

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**ESTUDIO FISICOQUIMICO DE QUITINA Y QUITOSAN EXTRAIDOS  
DEL CAPARAZON DE LANGOSTA (*Panulirus interruptus*)**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**OCEANOLOGO**  
**PRESENTA**  
**GERMAN CASTILLO ROSALES**

**ENSENADA, B.C., JULIO DE 1991.**

## RESUMEN

Se utilizaron desechos comerciales de caparazón de langosta roja (*Panulirus interruptus*), para la obtención de quitina y quitosán bajo diferentes condiciones de extracción. Se realizó la caracterización fisicoquímica mediante la determinación de grupos acetilos, grupos aminos, viscosidad intrínseca y masa molecular promedio de los productos de quitina y quitosán obtenidos.

En base a éstos parámetros, se hizo una cualificación de los productos que mejores propiedades presentaron, de acuerdo a los criterios propuestos por Hattis y Murray (1977) y Moorjani *et al.* (1977) y se encontró que las mejores condiciones de extracción fueron: HCl 3N durante 48 horas a temperatura ambiente; NaOH 1N durante 36 horas a 100°C y 5 horas de desacetilación.

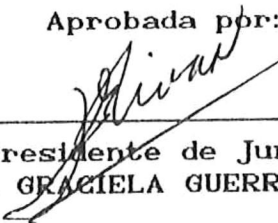
ESTUDIO FISICOQUIMICO DE QUITINA Y QUITOSAN EXTRAIDOS DEL  
CAPARAZON DE LANGOSTA (*Panulirus interruptus*)

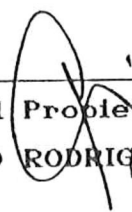
TESIS


QUE PRESENTA:

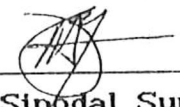
GERMAN CASTILLO ROSALES


Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Presidente de Jurado  
Q.F.B. GRACIELA GUERRA RIVAS

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal Propietario  
M.G. ARMANDO RODRIGUEZ PINAL

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal Propietario  
Q.F.B. EDUARDO DURAZO BELTRAN

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal Suplente  
M.G. HECTOR BUSTOS SERRANO

  
\_\_\_\_\_  
Sinodal Suplente  
OC. JUAN ANTONIO FERNANDEZ APANGO

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California", gracias al apoyo de la U. A. B. C.

## DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado con todo respeto y cariño a mis padres:

Aniceto Castillo Rangél

y

Maria del Socorro Rosales García

porque gracias a ellos estoy aquí.

A mis hermanos: Gustavo, Enrique, Edmundo y Beto,

por su afecto y apoyo incondicional en esos pequeños imprevistos (\$).

y a quien siempre ha estado conmigo y me ha ayudado a salir adelante y poder concluir esta etapa de mi vida:

DIOS

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer atentamente a la Profesora Q.F.B. Graciela Guerra Rivas, por su asesoría como Director de Tesis y por la oportunidad brindada para poder realizar este trabajo dentro del proyecto.

A mis sinodales M.C. Armando Rodríguez Pinal, Q.F.B. Eduardo Durazo Beltrán, Oc. Juan Antonio Fernández Apango y M.C. Hector Bustos Serrano por sus acertadas sugerencias al presente trabajo.

A los integrantes del proyecto por el tiempo en que convivi con ustedes.

Y un agradecimiento muy especial, como ya es costumbre en los tesisistas, a todas aquellas personas de Ciencias Marinas y relacionadas con la escuela que muy cortesmente nunca me preguntaron PARA CUANDO?

## INDICE GENERAL

	Pag.
Introducción .....	1
Antecedentes .....	4
Objetivo .....	10
Métodos y Materiales .....	11
I. Descripción del recurso natural .....	11
II. Obtención de quitina y quitosán .....	11
III. Análisis cualitativo de quitina y quitosán .....	14
IV. Caracterización de quitina y quitosán .....	19
Resultados .....	22
I. Rendimiento .....	22
II. Pruebas cualitativas .....	24
III. Caracterización fisicoquímica .....	30
Discusiones .....	45
Conclusiones .....	56
Recomendaciones .....	57
Bibliografía .....	58

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Pag.
I. Diversos métodos y condiciones utilizadas para la obtención de quitina y quitosán .....	8
II. Condiciones utilizadas durante la obtención de las muestras de quitina .....	15
III. Condiciones utilizadas para la obtención de quitosán .....	16
IV. Rendimiento y valores de humedad y cenizas en muestras de quitina .....	23
V. Resultados de las pruebas confirmatorias efectuadas en quitina y quitosán .....	26
VI. Resultados de las pruebas de solubilidad efectuadas en muestras de quitosán .....	27
VII. Lecturas de absorbancia de muestras de quitosán hidrolizadas en HCl 6N .....	29
VIII. Valores de $R_f$ de los productos identificados en cromatografía en papel .....	31
IX. Bandas características de quitina y quitosán identificadas con espectroscopía de IR .....	33
X. Porcentajes de grupos acetilos, grupos amino y de desacetilación de muestras de quitina y quitosán ...	34
XI. Viscosidades absolutas, viscosidades intrínsecas y masas moleculares promedio de muestras de quitosán .....	39

## LISTA DE FIGURAS.

Fig.	Pag.
1. Estructuras de celulosa, quitina y quitosán .....	5
2. Secuencia esquemática para la obtención de quitina (Hackman, 1954) y quitosán (Broussignac, 1968) y pruebas de caracterización fisicoquímica .....	12
3. Variación en el contenido de cenizas de las muestras de quitina de cada fracción .....	25
4. Espectros de HPLC de productos de hidrólisis de quitosán en HCl 0N .....	32
5. Curvas de titulación potenciométrica de soluciones de quitosán comercial y de la fracción I .....	37
6. Curvas de titulación potenciométrica de soluciones de quitosán de la fracción IV .....	38
7. Variación de la viscosidad absoluta de soluciones de quitosán de la fracción IV, en función del tiempo de desacetilación .....	40
8. Variación de la masa molecular promedio de muestras de quitosán de la fracción IV, en función del tiempo de desacetilación .....	41
9. Variación del % de grupos amino y de desacetilación en quitosán, fracción IV en función del tiempo de desacetilación .....	43
10. Variación del porcentaje de grupos aminos y viscosidad intrínseca de muestras de la fracción IV, en función del tiempo de desacetilación .....	44

## INTRODUCCION

La quitina es un polisacárido distribuido ampliamente en la naturaleza; tomando en cuenta su abundancia es considerada como el polisacárido mas importante dentro del reino animal (Hunt, 1970).

La quitina constituye el componente orgánico mayoritario del exoesqueleto de los invertebrados, encontrándose principalmente en los *phyla Annelida, Arthropoda y Mollusca* y en menor extensión en *Coelenterata* y *Nematoda* (Foster y Webber, 1960). Richards (1951) estudió las clases más grandes de los artrópodos y reportó que la quitina se localizó en la pared corporal de los organismos estudiados.

Las principales especies reportadas con el mayor contenido de quitina según Knorr (1984) son:

- Cangrejo (*Cancer sp*) 72.1%; (*Carcinus sp*) 64.2%
- Camarón (*Cragon sp*) 69.1%
- Langosta (*Nephrops sp*) 69.8%; (*Homarus sp*) 77%

Actualmente la producción de quitina al igual que otros polisacáridos de origen marino (carragenanos, alginatos y agar) han llegado a ser una excelente alternativa para subsanar la gran demanda industrial de celulosa en el ámbito industrial.

Allan et al. (1977) reportaron que la producción de quitina a partir únicamente de crustáceos, es de alrededor de 150,000 toneladas por año. Austin (1981) citó que la

cantidad de quitina sintetizada tan solo por copépodos marinos, se aproxima al billón de toneladas por año y considerando solamente la industria procesadora de mariscos de la región de Alaska, la cantidad de desperdicios de caparazón de cangrejo en la temporada de producción de 1981, ascendió a más de 8 millones de libras en un período de tres meses, representando aproximadamente  $1.6 \times 10^6$  lb de quitina (Rha, 1985).

A pesar de que en la década de los 70's cerca de un billón de toneladas de quitina eran sintetizadas anualmente, éste polisacárido poseía una escasa demanda comercial (Bough, 1977).

En la actualidad, es posible obtener a la quitina en grandes cantidades con un grado de pureza elevado que hacen factible su uso en la industria médica y cosmetológica (Sandford, 1988) y gracias a la marcada expansión que ha experimentado la industria procesadora de mariscos, ésta ha llegado a ser una fuente importante de materia prima para la producción de quitina (Johnson y Peniston, 1977). Sin embargo, en estudios de mercado, se ha señalado que no todas las especies pueden considerarse como fuente potencial para la obtención a escala industrial de quitina, ya que algunas son comercializadas sin eliminar gran parte del caparazón (Hattis y Murray, 1977).

En México, el procesamiento de mariscos, en específico de crustáceos, está limitado a la captura, cocimiento y venta del producto entero al exterior y el caparazón es usado ocasionalmente en los restaurantes como ingrediente para la elaboración de platillos, en agricultura como fertilizante o en última instancia como alimento para ganado porcino.

A nivel nacional, destacan dos trabajos referentes a la quitina, el efectuado por Ruíz-Herrera (1981), cuyo enfoque fue la síntesis de quitina *in vitro* con microorganismos y el de Ortega Garza (1982), quien realizó un estudio global con langostilla en los que incluyó estudios de caracterización de quitina. La escasa investigación al respecto demuestra el poco interés por parte de la comunidad científica de México hacia un recurso económicamente potencial.

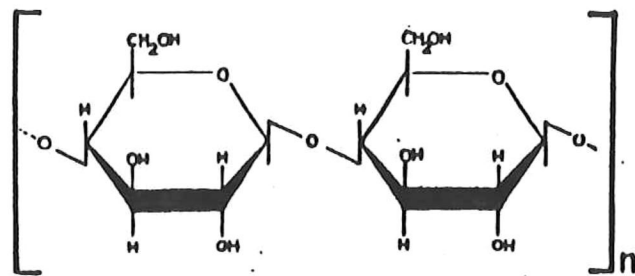
El presente trabajo, se realizó considerando la importancia de la extracción de quitina, para su aprovechamiento, además de la necesidad de resolver el problema ecológico que implica la eliminación de los caparazones por parte de las industrias procesadoras de mariscos. Se utilizaron estos desperdicios como materia prima para la obtención de dicho polisacárido, el estudio de sus propiedades y la observación en ellas del efecto de los procesos de comercialización y de los diferentes factores que intervienen en la extracción química.

## ANTECEDENTES

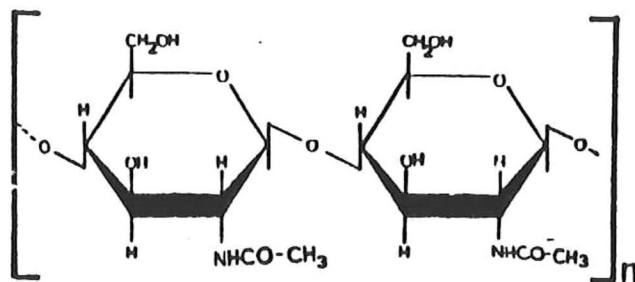
La quitina es un polisacárido que está constituido predominantemente, y en algunas ocasiones completamente, por residuos de **2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa**, los cuales están unidos por enlaces glucosídicos del tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ ; puede ser referida como un derivado de la celulosa en la que el grupo hidroxilo del carbono dos ha sido sustituido por un grupo acetamido (Foster y Webber, 1960). Esta estructura se ilustra comparativamente con las estructuras de la celulosa y el quitosán en la figura 1. Generalmente la quitina se encuentra formando complejos con moléculas protéicas y en ocasiones también asociada con sales de calcio o magnesio, lípidos y otras sustancias orgánicas (Hunt, 1970). Sus cadenas están enlazadas entre sí por puentes de hidrógeno, lo que le confiere baja solubilidad y la capacidad de formación de filamentos (Cabib, 1987).

Los diversos estudios espectroscópicos, han revelado la existencia de tres tipos diferentes de quitina,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -quitina (Carlström, 1957); se presenta como un sólido amorfo, blanco, insoluble en agua, soluciones ácidas ó alcalinas diluidas y en la mayor parte de los disolventes orgánicos; su solubilidad se presenta en soluciones de ácidos minerales concentrados en donde puede ocurrir una degradación extensa hasta unidades monoméricas (Hackman, 1971).

