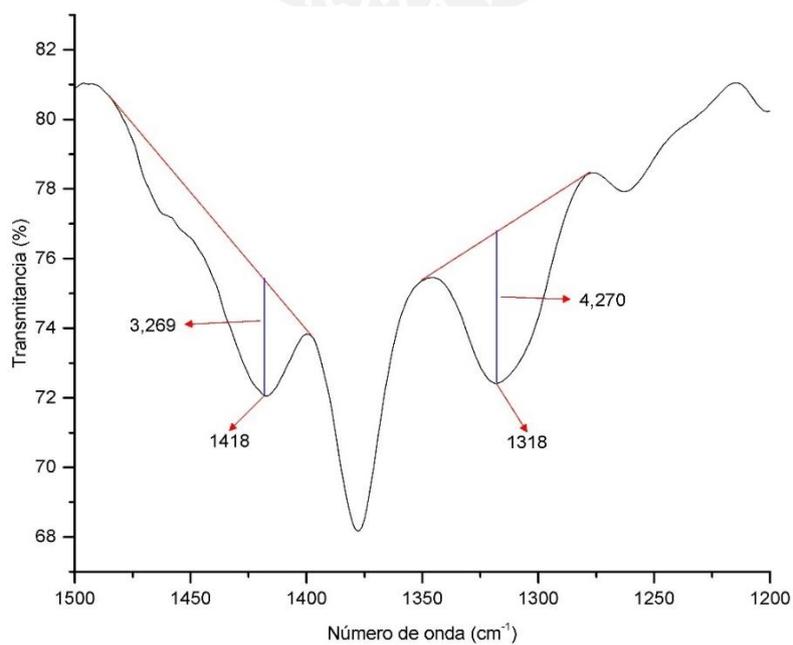
Por Absorbancia



$$DA (\%) = 31,92 * \frac{0,025}{0,019} - 1,22$$

$$DA (\%) = 40,78$$

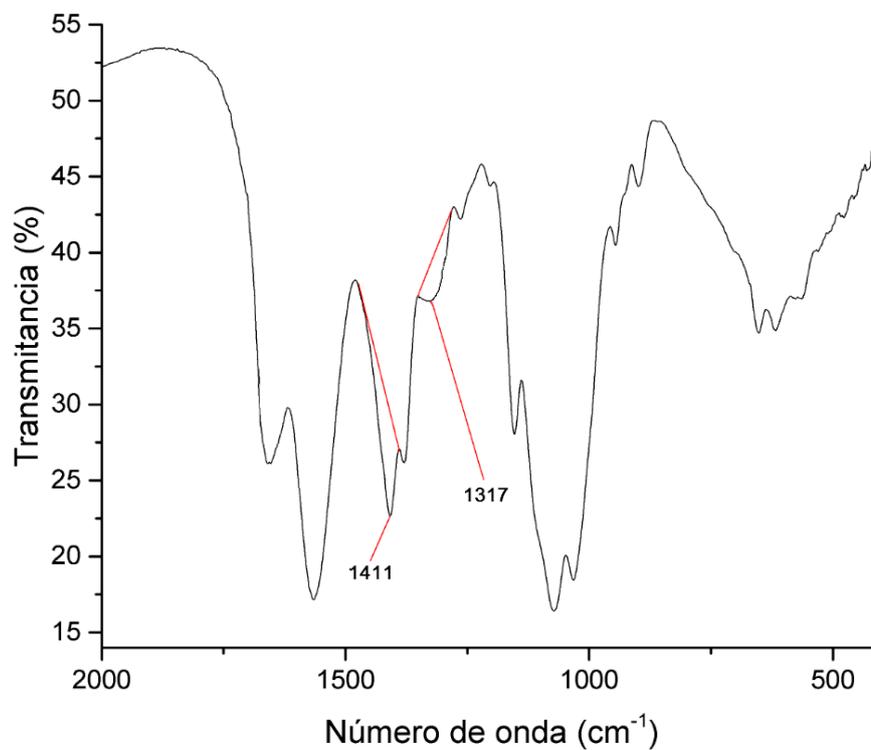
Por Transmitancia



$$DA (\%) = 31,92 * \frac{4,270}{3,269} - 1,22$$

$$DA (\%) = 40,47$$

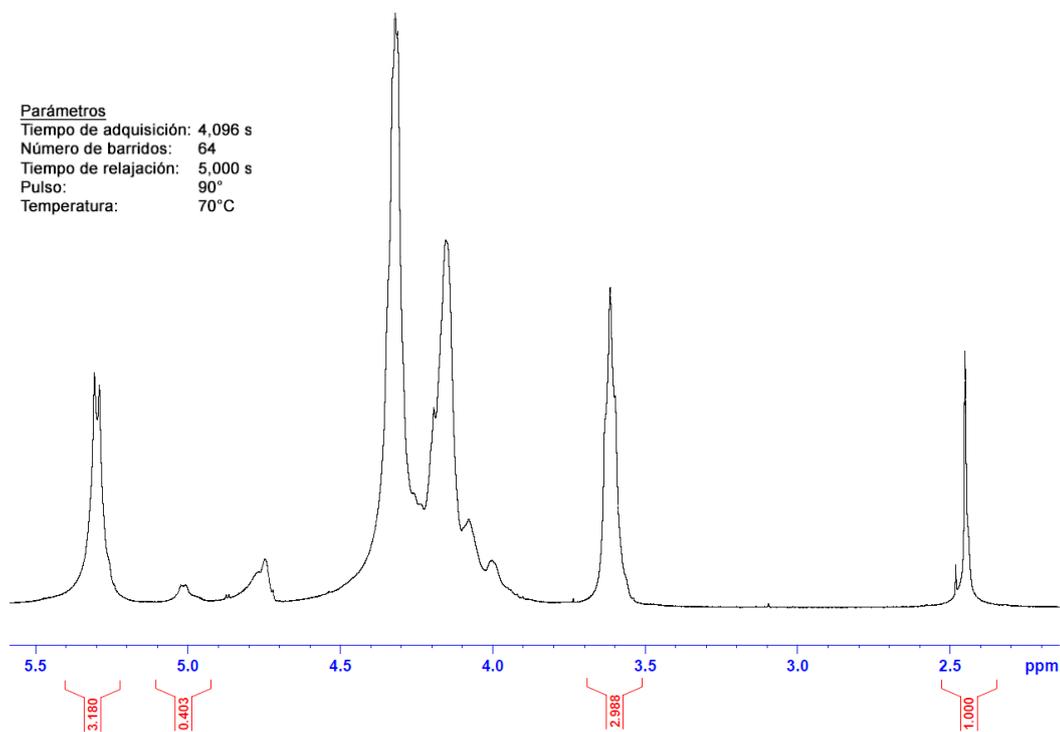
Anexo 2. Cálculo del DA de la quitosana Q-10 por FT-IR.



$$DA (\%) = 31,92 * \frac{1,07}{2,34} - 1,22$$

$$DA (\%) = 13,37$$

Anexo 3. Espectro de ^1H -RMN de cloruro de quitosana (Q-10) en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500MHz .



