



Universidad de los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Laboratorio de Polímeros



## **Purificación y caracterización de quitosano nacional**

Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciada en Química

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Bra. Castillo Ramírez Alba Mariely**

Tutor: Dr. Cristóbal Lárez Velásquez

Co-tutor: Lic. Cesar Izaguirre

Mérida, Septiembre 2017

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## AGRADECIMIENTOS

Difícil expresar en estas líneas el agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y creyeron en mí durante esta importante etapa de mi vida. Quiero agradecer muy especial:

A Dios todopoderoso por darme la vida y colocarme en el lugar y con las personas indicadas para formarme hoy profesionalmente.

A mis Padres Julio Castillo y Eden Ramírez por el apoyo, compromiso, dedicación, sacrificio y sobre todo por el amor que me han brindado. Sin duda alguna sé que tengo a los mejores padres, gracias por el hogar donde crecí, gracias por la educación, gracias por la familia que somos, pero por sobre todo gracias por existir en mi vida. Este triunfo les pertenece. Los AMO.

A mis hermanos Jerson, María Alejandra y Julio Cesar, quienes han sido el mejor ejemplo a seguir, la bendición más grande que Dios me ha regalado, mis compañeros en cada batalla, mis amigos. Este triunfo también es de ustedes. Los AMO.

A Camilo Alejandro, mi niño hermoso, más que un sobrino un hijo para mí. Gracias por llenar mis días de alegría. Al igual que Ayeen Natalia y Ana María, que este triunfo les sirva de ejemplo para sus vidas. Los AMO.

A mi tía Debora Castillo por la ayuda, la entrega y el compromiso durante mi crianza. Infinitas gracias tía.

A mis amigos Gabriela Hernández, Stefania Contreras, Juliana Meneses y Alejandro Gonzales por su confianza, constante apoyo moral y personal. Ustedes forman parte de esa familia que decidí tener. Los quiero mucho.

Al Dr. Cristóbal Lárez Velásquez, tutor de esta investigación, mi agradecimiento hacia usted por la dedicación en cada etapa de este trabajo, por la paciencia y sobre todo por la enseñanza brindada.

A la M. Sc. Iris Santos, agradecida estaré siempre con usted por la disposición y desinteresada colaboración en el desarrollo de este trabajo. Gracias por sus conocimientos, enseñanzas, pero sobre todo gracias por su amistad durante estos años.

A los profesores Claudio Lugo y Freddy Carrillo, miembros del jurado de este trabajo especial de grado. Gracias por los aportes hechos al mismo.

Al Lic. William Velázquez, Fanny y Marlin Villarreal por la ayuda brindada en este trabajo desde cada uno de sus espacios.

Finalmente quiero agradecer a la ilustre Universidad de los Andes, especialmente a la Facultad de Ciencias por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de formarme profesionalmente.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo Gracias.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Polímeros .....	1
1.2. Generalidades de quitina y quitosano .....	3
1.3. Obtención de quitina y quitosano .....	5
1.3.1. Proceso de desproteínización .....	6
1.3.2. Proceso de desmineralización .....	6
1.3.3. Proceso de desacetilación .....	7
1.4. Propiedades fisicoquímicas del quitosano .....	7
1.4.1. Grado de desacetilación (GDD) .....	8
1.4.2. Peso molecular promedio .....	8
1.4.3. Solubilidad .....	8
1.4.4. Humedad .....	8
1.4.5. Cenizas .....	9
1.4.6. Material insoluble .....	9
1.5. Aplicaciones del quitosano.....	9
1.6. Técnicas a utilizar .....	11
1.6.1. Espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FT-IR) .....	11
1.6.2. Viscosidad intrínseca .....	12
1.6.3. Titulación potenciométrica .....	13
1.6.4. Titulación conductimétrica.....	13
1.6.5. Gravimetría .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19
<b>5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	21
6.1. Materiales, equipos y reactivos.....	21
6.2. Purificación de quitosano.....	22
6.3. Caracterización de quitosano y del material purificado (fracción soluble).....	23
6.4. Preparación del oleato de sodio.....	26
6.5. Preparación y caracterización de complejos de quitosano con oleato de sodio.....	27
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
7.1. Purificación de quitosano.....	29
7.2. Caracterización de quitosano de partida y del material purificado.....	30
Determinación del contenido de humedad y del porcentaje de ceniza.....	30
Espectroscopia FT-IR.....	31
Determinación del grado de desacetilación.....	32
Espectroscopia FT-IR.....	32
Titulación potenciométrica.....	34
Titulación conductimétrica.....	35
Determinación del peso molecular viscosimétrico .....	36
7.3. Preparación, purificación y caracterización del oleato de sodio.....	38
7.4. Preparación y caracterización de complejos de quitosano con oleato de sodio.....	42
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	47
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	49
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>APÉNDICES</b> .....	55

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Propiedades de algunos polisacáridos naturales .....	3
<b>Tabla 2:</b> Características fisicoquímicas de quitina y quitosano y los métodos de determinación .....	9
<b>Tabla 3:</b> Aplicaciones del quitosano en diferentes áreas .....	10
<b>Tabla 4:</b> Reactivos y solventes utilizados .....	21
<b>Tabla 5:</b> Equipos e instrumentos .....	21
<b>Tabla 6:</b> Preparación de soluciones para la determinación del peso molecular viscosimétrico .....	26
<b>Tabla 7:</b> Preparación de la solución acuosa de quitosano en HCl .....	27
<b>Tabla 8:</b> Preparación de la solución acuosa de oleato de sodio .....	27
<b>Tabla 9:</b> Preparación de la solución acuosa de oleato de sodio .....	28
<b>Tabla 10:</b> Resultados obtenidos durante la cuantificación de las distintas fracciones de acuerdo a su solubilidad en ácido acético y tamaños de tamices empleados .....	30
<b>Tabla 11:</b> Contenido de humedad y porcentaje de ceniza de la muestras analizadas .....	31
<b>Tabla 12:</b> Asignación de las principales señales de los espectros FT-IR del quitosano de partida y sus fracciones FI-1, FI-2 y FS obtenidas durante el proceso de purificación .....	32
<b>Tabla 13:</b> Valores del GDD obtenidos mediante espectroscopia de FT-IR .....	33
<b>Tabla 14:</b> Resultados obtenidos de la valoración potenciométrica para la fracción soluble .....	35
<b>Tabla 15:</b> Resultados de la determinación conductimétrica del GDD para la fracción soluble de quitosano .	36
<b>Tabla 16:</b> Resultados obtenidos para el GDD por espectroscopia IR y titulación potenciométrica .....	36
<b>Tabla 17:</b> Resultados obtenidos en la determinación del peso molecular viscosimétrico de la fracción soluble ...	37
<b>Tabla 18:</b> Resultados obtenidos del peso molecular por el método viscosimétrico .....	38
<b>Tabla 19:</b> Resultados de la titulación potenciométrica del ácido oleico con HCl 0,0923N .....	39
<b>Tabla 20:</b> Cantidades usadas en la preparación del oleato de sodio .....	39
<b>Tabla 21:</b> Asignación de las principales señales del espectro FT-IR para el ácido oleico .....	40
<b>Tabla 22:</b> Asignación de las principales señales del espectro FT-IR para el oleato de sodio .....	41
<b>Tabla 23:</b> Asignación de las principales señales del espectro FT-IR para los complejos quitosano/OS ...	43

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Tipos de copolímeros.....	2
<b>Figura 2:</b> Estructura química de la quitina.....	4
<b>Figura 3:</b> Estructura química de la celulosa.....	4
<b>Figura 4:</b> Estructura química del quitosano.....	5
<b>Figura 5:</b> Esquema para la obtención de quitina y quitosano a partir de conchas de crustáceos.....	6
<b>Figura 6:</b> Mecanismo de reacción de la desacetilación de la quitina para obtener quitosano. a) Reacción general, b) Mecanismo de reacción.....	7
<b>Figura 7:</b> Tipos de vibraciones moleculares. <i>Nota:</i> + indica un movimiento del plano de la página hacia el lector; - indica un movimiento del plano de la página alejándose del lector.....	11
<b>Figura 8:</b> a) Muestra inicial de quitosano, b) Quitosano en la solución acuosa de ácido acético al 0,5 %.....	22
<b>Figura 9:</b> a) Filtrado 1, b) fracción insoluble 1 y c) fracción insoluble 2 antes de precipitación con NaOH.....	23
<b>Figura 10:</b> a) Fracción insoluble 1, b) Fracción insoluble 2 y c) fracción soluble.....	23
<b>Figura 11:</b> Complejos quitosano/OS luego de centrifugados: (a) oleato 20 %, (b) oleato 40 %, (c) oleato 60 %, (d) oleato 80 %, (e) oleato 100 %, (f) oleato 120 %, (g) oleato 140 %, (h) oleato 160 %.....	28
<b>Figura 12:</b> Esquema para la purificación de quitosano. FS (fracción soluble), FI-2 (fracción insoluble 2) y FI-1 (fracción insoluble 1).....	29
<b>Figura 13:</b> Espectros FT-IR del quitosano de partida y sus fracciones FI-1, FI-2 y FS obtenidas durante el proceso de purificación. Tomados en pastilla de KBr.....	31
<b>Figura 14:</b> Espectro FT-IR con las señales indicadas para determinar el GDD.....	33
<b>Figura 15:</b> Curva de valoración potenciométrica de la fracción soluble de quitosano.....	34
<b>Figura 16:</b> Curva de valoración conductimétrica de la fracción soluble de quitosano.....	35
<b>Figura 17:</b> Ecuación para reacción de titulación potenciométrica y conductimétrica del quitosano disuelto en exceso de ácido con NaOH.....	36
<b>Figura 18:</b> $\eta$ (reducida e inherente) Vs $P_{\text{olimero}}$ (g/mL).....	37
<b>Figura 19:</b> Curva de titulación potenciométrica para la neutralización con HCl del ácido oleico.....	38
<b>Figura 20:</b> Espectro FT-IR del ácido oleico utilizado para la obtención del oleato de sodio.....	39
<b>Figura 21:</b> Espectro FT-IR del ácido oleico reportado.....	40
<b>Figura 22:</b> Espectro FT-IR del oleato de sodio obtenido.....	41
<b>Figura 23:</b> Espectro FT-IR del oleato de sodio reportado.....	41
<b>Figura 24:</b> Formación del complejo polielectrolito/surfactante mediante la interacción electrostática entre el policationo quitosano protonado y los aniones oleato.....	42
<b>Figura 25:</b> Espectro FT-IR de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 %, (i) OS 160 %. Tomados en pastillas de KBr. Los valores de pH final se refieren al valor del pH de la solución que se forma luego de mezclar las soluciones de oleato de sodio, quitosano y agua.....	43
<b>Figura 26:</b> Espectro FT-IR entre 1800 a 800 $\text{cm}^{-1}$ de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 %, (i) OS 160 %.....	44
<b>Figura 27:</b> Espectro FT-IR de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 % controlando el pH. Los valores de pH final se refieren al valor del pH de la solución que se forma luego de mezclar las soluciones de oleato de sodio, quitosano y agua.....	45
<b>Figura 28:</b> Espectro FT-IR entre 1800 a 800 $\text{cm}^{-1}$ de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 % controlando el pH.....	46

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en la purificación y caracterización de quitosano nacional proveniente de la empresa Innovaquito C.A. Estos resultados pudieran arrojar información útil para la obtención de materiales con la pureza adecuada para su aplicación en diversas áreas, así como también para establecer métodos de caracterización de uso nacional para quitosanos.