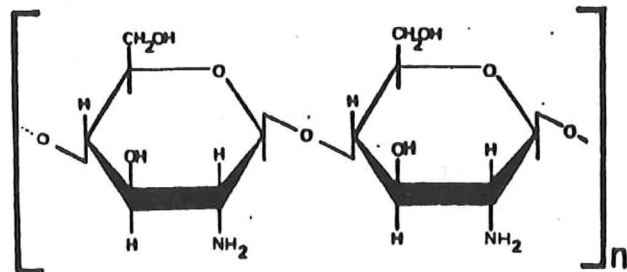
Los primeros reportes de la quitina son del siglo XIX



CELULOSA



QUITINA



QUITOSAN

Figura i. Estructuras de celulosa, quitina y quitosán.

con los trabajos de Henri Braconnot y A. Odier, siendo este último quien estableció las semejanzas estructurales entre la quitina y la celulosa (Muzzarelli, 1977b).

Sannan y colaboradores, realizaron estudios con soluciones de quitina en ácidos minerales concentrados y reportaron que la quitina pudo ser regenerada por precipitación mediante el uso de soluciones alcalinas. En estudios posteriores estos autores demostraron que la solubilidad de la quitina regenerada fue promovida por efecto de la desacetilación del polisacárido (Sannan et al. 1976). Austin (1981) señaló que la quitina no es soluble en disolventes ordinarios y que los ácidos minerales, fluoroalcoholes y ciertas soluciones de sales hidrotópicas la disuelven, pero ocasionando una degradación de la molécula.

Vincendon (1975), realizó estudios relacionados con la disolución de la quitina en **N,N-dimetilacetamida-5% LiCl** y concluyó que la solubilidad se explica por la formación de puentes de hidrógeno entre cada molécula de **LiCl** y un grupo **-OH** ó **-NH** de la cadena del polisacárido.

Diversos métodos se han establecido para la obtención de quitina a partir de caparzones de crustáceos, los cuales basan su efectividad en el uso de soluciones ácidas diluidas para la eliminación de minerales y el tratamiento con reactivos alcalinos para eliminar a las proteínas

acomplejadas a la molécula del polisacárido (Tabla I). Basado en ello algunos autores sostienen que la quitina no es una entidad química, sino un producto que se define por su fuente y método de aislamiento (Rutherford y Austin, 1977).

Bough et al. (1977), estudiaron el efecto del tiempo de desacetilación sobre las características finales del quitosán y concluyeron que después de las dos horas el tamaño y distribución de la masa molecular siguió disminuyendo mientras que el contenido de grupos acetilos de los productos de quitosán presentó variaciones ligeras. Bough et al. (1978), en un estudio de caracterización de quitosán y su funcionalidad como agente coagulante en el tratamiento de aguas residuales, reportaron que la viscosidad de las soluciones de este polisacárido fueron menores cuando la desproteínización se llevó a cabo mediante extracción enzimática, que cuando se realizó con hidróxido de sodio; por otro lado la viscosidad fue ligeramente diferente entre muestras desmineralizadas y no desmineralizadas. Brine y Austin (1981), encontraron que las propiedades de la quitina varían dependiendo de la especie, reflejándose en el peso molecular, solubilidad, actividad óptica, viscosidad y el grado de desacetilación.

Dada la variabilidad en las características de la quitina con respecto al método de extracción, es necesario un control de calidad estricto con el fin de asegurar una

Tabla I. Diversos métodos y condiciones utilizadas para la obtención de quitina y quitosán.

ESPECIE	ELIMINACION DE MINERALES	ELIMINACION PROTEINAS	REFERENCIA
LANGOSTA	HCl 2N/48 hr T amb.	NaOH N/36 hr 100 °C	HACKMAN, 1954
LANGOSTA	HCl 37% -20 °C	FUSION DE PASTILLAS DE RON 100 °C	ROSEMAN et al 1957
LANGOSTA	EDTA 0.1M/6 días Y HCl 2N/2 días	Pseudomonas ballephila	SHIMAHARA, et al 1984
CANGREJO	HCl 5% /24 hr 25 °C	NaOH 5% 85-90 °C	BROUSSIGNAC, 1968
CANGREJO (Limulus)		NaOH 5%/5-12hrs 25 °C	RUTHERFORD Y AUSTIN, 1977.
CANGREJO (Ceryon)	HCl N/3 hr	NaOH N/50 °C	BRINE Y AUSTIN, 1981
CANGREJO Callinectes	Ac. acético 1.75 N	NaOH N/50 °C	IBID.
CANGREJO (Merrillpe)	FORMALINA/EDTA pH=7/12 hr	NaOH N/50 °C	IBID.

buena producción de este polisacárido. Los criterios para llevar a cabo tal control ya se han reportado ampliamente (Kaye 1985; Sanford 1988).

## OBJETIVO

Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de quitina y quitosán de langosta de desechos comerciales (*Panulirus interruptus*), obtenidas bajo diferentes condiciones de extracción.

## METODOLOGIA Y MATERIALES

### I.- DESCRIPCION DEL RECURSO NATURAL.

La langosta roja (*Panulirus interruptus*) es una especie de importancia comercial cuyo habitat se localiza en fondos rocosos y arrecifales, se encuentra ampliamente representada en mares fríos, templados y tropicales. Presenta una regionalización bien definida desde San Luis Obispo en California, hasta la isla Margarita en Baja California Sur, encontrándose también en el Golfo de California (Secretaría de Pesca, 1987).

### II.- OBTENCION DE QUITINA Y QUITOSAN

En la figura 2 se ilustran, de manera esquemática, las diferentes etapas que se siguieron para la obtención de quitina y quitosán.

#### a) Colecta de exoesqueletos de langosta.

La colecta se realizó en los restaurantes de especialidades marinas de la ciudad de Ensenada, B. C. Después de colectados se trasladaron al laboratorio y se lavaron con agua dulce con el fin de evitar cualquier daño por acción bacteriana. Durante el lavado se eliminó grasa, suciedad y residuos de tejido muscular. Posteriormente se separaron el caparazón del cefalotórax y los segmentos abdominales eliminando los apéndices y las antenas, con el

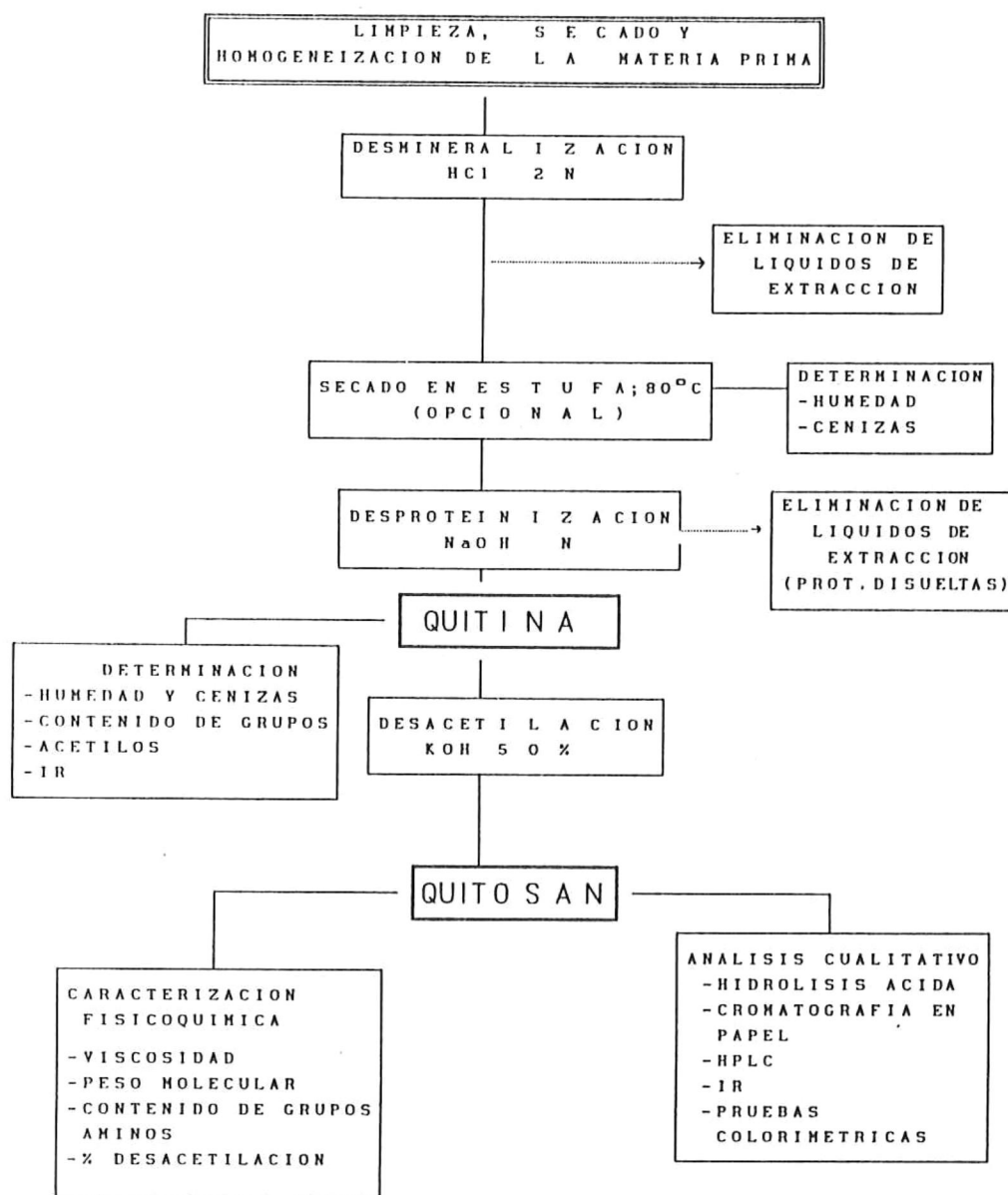


Fig. 2. SECUENCIA ESQUEMATICA PARA LA OBTENCION DE QUITINA(Hackman, 1954) Y QUITOSAN(Broussignac, 1968) Y PRUEBAS DE CARACTERIZACION FISICOQUIMICA.

fin de obtener una muestra homogénea ó representativa.

De las condiciones reportadas por varios autores se seleccionaron las condiciones para el secado de los exoesqueletos: al aire libre durante 4 horas y en estufa a 80°C durante 5 horas.

**b) Obtención de quitina y quitosán.**

Los exoesqueletos secos se molieron hasta obtener partículas de aproximadamente 0.5 cm. Se mezcló todo el material y se fraccionó para obtener 4 partes iguales (I, II, III, IV) correspondientes a cada parámetro que se modificó (concentración de HCl, concentración de NaOH, tiempo de desproteínización y tiempo de desmineralización, respectivamente); a su vez cada parte se dividió en 5 muestras (A, B, C, D y E).

La extracción de quitina se realizó teniendo como base el método propuesto por Hackman (1954), el cual comprende inicialmente la desmineralización y enseguida la desproteínización.

El quitosán se preparó por desacetilación de las muestras de quitina acorde con el método propuesto por Broussignac (1968).

- DESMINERALIZACION. A cada parte se le agregó HCl 2N y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 48

horas. Al término de las 48 horas, las partículas se recuperaron mediante decantación y filtración a presión reducida. Se lavaron con agua desionizada hasta pH neutro, enseguida se secaron en estufa a 90°C por 3-4 horas. Se registraron los pesos de cada muestra desmineralizada.

-DESPROTEINIZACION. Las muestras desmineralizadas se procesaron utilizando NaOH 1N durante 36 horas con agitación constante, cada 12 horas se renovó la solución de NaOH.

-DESACETILACION. La obtención del quitosan se llevó a cabo por hidrólisis de los grupos acetilos en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 50% en etanol y etilenglicol. Cada muestra de quitina se colocó con la solución de KOH en una proporción de 1:10 a reflujo durante 5 horas a 100°C. El quitosán resultante se recolectó por decantación y filtración a presión reducida. Se lavó con agua desionizada hasta pH neutro, se secó con acetona y en estufa durante 3 horas a 70°C.

Las tablas II y III resumen las condiciones empleadas para cada muestra de quitina y quitosán.