Quitosana Q-10 con un DA= 10,66%.

$$\left[\frac{3,180 + 2,988}{2} \right] = 3,084 \quad \text{Unidades desacetiladas}$$

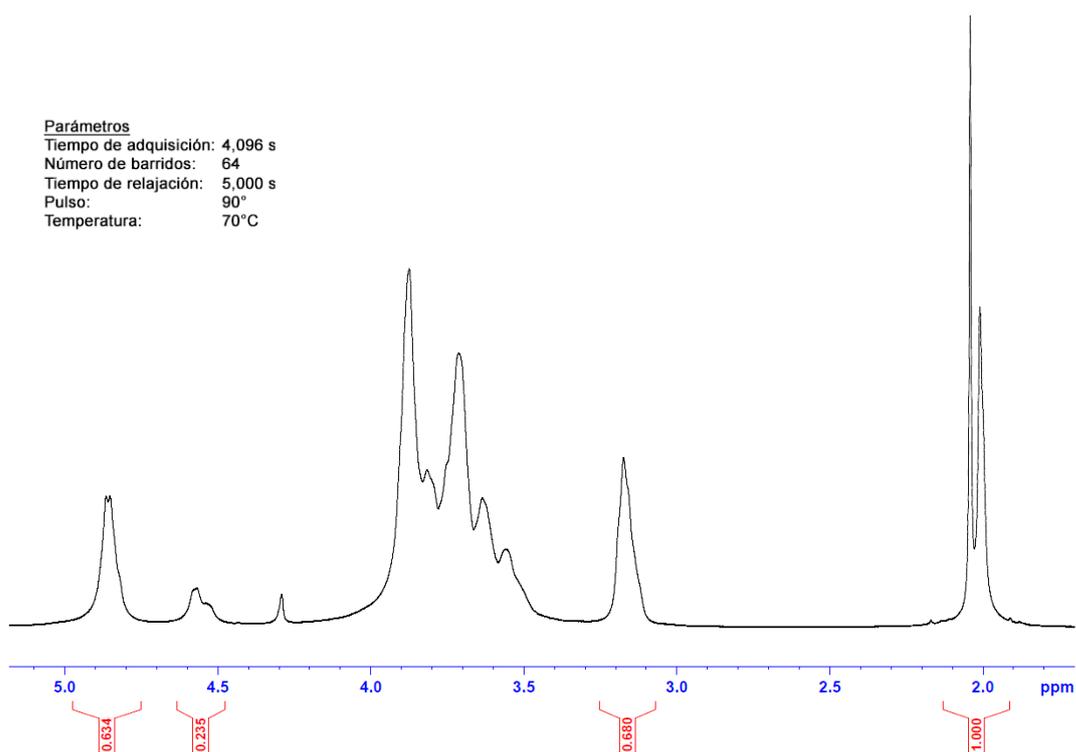
$$\left[\frac{0,403 + \frac{1,000}{3}}{2} \right] = 0,368 \quad \text{Unidades acetiladas}$$

$$\left[\frac{0,368}{3,084 + 0,368} \right] * 100 = 10,66\%$$

Anexo 4. Espectros de ^1H -RMN de cloruro de quitosana de productos de acetilación con anhídrido acético, en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ a 70°C y 500MHz.

Quitosana de partida Sigma Aldrich

Razón Anh/GlcN=1

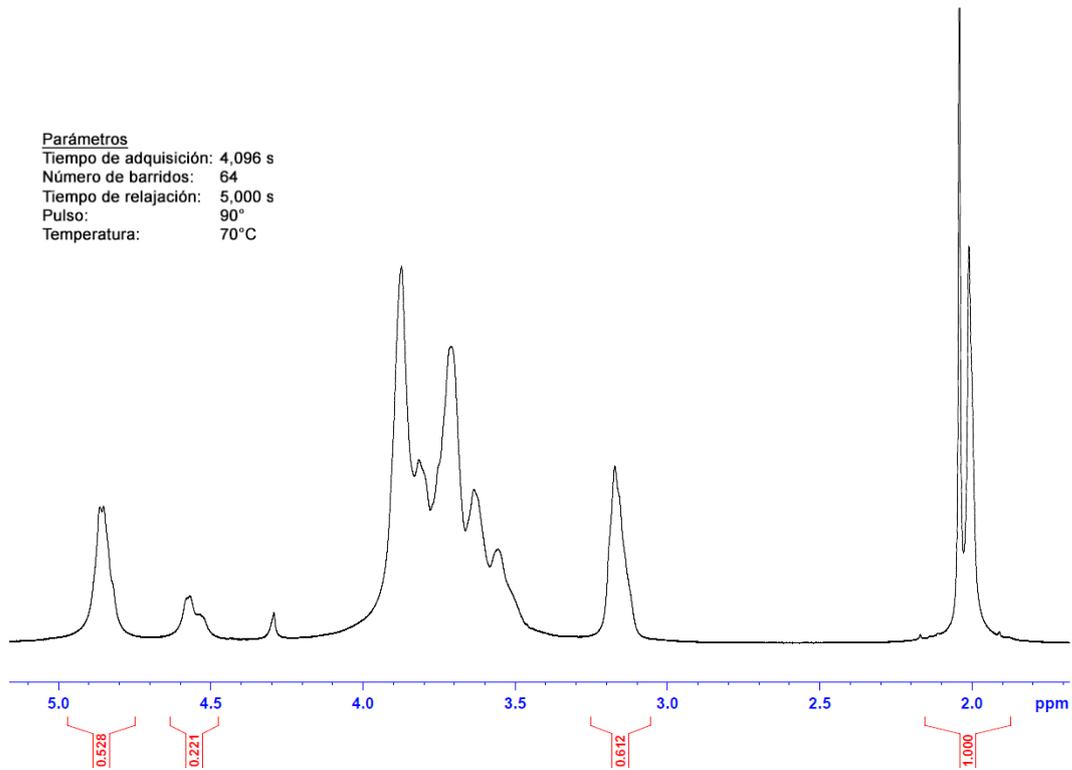


$$\left[\frac{0,634 + 0,680}{2} \right] = 0,657 \quad \text{Unidades desacetiladas}$$