En la purificación de quitosano se logró cuantificar mediante el método propuesto las distintas fracciones en las cuales se dividió el material de partida, obteniéndose fracciones insolubles que representan alrededor del 25 % de la muestra inicial y una fracción soluble que representa el 50 %. Las distintas fracciones obtenidas fueron caracterizadas mediante espectroscopia FT-IR para la identificación de las principales bandas características de estos materiales. Adicionalmente, se utilizó la técnica gravimétrica para la determinación del contenido de humedad y el porcentaje de ceniza de la muestra inicial de quitosano y de la fracción soluble obtenida. Para realizar una caracterización más completa de estos materiales, se realizó la determinación del grado de desacetilación (GDD) utilizando tres técnicas analíticas: espectroscopia FT-IR, titulación potenciométrica y titulación conductimétrica, resultando valores para el GDD de 83,8; 81,3 y 80,5 %, respectivamente. Adicionalmente, se realizó la determinación del peso molecular promedio viscoso resultando un valor para este importante parámetro de 116,5 kDa.

Como complemento a los estudios de purificación y caracterización descritos se usó el quitosano purificado (fracción soluble) para realizar estudios preliminares dirigidos a la obtención de complejos polielectrolitos con oleato de sodio (OS) en distintas proporciones. La caracterización de los policomplejos mediante espectroscopia FT-IR indica que la reacción parece verse afectada por la precipitación parcial del ácido oleico, debido probablemente a problemas de mezclado.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## 1. INTRODUCCIÓN

---

En la actualidad, debido a los altos niveles de contaminación, se hace cada vez más necesario el uso de materiales naturales biodegradables y de poco impacto ambiental. El quitosano, un biopolímero lineal, es obtenido mediante desacetilación de la quitina, polímero de origen natural de amplia distribución en la naturaleza, presente en el exoesqueleto de artrópodos, parte de la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras, así como en algunos tipos de algas.

Este material se caracteriza por la presencia de grupos amino colgantes en su cadena polimérica, los cuales han hecho del quitosano uno de los productos más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, debido a la posibilidad de desarrollar una amplia variedad de modificaciones química, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, entrecruzamiento para formar hidrogeles, hidrólisis para obtener oligosacáridos, amidación, esterificación, entre otras, de las cuales es posible obtener derivados con aplicaciones que abarcan diferentes campos, entre los que destacan la medicina, farmacia, biotecnología, cosmética, el sector textil, alimentario, la alimentación, la agricultura, tratamiento de aguas, recuperación mejorada de petróleo, etc.

La producción de quitosano comercial usualmente presenta algunos inconvenientes para la obtención de materiales que puedan ser usados en algunas aplicaciones específicas. Entre los factores más importantes a controlar para su uso en algunas de ellas podemos citar el peso molecular, el grado de desacetilación, el contenido de proteínas, el contenido de metales, el contenido de colorantes, etc.

En Venezuela se ha establecido recientemente una planta comercial (InnovaQuito) para la obtención de quitosano cuya producción básicamente se ha dirigido al sector agrícola. Es por ello que en el presente trabajo se busca establecer un método de purificación y caracterización de este quitosano nacional a los fines de comprobar la factibilidad de su aplicación en otras áreas de interés para el país, como por ejemplo en la recuperación mejorada de petróleo, el tratamiento de aguas, la preparación de adsorbentes, la obtención de soportes para catalizadores químicos y enzimáticos, preparación de películas para el tratamiento de quemaduras, entre otros.

### 1.1. Polímeros

Los polímeros son un tipo particular de macromoléculas, que se caracterizan por tener una unidad que se repite a lo largo de la molécula [1]. Esta unidad repetitiva se conoce como unidad constitucional repetitiva (ucr) y es capaz de generar moléculas formadas por cadenas muy largas por un proceso conocido como polimerización, el cual consiste en *“la unión de muchas moléculas pequeñas para dar origen a moléculas muy grandes”* [2].

Con la unión de un mismo tipo de ucr o de varios de ellas pueden obtenerse materiales conocidos como homopolímeros y copolímeros, respectivamente, siendo los primeros aquellos que están conformados por un solo tipo de ucr, y los segundos los que tienen más de un tipo.

Los copolímeros formados por dos tipos de ucr pueden ordenarse de diversas maneras [3]:

Copolímeros alternados: las unidades repetitivas se alternan consecutivamente a lo largo de toda la cadena.

Copolímeros al azar: no existe una secuencia definida en el ordenamiento de las unidades repetitivas a lo largo de la cadena.

Copolímeros en bloque: existen secuencias completas de una sola de las unidades repetitivas, seguidas por secuencias completas de la otra unidad repetitiva.

Copolímeros de injerto: existe una cadena principal constituida por un solo tipo de unidad repetitiva la cual tiene injertados lateralmente a dicha cadena bloques de cadenas conformadas por el otro tipo de unidad repetitiva.

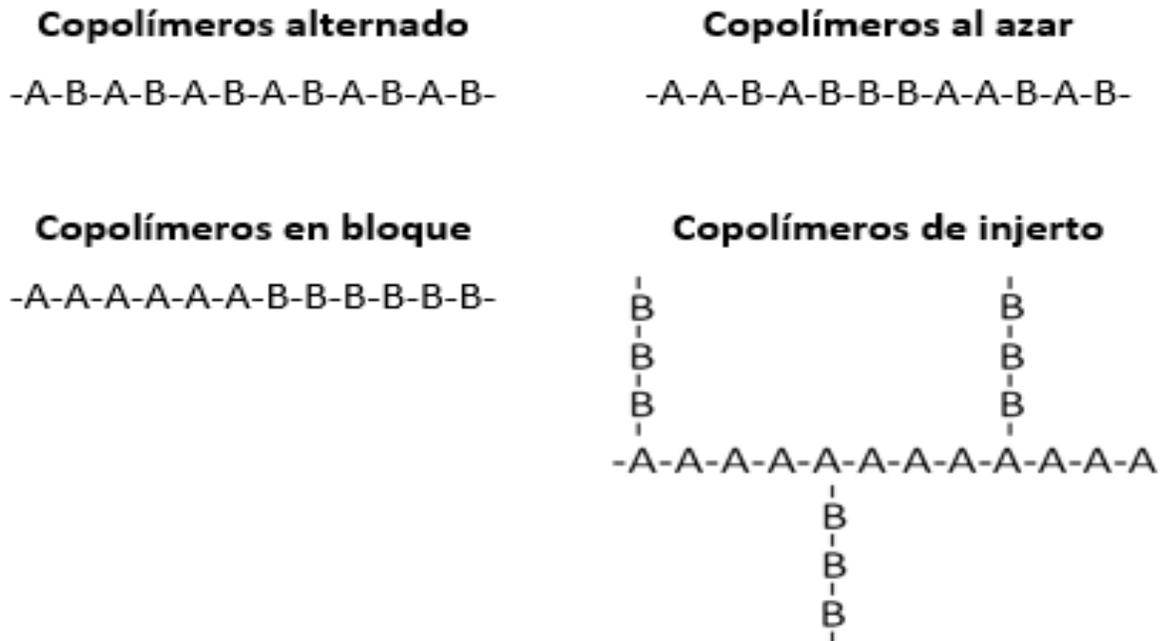


Fig. 1: Algunos de los posibles tipos de copolímeros con dos ucr.

Los polímeros se pueden clasificar de diversas maneras, pero atendiendo a su origen se pueden clasificar en dos grandes grupos [2]:

- Los polímeros naturales, que conforman clases de compuestos que son, literalmente vitales, como por ejemplo:
  - Polisacáridos* como el almidón y la celulosa, que proporcionan alimento, vestuario y techo;
  - Proteínas*, que forman parte importante del cuerpo animal, lo mantiene armado y lo hacen funcionar,
  - Ácidos nucleicos*, que se relacionan con los aspectos genéticos a nivel molecular.
- Los polímeros sintéticos, que son los transformados o hechos por el hombre. Incluyen:
  - Elastómeros*, que tienen la elasticidad característica del caucho,
  - Fibras*, que son materiales alargados y delgados, en forma de hilos muy resistentes a lo largo de la fibra, como el algodón, la lana, seda, y
  - Plásticos*, que pueden moldearse por extrusión en láminas y tubos, transformar en pinturas para superficies o moldear para formar numerosas piezas y objetos.

En la tabla 1 se muestran los polisacáridos naturales más comunes, provenientes directamente del reino vegetal o animal [4].

Tabla 1: Propiedades de algunos polisacáridos naturales.

POLISACÁRIDO	FUENTE	UNIDAD (ES) DE AZÚCAR MONOMÉRICO	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR
Amilopeptina	Maíz, patatas	D-Glucosa	Ramificada	$10^6-10^7$
Amilosa	Plantas	D-Glucosa	Lineal	$10^4-10^6$
Quitina	Animales	2-Acetamidoglucosa		
Glucógeno	Animales (músculos)	D-Glucosa	Ramificada	$>10^8$
Inulina	Alcachofas	D-Fructosa	Lineal (en su mayoría)	$10^3-10^6$
Manano	Levaduras	D-Manosa	Lineal (2-D)	$10^6$
Celulosa	Plantas	D-Xilosa	Lineal (2-D)	-
Xilano	Plantas	D-Xilosa	Lineal (en su mayoría)	-
Licenano	Moho islandés	D-Glucosa	Lineal	$10^5$
Galactano	Plantas	D-Galactosa	Ramificada	$10^4$
Arabinoxilano	Granos de cereales	L-Arabinofuranosa unida a cadena de xilosa	Ramificada	$>10^4$
Galactomanano	Mucilagos de semilla	Cadena de D-Galactopiranos, cadena lateral de galactosa y arabinosa	Ramificada	$10^5$
Arabinogalactano	Altramuces, soja, granos de café	Cadena de D-Galactopiranos, cadena lateral de galactosa y arabinosa	Ramificada	$10^5$
Carragenano	Algas	Complejo que contiene beta-galactopiranos unida a 3,6-anhidro-D-galactopiranos	Lineal	$10^5-10^6$
Agar	Alga roja	Igual que el anterior pero con L-galactopiranos	Lineal	-
Alginatos	Algas pardas	Acido beta-D-manuronico y acido alfa-L-guluronico	Lineal	-

## 1.2. Generalidades de quitina y quitosano

La quitina, poli [ $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos] (figura 2), es el componente orgánico más abundante en la estructura esquelética de mucha de las clases que conforman al grupo de los invertebrados como, por ejemplo los artrópodos, los anélidos, los moluscos y los celentéreos. La quitina se encuentra presente, además, en algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, y en algas como las diatomeas. Es una de las sustancias orgánicas más abundantes de la naturaleza, presenta alta similitud estructural con la celulosa (figura 3). La diferencia entre ellas se encuentra en que el carbono 2 contiene un grupo hidroxilo en la celulosa y el grupo acetamida en la quitina. Ambos biopolímeros cumplen roles semejantes: actúan como materiales de soporte y defensa en los organismos que los contienen [5].

Fue descubierto por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos; posteriormente Odier, en un artículo sobre insectos, reportó que había encontrado la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola “quitina” [6].