### III.- ANALISIS CUALITATIVO DE QUITINA Y QUITOSAN.

a) Prueba de vanWisseling (Richards, 1951). Se colocó una hojuela de quitina en un tubo de ensayo, se agregó KOH 50% y se calentó en baño térmico de glicerina a 100°C

Tabla II. Condiciones utilizadas durante la obtención de las muestras de quitina

MUESTRA	TIEMPO DE TRATAMIENTO ACIDO	CONCENTRACION DE HCl	TIEMPO DE TRATAMIENTO ALCALINO	CONCENTRACION DE NaOH
I-A	48 horas	1N	36 horas	1N
I-B	"	2N	"	1N
I-C	"	3N	"	1N
I-D	"	4N	"	1N
I-E	"	5N	"	1N
II-A	"	2N	"	0.25N
II-B	"	2N	"	0.50N
II-C	"	2N	"	1N
II-D	"	2N	"	3N
II-E	"	2N	"	5N
III-A	"	2N	6 horas	1N
III-B	"	2N	12 horas	1N
III-C	"	2N	24 horas	1N
III-D	"	2N	36 horas	1N
III-E	"	2N	48 horas	1N
IV-A	108 horas	2N	36 horas	1N
IV-B	"	2N	"	1N
IV-C	"	2N	"	1N
IV-D	"	2N	"	1N
IV-E	"	2N	"	1N

Tabla III. Condiciones utilizadas para la obtención de quitosán

MUESTRA	CONCENTRACION KOH [% w/w]	TEMPERATURA [ °C ]	TIEMPO DE DESACETILACION
I-C	50	100	5 HORAS
I-D	"	"	"
I-E	"	"	"
IV-A	50	100	2 HORAS
IV-B	"	"	4 HORAS
IV-C	"	"	6 HORAS
IV-D	"	"	8 HORAS
IV-E	"	"	10 HORAS

durante 15 minutos. Posteriormente se eliminó el KOH y se enjuagó la muestra con agua destilada, se agregó ácido acético al 2% y una gota de  $H_2SO_4$  al 1% para precipitar el material disuelto.

**b) Prueba de yodo-yoduro** (Richards, *op. cit.*). Se colocó una hojuela en solución de yodo 0.2% y yoduro de potasio en exceso, se agregó una gota de  $H_2SO_4$  al 1% hasta adquirir una coloración rojo-violeta, por último se agregaron unas gotas de  $H_2SO_4$  75% para verificar la existencia de quitina al desaparecer la coloración.

**c) Prueba de solubilidad para diferenciación de quitosán.** Esta prueba consistió básicamente en medir la solubilidad del quitosán en soluciones de ácido acético a concentraciones de 1-10%, de esta forma al ser insoluble la quitina en ácido acético, se logró la diferenciación entre ambos productos.

**d) Hidrólisis ácida de quitosán.** Esta prueba se realizó tomando como referencia el trabajo reportado por Hackman (1962) para determinar la pureza de la muestra de quitosán obtenida bajo diferentes condiciones de extracción.

Se preparó una solución de quitosán cuya concentración fué de 5mg/ml en HCl 0.3 N y se realizó la hidrólisis de acuerdo al siguiente cuadro:

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo de hidrolizado (hr)	0	1	2	3	4	4.5	5	5
HCl 6N (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
Quitosán (mL)	5	5	5	5	5	5	5	0
T [ °C ]	100	100	100	100	100	100	100	100

Al término de las 5 horas, se enfriaron las muestras y se centrifugaron, los sobrenadantes se colocaron en refrigeración.

En cada hidrolizado, se determinó la presencia de glucosamina de acuerdo al método de Elson-Morgan (1933)

e) HPLC. A partir de la muestra de hidrolizado que presentó la mayor absorbancia en la prueba de D-glucosamina se corrió un espectro de HPLC en un cromatógrafo Waters (MILLIPORE<sup>®</sup>) del Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (U. N. A. M.), se utilizó una columna del tipo Bondapack C<sub>18</sub> (30×1 cm); con flujo de 1ml·min<sup>-1</sup>; se empleó agua

como eluente y la detección se llevó a cabo con un detector de luz ultravioleta visible (196 nm); se trabajó a 25°C.

f) **Cromatografía en papel.** Se corrió un cromatograma en papel utilizando la misma muestra de hidrolizado del inciso anterior, junto con esta muestra se puntearon estándares de N-acetilglucosamina y D-glucosamina; se utilizó como eluente una mezcla de butanol: ácido acético: agua (77:6:17) (v/v) y dos reveladores: permanganato de potasio y ninhidrina.

g) **Análisis de espectroscopía de IR.** Las muestras de quitina I-C y de quitosán correspondiente, se corrieron en pastillas de bromuro de potasio (KBr), en un espectroscopio de IR modelo Perkin-Elmer 1330.

#### IV.- CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE QUITINA Y QUITOSAN.

a) **Análisis de humedad y cenizas.** Se realizó el análisis de humedad y cenizas de cada una de las muestras de quitina obtenidas de acuerdo a los métodos establecidos por la A. O. A. C. (1975).

b) **Porcentaje de acetilación.** Para quitosán se utilizó el método potenciométrico de Broussignac (1968), mediante titulación con NaOH 1N y elaboración de curvas de titulación. Los valores así obtenidos se introdujeron en

la siguiente ecuación:

$$\%NH_2 = \frac{(16.1)\left(\frac{x-y}{1000}\right)}{M}$$

donde: M = peso de la muestra en gramos.

X y Y puntos de inflexión de la curva de titulación.

En las muestras de quitina se usó el método de desacetilación en medio ácido y titulación con NaOH (Wiesenberger 1947; citado por Bance, 1982).

La evaluación del grado de acetilación también puede expresarse como el porcentaje de desacetilación, esto es, la tasa, expresada en porcentaje, del número total de unidades de glucosamina desacetiladas con respecto al número total de unidades monoméricas de quitosán (Bough et al. 1977). El porcentaje de desacetilación se calculó directamente al ser introducidos tanto el porcentaje de grupos aminos como el de grupos acetilos en las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ DESACETILACION} = \frac{203.2 \times \% \text{ DE GRUPOS AMINOS}}{16.02 + 0.4204 \times \% \text{ DE GRUPOS AMINOS}}$$

$$\% \text{ DESACETILACION} = \frac{(4305 - 203.2 \times \% \text{ DE GRUPOS ACETILOS})}{43.05 - 0.4204 \times \% \text{ DE GRUPOS ACETILOS}}$$

c) **Determinación de la viscosidad intrínseca.** La determinación de viscosidad intrínseca en quitosán se obtuvo gráficamente a partir de valores de viscosidad específica e inherente (Shoemaker et al. 1984).

La obtención de las viscosidades específica ( $\eta_{sp}$ ) e inherente ( $\eta_{inh}$ ), se realizaron en un viscosímetro Cannon-Ubbelohde No. 400, con una constante del aparato de 1.036  $\text{cs} \cdot \text{seg}^{-1}$  utilizando soluciones de quitosán con concentraciones de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 [ $\text{g}/100\text{mL}$ ], en ac. acético 0.2M/NaCl 0.1M/Urea 4M.

d) **Masa Molecular.** La masa molecular de las muestras de quitosán se determinó a partir de los valores de viscosidad intrínseca de cada muestra conforme a la ecuación de Staudinger (Shoemaker et al. 1974):

$$[\eta] = KM^a$$

donde:  $[\eta]$  = viscosidad intrínseca

$$K = 8.93 \times 10^{-4}$$

$$a = 0.71$$

$M$  = Masa molecular del polímero.

## RESULTADOS

### I.- Rendimiento.

La tabla IV, muestra los rendimientos obtenidos después del procesamiento de cada muestra de caparazón con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio y los resultados de los análisis de humedad y cenizas.

Después del tratamiento ácido, en la fracción I sólo la muestra I-B presentó un rendimiento cercano al 80% y muy cercana a esta muestra, fué la I-A con 74.96%; las otras tres muestras: I-C, I-D y I-E presentaron porcentajes considerablemente más bajos (46.73%, 36.50% y 30.49% respectivamente).

En la fracción II todas las muestras sobrepasaron el 80%, mientras que en la fracción III la muestra III-D presentó el rendimiento más bajo con 75.13%. En la fracción IV los rendimientos fueron homogéneos, el mínimo fue de 35.63% y el máximo de 38.74%.

Después del tratamiento alcalino, la fracción I presentó el rango más amplio de variación en el rendimiento desde 17.08% (I-D) a 46.69% (I-B); en la fracción II fue de 42.56% (II-B) hasta 53.84% (II-D); en la fracción III el mínimo fue 49.61% (III-B) y el máximo 57.46% (III-A) y en la fracción IV la variación fue desde 16.41% (IV-B) hasta 17.43% (IV-C).

Los valores de humedad para la mayoría de las muestras fue menor del 10%, la excepción se encontró en las

Tabla IV. Rendimiento y valores de humedad y cenizas en muestras de quitina

HUESTRA	PESO INICIAL	% POSTDESHIN.	% POSTDESPROT.	% HUMEDAD	% CENIZAS	% QUITINA *
I-A	130g	74.96	34.84	7.80	45.46	16.29
I-B	"	79.64	46.69	2.26	39.46	27.21
I-C	"	46.73	34.37	17.86	1.08	27.86
I-D	"	36.50	17.08	2.98	2.97	16.06
I-E	"	30.49	20.49	5.63	0.64	19.21
II-A	"	81.84	46.15	1.44	40.17	26.95
II-B	"	81.53	42.56	4.22	40.36	23.59
II-C	"	81.84	50.05	1.46	38.80	29.90
II-D	"	82.07	53.84	1.66	37.67	32.67
II-E	"	81.53	48.84	4.48	43.48	25.43
III-A	"	77.69	57.46	0.57	58.39	23.58
III-B	"	78.12	49.61	0.18	60.32	19.60
III-C	"	81.53	50.15	6.57	37.00	28.30
III-D	"	75.13	53.84	6.33	41.46	28.11
III-E	"	84.61	49.61	4.04	33.32	31.08
IV-A	"	37.55	17.01	4.38	0.021	16.26
IV-B	"	37.02	16.41	7.07	0.018	15.25
IV-C	"	35.63	17.43	10.13	0.022	15.66
IV-D	"	37.46	16.92	8.53	0.016	15.50
IV-E	"	38.74	16.82	7.07	0.022	15.63

\* PORCENTAJE LIBRE DE HUMEDAD Y CENIZAS.

muestras I-C y IV-C, que fueron de 17.86% y 10.13% respectivamente.

La mayor parte de las muestras presentaron un porcentaje de cenizas mayores del 30% y sólo las muestras C, D y E del lote I presentaron valores entre 1 y 3% mientras que todas las muestras del lote IV resultaron con valores menores del 0.1% (figura 3)

De acuerdo a los rendimientos de quitina libre de humedad y cenizas en la tabla IV, en la fracción I el máximo rendimiento fué de la muestra I-C; en la fracción II fué la muestra II-D; en la fracción III fué la III-E y en la fracción IV la IV-A; los rendimientos más bajos se presentaron en las muestras I-D, II-B, III-B y IV-B.

## II.- Pruebas cualitativas.

Las pruebas de vanWisseling y de yodo-yoduro se realizaron con las muestras de quitina que presentaron los valores de cenizas más bajos, es decir cuya desmineralización fué más efectiva. Todas las muestras analizadas resultaron positivas para ambas pruebas (tabla V).

Los resultados de la prueba de solubilidad para quitosán se presentan en la tabla VI. De acuerdo a esta tabla se observó que las muestras I-A y I-B no presentaron solubilidad en ácido acético, mientras que la muestra I-C