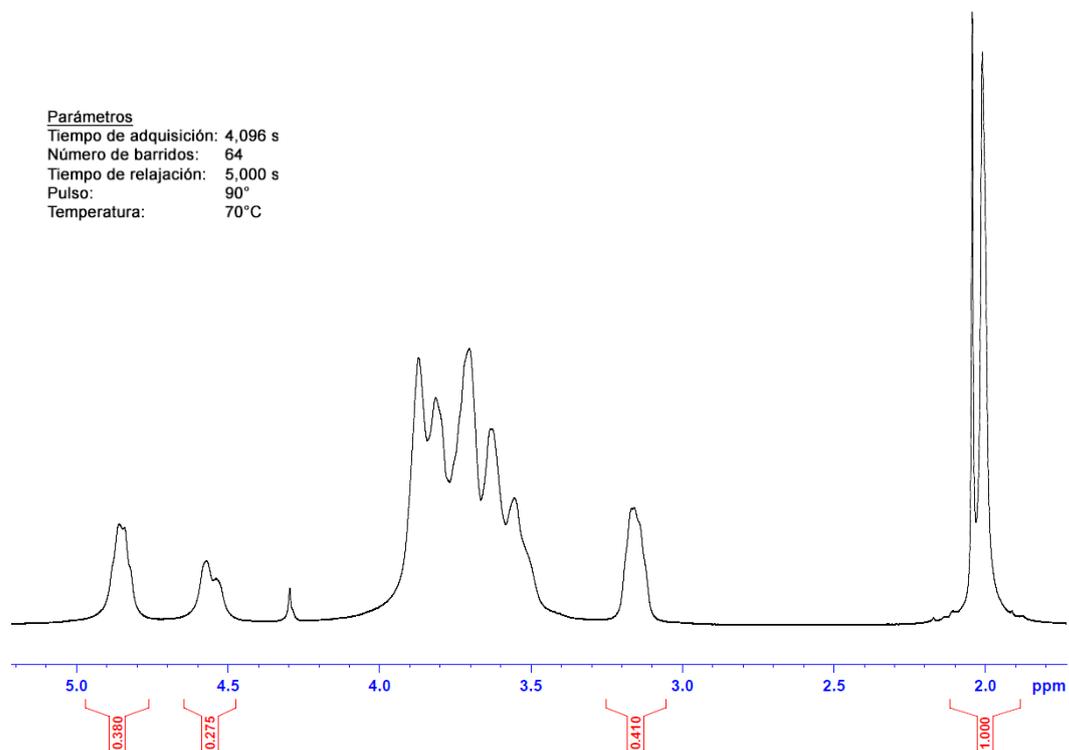
$$\left[\frac{0,235 + \frac{1,000}{3}}{2} \right] = 0,284 \quad \text{Unidades acetiladas}$$