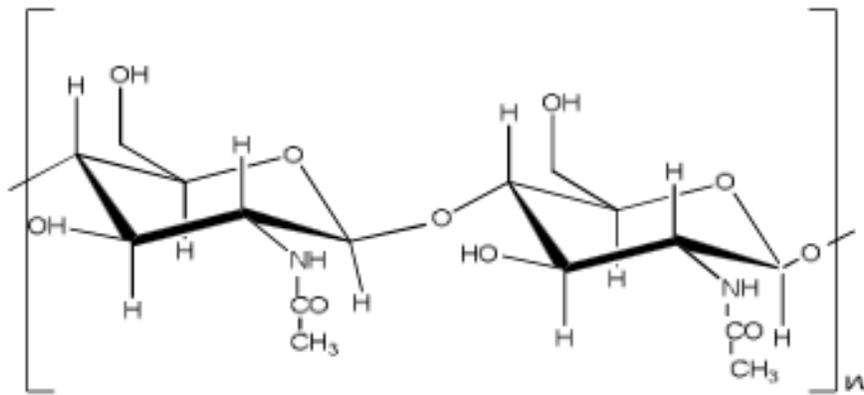


Fig. 2: Estructura química de la quitina.

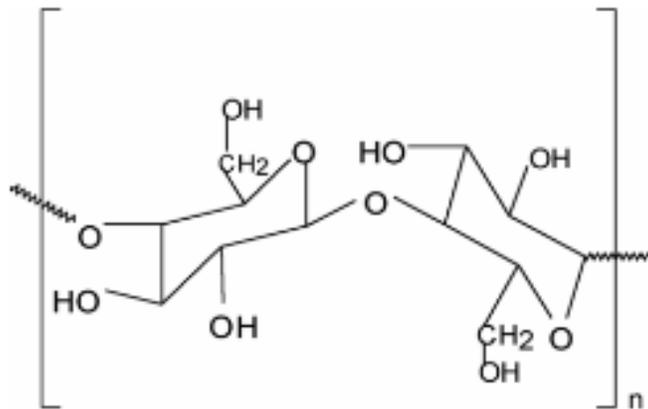
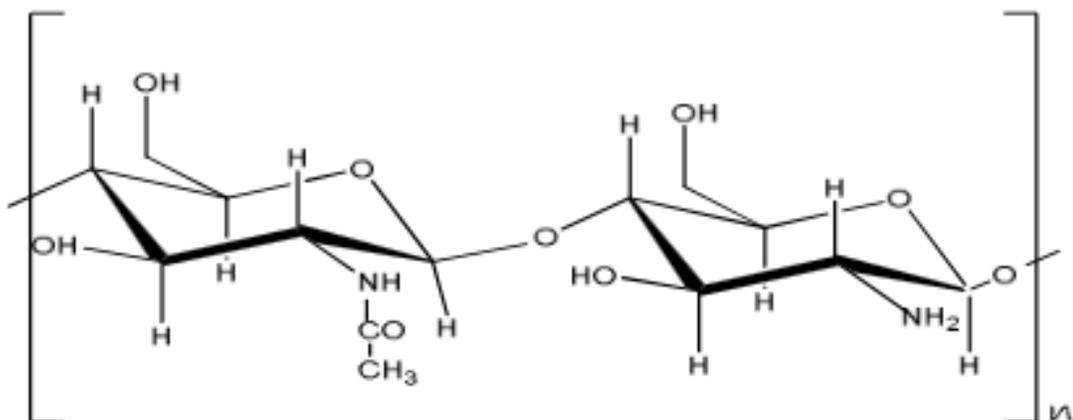


Fig. 3: Estructura química de la celulosa.

Cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado, y a temperaturas superiores a 60 °C, se produce la reacción de desacetilación. Esta reacción consiste en la pérdida del resto aceto del grupo amida del carbono 2, mientras queda un grupo amino en esa posición. Si en la reacción se pierde más del 50 % de los grupos acetilos, el producto de la reacción se denomina quitosano y presenta propiedades significativamente diferentes a la quitina de partida. El quitosano constituye el derivado más importante de la quitina [5].

El quitosano, poli [ $\beta$ -(1-4)-2-amido-2-desoxi-D-glucopiranososa] (figura 4), es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción ocurre mediante la reacción antes mencionada con diferentes grados de desacetilación (GDD). El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quien la denominó “quitosano” (del inglés *chitosan*). También se conoce como quitosana o quitosán en algunos lugares [7].

El quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina, es una modificación de la quitina y posee propiedades de reactividad y solubilidad notorias. Se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular y de fácil solubilidad en medio ácido acuoso. Es soluble en soluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos como el ácido fórmico, acético, cítrico y tartárico, y también en ácidos minerales diluidos a excepción del ácido sulfúrico. Su GDD debe ser mayor al 50 % y se han reportado diferentes valores para su peso molecular promedio (MW) [8].



**Fig. 4:** Estructura química del quitosano.

El quitosano es el único polisacárido catiónico natural, lo que le confiere características especiales que lo hacen útil en numerosas aplicaciones. Sin embargo, sus principales desventajas radican en su limitada solubilidad en medio acuoso neutro o alcalino y en su procesabilidad, además de la dificultad para obtener propiedades homogéneas en relación a peso molecular y GDD. [5].

Debido a la presencia de grupos amino primarios, el quitosano puede someterse a numerosas transformaciones poliméricas conocidas que pueden producir derivados funcionales con propiedades específicas y ampliar considerablemente el campo de aplicación de polímeros naturales. La presencia del grupo amino e hidroxilo en la cadena polimérica conduce a la posibilidad de modificaciones químicas diversas, estos grupos pueden ser objeto de reacciones de alquilación y acilación. Dentro de estas diversas modificaciones encontramos quitosano entrecruzado, N-alquilquitosano, N-carboximetilquitosano, sulfoetil-quitosano y las nombradas bases de Schiff [9].

### 1.3. Obtención de quitina y quitosano

Los procesos para obtener la quitina y el quitosano son relativamente sencillos, aunque el tratamiento con álcali concentrado a temperaturas relativamente altas implica riesgos importantes para los operadores de las plantas de producción y hostilidad hacia el ambiente [10]. A continuación en la figura 5 se muestra un esquema para la obtención de quitina y quitosano:

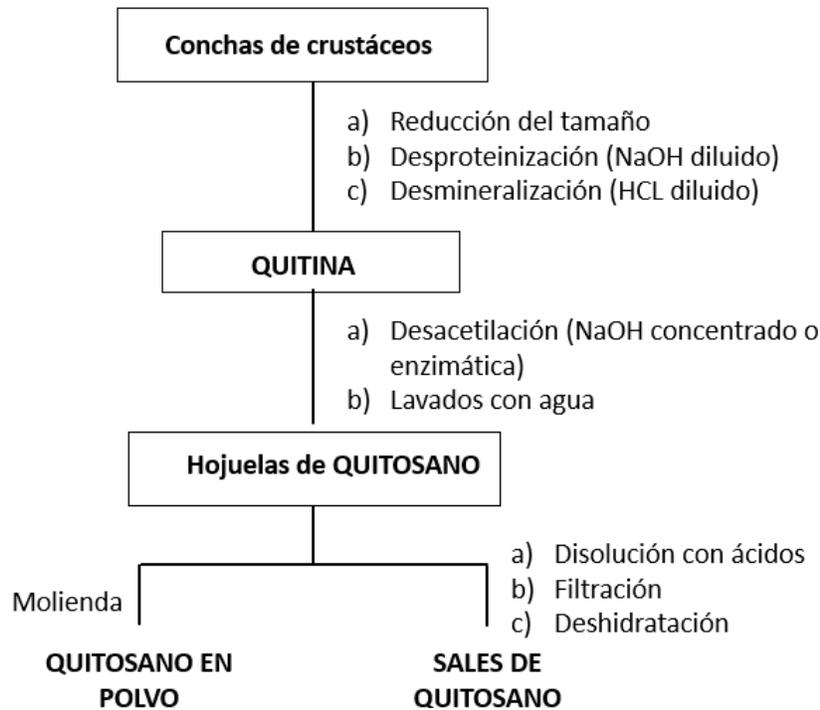


Fig. 5: Esquema para la obtención de quitina y quitosano a partir de conchas de crustáceos [10].

Según el esquema mostrado, la principal fuente de materia prima para la obtención de quitina son los desechos de crustáceos, compuestos por proteínas, sales de calcio, fundamentalmente carbonatos y fosfatos. Por lo tanto, el aislamiento de la quitina consta de dos operaciones básicas, como lo son la desproteínización y la desmineralización; en algunos casos se lleva a cabo la separación de los pigmentos lipídicos (carotenoides) [10], mientras que para la obtención de quitosano se lleva a cabo el proceso de desacetilación a partir de la quitina obtenida.

### 1.3.1 Proceso de desproteínización

En el proceso químico para separar la proteína presente en el material biológico, los exoesqueletos de crustáceos son tratados usualmente con soluciones de NaOH con concentración oscilando entre 1-10 %, a temperaturas entre los 65 – 100 °C y durante periodos de 1 a 24 horas.

Cuando la extracción de proteínas se efectúa en condiciones operativas más severas para asegurar su remoción completa, estas sufren modificaciones químicas sustanciales. El incremento de la concentración del reactivo, de la temperatura, o la prolongación del tiempo de reacción por sobre ciertos valores, no solo produce la ruptura de los enlaces entre proteínas y quitina, sino que las proteínas sufren una hidrólisis de su estructura, lo que genera cadenas de polipéptidos de bajos pesos moleculares [11].

### 1.3.2 Proceso de desmineralización

El contenido mineral de los residuos de los crustáceos oscila entre 30 – 55 %, está constituido, principalmente por carbonato de calcio y, en menor proporción, por fosfato de calcio. La remoción de estos minerales se realiza por tratamiento con ácido. Para ello, se han utilizado numerosos ácidos como HCl, HNO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, HCOOH, entre otros. Generalmente, se realiza con soluciones diluidas de HCl, la cantidad de este ácido y el tiempo de tratamiento pueden variar desde media hora hasta varios días, según los métodos de preparación. Si se prolonga el tiempo de desmineralización a 24

horas, se observa solo una leve disminución en las cenizas, pero puede ocurrir una mayor despolimerización y desacetilación [11].

La desmineralización se produce cuando el ácido reacciona con el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:



En esta reacción, se obtiene cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) disuelto en el afluente acuoso y se libera dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Mediante esta ecuación, es posible calcular el requerimiento estequiométrico de HCl necesario para reaccionar con la cantidad de  $\text{CaCO}_3$  presente. Es necesario considerar la variabilidad del contenido de minerales en las conchas de crustáceos, ya que este varía no solo con la especie sino con el periodo de recolección de la misma [12].

### 1.3.3 Proceso de desacetilación

La reacción de N-desacetilación de la quitina con NaOH ocurre por la hidrólisis del grupo acetamida, sustituyente del C (2) en el anillo, para generar el polímero desacetilado. Esta reacción sucede mediante un mecanismo de adición-eliminación nucleofílica para generar el quitosano [13]. En la figura 6 se muestra el mecanismo de esta reacción.

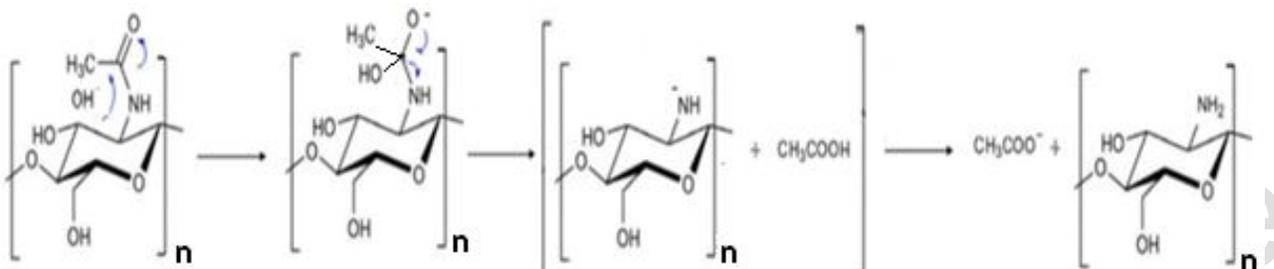


Fig. 6: Mecanismo de reacción de la desacetilación de la quitina para obtener quitosano. a) Reacción general, b) Mecanismo de reacción.