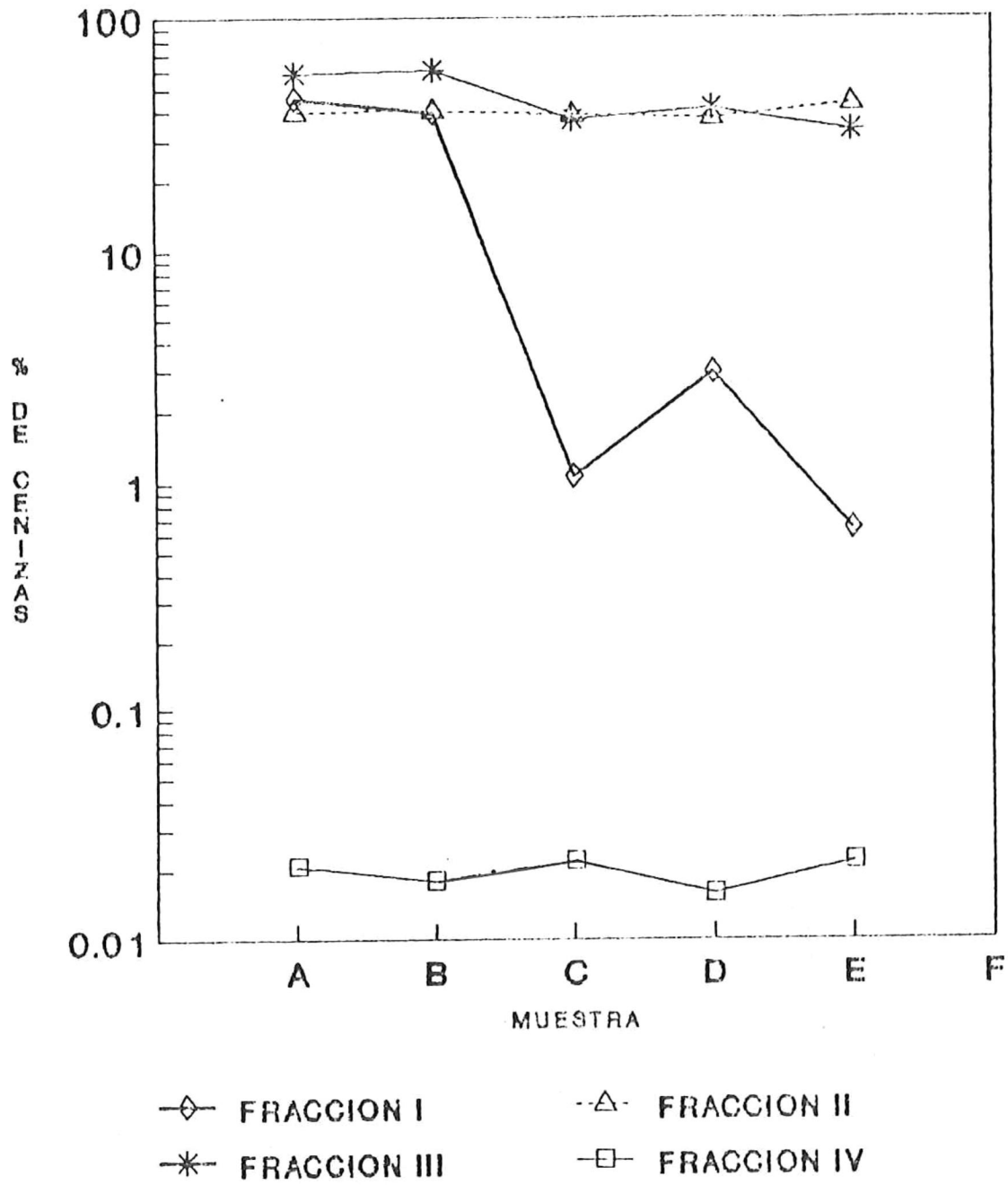


Figura 3. Variación en el contenido de cenizas de las muestras de quitina de cada fracción.

Tabla V. Resultados de las pruebas confirmatorias  
efectuadas en quitina y quitosán

MUESTRA	vanWisseling	Yodo-yoduro
I - C	+	+
I - D	+	+
I - E	+	+
IV - A	+	+
IV - B	+	+
IV - C	+	+
IV - D	+	+
IV - E	+	+

Tabla VI. Resultados de las pruebas de solubilidad efectuadas en muestras de quitosán.

MUESTRA	CONCENTRACION DE ACIDO ACETICO									
	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
I - A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I - B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I - C	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
I - D	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
I - E	+	+	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
II - A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II - B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II - D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II - E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III - A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III - B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III - C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III - D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III - E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV - A	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
IV - B	+	<u>+</u>	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
IV - C	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
IV - D	+	+	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
IV - E	+	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>

+ Disolución total

+ Disolución parcial

- No se disolvió

logró solubilizarse hasta una concentración de 4%, en concentraciones más elevadas su solubilidad fue parcial. La muestra I-D se solubilizó por completo en ácido acético al 1% y a concentraciones más elevadas su solubilidad fue menor, por último la muestra I-E presentó un intervalo de solubilización más amplia, de 1% a 6%.

Las muestras de la fracción II no presentaron solubilidad en ácido acético al igual que las muestras de la fracción III.

En la fracción IV, la muestra que presentó el intervalo más amplio de solubilidad fue la muestra IV-D logrando solubilizarse aún hasta la concentración de 6%; la muestra IV-E se solubilizó de 1% a 5%; la muestra IV-C se solubilizó solamente en concentraciones menores a 4%; la muestra IV-B se solubilizó en ácido al 1% y al 3%, al 2% fue parcial al igual que a concentraciones mayores de 3%, por último la muestra IV-A sólo presentó solubilidad completa a concentraciones de 1% y 2%.

Después de realizada la hidrólisis ácida de la muestra de quitosán I-C se registraron las absorbancias a 530 nm, (Tabla VII). El máximo de absorbancia ocurrió a las 4.5 hrs. de hidrólisis.

Los productos identificados en el hidrolizado de quitosán, fueron D-glucosamina y una escasa presencia de N-acetilglucosamina, los valores respectivos de  $R_f$  para

Tabla VII. Lecturas de absorbancia de muestras de quitosán hidrolizadas en ácido clorhídrico 6N.

TUBO No.	TIEMPO DE HIDROLIZADO (horas)	ABSORBANCIA
1	0	0.009
2	1	0.049
3	2	0.093
4	3	0.148
5	4	0.171
6	4.5	0.220
7	5	0.158
8	5	0.007

estos productos y los estándares respectivos se reportan en la tabla VIII.

Del hidrolizado de la muestra de quitosán I-C se obtuvieron los espectros de HPLC en donde se lograron identificar residuos de N-acetilglucosamina ( $t_R = 3,56$  min.) y de D-glucosamina ( $t_R = 3.15$  min.) en una proporción de 2% y 98% respectivamente (figura 4a-d).

Las bandas características de quitina y quitosán identificadas en los espectros de infrarrojo de la muestra I-C, mostraron que el rasgo más notorio fue la banda a los  $1650 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro de quitina correspondiente al grupo carboxilo (amida I) presentandose en el espectro de quitosán con menos intensidad (Tabla IX).

### III.- CARACTERIZACION FISICOQUIMICA.

a) **Porcentaje de grupos acetilos.** Los valores de grupos acetilos y su transformación a porcentajes de desacetilación de las muestras de quitina cuyo contenido de cenizas fue menor al 5%, así como los resultados de grupos amino y el grado de desacetilación de las respectivas muestras de quitosán, (Tabla X).

Los valores de grupos acetilos de las muestras de quitina de la fracción I presentaron un intervalo de variación pequeño, en promedio todas las muestras

Tabla VIII. Valores de  $R_f$  de los productos identificados en la cromatografía en papel.

MUESTRA	$R_f$	$R_f$
	REVELADOR $KHnO_4$	REVELADOR NINHIDRINA
QUITOSAN HIDROLIZADO	0.138	0.158
D-glucosamina	0.124	0.138
N-acetilglucosamina	0.0758	0.103

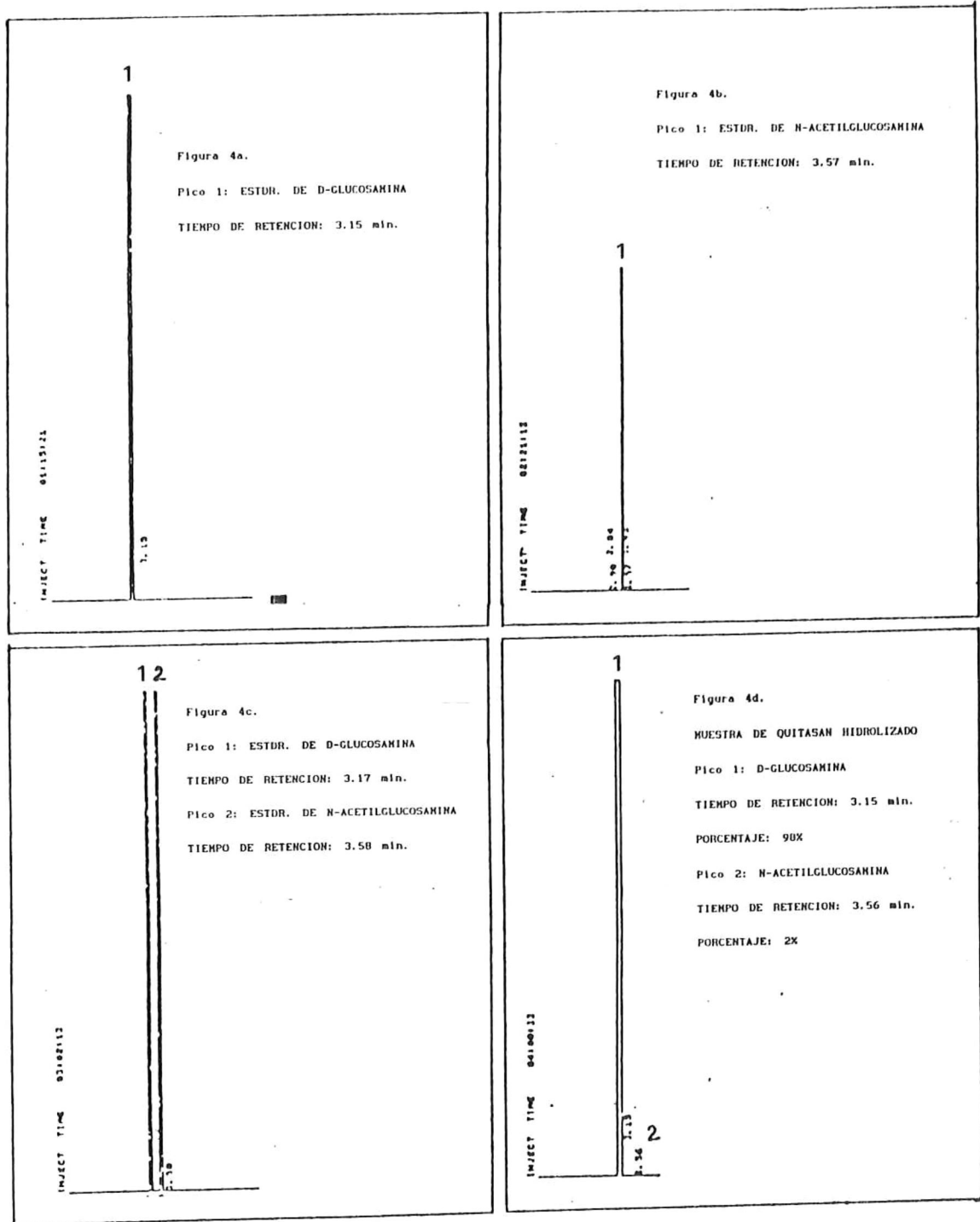


Figura 4 (a-d). Espectros de HPLC de productos de hidrólisis de quitosán en HCl 6N.

Tabla IX. Bandas características de quitina y quitosán identificadas en los espectros de IR.

QUITINA	
3500 $\text{cm}^{-1}$	Alargamiento de -OH
3225 $\text{cm}^{-1}$	Vibración de alargamiento N-H
2950 $\text{cm}^{-1}$	Alargamiento $\text{CH}_3$
2850 $\text{cm}^{-1}$	Alargamiento simétrico de $\text{CH}_2$
1650 $\text{cm}^{-1}$	Puente de hidrógeno C-O---NH
1630 $\text{cm}^{-1}$	Vibración C-O
1600 $\text{cm}^{-1}$	Alargamiento C=O, amida I
1380 $\text{cm}^{-1}$	Doblamiento CH y deformación $\text{CH}_3$
1300 $\text{cm}^{-1}$	
1070 $\text{cm}^{-1}$	C-O alargamiento, ácido carboxílico
QUITOSAN	
3400 $\text{cm}^{-1}$	Alargamiento O-H
2900 $\text{cm}^{-1}$	Alargamiento $\text{CH}_3$
1650 $\text{cm}^{-1}$	Debil alargamiento C-O---NH
1630 $\text{cm}^{-1}$	Vibración C-O
1600 $\text{cm}^{-1}$	Débil alargamiento C=O, amida I
1100 $\text{cm}^{-1}$	C-O, ácido carboxílico.

Tabla X. Porcentajes de grupos acetilos, grupos amino y de desacetilación de muestras de quitina y quitosán.

MUESTRA	QUITINA		QUITOSAN	
	% Grupos ACETILOS	% DESACETIL.	% Grupos AMINO	% DESACETIL.
I-C	18.19	17.14	4.830	54.37
I-D	17.36	21.69	7.128	81.09
I-E	17.10	23.10	8.690	89.72
IV-A	18.25	16.81	4.347	49.47
IV-B	18.46	15.64	5.313	59.15
IV-C	18.40	15.97	5.630	62.17
IV-D	17.88	18.85	6.182	67.42
IV-E	17.80	19.29	6.473	70.19
(Sigma)	‡	‡	5.150	57.52

‡ NO SE REALIZARON ESTAS DETERMINACIONES.

presentaron 17.6% de grupos acetilos; transformados a porcentajes de desacetilación el rango de variación se amplió, esto es, para la muestra I-C se obtuvo el porcentaje de desacetilación más bajo con 17.14% y el más alto fue de 23.10% para la muestra I-D.