$$\left[\frac{0,284}{0,657 + 0,284} \right] * 100 = 30,17\%$$

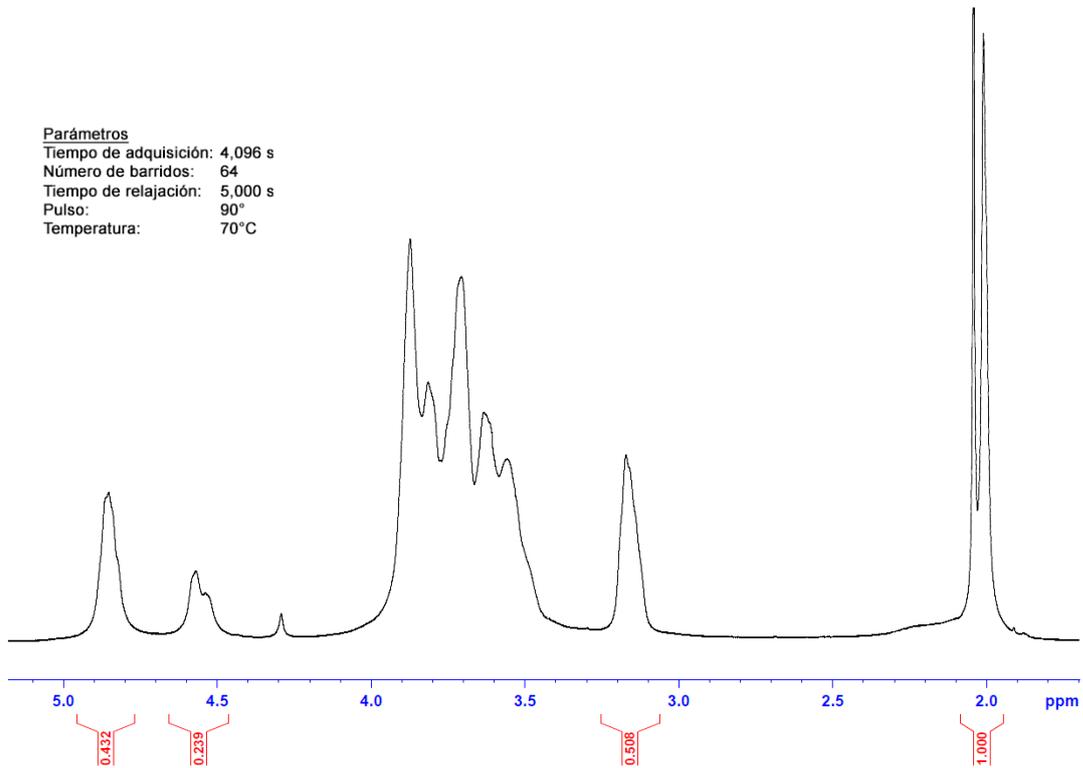
Razón Anh/GlcN=2



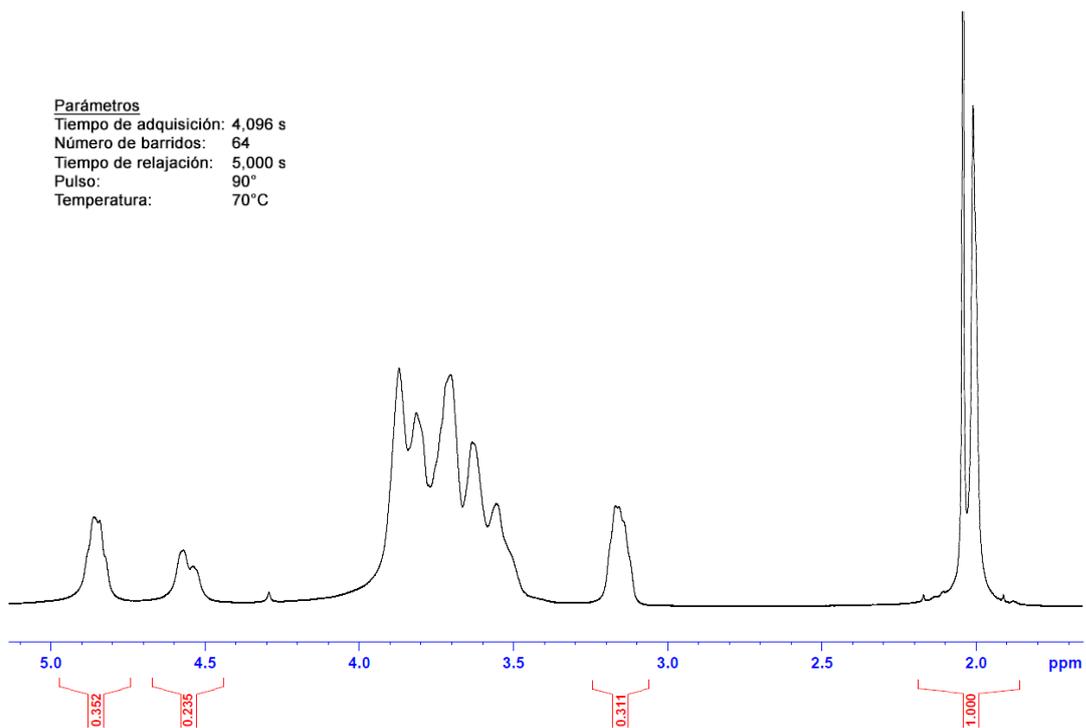
Razón Anh/GlcN=5



Razón Anh/GlcN=9

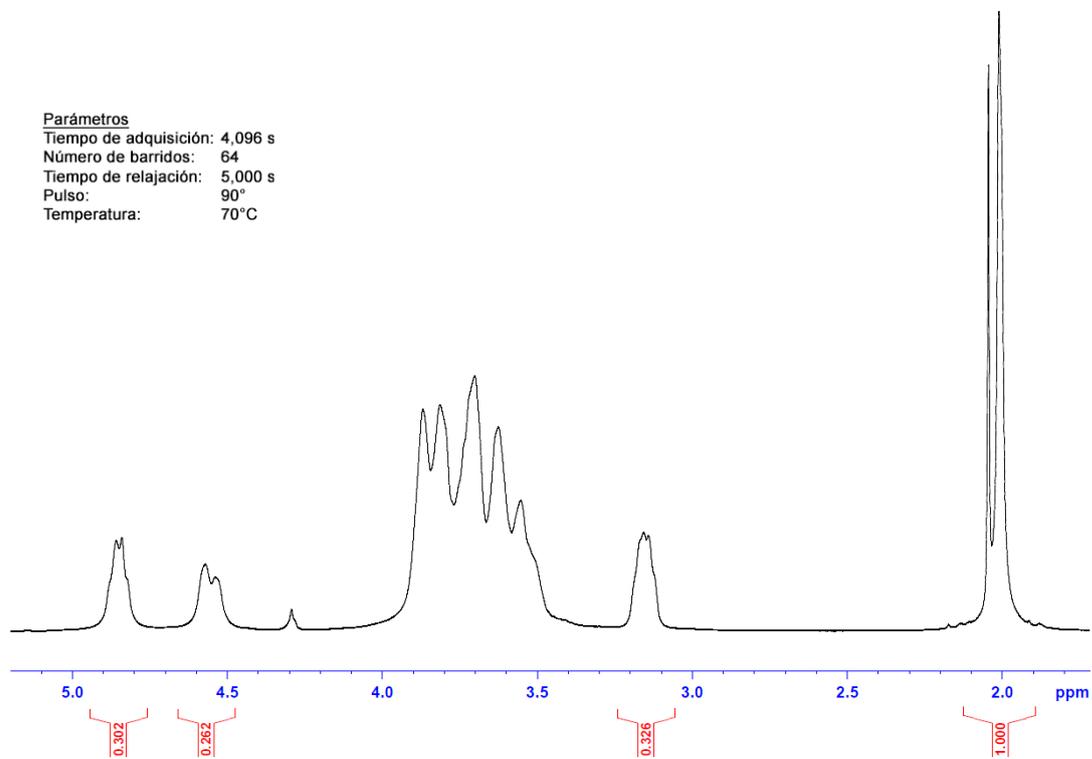


Razón Anh/GlcN=10



Razón Anh/GlcN=12

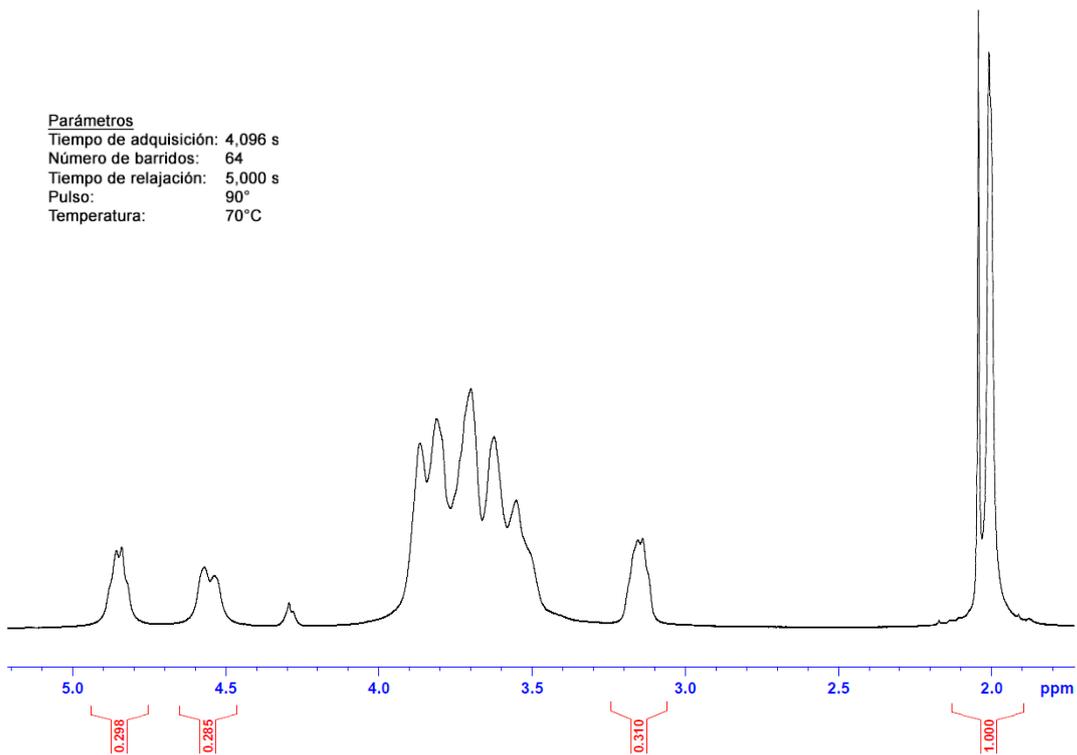
Parámetros
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C