La desacetilación completa difícilmente se alcanza y normalmente no es necesaria, ya que la solubilidad en soluciones de ácido diluido se logra a partir de un grado de desacetilación de ~60%. El criterio utilizado para distinguir entre quitina y quitosano es precisamente la solubilidad de este último en soluciones de ácido diluido [11].

## 1.4. Propiedades fisicoquímicas de quitosano

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano varían dependiendo de la fuente y método de obtención de la quitina, así como de las condiciones y métodos de desacetilación de la misma.

Las principales propiedades fisicoquímicas del quitosano, que determinan sus propiedades funcionales, son: el grado de desacetilación, el peso molecular promedio, la solubilidad y viscosidad, aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas, proteínas y material insoluble también son características importantes a considerar para la aplicación del quitosano [14].

### 1.4.1. Grado de desacetilación (GDD)

El GDD del quitosano es un indicativo del número de grupos amino a lo largo de la cadena polimérica, llevándose a cabo el proceso de desacetilación por hidrólisis química bajo condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática [15].

Usualmente el quitosano es caracterizado por el GDD, el cual influye no solo en el resto de sus propiedades fisicoquímicas, sino también en su biodegradabilidad, solubilidad en soluciones acidas,

hinchamiento en agua, actividad inmunológica, bioactividad y biocompatibilidad. Este hecho es importante al momento de seleccionar el quitosano adecuado para cada aplicación. Por ejemplo, cuando es utilizado como soporte para inmovilización de células, un mayor GDD proporciona una mayor adhesión celular a las películas del quitosano [16].

#### 1.4.2. *Peso molecular promedio*

El peso molecular de las muestras de quitina y quitosano es otro de los parámetros a tener en cuenta en los diferentes usos que se le pueden dar a estos biomateriales. Una de las propiedades funcionales más dependientes del peso molecular promedio es la bioactividad. El quitosano se puede utilizar, entre otras aplicaciones y en función del peso molecular que tenga, como agente espesante, regulador de la viscosidad, estabilizador, agente bioactivo contra hongos y vehículo de liberación controlada.

#### 1.4.3. *Solubilidad*

Mientras que la quitina es insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos, el quitosano se disuelve fácilmente en soluciones acidas diluidas por debajo de pH 6,0. Esto se debe a que el quitosano es una base fuerte por contar con grupos amino primarios con un valor pKa de 6,3. La presencia de estos grupos amino implica que el valor del pH altera sustancialmente el estado de carga del polielectrolito y, por ende, sus propiedades. A valores de pH bajos, los grupos amino se protonan y se cargan positivamente, haciendo al quitosano un polielectrolito catiónico soluble en agua. Por otra parte, a medida que aumenta el pH por encima de 6, los grupos amino se desprotonan y el quitosano, al perder su carga, se convierte en un polímero neutro insoluble [17]. El quitosano es soluble en diferentes medios ácidos [16]:

- Ácidos inorgánicos: es soluble en ácidos diluidos como el clorhídrico, el bromhídrico, el iodhídrico, el nítrico y el perclórico. Sin embargo, cuando se incrementan las concentraciones de estos ácidos, se observa precipitación del quitosano. Es insoluble en ácido sulfúrico diluido pero mejora su solubilidad al incrementar la concentración del ácido.
- Solventes orgánicos: el quitosano es insoluble en la mayoría de solventes orgánicos. Sin embargo, se ha reportado que es soluble en dimetilformamida y en tetraóxido de dinitrógeno en una relación 3:1 (solvente/quitosano).
- Solubilidad en agua: cuando la desacetilación de la quitina alcanza una proporción de 60 % o más de grupos amino el producto obtenido se hace soluble en medio ácido acuoso.

#### 1.4.4. *Humedad*

Tanto las muestras comerciales de quitosano como las que se obtienen en el laboratorio suelen contener diferentes contenidos de agua; por este motivo, el porcentaje de humedad es un parámetro que debe considerarse al momento de trabajar con dichas muestras [16].

#### 1.4.5 *Cenizas*

El contenido de cenizas es indicativo del contenido de material inorgánico presente en la muestra. Es un parámetro muy importante al momento de evaluar las aplicaciones de un quitosano determinado. Por ejemplo, en las aplicaciones biomédicas se requiere un valor muy bajo de este parámetro. También es importante considerar que el contenido de cenizas depende de la temperatura utilizada para el tratamiento de la muestra [16].

#### 1.4.6. *Material insoluble*

El contenido de material insoluble viene dado por la presencia de sales insolubles, quitosano poco desacetilado y otros contaminantes. Este contenido se determina disolviendo el quitosano en ácido

acético, o su sal en agua, y luego filtrando. El peso de las partículas que quedan en el filtro, permite la determinación del material insoluble en la muestra [16].

**Tabla 2:** Características fisicoquímicas de quitina y quitosano y sus métodos de determinación [9].

Características fisicoquímicas	Método de determinación
Grado de desacetilación	Espectroscopia FTIR
	Primera derivada de espectroscopia UV
	Espectroscopia <sup>1</sup> H RMN Y <sup>13</sup> C RMN
	Valoración conductimétrica
	Valoración potenciométrica
Masa molar promedio o distribución de masas molares	Viscosimetría
	Cromatografía de permeación de geles
	Dispersión de luz
Cristalinidad	Difracción de rayos X
	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
Contenido de humedad	Análisis gravimétrico
	Termogravimetría
Contenido de cenizas	Análisis gravimétrico
Proteínas	Método de Kjeldahl

### 1.5. Aplicaciones del quitosano

La baja solubilidad de la quitina es el mayor factor limitante para su utilización, sin embargo, varias aplicaciones de la quitina y quitinas modificadas han sido reportadas, como en el empleo efectivo de la quitina en polvo para la cicatrización de las heridas por quemaduras, ya que al aplicar quitina en una herida ésta es despolimerizada por la acción de las enzimas lisosomales abundantes en el sitio de la lesión [18]. El quitosano, debido a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y biológicas, tiene una gran variedad de aplicaciones que abarcan campos tan diferentes como la medicina, la farmacia, la agricultura, la alimentación, el sector textil, entre otros [19]. En la Tabla 3 se muestran algunas de las áreas de aplicación del quitosano.

Tabla 3: Aplicaciones del quitosano en diferentes áreas [17].

Áreas	Aplicaciones
Tratamientos de agua	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Removedores de iones metálicos.</li> <li>▪ Quelantes de metales de transición y contaminantes ambientales.</li> <li>▪ Floculantes, coagulantes y precipitantes de proteínas, aminoácidos, tintes, colorantes, algas, aceites, metales radioactivos, partículas en suspensión y pesticidas.</li> </ul>
Industria Alimentaria	<p><b>Aditivos en los alimentos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Espesantes, gelificantes y emulsionantes.</li> <li>▪ Mejora la textura.</li> <li>▪ Estabilizantes del color.</li> <li>▪ Agentes que previene la precipitación del vinagre.</li> <li>▪ Aditivos con características nutricionales.</li> <li>▪ Aditivos para la alimentación animal.</li> </ul> <p><b>Envoltura y recubrimiento protector de alimentos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Retrasa el envejecimiento.</li> <li>▪ Disminuye la oxidación.</li> <li>▪ Disminuye las pérdidas por transpiración.</li> <li>▪ Protege frente al ataque de hongos.</li> </ul>
Procesos industriales	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agente purificador de azúcar.</li> <li>▪ Clarificador en industrias de bebidas.</li> <li>▪ Coagulación del queso.</li> <li>▪ Retardador del oscurecimiento enzimático de manzana y pera.</li> </ul>
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Propiedades antimicrobianas.</li> <li>▪ Capacidad de retención de humedad.</li> </ul>
Biotecnología	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inmovilización de enzimas.</li> <li>▪ Separación de proteínas.</li> <li>▪ Inmovilización celular.</li> <li>▪ Reacción con aldehídos.</li> <li>▪ Captación de células y enzimas</li> </ul>
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bioestimulante de plantas en tratamientos de semillas, raíces y hojas.</li> <li>▪ En tratamientos post cosecha de frutas y verduras con el fin de aumentar su conservación.</li> <li>▪ Recubrimientos de semillas.</li> <li>▪ Conservación de frutas.</li> <li>▪ Protección frente a plagas y hongos.</li> <li>▪ Estimulante del crecimiento.</li> </ul>
Cosméticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Propiedades humectantes.</li> <li>▪ Propiedades abrasivas.</li> </ul>
Industria papelera	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Elaboración de papeles.</li> <li>▪ Aumenta el rendimiento de la pulpa.</li> <li>▪ Capacidad de retención de agua.</li> </ul>
Tecnologías de membranas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Para la separación de componentes.</li> <li>▪ Absorbentes de encapsulación.</li> <li>▪ Control de permeabilidad.</li> <li>▪ Osmosis inversa.</li> </ul>
Industria textil	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evita el encogimiento de los tejidos.</li> <li>▪ Fija el color.</li> <li>▪ Componentes de fibras que se utilizan en la mejora de lanas.</li> <li>▪ Impermeabilización de algodones y linos.</li> </ul>
Industria farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Liberación controlada de sustancias.</li> </ul>

## 1.6. Técnicas a utilizar

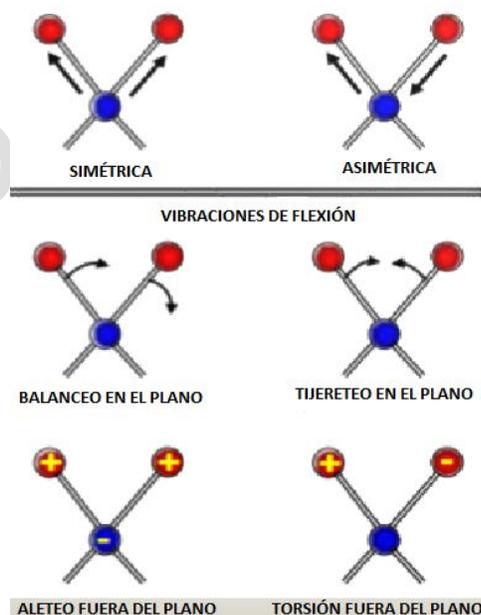
### 1.6.1. Espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FT-IR)

El segmento infrarrojo del espectro electromagnético se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio y lejano, así nombrados por su relación con el espectro visible. El infrarrojo lejano (aproximadamente  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano ( $14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas [20].

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones, conocidas como vibración de *tensión* y vibración de *flexión*:

Las vibraciones de tensión (estiramiento simétrico y asimétrico), representan un movimiento rítmico a lo largo del eje de enlace de tal modo que la distancia interatómica aumenta o disminuye.

Las vibraciones de flexión (de deformación o de tijeras), se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de *tijereteo*, de *balanceo*, de *aleteo* y de *torsión*. Los distintos tipos de vibraciones se presentan esquemáticamente en la figura 7.



**Fig. 7:** Tipos de vibraciones moleculares. Nota: + indica un movimiento del plano de la página hacia el lector; - indica un movimiento del plano de la página alejándose del lector.

En una molécula que contiene más de dos átomos, son posibles todos los tipos de vibraciones mostrados en la figura 7. Además, puede producirse una interacción o acoplamiento de las vibraciones si estas involucran enlaces con un mismo átomo central. El resultado del acoplamiento es un cambio en las características de las vibraciones implicadas.