Para la fracción IV la muestra de quitina con mayor porcentaje de grupos acetilos fue la IV-B con 18.46% y 15.64% de desacetilación, para la muestra IV-E se obtuvo el porcentaje de grupos acetilos más bajo (17.80%) con un porcentaje de desacetilación de 19.29%.

Con respecto a las muestras de quitosán, la muestra I-E presentó el mayor porcentaje de desacetilación con 89.72 y 8.69% de grupos aminos libres; la muestra IV-A mostró el menor porcentaje de desacetilación con 49.47 y 4.347% de grupos aminos libres. La muestra de quitosán comercial, presentó resultados similares a las muestras I-C y IV-B, con 5.15% de grupos aminos libres y 57.52% de desacetilación.

En las titulaciones potenciométricas de las muestras de quitosán se encontró que el punto inicial de la titulación de los grupos aminos libres se localizó a pH=5.5 y el punto final se presentó alrededor del pH=6.75, el punto medio de la curva se localizó a un pH=6.125; para la muestra de quitosán comercial el punto inicial de la titulación se localizó a pH= 5.5, el punto final fue a pH=

6.8 y de 6.15 el punto medio de la curva de titulación. Lo anterior se puede observar en las figuras 5 y 6.

**b) Viscosidad y masa molecular.** Los valores en la viscosidad intrínseca se reportan en la tabla XI, así como las respectivas masas moleculares promedio. Las máximas viscosidades absolutas obtenidas en soluciones de quitosán al 1% fueron para la muestra I-C con 362.7 centipoises (cp) y para la muestra IV-A de 90.5 cp; las viscosidades intrínsecas fueron  $15.12 \text{ dl}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $4 \text{ dl}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente y los masas moleculares promedio resultantes fueron de 907,789 para la muestra I-C y de 138,850 para la muestra IV-A. Para la muestra de quitosán comercial los valores obtenidos de viscosidad absoluta, intrínseca y masa molecular promedio fueron de 54.95 cp,  $18 \text{ dl}\cdot\text{g}^{-1}$  y 1,155,000 respectivamente.

El efecto causado por la variación del tiempo de desacetilación sobre la viscosidad se observa en la figura 7, en donde se observa un descenso pronunciado de las 2 horas de desacetilación a las 4 y hacia las 6 horas se presentó un aumento hasta 50 cp para disminuir hasta 40 cp a las 10 horas.

La figura 8 muestra las diferencias de la masa molecular de las muestras de la fracción IV con respecto al tiempo de desacetilación, se observa que fue disminuyendo la masa molecular conforme aumentó el tiempo

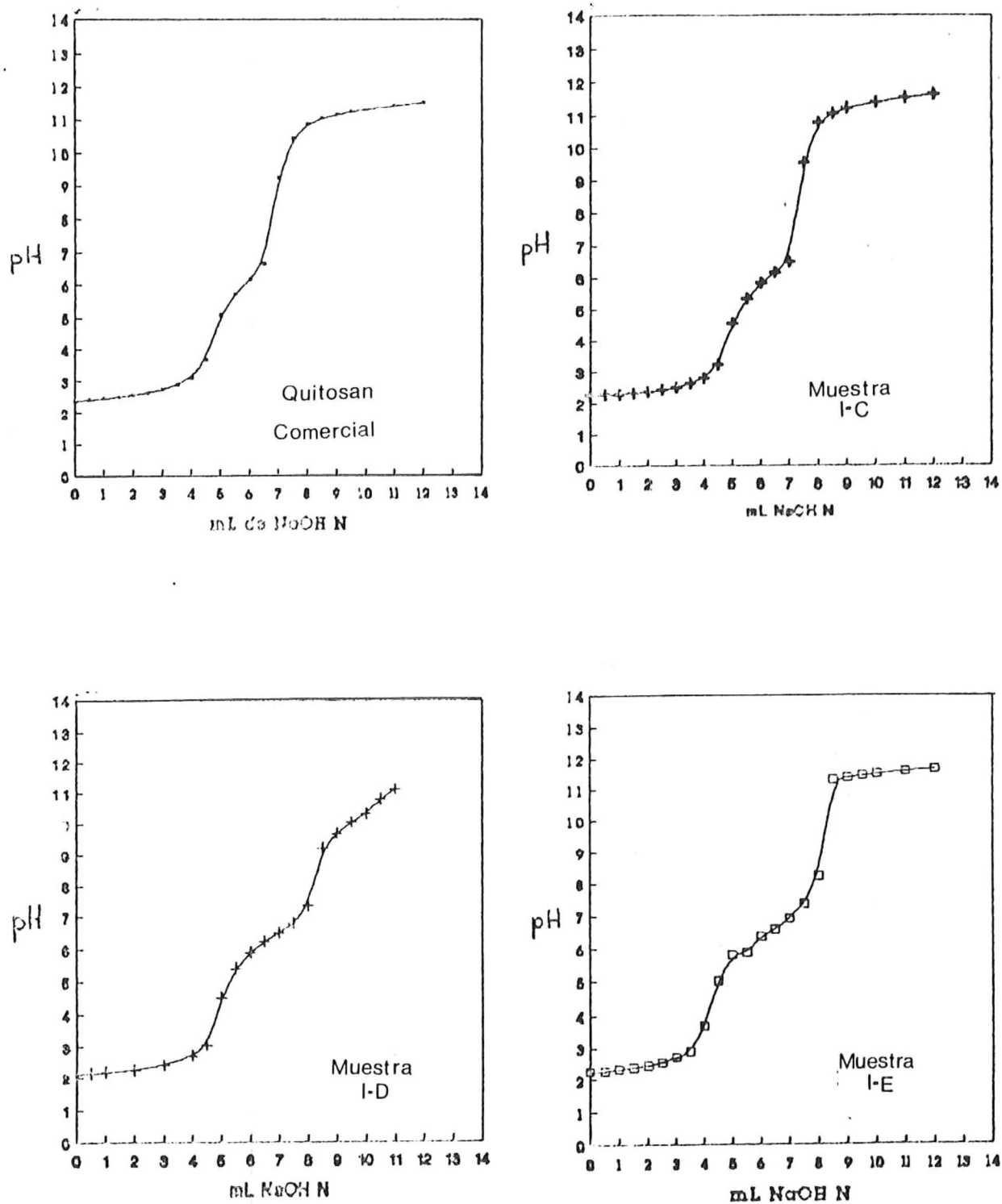


Figura 5. Curvas de titulación potenciométrica de soluciones de quitosán de la fracción I y de quitosán comercial.

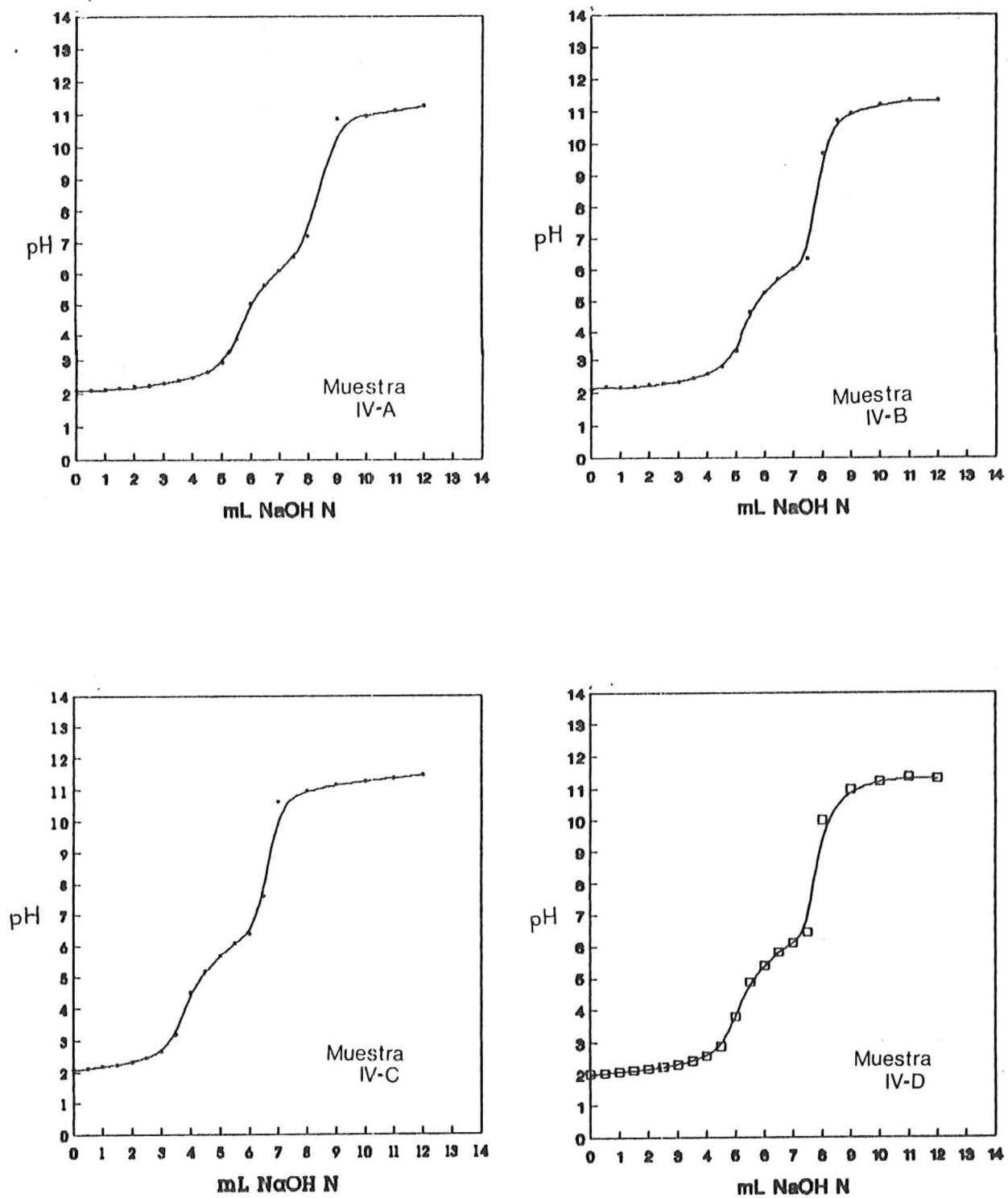


Figura 6. Curvas de titulación potenciométrica de soluciones de quitosán de la fracción IV

Tabla XI. Viscosidades absolutas, viscosidades intrínsecas y masas moleculares promedio de muestras de quitosán.

MUESTRA	TIEMPO DE DESACETIL -ACION (Hr)	VISCOSIDAD ABSOLUTA (Cp)	VISCOSIDAD INTRINSECA [ $\eta$ ] [dL·g <sup>-1</sup> ]	MASA MOLECULAR PROMEDIO $\bar{M}_v$
I-C	5	362.70	15.12	907789
I-D	5	10.42	1.55	36530
I-E	5	+	+	N.D.
IV-A	2	90.50	4.00	138850
IV-B	4	43.82	3.50	115045
IV-C	6	51.59	3.00	92592
IV-D	8	50.97	2.90	88275
IV-E	10	38.33	2.00	52307
QUITOSAN ‡ (SIGMA)	-	54.95	18.00	1155000
QUITOSAN * (SIGMA)	-	164.86	50.00	N.D.

‡ Determinaciones realizadas con el sistema ac. acético 0.2M; NaOH 0.1M; Urea 4M como disolvente.

\* Determinaciones realizadas en ácido acético al 1% como disolvente, no se determinó la masa molecular.

+ Estas determinaciones no se alcanzaron a registrar con el viscosímetro utilizado en este estudio.