Razón Anh/GlcN=14

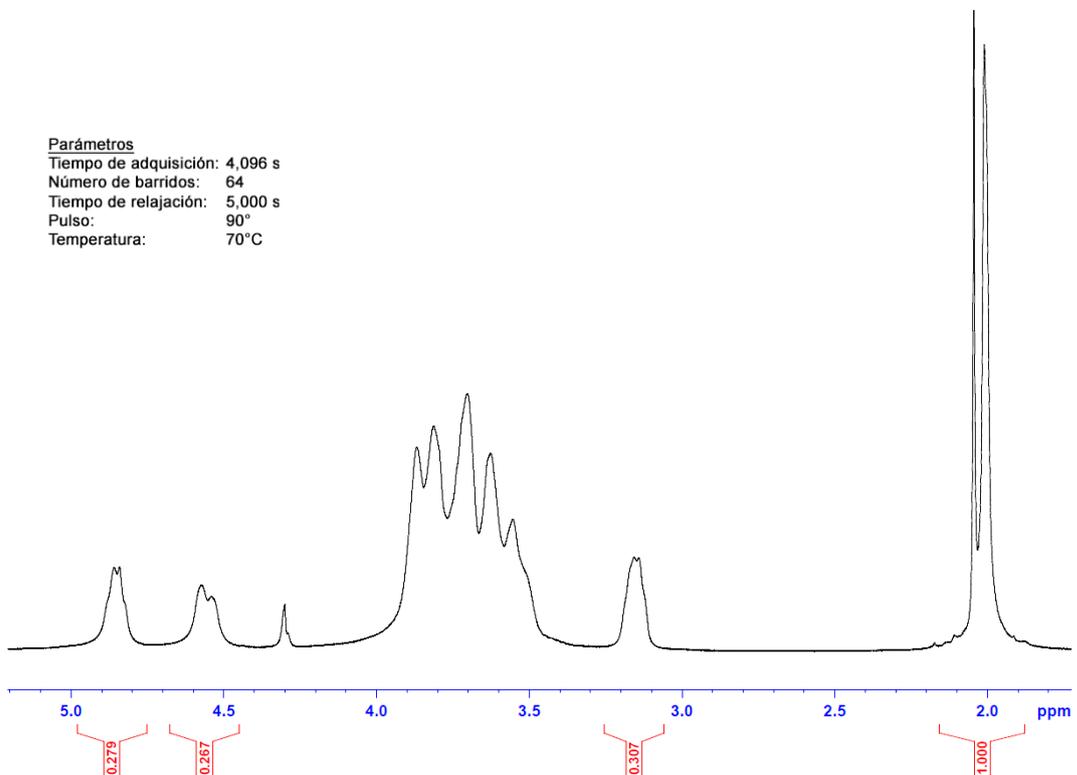


Parámetros
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C



Razón Anh/GlcN=15

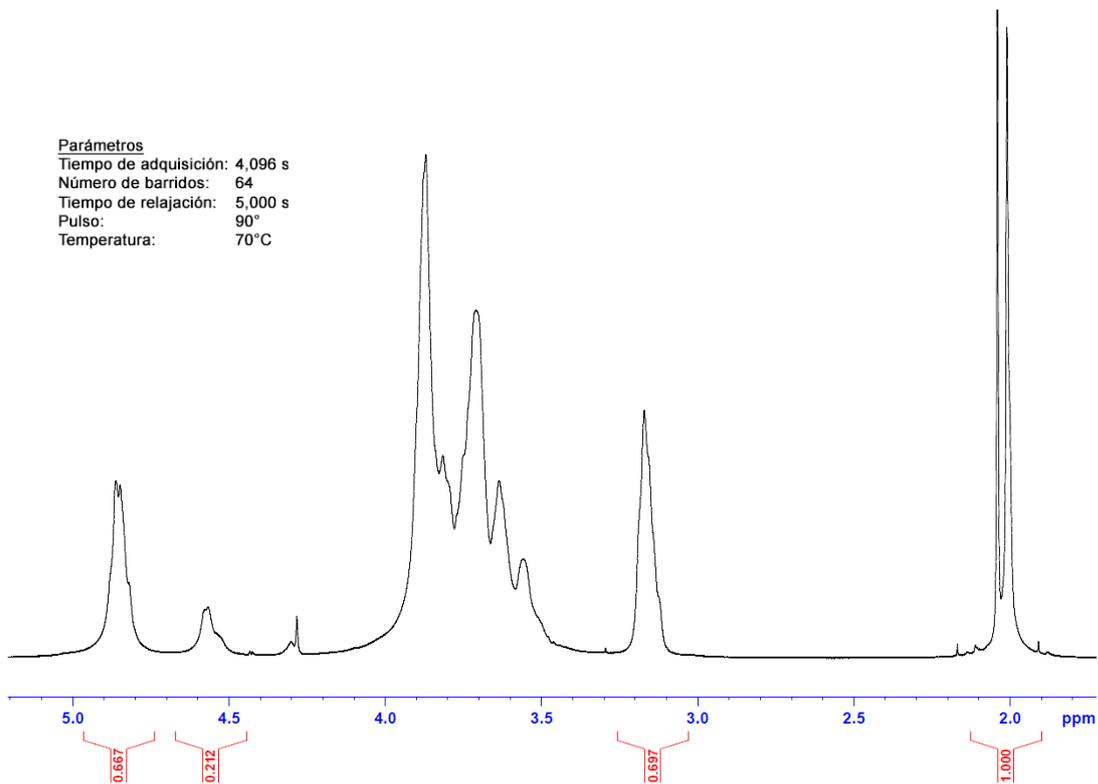
Parámetros
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C