El principal uso de la espectroscopia infrarroja ha sido la identificación de compuestos orgánicos. Además de esta aplicación cualitativa, esta técnica es empleada en el análisis cuantitativo. En el caso del quitosano ha sido utilizada para determinar el GDD.

El uso de la espectroscopia infrarroja para determinar el GDD en el quitosano requiere de una curva de calibración, usando la relación entre la absorbancia (A) de una banda de evaluación (BE), la cual cambia de intensidad con el GDD y la banda de referencia (BR), que no cambia de intensidad con éste. La absorbancia de BE y BR son determinadas mediante el método de la línea base [21].

### 1.6.2. Viscosidad intrínseca

La viscosidad es una de las propiedades más importantes de las soluciones poliméricas. Depende de la estructura química del polímero, de las interacciones con el disolvente y del peso molecular. Normalmente, una molécula de alto peso molecular en un buen disolvente adquiere un gran volumen hidrodinámico y la viscosidad de la solución aumenta [22].

La relación de las viscosidades de una disolución de un polímero y la del disolvente se denomina viscosidad relativa ( $\eta_r$ ). Este valor menos 1, se llama viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ) y la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ), o índice de viscosidad, se obtiene dividiendo  $\eta_{sp}$  por la concentración de la disolución (C). La viscosidad inherente es la relación del logaritmo natural de la viscosidad relativa y la concentración (C). Por último, la viscosidad intrínseca ( $\eta_{intr}$ ), es la relación de la viscosidad específica a la concentración, extrapolada a la concentración cero. La viscosidad relativa se mide a varias concentraciones y la línea de tendencia que resulta de graficar  $\eta_{red}$  vs.  $c_p$  se extrapola a la concentración cero. La viscosidad intrínseca es una medida del peso molecular del polímero o el grado de polimerización [23].

#### Viscosidad relativa

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (1)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad de la solución de polímero y  $\eta_0$  es la viscosidad del disolvente puro.

#### Viscosidad específica

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (2)$$

#### Viscosidad reducida

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c_p} \quad (3)$$

donde  $c_p$  es la concentración del polímero. Esta es una medida de la habilidad de un polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente.

#### Viscosidad inherente

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_r}{c_p} \quad (4)$$

#### Viscosidad intrínseca

$$[\eta] = (\eta_{red})_{c \rightarrow 0} = (\eta_{inh})_{c \rightarrow 0} \quad (5)$$

Las ecuaciones más comunes para evaluar la viscosidad intrínseca son las ecuaciones de Huggins y Kraemer, dadas por las ecuaciones (6) y (7), respectivamente [22].

$$\frac{\eta_{sp}}{c_p} = [\eta]_H + k_H [\eta]_H^2 c_p \quad (6)$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c_p} = [\eta]_K - k_K [\eta]_K^2 c_p \quad (7)$$

La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, razón por la que su determinación se realiza extrapolando a concentración nula. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el solvente y de la temperatura de trabajo. Para un sistema polímero/solvente puede utilizarse la expresión de Mark-Houwink-Sakurada para determinar el peso molecular promedio viscoso del polímero [24].

$$[\eta] = K M_v^\alpha \quad (8)$$

donde  $M_v$  es el peso molecular promedio viscoso,  $K$  y  $\alpha$  son constantes para un sistema dado polímero/disolvente/temperatura.

### 1.6.3. Titulación potenciométrica

Una titulación potenciométrica implica la medida del potencial de un electrodo indicador conveniente en función del volumen de titulante. Este tipo de titulaciones proporcionan datos que son más confiables que los datos de titulaciones en que se utilizan indicadores químicos.

El proceso comprende la medición y registro del potencial de la celda (en unidades de milivoltios o pH, según el caso) después de cada adición de reactivo. Al principio se añade el titulante en grandes incrementos de volumen, que luego se van haciendo menores a medida que se alcanza el punto final (que se infiere de los grandes cambios en la respuesta por unidad de volumen añadido) [25].

La potenciometría permite determinar el contenido de grupos aminos libres y por consecuencia el GDD, siempre que el material a estudiar sea completamente soluble. El método consiste en exponer el quitosano a un exceso de disolución de ácido clorhídrico, ocurriendo la protonación del grupo amino libre del mismo, valorando después esta disolución con NaOH, este reacciona primero con el ácido libre en la disolución y luego se desplaza de la molécula de quitosano, el anión cloruro unido al grupo amino libre. El quitosano precipita al quedar libre en medio neutro, por lo que puede registrarse la diferencia de pH entre estos dos puntos y se obtiene una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido, con dos puntos de inflexión [26].

La diferencia entre los dos puntos de inflexión de la curva de titulación ( $V_2 - V_1$ ) corresponde a la cantidad de ácido necesario para protonar los grupos amino del quitosano. Con base a lo anterior, la ecuación (9) permite conocer el grado de desacetilación [27]:

$$\%DD = 100 - 16,1 \frac{(V_2 - V_1) M}{w} \quad (9)$$

En esta ecuación,  $V_2$  es el punto de inflexión mayor,  $V_1$  corresponde al punto de inflexión menor, expresados como volúmenes de NaOH,  $M$  es la molaridad de la solución de NaOH (mol/L),  $w$  es el peso del quitosano empleado (expresado en g) y 16,1 es el peso molecular del grupo amino ( $-NH_2$ ).

#### 1.6.4 Titulación conductimétrica

Esta técnica permite monitorear los cambios en la conductividad de una solución debidos a la distinta movilidad que presentan los iones hidrógeno e hidróxido en el medio, en función del volumen de titulante añadido.

Al igual que la titulación potenciométrica, esta técnica, permite determinar el GDD del quitosano cuando una cantidad pesada de quitosano es disuelta en exceso de HCl y valorada con una solución de NaOH, utilizando en este caso un conductímetro. El resultado de esta titulación se representa en tres etapas: al inicio la solución de quitosano presenta una disminución lineal de la conductividad que corresponde a la neutralización de los iones  $H^+$  del HCl en exceso, la siguiente etapa presenta un cambio de pendiente atribuido a la neutralización de los protones provenientes de la disociación de los grupos amino protonados del quitosano y, finalmente, la última etapa corresponde al incremento en la conductividad debido al exceso de iones hidroxilo del NaOH añadido. La diferencia encontrada entre estos dos puntos de cambio de pendiente corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los grupos aminos protonados del quitosano [28]. Con base en lo descrito, la ecuación 9 también permite conocer el GDD.

#### 1.6.5 Gravimetría

Los métodos gravimétricos, los cuales se basan en las mediciones de masa, son principalmente de dos tipos [25]:

- (a) Métodos de precipitación, donde el analito es convertido a un precipitado escasamente soluble. Más tarde el precipitado se filtra, se lava para eliminarle impurezas, se convierte mediante el tratamiento térmico adecuado en un producto de composición conocida, y finalmente se pesa
- (b) Método de volatilización, el analito o sus productos de descomposición se volatilizan a una temperatura adecuada. El producto volátil se recoge y se pesa o, alternativamente, se determina de manera indirecta la masa del producto por la pérdida de masa en la muestra.

En la determinación del porcentaje de humedad, se lleva a cabo el método gravimétrico por volatilización, donde la muestra es llevada a peso constante a una determinada temperatura, y por diferencia de peso se logra determinar esta propiedad. Por su parte, para el contenido de cenizas que también es determinado por el método gravimétrico, depende de la temperatura utilizada para el tratamiento de la muestra.

## 2. ANTECEDENTES

---

El interés fundamental de este trabajo de investigación es la purificación y caracterización de quitosano nacional, siendo una de sus posibles aplicaciones la preparación de insumos para la recuperación mejorada de crudos. Por tal motivo, es necesario señalar algunos estudios referentes a este tema, que han sido publicados a través de los años, dentro de los cuales destacan:

- White y col. (1979) [29] desarrollaron un método para el aislamiento de quitosano a escala de laboratorio, a partir de paredes de hongos (*Mucor rouxii*), donde obtuvieron rendimientos entre 16 a 22 % sobre una base de peso de células secas, de los cuales entre 35 - 40 % estaba constituido por glucosamina. El quitosano lo extrajeron de las paredes miceliales purificadas con ácido acético, fórmico y clorhídrico, obteniendo un mayor rendimiento con ácido clorhídrico.
- Sánchez y col. (2007) [30] caracterizaron fisicoquímicamente quitosano proveniente del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para obtener hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehído y glioxal. Para ello, realizaron un proceso de purificación de quitosano colocando en un reactor de vidrio una relación 1:20 de quitosano y ácido acético al 2 % v/v. La solución fue agitada a una velocidad de 25 rpm y posteriormente filtrada al vacío, añadiendo NaOH a la solución obtenida. La solución resultante fue filtrada nuevamente y llevada a pH neutro, por último secaron el sólido obtenido con etanol a temperatura ambiente durante varios días. Con el quitosano purificado realizaron los entrecruzamientos, encontrando que el quitosano entrecruzado al 20 % con glioxal posee las mejores condiciones para ser utilizado como soporte de fibroblastos humanos.
- Colina y col. (2014) [13] evaluaron los procesos para la obtención química de quitina y quitosano, a partir de desechos de la industria cangrejera; propusieron 4 pasos fundamentales, la desproteinización con NaOH al 10 %, desmineralización con ácido clorhídrico ó ácido fosfórico a diferentes concentraciones, decoloración con etanol y otros alcoholes y por último la hidrólisis de los grupos acetamida con NaOH al 30 %. Obtuvieron quitosanos con distintos grados de desacetilación comprendidos entre 82,52 hasta 95,01 %. El quitosano fue caracterizado mediante FTIR para determinar el GDD y las bandas de los grupos funcionales característicos, así como el porcentaje de cenizas y humedad.
- Perentena y col. (2015) [9] obtuvieron quitosanos a partir de la quitina extraída de exoesqueletos de cangrejo con diferentes GDD (75,5; 88 y 97) %, variando la concentración de NaOH y los tiempos de reacción en el proceso de desacetilación. Posteriormente prepararon derivados del tipo bases de Schiff con p-dimetilaminobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído para formar derivados biopoliméricos, lográndose una mayor sustitución con el quitosano de GDD 97 %.

Por otro lado, se han encontrado algunos trabajos interesantes en la modificación hidrofóbica del quitosano, la cual pudiera resultar en una potencial aplicación de los derivados en la recuperación mejorada de crudos, entre los que destacan:

- Lárez-Velásquez y col. (2006) [31] realizaron la modificación química del quitosano mediante una reacción de amidación de los grupos amino presentes en las unidades glucosamina del biopolímero y el cloruro de oleilo. Obtuvieron materiales modificados en diversas proporciones que fueron caracterizados desde el punto de vista del porcentaje de amidación a través de estudios de <sup>1</sup>H-RMN de las muestras que resultaron solubles y FTIR para las muestras

insolubles. De esta manera mostraron un porcentaje máximo de modificación del 60 % de las unidades repetitivas en la cadena del biopolímero.

- Chiu y col. (2009) [32] desarrollaron un método para la formación de un hidrogel sensible al pH, utilizando un biopolímero naturalmente abundante, como el quitosano, con injerto controlado de cadenas laterales hidrófobas, dirigido a aplicaciones biomédicas. La hidrogenación fue impulsada por una transformación de la nano-estructura de los agregados de las cadenas laterales.
- El Fray y col. (2012) [33] estudiaron la modificación del quitosano con ácidos grasos como el ácido oleico. Utilizaron carbodiimida como iniciador para la reacción del grupo carboxilo y el grupo aminoglucósido. El análisis FTIR confirmó la formación de quitosanos modificados.

www.bdigital.ula.ve

### **3. HIPÓTESIS**

---

Es posible obtener a partir del quitosano nacional, específicamente del proveniente de la empresa Innovaquito C.A, insumos químicos con potencial para su aplicación en la recuperación mejorada de crudo.

www.bdigital.ula.ve

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1. *Objetivo general*

Purificar y caracterizar quitosano nacional para tratar de establecer un proceso que permita obtenerlo con la pureza adecuada para su empleo en diversas áreas.