N.D. No se determinó

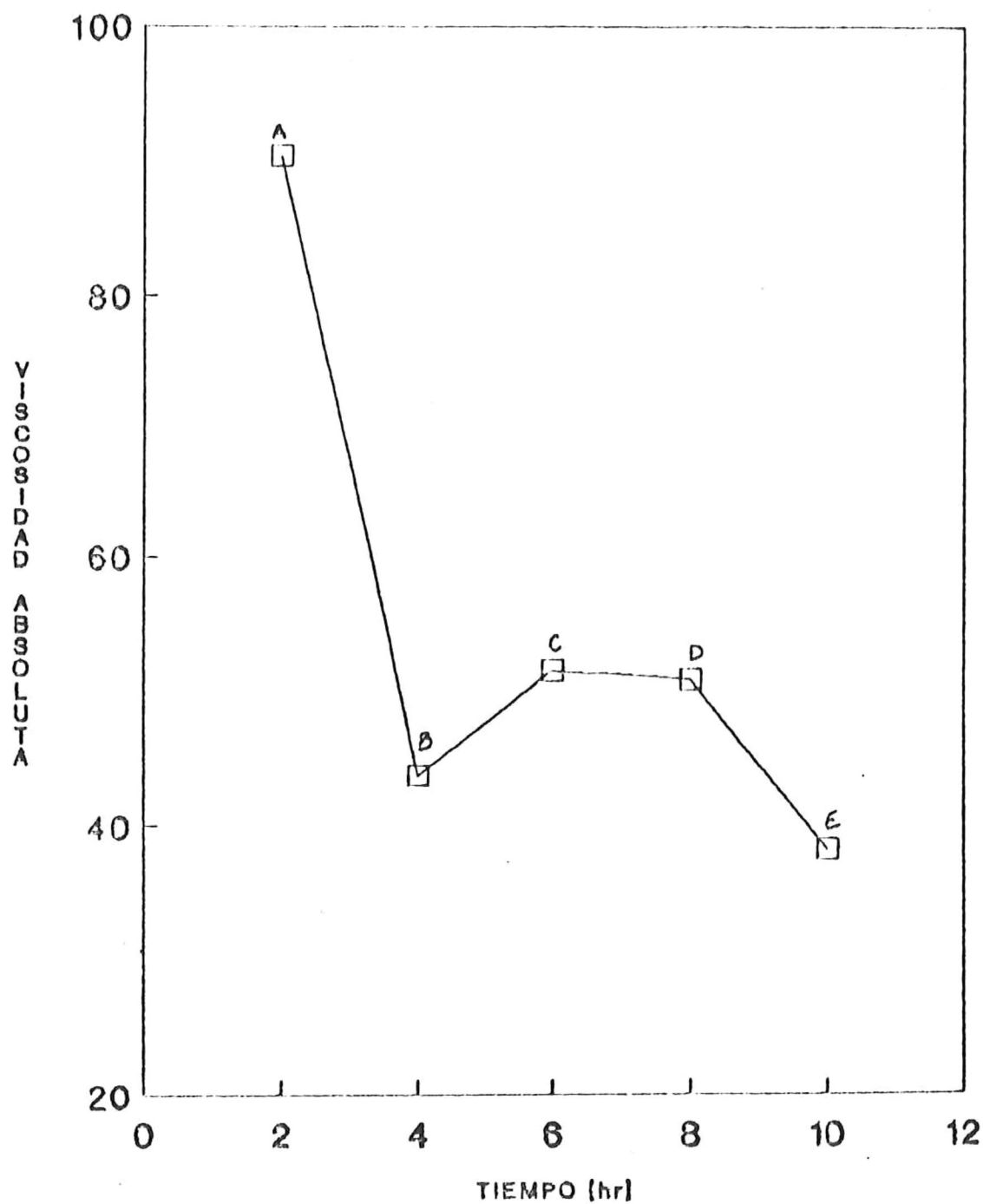


Figura 7. Variación de la viscosidad absoluta de soluciones de quitosán de la fracción IV, en función del tiempo de desacetilación.

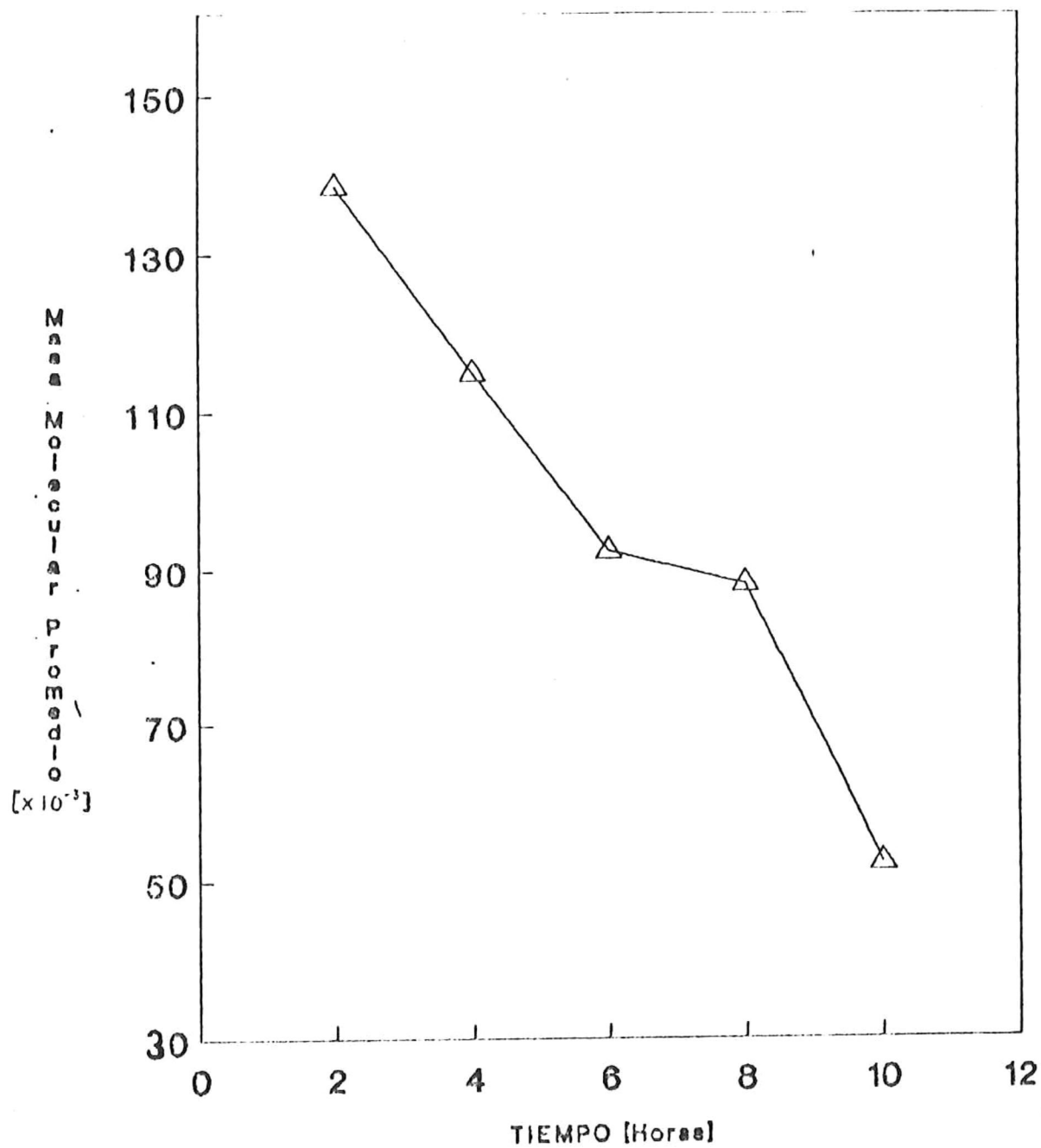


Figura 8. Variación de la masa molecular promedio de muestras de quitosán de la fracción IV en función del tiempo de desacetilación.

de desacetilación. Las muestras con 6 y 8 horas de desacetilación presentaron masas moleculares similares y a las 10 horas se obtuvo una disminución mas pronunciada hasta aproximadamente 50,000.

En la figura 9, se puede observar el comportamiento de los grupos aminos y la viscosidad intrínseca de las muestras de la fracción IV en función del tiempo de desacetilación. La variación en el contenido de grupos aminos disminuyó hasta observarse un comportamiento estable cercano al 7%; mientras que el porcentaje de desacetilación se estabilizó cerca del 80%. En ambas curvas se observó una disminución en la pendiente de las 4 a las 6 horas de desacetilación y la máxima variación de las 2 a las 4 horas.

En la figura 10, se comparan el comportamiento del porcentaje de grupos aminos y la viscosidad intrínseca en función del tiempo de desacetilación. Ambas curvas presentan un comportamiento opuesto, es decir, la viscosidad intrínseca disminuyó desde aproximadamente 4  $\text{dl} \cdot \text{g}^{-1}$  hasta aproximadamente 2  $\text{dl} \cdot \text{g}^{-1}$  y el porcentaje de grupos aminos aumentó desde 4.3 hasta 6.5 aproximadamente. En la curva de viscosidad intrínseca la mayor variación se presentó de las 8 a las 10 horas.

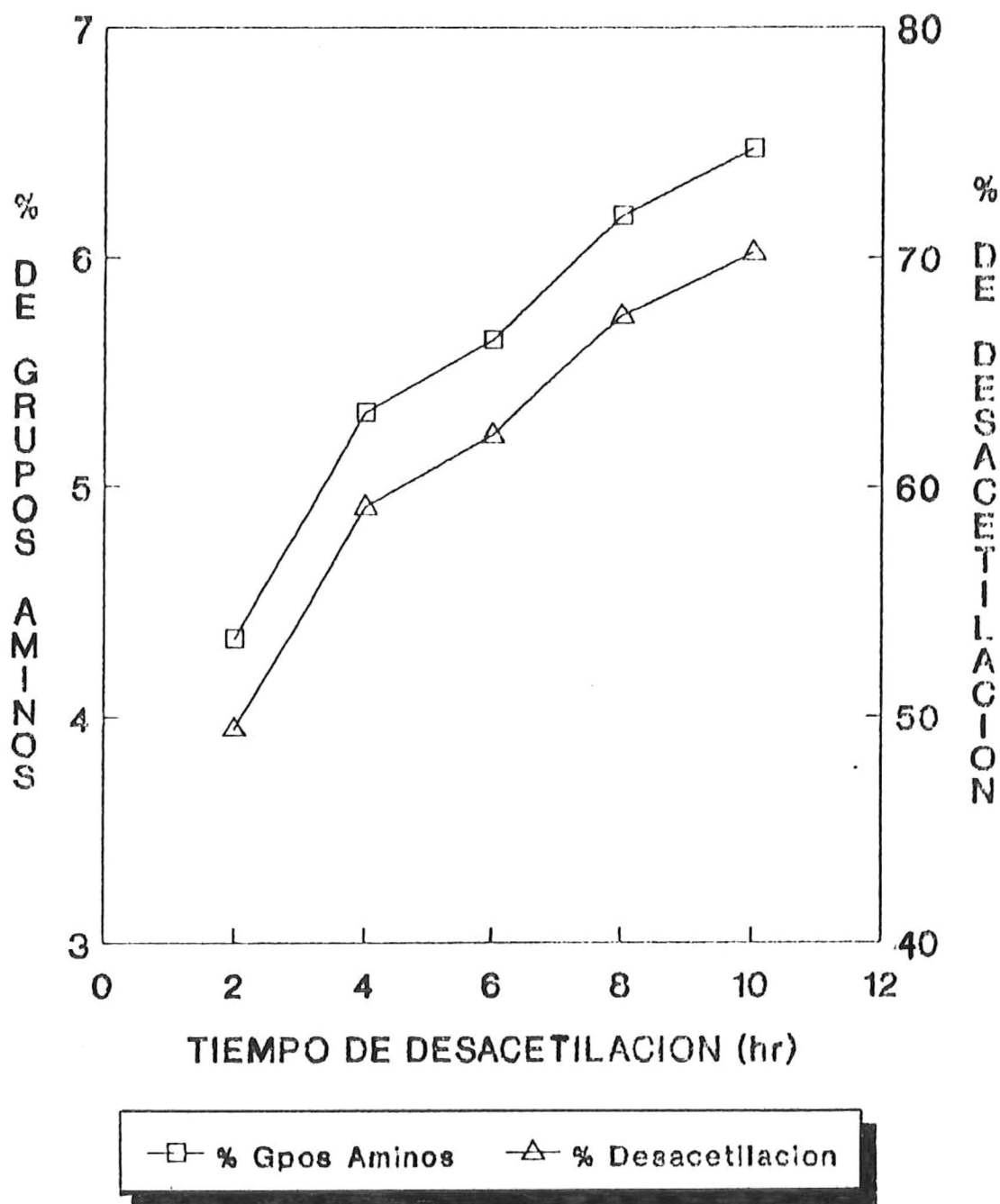


Figura 9. Variación del % de grupos amino y de desacetilación en quitosán, fracción IV en función del tiempo de desacetilación.