Qitosana de partida Q-10

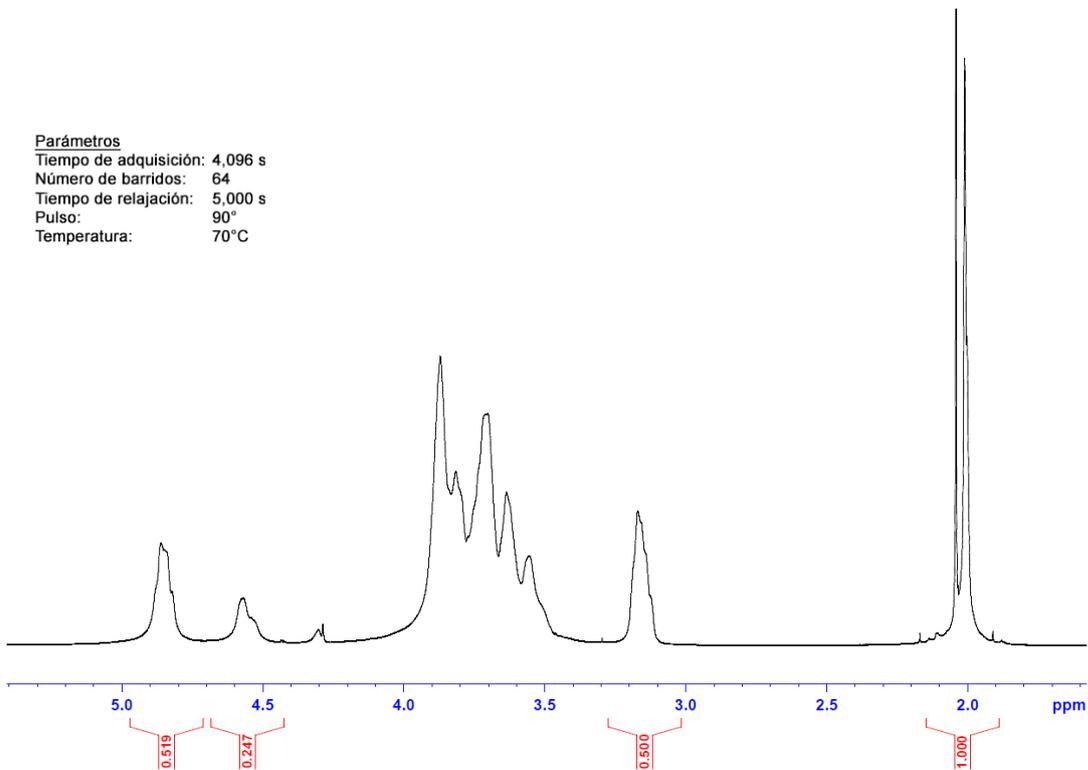
Razón Anh/GlcN=5

Parámetros
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C



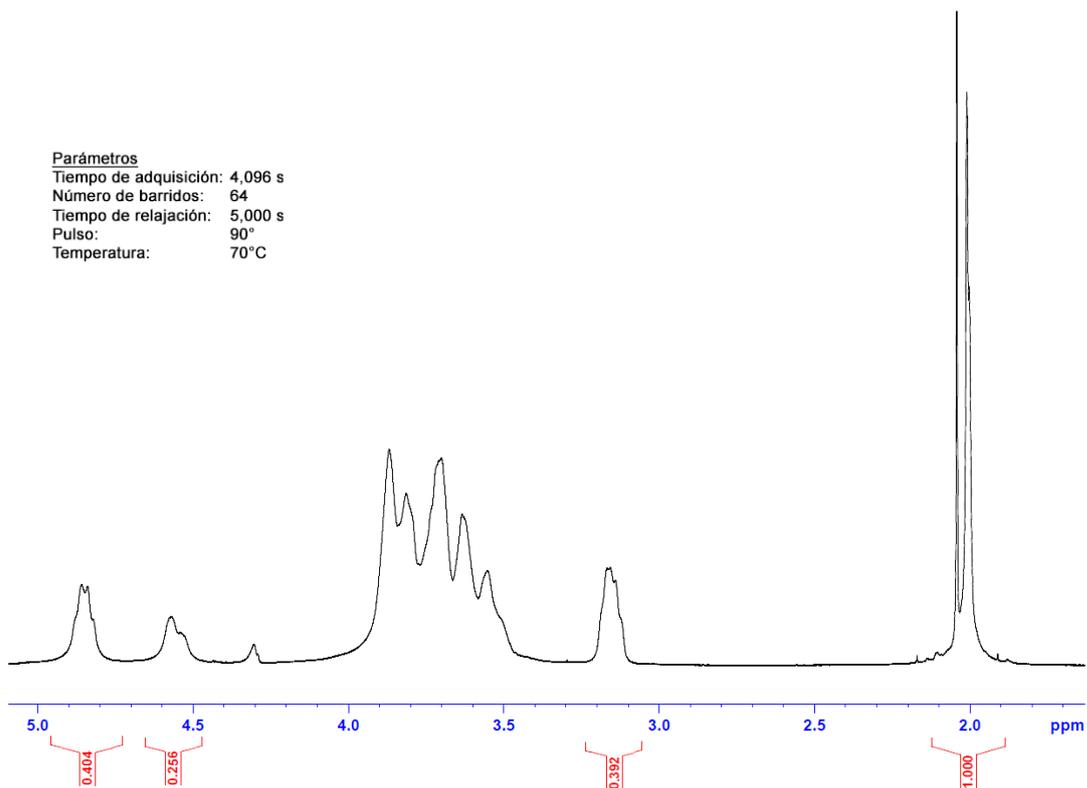
Razón Anh/GlcN=10

Parámetros
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C



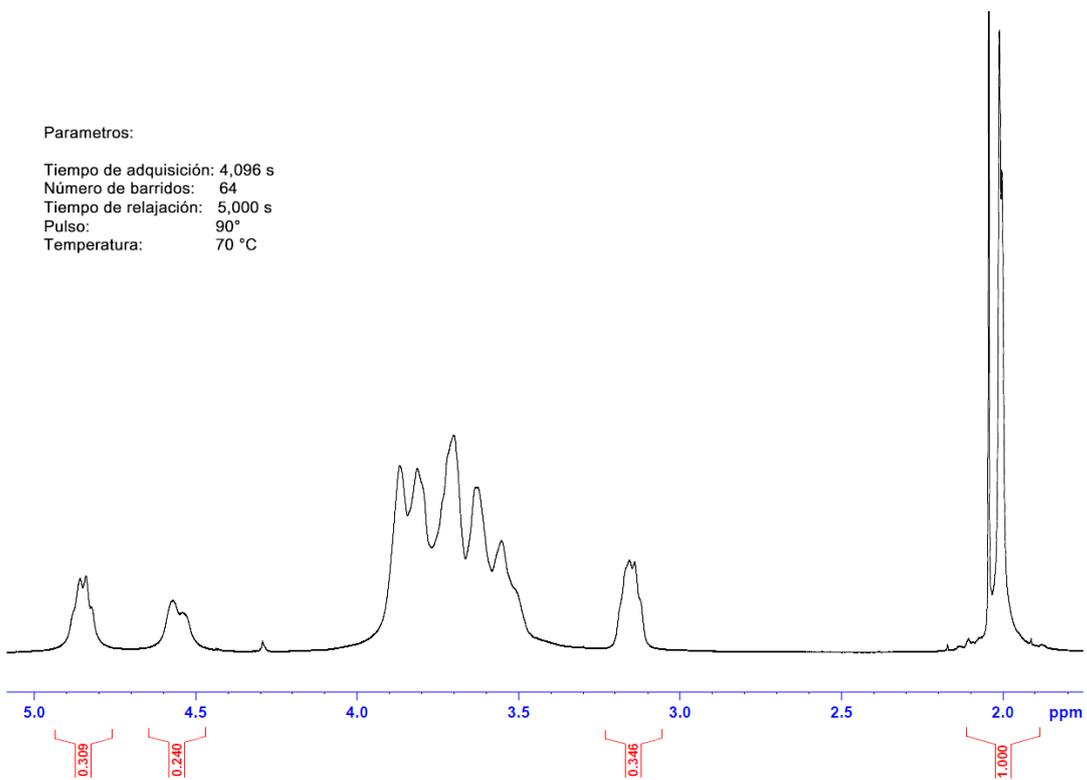
Razón Anh/GlcN=15

Parámetros
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C



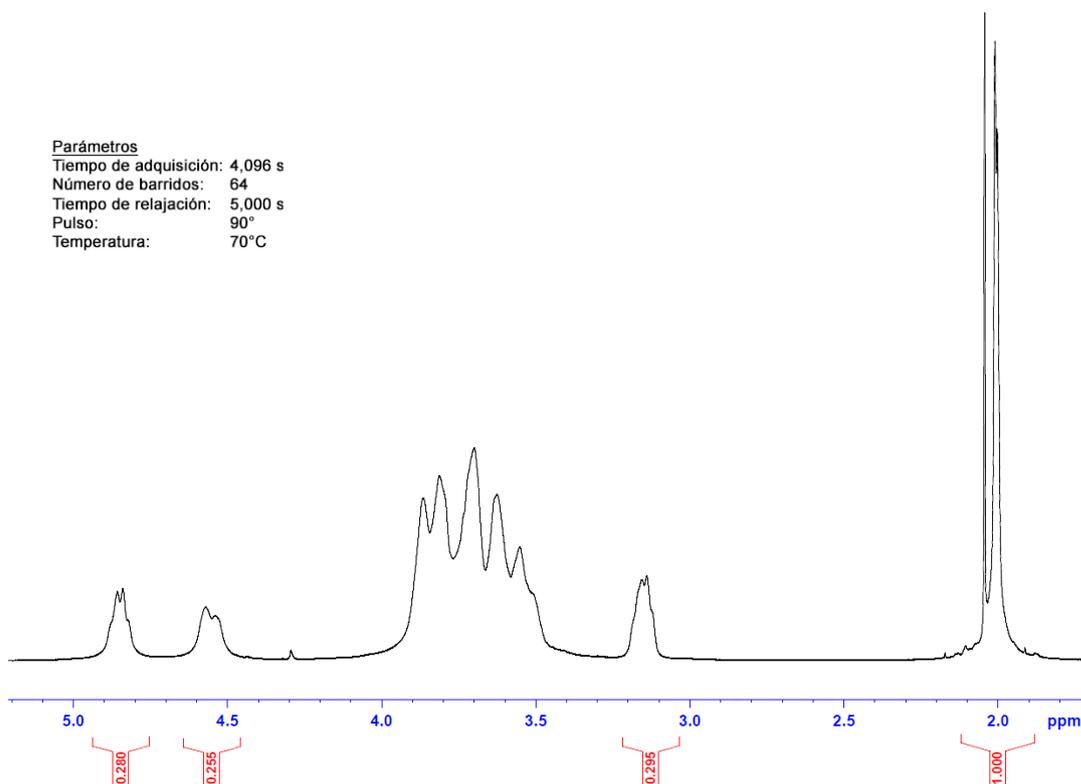
Razón Anh/GlcN=20

Parametros:
Tiempo de adquisición: 4,096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5,000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70 °C