### 4.2. *Objetivos específicos*

- Establecer un método para la caracterización de quitosanos nacionales.
- Caracterizar mediante las técnicas adecuadas (espectroscopia FT-IR, titulación potenciométrica, viscosimetría capilar, gravimetría, etc.) la fracción soluble de estos materiales.
- De ser posible realizar ensayos preliminares de modificación hidrofóbica de la fracción soluble obtenida.

www.bdigital.ula.ve

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 5.1. Materiales, equipos y reactivos

#### *Materiales*

Quitosano: proveniente de la empresa mixta Innovación Ambiental Quitosano C.A (Innovaquito C.A) ubicada en Maracaibo Estado Zulia (Venezuela).

#### *Reactivos y solventes*

La tabla 4 muestra los reactivos y solventes utilizados en el desarrollo de este trabajo.

**Tabla 4:** Reactivos y solventes utilizados.

Reactivos y Solventes	Pureza (%)	Marca
Ácido acético	99,8	Riedel de Haen
Ácido sulfúrico	96,0-98,0	LABOQG
Ácido clorhídrico	37	Riedel de Haen
Acetato de sodio	99,5	Prolabo Venezolana
Biftalato de potasio	99,5	Riedel de Haen
Hidróxido de sodio	-	IQE
Hidróxido de potasio	-	IQE
Ácido oleico	99,9	Prolabo Venezolana
Hexano	-	Riedel de Haen
Éter etílico	-	Riedel de Haen

#### *Equipos e instrumentos*

La tabla 5 muestra las especificaciones de cada uno de los equipos e instrumentos utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

**Tabla 5:** Equipos e instrumentos

Equipo o instrumento	Marca	Especificación
Balanza analítica	Adventurer OHAUS	Máxima Capacidad: 210 g. Apreciación: 0,0001 g
Plancha de calentamiento	Isotemp	Heat- Stir
Tamices	Endecotts LTD	Abertura de 250 y 106 $\mu\text{m}$
pHmetro	Metrohm	
Equipo de FT-IR	Perkin-Elmer RX1, modelo 1605	Laboratorio de docencia
Equipo de FT-IR	Perkin-Elmer, modelo Frontier	Laboratorio de Cinética y Catálisis
Bomba de vacío rotatoria	Welch	DuosealVacuumPump. Modelo 1400
Mufla	Lindbert	Modelo 51894. Temperatura máxima 1000°C
Estufa	Memmert	Temperatura máxima 220°C

## 5.2. Purificación del quitosano

La purificación del quitosano se realizó luego de varios ensayos preliminares que tomaron en consideración varios trabajos anteriores [27, 29, 30]; puede resumirse de la siguiente manera:

- Inicialmente se colocaron 4 g del quitosano a estudiar (figura 8a) en 400 mL de una solución acuosa de ácido acético al 0,5 % con agitación constante (figura 8b) durante 24 horas y a temperatura ambiente.
- La mezcla obtenida se filtró en el tamiz de 250  $\mu\text{m}$  de abertura, obteniendo de esta manera un filtrado y una fracción insoluble; esta última es colocada en las mismas condiciones que la muestra inicial con 400 mL de la solución acuosa de ácido acético al 0,5 %, con agitación constante durante 24 horas y a temperatura ambiente, luego de lo cual se filtra con el tamiz de 250  $\mu\text{m}$ , reuniendo el filtrado con el obtenido anteriormente (esta mezcla se denomina en lo sucesivo filtrado 1) (figura 9a), mientras que el material insoluble se denomina insoluble 1 (figura 9b).
- El filtrado 1 fue sometido a un nuevo proceso de filtración, en este caso utilizando un tamiz de 106  $\mu\text{m}$ , es decir, de abertura más pequeña; en este proceso se obtuvo el filtrado 2 y una nueva fracción insoluble denominada insoluble 2 (figura 9c).
- El filtrado 2 resultante se filtró consecutivamente mediante filtros de vidrio sinterizado (Sovirel N° 1 y 2), obteniéndose en este proceso el filtrado 3 y una nueva fracción insoluble 3, en pequeña proporción.
- Las fracciones insolubles 1 y 2 fueron colocadas separadamente en NaOH acuoso al 1 % y los precipitados blanquecinos resultante fueron filtrados por succión con papel de filtro (Rundfilter N° 640), luego lavados con agua destilada hasta pH neutro y por último secados en la estufa a 40°C aproximadamente (figura 10a y 10b, respectivamente).
- El filtrado 3 se precipitó con NaOH acuoso al 1 %, obteniéndose un precipitado blanquecino que se filtró por succión, con papel de filtro (Rundfilter N° 640), al cual se le realizaron varios lavados con agua destilada hasta pH neutro. Finalmente, el material húmedo se congeló durante toda la noche en un refrigerador a -11 °C y se sometió a un proceso de secado al vacío a temperatura ambiente, denominándose fracción soluble (figura 10c).

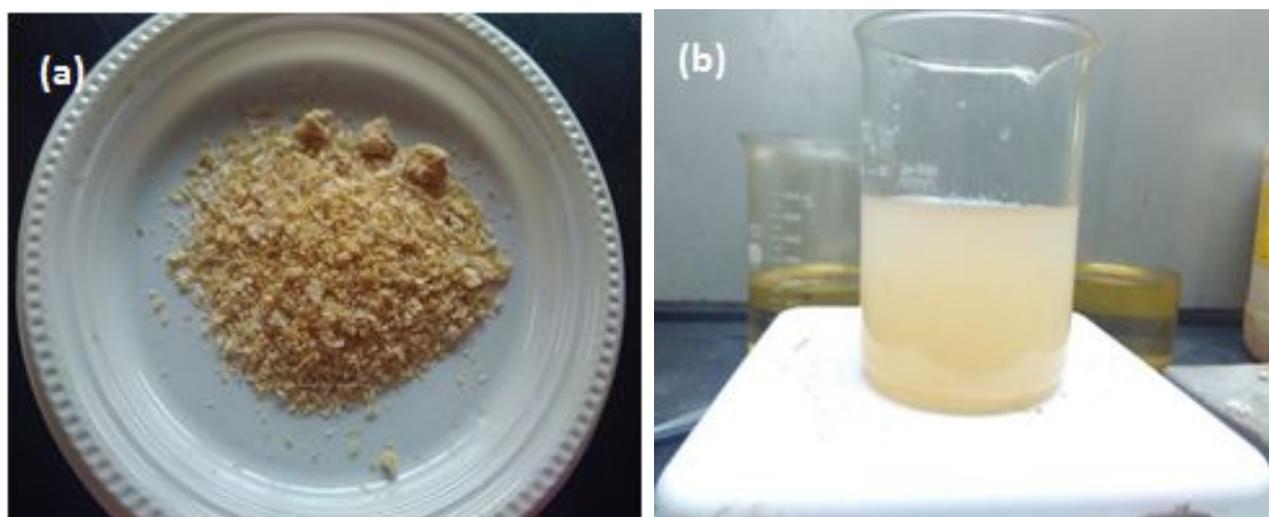


Fig. 8: a) Muestra inicial de quitosano, b) Quitosano en la solución acuosa de ácido acético al 0,5 %.

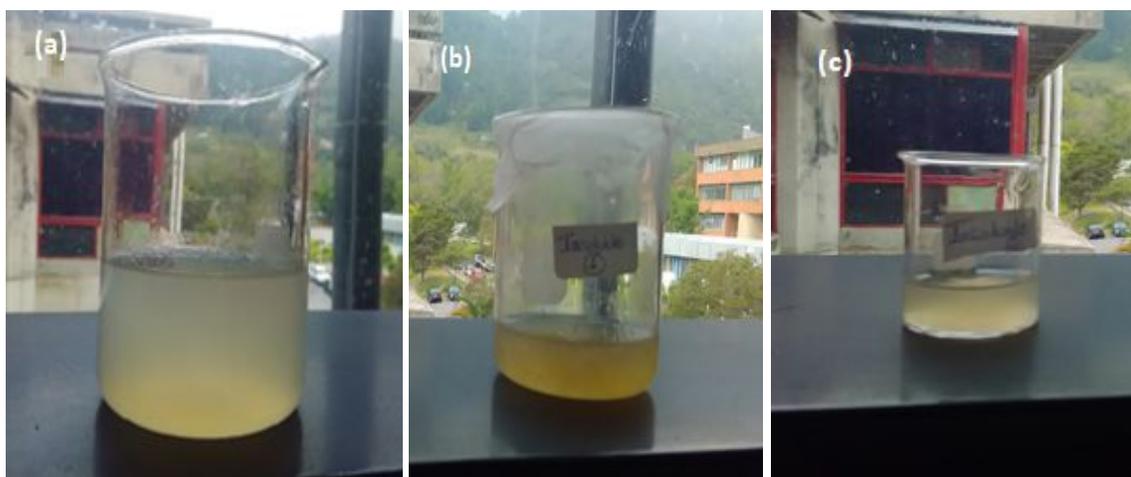


Fig. 9: a) Filtrado 1, b) fracción insoluble 1 y c) fracción insoluble 2 antes de precipitación con NaOH.

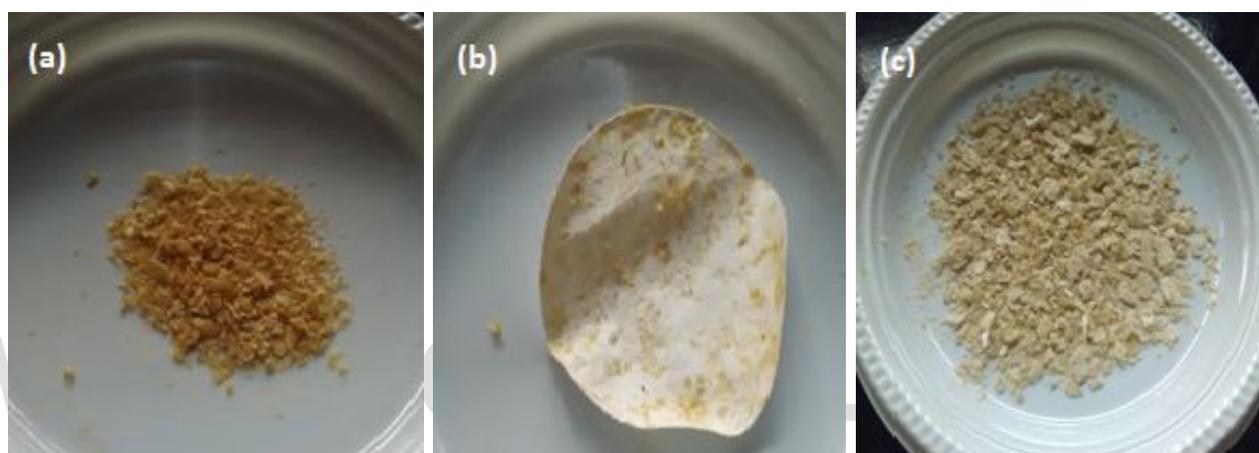


Fig. 10: a) Fracción insoluble 1, b) Fracción insoluble 2 y c) fracción soluble.