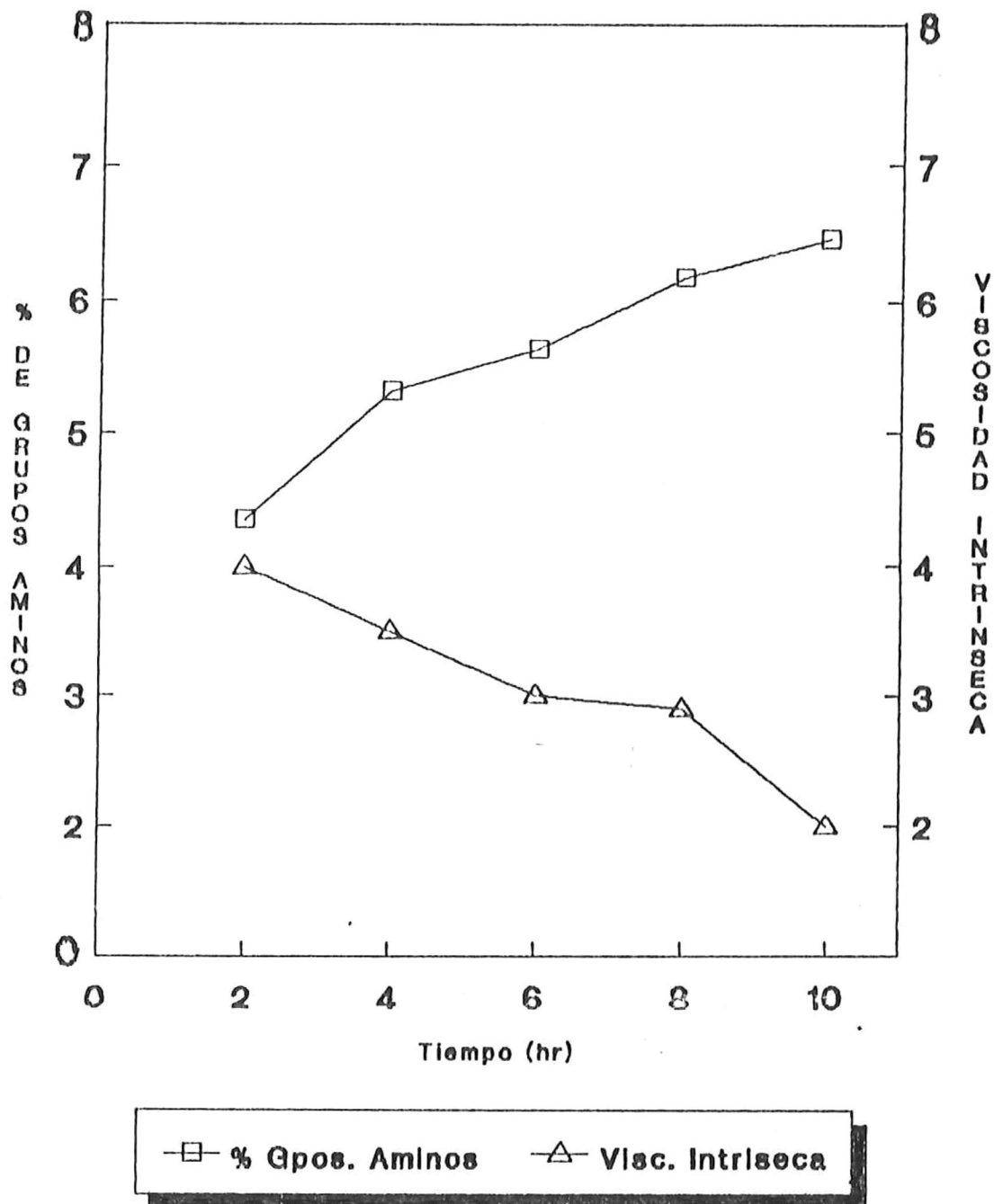


Figura 10. Variación del porcentaje de grupos aminos y viscosidad intrínseca de muestras de la fracción IV en función del tiempo de desacetilación.

## DISCUSIONES

A partir de los resultados de la tabla IV se infiere que las concentraciones menores de 3N fueron insuficientes para obtener una desmineralización adecuada, cuando el tiempo de proceso fue de 48 horas, en comparación con la fracción IV en donde las muestras fueron procesadas durante 108 horas en HCl 2N y en las que la desmineralización fue casi completa.

Al comparar a las muestras de la fracción I, cuyos valores de cenizas fueron menores al 3%, con las muestras de la fracción IV, se dedujo que el tiempo fue un factor determinante para una buena eliminación de minerales.

Hackman (1954) reportó para quitina extraída del caparazón de langosta con HCl 2N por 48 horas, un contenido nulo de cenizas, en contraste con el 40-60% obtenido en las muestras del presente trabajo, procesadas bajo las mismas condiciones (I-B, II-C y III-D). Estas diferencias, pueden ser explicadas en base al tamaño de partícula, si el tamaño es mayor, es más difícil la penetración del ácido en la matriz del caparazón para lograr una buena eliminación de los minerales.

Al analizar la curva correspondiente a la fracción I en la figura 3, se observó un aumento en el contenido de cenizas de la muestra I-C a la muestra I-D, este comportamiento resultó contrario al esperado, dado que las

concentraciones fueron 3N y 4N respectivamente, lo cual también puede ser explicado, también, en función del tamaño de partícula.

Debido a que no se logró obtener un disolvente adecuado para las muestras de quitina se orientó el trabajo hacia el estudio del quitosán producido a partir de las muestras de quitina.

Los resultados de las pruebas cualitativas de vanWisseling y de yodo-yoduro confirmaron la naturaleza glucosídica de la quitina. La prueba de vanWisseling mostró que se produce quitosán por efecto del KOH al 50% sobre quitina y la prueba de yodo-yoduro nos indicó la presencia de un azúcar al formarse el compuesto coloreado característico al reaccionar el yodo (agente oxidante) con un carbohidrato.

Los resultados de la prueba de solubilidad de quitosán se utilizaron para diferenciarlo de la quitina, debido a que ésta última no es soluble en ácido acético por la presencia de los grupos acetilos en su molécula. Por otra parte, la insolubilización de las muestras I-A, I-B y de las fracciones II y III sirvió como criterio para seleccionar a las muestras restantes, las cuales sí presentaron solubilidad en ácido acético, siendo utilizadas en las determinaciones de grupos aminos,

desacetilación, viscosidad y masa molecular promedio.

La insolubilidad de las muestras I-A, I-B y de las fracciones II y III se atribuyó al alto contenido de minerales presentes, más que a la presencia de grupos acetilos. Por otra parte, en las muestras de quitosán que presentaron solubilidad, se observó que a medida que aumentó la concentración de ácido acético, la solubilización se hizo más lenta, lo cual puede explicarse en base a la disminución de la actividad del ácido acético a elevadas concentraciones. Este mismo comportamiento se observó en la fracción IV en la que todas las muestras se disolvieron rápidamente a concentraciones menores a 5% y sólo la muestra IV-D hasta 6%.

Los valores de  $R_f$  reportados en la tabla VIII se consideraron bajos; sin embargo. Aunque no son iguales, existe cierta concordancia entre el valor de  $R_f$  de la muestra de hidrolizado de quitosán y el correspondiente al estándar de D-glucosamina con los dos reveladores. Los valores de  $R_f$  del estándar de N-acetilglucosamina fueron aún más bajos, pero cabe hacer notar que la mancha correspondiente a éste último fué muy tenue. No obstante, el trabajo realizado con la cromatografía en papel se hizo únicamente con el fin de detectar la presencia de los

residuos de quitosán hidrolizado, ya que para la identificación se utilizaron los espectros de HPLC.

En los espectros de HPLC (fig. 4-d) se logró identificar a la banda de D-glucosamina y trazas de N-acetilglucosamina; la lectura del aparato reportó que la proporción de D-glucosamina y de N-acetilglucosamina fue de 98% y 2% respectivamente lo cual nos da una idea de la pureza de la muestra y además indicó también que la desacetilación del producto analizado fue casi completa.

Las bandas características de los espectros de IR de quitina y quitosán, mostraron que el rasgo característico fue la reducción en el contenido de los grupos acetilos en las cadenas de quitina, esto concordó con la disminución de la absorbancia de las bandas registradas en el espectro de quitosán a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y a  $1610\text{ cm}^{-1}$  y que corresponden a un C=O carbonilo (amida I) y al puente de hidrógeno C-O.....NH. Por otra parte en ambos espectros se observó una similitud en el resto de las bandas registradas.

Los porcentajes de grupos acetilos de todas las muestras, resultaron más bajos que el valor teórico reportado para quitina de 21.2% (Brine y Austin, 1981), lo cual se explica por una hidrólisis parcial de los grupos acetilos por acción del ácido durante el proceso de extracción.

En la fracción I, se observó una disminución gradual de los grupos acetilos equivalente a un aumento similar del grado de desacetilación, conforme a la concentración de HCl usada para la desmineralización. De estos resultados se puede deducir que la concentración de ácido utilizada tuvo un efecto más amplio que la simple eliminación de minerales. En la fracción IV, los porcentajes de grupos acetilos, fueron menos variables y ligeramente más altos que en la fracción I, lo que indicó que el efecto producido por la concentración del ácido resultó ser mayor que el tiempo prolongado de tratamiento con ácido. En cuanto al tratamiento alcalino no se puede considerar determinante en estas diferencias ya que fue el mismo para las 8 muestras.

De acuerdo al porcentaje de grupos aminos de las muestras de quitosán, en la fracción I se observó un aumento en el contenido en los valores de grupos aminos al igual que los porcentajes de desacetilación calculados a partir de los primeros. Dado que las tres muestras fueron desacetiladas bajo las mismas condiciones, se infiere que el aumento en la desacetilación es debido al aumento en la concentración de ácido clorhídrico, más que a los tratamientos alcalinos.

Las muestras de quitosán de la fracción IV presentaron

un aumento en el contenido de grupos aminos conforme aumentó el tiempo de desacetilación, este comportamiento resultó ser como se esperaba, pero es importante hacer notar que a medida que aumentó el tiempo de desacetilación se hizo más alto el riesgo de disminuir el grado de polimerización de las cadenas de quitosán, como se denotó en la figura 10.

Al comparar los valores de grupos amino y de desacetilación de las muestras I-C y IV-B con los correspondientes a la muestra de quitosán comercial, se observó una similitud en los resultados, lo que dió pauta para suponer que el tiempo de desacetilación más adecuado en la obtención del mejor producto de quitosán, resultó entre las 4 y 5 horas, sin embargo, la muestra IV-B presentó una viscosidad muy baja reflejandose directamente en la masa molecular promedio; por otro lado, la muestra I-C presentó la viscosidad más alta considerandose de este modo la que menos degradación presentó.

En los valores de desacetilación de las muestras de quitosán de la fracción I, se observó que de la muestra I-C a la muestra I-D, existió un aumento apreciable en los valores de desacetilación, de 54.37% a 81.09%, con 89.72% en la muestra I-E. Esto sugiere que la acción del HCl a altas concentraciones, además de lograr una eliminación de

los minerales, afectó la estructura del polímero; y por otro lado en la fracción IV, aunque se aumentó el tiempo de desacetilación, tan sólo se produjo una diferencia de alrededor del 20% entre las muestras procesadas durante dos y diez horas (Fig. 9).

En la desacetilación de la fracción IV, se observó que en las primeras 4 horas se registró la mayor eliminación de los grupos acetilos de la molécula de quitina considerando que el contenido de grupos acetilos fue limitado, conforme se aumentó el tiempo los cambios en la desacetilación fueron menos pronunciados, lo cual se atribuyó a la disminución gradual en contenido de acetilos. Por otra parte, el grado de polimerización de las cadenas, se mantuvo en decremento mientras que la densidad de carga de los grupos amino aumentó de manera proporcional al porcentaje de desacetilación.

Se ha reportado que la desacetilación no es muy probable que ocurra mas allá del 85% (Broussignac, 1968); en la fracción I se obtuvieron valores de desacetilación cercanos al 90%, en comparación con las muestras de la fracción IV en las que la desacetilación no excedió al 75%, así, se asumió que en la primera fracción existió una mayor desacetilación que en la fracción IV, lo cual nos dá un indicio más del efecto ocasionado por el HCl, a

concentraciones mayores de 3N sobre los grupos acetilos.

Los resultados de viscosidad en la fracción I nos indicaron que las cadenas de quitosán de las muestras I-D y I-E, experimentaron una despolimerización extensa debido en gran parte a las elevadas concentraciones de HCl utilizadas, lo cual llegó a ocasionar la ruptura de las cadenas hasta residuos monoméricos de glucosamina (Hackman, 1962); además estos valores de viscosidad nos ayudaron a explicar el drástico aumento en los porcentajes de los grupos aminos de las muestras I-D y I-E, lo que hizo suponer que además de hidrolizarse los grupos acetilo, hubo una pérdida de muestra al llegarse a destruir las cadenas hasta residuos monoméricos de glucosamina, eliminados en los diferentes enjuagues a los que fueron sometidos las muestras.