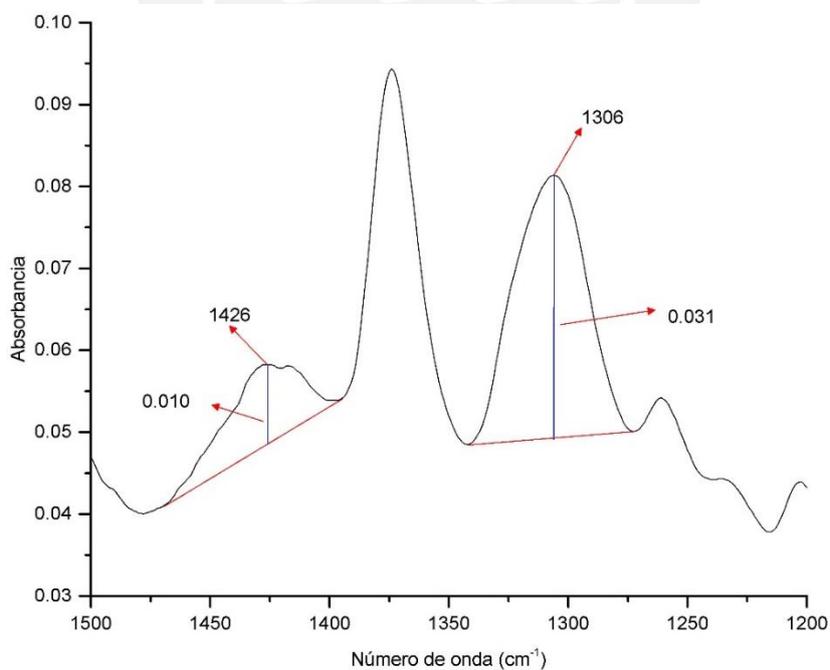
Razón Anh/GlcN=25

Parámetros
 Tiempo de adquisición: 4,096 s
 Número de barridos: 64
 Tiempo de relajación: 5,000 s
 Pulso: 90°
 Temperatura: 70°C



Anexo 5. Cálculo del DA a partir de espectros de FT-IR-ATR.

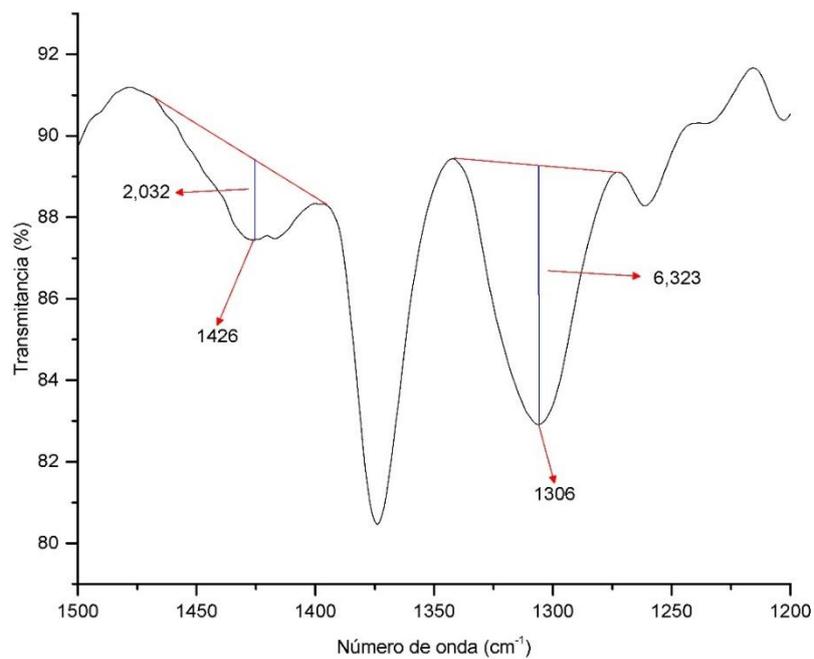
Quitosana acetilada a una razón (Anh/GlcN) de 30 - Absorbancia



$$DA (\%) = 31,92 * \frac{0,031}{0,010} - 1,22$$

$$DA (\%) = 97,73\%$$

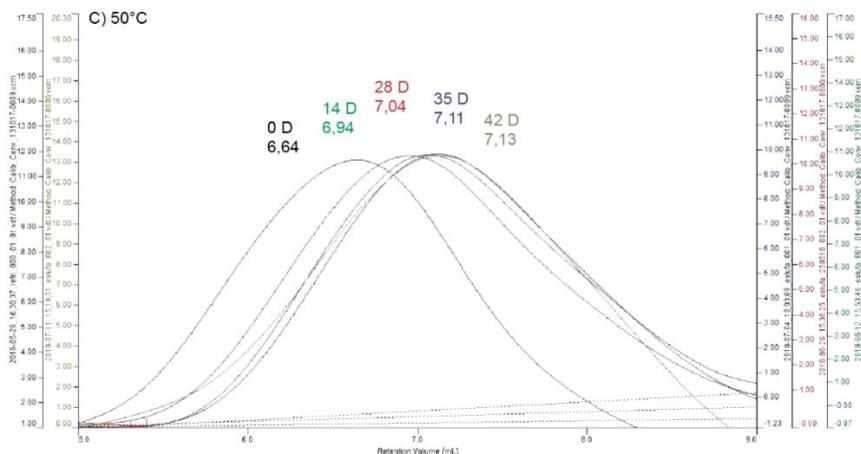
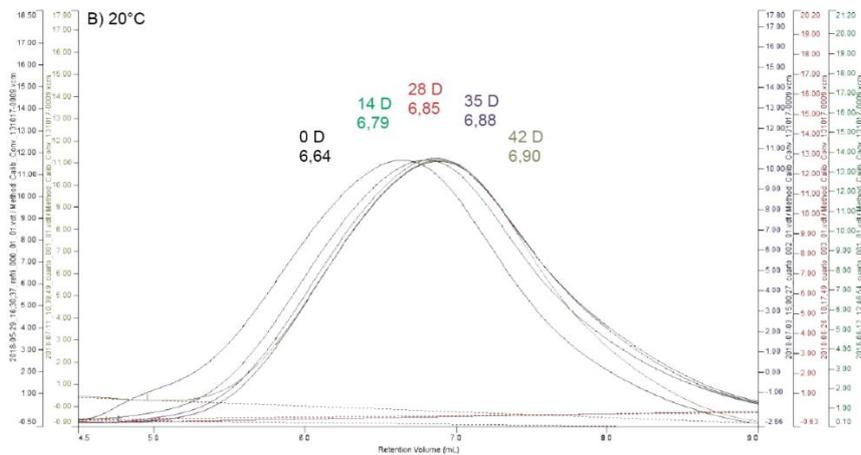
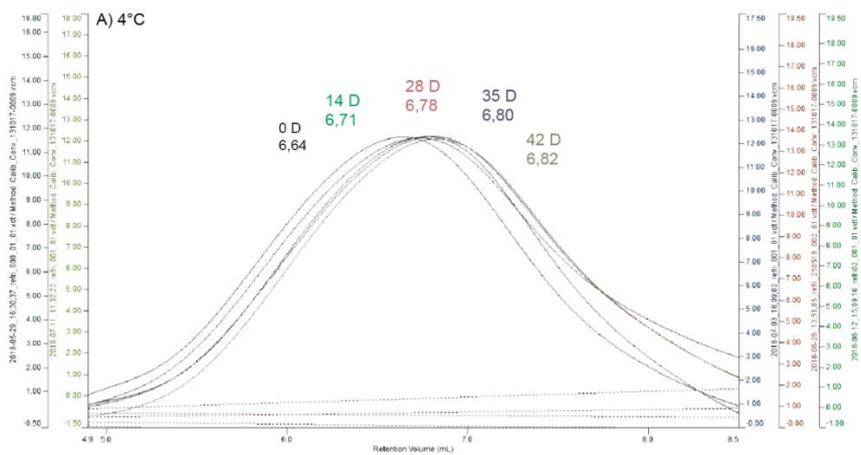
Quitosana acetilada a una razón (Anh/GlcN) de 30 - Transmitancia