### 5.3. Caracterización del quitosano de partida y del material purificado (fracción soluble)

#### *Determinación del porcentaje de ceniza*

El procedimiento para la determinación del porcentaje de ceniza se resume de la siguiente manera [34]:

- Se colocó el crisol durante al menos 1 hora en una mufla a la temperatura de incineración de la muestra.
- Se dejó enfriar el crisol en un desecador durante 30 minutos para así pesar el mismo ( $m_0$ ).
- Se pesaron 100mg de muestra (quitosano de partida y fracción soluble) por separado ( $m_1$ ).
- Se colocó el crisol con las muestras en la mufla y se incineraron a 800 °C durante 6 horas hasta cenizas grisáceas.
- Se dejó enfriar la capsula con la muestra en un desecador durante 30 minutos aproximadamente hasta obtener un peso constante ( $m_2$ ).
- El análisis se realizó por triplicado para cada una de las muestras. El porcentaje de cenizas se calcula según la ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} * 100 \quad (10)$$

*Determinación del contenido de humedad*

El procedimiento para la determinación del contenido de humedad se resume de la siguiente manera [35]:

- a) Se colocó el crisol y su tapa durante al menos 1 hora en la estufa a la temperatura de secado de la muestra.
- b) Se dejó enfriar el crisol tapado en un desecador durante 30 minutos para así tener el peso de los mismos ( $m_1$ ).
- c) Se pesaron 100 mg de muestra (quitosano de partida y fracción soluble) por separado ( $m_2$ ).
- d) Se colocó la muestra en el crisol destapado y la tapa en la estufa a 105°C durante 5 horas.
- e) Se tapó la capsula con la muestra y se dejó enfriar en un desecador durante 30 minutos aproximadamente hasta peso constante ( $m_3$ ).
- f) El análisis se realizó por triplicado para cada una de las muestras. El porcentaje de humedad se calcula según la ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} * 100 \quad (11)$$

*Espectroscopia infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR):*

Los espectros del quitosano de partida y de las fracciones soluble e insoluble, se tomaron elaborando pastillas con KBr, mezclando íntimamente en el mortero de ágata 2,5 mg de las muestras con 100 mg de KBr seco.

*Determinación del grado de desacetilación (GDD)*

Espectroscopia de FT-IR: se utilizaron dos métodos, el método propuesto por Baxter y cols. y el método propuesto por Brugnerotto y cols.

Para el método de Baxter y cols. El grado de N-acetilación (GA) se calcula mediante la siguiente ecuación [16]:

$$GA (\%) = (A_{1655}/A_{3450}) * 115 \quad (12)$$

donde  $A_{1655}$  y  $A_{3450}$  son las absorbancias correspondientes, respectivamente, a la amida I y a la referencia perteneciente a la banda del enlace O-H.

Para el método de Brugnerotto y cols. el GA viene dado por:

$$GA (\%) = 31,92 * (A_{1320}/A_{1420}) - 12,20 \quad (13)$$

donde  $A_{1320}$  y  $A_{1420}$  son las absorbancias correspondientes, respectivamente, a la amida III y a la referencia, siendo ésta la banda del enlace C-H.

Entonces, para ambos métodos el GDD será:

$$GDD (\%) = 100 - GA \quad (14)$$

Método potenciométrico: el contenido de grupos aminos libres en la muestra de quitosano se determina mediante titulación potenciométrica. El procedimiento se resume de la siguiente manera [36]:

- a) Preparación de la solución patrón de biftalato de potasio (BP):

- Se pesan 2,0000 g de BP que se mantuvieron previamente durante una hora en la estufa a 100 °C.
  - El BP pesado se colocó en un matraz aforado de 100 mL y se enrasó con agua destilada.
- b) Preparación y valoración de la solución de NaOH:
- Se pesó 1,0000 g de NaOH usando una balanza analítica.
  - El NaOH pesado se colocó en un matraz aforado de 250 mL y se enrasó con agua destilada.
  - Seguidamente se titularon 3 alícuotas de 10 mL (c/u) de la solución patrón (usando una pipeta volumétrica y fenolftaleína como indicador) con el NaOH recién preparado.
- c) Preparación y valoración de la solución de HCl:
- Se midieron 0,8 mL de HCl usando una pipeta graduada.
  - El HCl medido se colocó en un matraz aforado de 100 mL y se enrasó con agua destilada.
  - Seguidamente se titularon 3 alícuotas de 10 mL (c/u) de la solución de HCl (medidos usando una pipeta volumétrica y fenolftaleína como indicador) con el NaOH recién estandarizado.
- d) Titulación potenciométrica de la fracción soluble de quitosano:
- Se colocaron en agitación y hasta completa disolución 0,15 g de la muestra de quitosano, procedente de la fracción soluble, en 25 mL de la solución de HCl estandarizada.
  - Una vez disuelto el quitosano la solución fue titulada pH-métricamente con el NaOH recién estandarizado, agitando luego de la adición del titulante y deteniendo la agitación para obtener una medida estable. El procedimiento se realizó por triplicado.

La concentración de grupos amino en la muestra se calcula según la siguiente ecuación [37]:

$$[\text{NH}_3^+] = N_{\text{NaOH}} \cdot (V_2 - V_1) / (m_q \cdot F_c) \quad (15)$$

de la cual se deriva el GDD:

$$\text{GDD} = [\text{NH}_3^+] \cdot \text{PE}_{\text{ur}} \cdot 100 \quad (16)$$

donde  $N_{\text{NaOH}}$  es la concentración de la solución de NaOH (eq/L);  $V_2$  y  $V_1$  son los volúmenes de NaOH (mL) gastados durante la titulación para la neutralización de los protones totales en la solución y los protones libres (no asociados como  $\text{NH}_3^+$ ), respectivamente;  $m_q$  es la masa titulada de quitosano (g),  $F_c$  es un factor de corrección de humedad de la muestra de quitosano (obtenido por gravimetría) y  $\text{PE}_{\text{ur}}$  es el peso equivalente de la unidad repetitiva desacetilada del polímero (g/eq).

Método conductimétrico: el método conductimétrico es una técnica titulométrica que permite determinar el contenido de grupos amino libres en la muestra de quitosano. El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera:

- Se prepararon y estandarizaron soluciones de NaOH (0,05 N) y HCl (1N) como se describió anteriormente.
- Se colocaron en agitación y hasta completa disolución 0,15 g de la fracción soluble de quitosano en 25 mL de la solución estandarizada de HCl.
- La solución de quitosano fue titulada conductimétricamente con NaOH estandarizado, bajo agitación constante durante 5 minutos que se detiene para realizar la medida de conductividad.

El GDD se calcula mediante las ecuaciones 15 y 16 mostradas anteriormente.

#### *Determinación del peso molecular viscosimétrico*

El procedimiento para la determinación del peso molecular viscosimétrico se resume de la siguiente manera:

- Se preparó 100 mL de una solución buffer (ácido acético 0,3 M/ acetato de sodio 0,2 M).
- Se preparó una solución de quitosano al 2 % (p/v) (1,0004 g de la fracción soluble de quitosano) en 50 mL del buffer.
- Se colocó el viscosímetro de Ubbelohde en un baño térmico a 25 °C.
- Posteriormente se procedió a medir el tiempo de elución de la solución buffer en el viscosímetro, luego se midió el tiempo de elución del quitosano a distintas concentraciones (ver tabla 6).
- Las medidas del tiempo de elución para cada solución fueron realizadas por quintuplicado.

**Tabla 6:** Preparación de soluciones para la determinación del peso molecular viscosimétrico.

Solución	V sol. quitosano (mL)	V sol. buffer (mL)	V total (mL)	[Polímero](g/100mL)
Buffer	0	12	12	0,0000
Sol. 1	12	0	12	0,1775
Sol. 2	0	3	15	0,1420
Sol. 3	0	3	18	0,1183
Sol. 4	0	5	23	0,0926
Sol. 5	0	7	30	0,0710

#### **5.4. Preparación del oleato de sodio**

El oleato de sodio (OS) se preparó por neutralización estequiométrica del ácido oleico con solución estandarizada de NaOH. El proceso se resume de la siguiente manera:

- Se preparó y valoró 500 mL de una solución de NaOH como se describe en el apartado 6.3.
- Se preparó y valoró 100 mL de una solución de HCl como se describe en el apartado 6.3.
- Una vez obtenida la concentración de NaOH se procedió a determinar la cantidad necesaria de éste para neutralizar el ácido oleico, para ello se titula potenciométricamente la solución de ácido oleico (0,2 g en 10 mL de NaOH estandarizado) con la solución de HCl estandarizada.

- d) Teniendo el volumen necesario de la solución de NaOH estandarizada para neutralizar la cantidad de ácido oleico utilizada, se procedió a realizar el cálculo para tener el volumen de NaOH para neutralizar 6 g de ácido.
- e) En un vaso de precipitado se colocaron 6 g de ácido y se añadió con agitación constante el volumen de NaOH calculado.
- f) La solución fue colocada en la estufa a 70 °C durante 7 días para la obtención de la sal seca.
- g) Para la purificación de la sal obtenida se realizaron tres lavados con porciones de 25 mL de hexano en caliente, seguidamente se lavó con diclorometano en las mismas condiciones.
- h) Por último se filtró por succión la sal lavada y se colocó nuevamente en la estufa a 70 °C durante 2 horas para su secado. Se obtuvo un sólido de color amarillo claro.

## 5.5 Preparación y caracterización de complejos de quitosano con oleato de sodio

### Preparación de los complejos

Para la preparación y estudio de estos complejos se seguirán algunos de los procedimientos reportados, siguiéndose en principio el trabajo de Rondón [38], realizándose las modificaciones necesarias. El proceso se resume de la siguiente manera:

- a) Se preparó una solución al 0,5 % (p/v) de quitosano (ver tabla 7) en HCl (5 % de exceso de HCl con respecto a los equivalentes de grupos amina del quitosano). La mezcla fue agitada hasta disolución completa.
- b) Se preparó una solución acuosa 0,1028 eq/L de OS (ver tabla 8).
- c) Para la preparación de la mezcla quitosano/oleato, se siguió el siguiente procedimiento:
  - Se colocaron 5 mL de la solución acuosa de quitosano en un tubo de ensayo y se añadió, con agitación, la cantidad respectiva de oleato (ver tabla 9), se completó con agua desionizada hasta el volumen final (10 mL) y se continuó la agitación durante 24 horas.
  - Las mezclas obtenidas se centrifugaron durante 30 min., se decantaron y se midió el pH de la solución sobrenadante.
  - Al sólido obtenido se le realizaron tres lavados con porciones de 5 mL de agua desionizada y se dejaron en la estufa a 50 °C durante 24 horas para obtener el complejo seco.