Los valores de los grupos amino y de las viscosidades intrínsecas y su comportamiento con respecto al tiempo de desacetilación, indicó que los puentes de hidrógeno que originalmente existían en las muestras sin disolver fueron rotos al entrar en solución el quitosán, pasando de una configuración globular a una más recta y rígida conforme aumenta la fuerza iónica del medio (Kienzle-Sterzer *et al.* 1984).

Con respecto a la fracción IV, los valores de

viscosidad absoluta resultaron ser inferiores a los de la muestra I-C, lo cual pudo haber sido resultado de dos factores; el tiempo de desmineralización y el drástico tratamiento alcalino durante la desacetilación. Los valores de masa molecular para estas muestras sugieren que hubo una despolimerización extensa y si tomamos en cuenta que la muestra I-C fue desacetilada durante un período de tiempo más prolongado y su masa molecular fue el más alto, la disminución en los valores de masa molecular para las muestras del lote IV se atribuyeron al largo proceso de desmineralización.

En las muestras de quitosán de la fracción IV con 2 y 4 horas de desacetilación ocurrió un descenso muy pronunciado en la viscosidad hasta 43.82 cp para después aumentar hasta 51.59 cp a las 6 horas y continuar con un comportamiento descendente. Este aumento en la viscosidad de las 4 a las 6 horas se atribuye más al comportamiento del quitosán en solución dentro del capilar del viscosímetro, es decir, al fenómeno de fricción y partículas muy pequeñas no solubilizadas, que a una disminución en el grado de polimerización, como lo demuestran los valores de peso molecular de éstas muestras. Por ésta razón cuando se pretende realizar un estudio con carácter científico, la caracterización más

precisa se debe llevar a cabo mediante el uso de las viscosidades intrínsecas (Haug y Smidsrod, 1962).

Debido a que el comportamiento fluido del quitosán como polielectrolito está determinado por su conformación molecular global, por la presencia de fuerzas enlazantes de hidrógeno y por la presencia de repulsiones electrostáticas, puede realizarse una correlación entre el peso molecular y la viscosidad intrínseca a partir de la cual se puede estimar aproximadamente la conformación en solución que adquiere el quitosán.

El valor de viscosidad de la muestra comercial de quitosán en solución en ácido acético fue casi tres veces más grande con respecto a la muestra comercial de quitosán en ácido acético-urea, observándose el efecto de la fuerza iónica del medio en la viscosidad intrínseca, ya que un incremento en el peso molecular, incrementa el grado de ionización de los grupos aminos de la estructura de quitosán o por el contrario, si decrece la fuerza iónica de la solución el volumen hidrodinámico (viscosidad intrínseca) se verá aumentado (Rha, 1985).

Las muestras de quitosán obtenidas en este trabajo se clasificaron de acuerdo a su calidad, según Moorjani et al. (1977) y Filar y Wirick (1977), de la siguiente manera: quitosán I-C entre mediana y alta calidad; quitosán I-D de baja calidad; quitosán IV-A de mediana

calidad; quitosán IV-B, C, D y E de baja calidad.

No obstante que no se obtuvieron valores de viscosidad lo suficientemente elevados como para quedar catalogadas todas las muestras como de alta calidad, estas muestras pueden tener utilidad como productos comerciales debido a sus parámetros de calidad.

Por otra parte se encontró que el valor de viscosidad absoluta para la muestra comercial disuelta en ácido acético-urea fue menor que en las muestras I-C y IV-A obtenidas en este estudio; el aspecto físico de estas muestras fue blanco con mínimas coloraciones cremosas y con aspecto nacarado, indicándonos que el contenido de impurezas fue mínimo comparadas con la muestra comercial cuya coloración fue amarilla parduzca.

En cuanto al porcentaje de desacetilación, se obtuvieron mayores valores indicándonos la mejor efectividad del método utilizado en este trabajo. La viscosidad intrínseca y la masa molecular promedio fueron similares entre la muestra comercial disuelta en ácido acético-urea y la muestra I-C asumiendo que el tratamiento de la última no fue tan drástico como para ocasionar una despolimerización del quitosán.

## CONCLUSIONES

- En base a los parámetros fisicoquímicos y propiedades analizadas la muestra que mejores condiciones de aplicabilidad comercial reflejó fue la I-C, cuyas condiciones de extracción fueron: HCl 3N, NaOH 1N y cinco horas de desacetilación.
- De acuerdo a las condiciones utilizadas en el presente estudio, la influencia del ácido clorhídrico fue determinante obteniéndose productos escasamente desmineralizados a concentraciones menores de 3N, en tanto que a concentraciones mayores, se produjo una despolimerización extensa.
- El contenido de grupos acetilos y la masa molecular promedio se vieron influenciados por el tiempo de desacetilación, la remoción de grupos acetilo presentó cambios ligeros después de las 4 horas, mientras que la viscosidad y como consecuencia también la masa molecular promedio continuaron disminuyendo.
- La presencia de minerales en las muestras disminuyó la solubilidad de la quitina y se reflejó en el resto de sus propiedades fisicoquímicas.
- Se determinó la factibilidad de aprovechamiento comercial de los desechos de caparazón de langosta, por ser adecuada como materia prima para la obtención de quitina.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios subsecuentes relacionados con la quitina y el método de extracción con la finalidad de investigar la posibilidad de estandarizar un método que pueda ser aplicable para otras especies disponibles (jaiba, camarón etc.).
- Promover ante el sector productivo el estudio de la quitina y sus subproductos con el fin de dar soluciones a diferentes problemas entre los que se incluyen los problemas ecológicos que implica el desecho de caparazones de crustáceos.

## BIBLIOGRAFIA

- Allan, G. G., J.R. Fox and N. Kong (1977). A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. In Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan (Eds. Muzzarelli, R.A.A. y E.R. Pariser), MIT-Sea Grant Program, Cambridge, Massachussets.
- A.O.A.C. (1975) Methods of analysis., 12th ed., Washington, D.C.
- Austin, P.R., C.J. Brine, J.E. Castle, and J.P. Zikakis (1981). Chitin: New facets of research. *SCIENCE* 212:749-753.
- Bance, S. (1981). Handbook of practical organic microanalysis. Ellis-Hornwood Series in Analytical Chemistry, Halsted Press-John Wiley & Sons. N.Y. pp.167-171
- Bough, W.A. (1977). Shellfish components could represent future food ingredients. *Food Product Development.* Octubre, 1977. University of Georgia. pp 1-4.
- Bough, W.A., A.C.M. Wu, W.B. Miller. (1977). Effect of time of deacetylation on molecular-weight distribution, acetyl content viscosity and performance of chitosan as a conditionin agent for activated sludge. *University of Georgia Marine Extension Bulletin.* No. 77-7; pp 1-38
- Bough, W.A., W.L. Salter, A.C.M. Wu and B.E.Perkins (1978). Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I Chemical composition, viscosity and molecular-weight distribution of chitosan products. *BIOTECH. and BIOENG.* 20:1931-1943.
- Brine, C.J. and P.R. Austin (1981). Chitin isolates; species variation in residual aminoacids. *COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.* 70b: 173-178.
- Broussignac, P. (1968). Un haut polymère naturel peu connu dans l'industrie.Le Chitosane. *CHIMIE ET INDUSTRIE GENIE CHIMIQUE* 99(9):1241-1247.

- Cabib, E. (1987). The synthesis and degradation of chitin. *ADV. ENZYMOL.* 59:59-101.
- Carlström, D. (1957). The crystal structure of  $\alpha$ -chitin. *J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL.* 3:669-683
- Elson, E.L. and W.T.J. Morgan (1933). CCXLVIII. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *BIOCHEM. J.* 27:1824-1828.
- Filar, L.J. and M.G. Wirick (1977). Bulk and solutions properties of chitosan. Proc. First Int. Conf. on Chitin/Chitosan, Muzzarelli, R.A.A. y E.R. Pariser ed., MIT-Sea Grant program, Cambridge, MA. pp. 169-181
- Foster, A.B. y J.M. Webber (1960). Chitin. *ADV. CARBOHYD. CHEM.* 15:371-393
- Hackman, R.H. (1954). Studies on chitin I. Enzymatic degradation of chitin and chitin esters. *AUST. J. BIOL. SCI.* 7:168-178
- Hackman, R.H. (1962). Studies on chitin V. The action of mineral acids on chitin. *AUST. J. BIOL. SCI.* 15:526-537.
- Hackman, R.H. (1971). The integument of arthropods. In Chemical Zoology. Vol.VI. (ed. Florkin M. y Scheer, B.T.) Academic Press, N.Y. pp.1-62
- Hattis, D. and A.E. Murray (1977). Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. MIT-Sea Grant Program, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge Mass. Report No. MITSG 77-3. pp 1-12
- Hunt, S. (1970). Chitin. In. Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates. chap. 8 Academic Press, N.Y. pp. 127-147
- Johnson, E.L. and Q.P. Peniston (1977). The production of chitin and chitosan. In. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan, Muzzarelli, R.A.A., E.R. Pariser, Cambridge, MA. ed. pp. 80-87

- Johnson, E.L., and Q.P. Peniston (1978). Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In. Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products. AVI Publishing, pp. 415-422.
- Kaye, R. (1985). Chitosan markets and quality go hand-in-hand. In. Biotechnology of Marine Polysaccharides. Rep. MIT-Sea Grant Program, Cambridge, Mass. pp. 333-342
- Kienzle-Sterzer, R. (1985). Diffusion and microviscosity in chitosan solutions. In. Chitin in Nature and Technology (Muzzarelli, R. A. A., C. Jeuniaux and G. W. Gooday eds.) pp 350-354
- Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food. FOOD TECH. 1:85-97
- Moorjani, M.N., D. Imam Khasim, S. Rajalakshmi, P. Puttarajappa and B.L. Amia (1977). Chitosan of high viscosity and protein as a valuable by-product from squilla. In. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan, Muzzarelli, R.A.A., E.R. Pariser eds., pp. 210-216
- Muzzarelli, R.A.A. ed. (1977a). Proceedings of The First International Conference on Chitin/Chitosan. MIT-Sea Grant Program, Cambridge Mass. pp 1-10
- Muzzarelli, R.A.A. (1977b). Chitin. Pergamon Press, Oxford, England. pp 10-84
- Ortega, G.C.A. (1982). Langostilla Mexicana; importante recurso en México. Inf. Técnico. CINVESTAV-IPN. Anuario 1985-1987. México D.F. p 89
- Rha, C.K. (1985). Chitosan as a biomaterial. In. Biotechnology of Marine Polysaccharides. (Rep. MIT-Sea Grant Program) pp 177-189
- Richards, A.G. (1951). The Integument of Arthropods. University of Minnesota Press, Minneapolis. pp.32-41.
- Ruiz-Herrera, J. (1981). La síntesis de quitina en los hongos. CIENCIA 32:89-96.

- Rutherford, F.A.III and P.R. Austin (1977). Native chitin properties and solvents. In. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. Muzzarelli, R.A.A., E.R. Pariser ed., Cambridge, Mass. pp. 182-192
- Sandford, P.A. (1988). Chitosan. Commercial uses and potential applications. In. Proc Fourth Int. Conf. on Chitin/Chitosan. pp. 51-69
- Sannan, T., K. Kurita and Y Iwakura (1976). Studies on chitin II. Effects of deacetylation on solubility. MAKROMOL. CHEM 177: 3589-3600.
- Secretaría de Pesca (1987). Pesquerías Mexicanas. Estrategias para su administración. SEPESCA ed. pp. 469-542.
- Shimahara, K., Y. Takiguchi, K. Ohkouchi, K. Kitainura and O. Okada (1984). Chemical composition and some properties of crustacean chitin prepared by use of proteolytic activity of *Pseudomonas maltophilia*, LC-102. In. U.S.-Japan Seminar on Advances in Chitin, Chitosan and Related Enzymes. J.P. Zikakis ed., Academic Press, N.Y. pp. 239-255
- Shoemaker, D.P., C.W. Garland and J.I. Steinfield (1974). Experiments in Physical Chemistry. McGraw-Hill, N.Y., 3rd edition. pp. 390-401.
- Vincendon, M. (1985). N.M.R. Conformational analysis of chitin in lithium-chloride solution. In. Chitin in Nature and Technology., Proceedings of the Third International Conference on Chitin/Chitosan. (Muzzarelli, R.A.A., C. Jeuniaux and G.W. Gooday eds), Ancona, Italy. pp. 343-345
- Wu, C.M. and W.A. Bough (1977). A study on the variables in the chitosan manufacturing process in relation to molecular weight distribution, chemical characteristics and waste treatment effectiveness. In Proceedings of the First International Conference on

Chitin/Chitosan. (Muzzarelli, R.A.A., E.R. Pariser  
ed), Cambridge, Mass. pp. 88-102