$$DA (\%) = 31,92 * \frac{6,323}{2,032} - 1,22$$

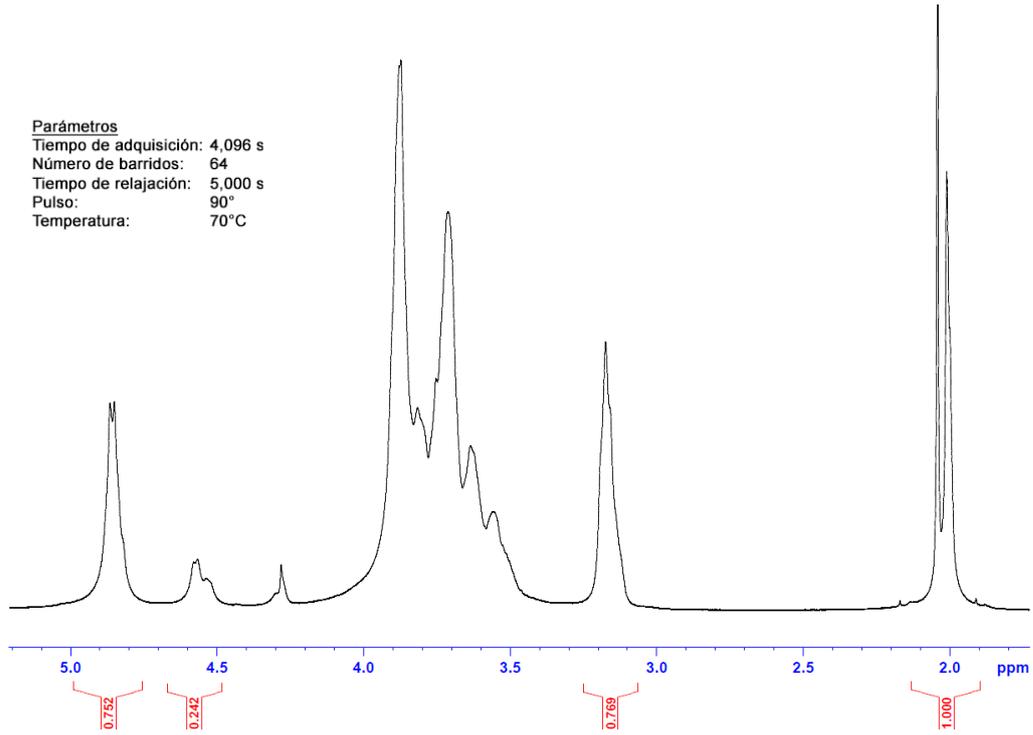
$$DA (\%) = 98,10$$

Anexo 6.. Efecto de la temperatura a 4°C (A), 20°C (B) y 50°C (C), y el tiempo de exposición (en días) en el tamaño de las cadenas de la quitosana y su desplazamiento en los cromatogramas.

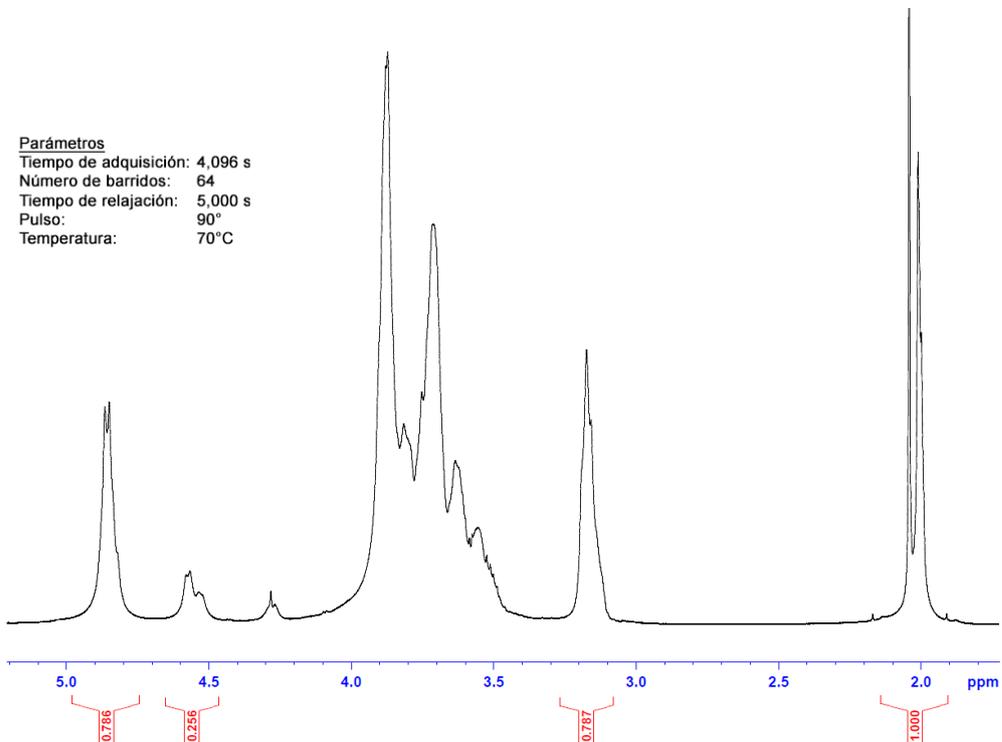


Anexo 7. Espectro de ¹H-RMN de cloruro de quitosana en DCI/D₂O a 70°C y 500MHz, de las muestras tratadas con ultrasonido.

Inicial



A los 9 minutos



A los 18 minutos

Parámetros

Tiempo de adquisición: 4.096 s
Número de barridos: 64
Tiempo de relajación: 5.000 s
Pulso: 90°
Temperatura: 70°C