**Tabla 7:** Preparación de la solución acuosa de quitosano en HCl

Masa de Q-NH <sub>2</sub> (g)	*Equivalentes de NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	V <sub>Solución</sub> (mL)	meq de HCl
0,25	0,0015	50	1,575

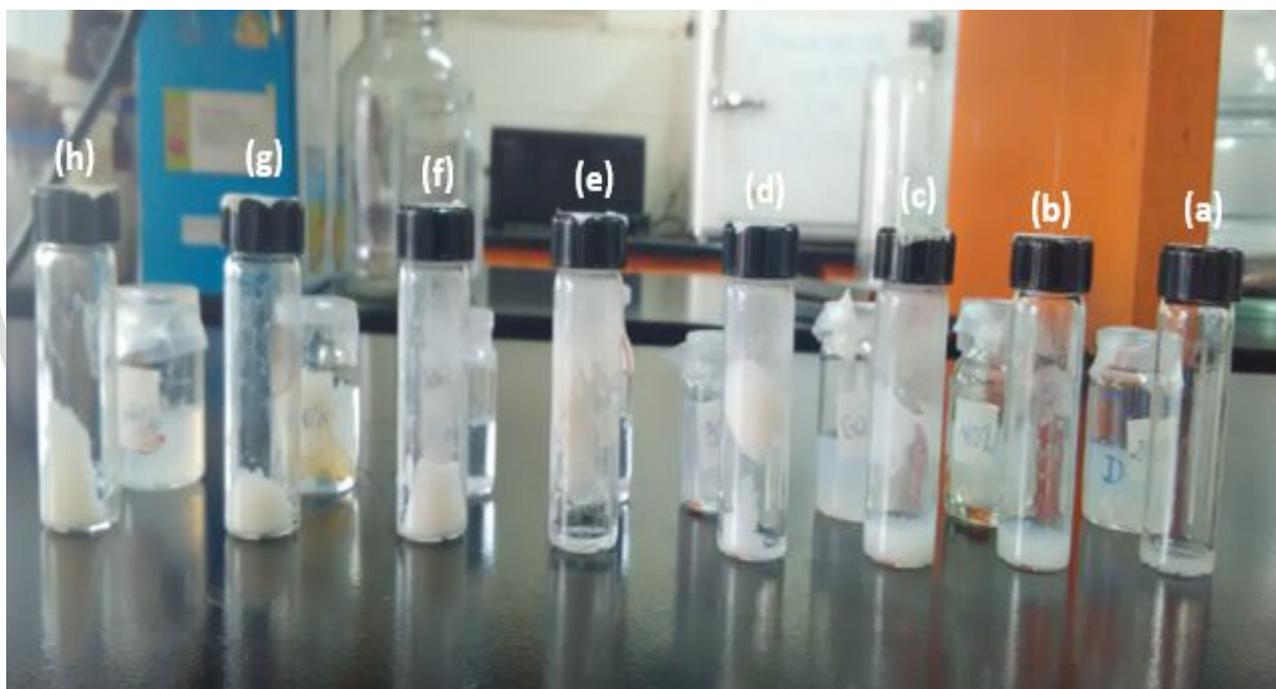
\*Equivalentes de NH<sub>3</sub> = masa de Q-NH<sub>2</sub>/Peso equivalente de la unidad repetitiva promedio.

**Tabla 8:** Preparación de la solución acuosa de oleato de sodio

Masa de oleato (g)	Equivalentes de oleato	V <sub>Solución</sub> (mL)	[Oleato] (eq/L)
0,3136	1,03x10 <sup>-3</sup>	50	0,1028

Tabla 9: Preparación de la solución acuosa de oleato de sodio

$V_{\text{QN}H_3^+}$ (mL)	meq. $\cdot$ QN $H_3^+$	meq. OS	$V_{\text{OS}}$ (mL)	$V_{\text{agua}}$ (mL)	$V_{\text{total}}$ (mL)	% teórico de sustitución
5	1,448	0	0,00	5,00	10	0
5	1,448	0,29	0,62	4,38	10	20
5	1,448	0,58	1,25	3,75	10	40
5	1,448	0,87	1,88	3,12	10	60
5	1,448	1,16	2,50	2,50	10	80
5	1,448	1,45	3,12	1,88	10	100
5	1,448	1,74	3,75	1,25	10	120
5	1,448	2,03	4,38	0,62	10	140
5	1,448	2,32	5,00	0,00	10	160



**Fig. 11:** Complejos quitosano/OS luego de centrifugados: (a) oleato 20 %, (b) oleato 40 %, (c) oleato 60 %, (d) oleato 80 %, (e) oleato 100 %, (f) oleato 120 %, (g) oleato 140 %, (h) oleato 160 %.

### Caracterización de los complejos

Los complejos quitosano/oleato de sodio fueron caracterizados mediante espectroscopia FT-IR en el laboratorio de Cinética y Catálisis de la Facultad de Ciencias. Las muestras se prepararon como pastillas de KBr mezclando 1 mg del complejo con 60 mg de KBr seco.

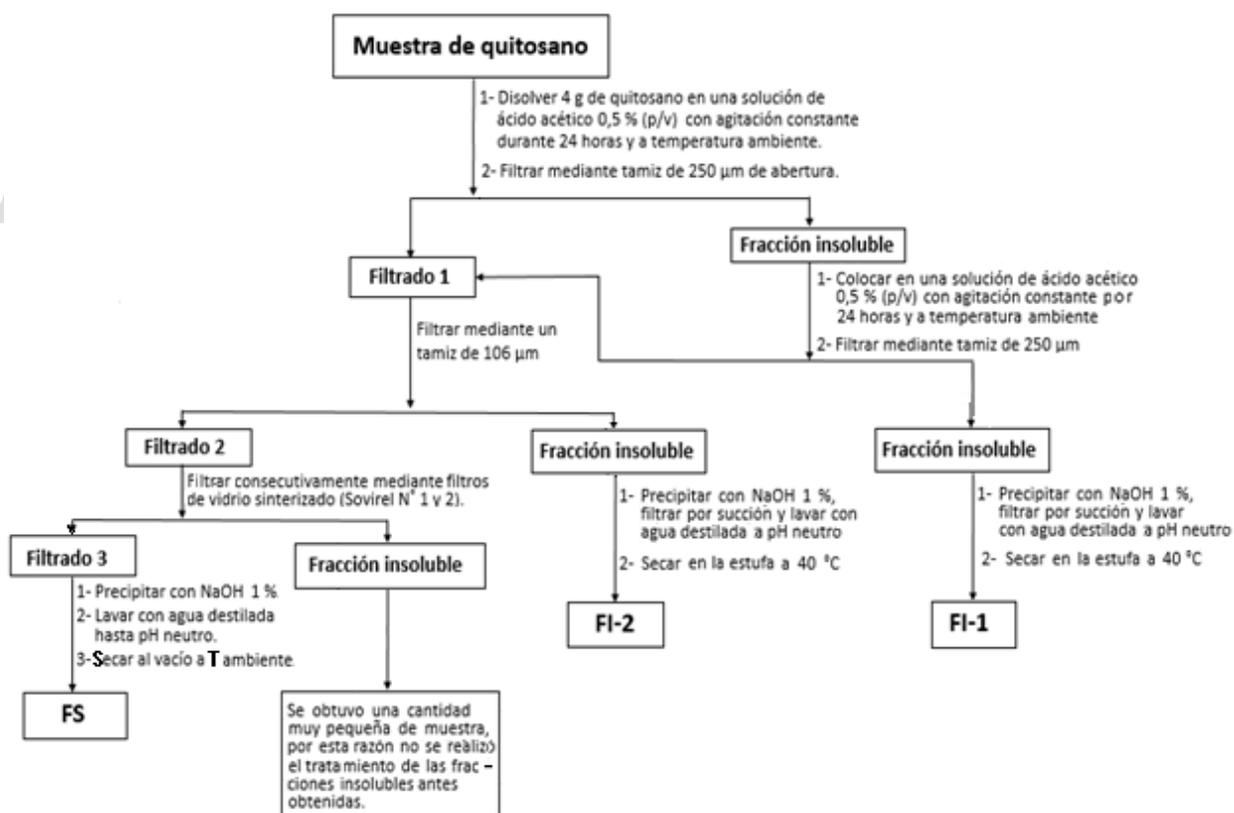
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Purificación de quitosano

Durante el proceso de purificación del quitosano se realizaron algunos ensayos que permitieran mejorar el rendimiento. Las principales observaciones que se pueden mencionar al respecto son:

- Luego de colocar el quitosano en ácido acético al 0,5 %, durante 24 horas y filtrar, se observó que buena parte de éste permanece insoluble; por ello, se decidió colocar la fracción insoluble obtenida en las mismas condiciones del tratamiento inicial, con el fin de investigar si se puede solubilizar una mayor cantidad de quitosano y de esta manera obtener un mejor rendimiento.
- Se realizaron tres procesos de filtración para investigar cualitativamente la composición de las fracciones insolubles obtenidas en cada proceso. Para ello se usaron tamices de diferentes aberturas (250 y 106  $\mu\text{m}$ ), obteniéndose las fracciones insolubles 1 y 2.
- La fracción soluble en ácido acético se purificó por re-precipitación en NaOH, lavados con abundante agua destilada, congelación y secado al vacío a temperatura ambiente, para de esta manera no someter la muestra a condiciones de alta temperatura de secado o por medio de la precipitación en etanol.

El proceso global para la purificación de quitosano se muestra en el esquema de la figura 5.



**Fig. 12:** Esquema para la purificación de quitosano. FS (fracción soluble), FI-2 (fracción insoluble 2) y FI-1 (fracción insoluble 1).

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos, sobre la base de tres replicas, durante el proceso de cuantificación de las distintas fracciones en las cuales se dividió el material de partida. Como se puede apreciar, el porcentaje de material insoluble en las muestras de quitosano evaluadas es superior al 25 %, de lo cual puede inferirse que la muestra contiene una porción de moléculas entrecruzadas químicamente y/o con bajos GDD, lo cual se discute en el análisis FTIR de las fracciones insolubles.

**Tabla 10:** Resultados obtenidos durante la cuantificación de las distintas fracciones en las que se dividió el material de partida, de acuerdo a su solubilidad en ácido acético y tamaños de tamices empleados.

Experiencia	$m_q$ (g)	FI-1		FI-2		FS		% RT
		$m_{FI-1}$ (g)	%	$m_{FI-2}$ (g)	%	$m_{FS}$ (g)	%	
1	4,0081	0,8889	22,18	0,1435	3,58	1,9898	49,64	75,40
2	2,0126	0,4872	24,21	0,0553	2,75	1,0334	51,35	78,30
3	2,0111	0,3768	18,74	0,0679	3,38	1,0396	51,69	73,81
<b><math>X \pm \Delta X</math></b>			<b>22 <math>\pm</math> 3</b>		<b>3,2 <math>\pm</math> 0,4</b>		<b>51 <math>\pm</math> 1</b>	<b>76 <math>\pm</math> 2</b>

Igualmente, en la tabla anterior se observa que la fracción soluble representa un 51 % de la muestra en estudio. Se esperaría que esta fracción presentase valores del GDD más altos que los de las fracciones insolubles.

## 6.2. Caracterización del quitosano de partida y del material purificado (fracción soluble)

### *Determinación del contenido de humedad y del porcentaje de ceniza*

El contenido de humedad y el porcentaje de ceniza son parámetros que se evalúan usualmente en muestras de quitosano. El contenido de humedad expresa, en general, el carácter higroscópico o hidrofílico de la muestra; usualmente, los carbohidratos contienen alrededor de un 10 % de humedad, que absorben del ambiente, existiendo una relación directa entre dicho porcentaje y el número de los grupos hidroxilos presentes en sus estructuras. Por su parte, el porcentaje de ceniza es indicativo de la cantidad de material inorgánico presente en la muestra, habiéndose reportado que el contenido de sales inorgánicas en exoesqueletos de crustáceos oscila entre el 30 y 55 %, compuestas por carbonato de calcio en mayor proporción y en menor proporción por fosfatos de calcio [5]. En el caso del quitosano, estos parámetros suelen variar dependiendo del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención [16].

Para la determinación del contenido de humedad y del porcentaje de ceniza en las muestras de quitosano inicial, y de la fracción soluble, se empleó el análisis gravimétrico por volatilización, como se describió en el apartado 5.3. En la tabla 11 se observa que la humedad para la muestra inicial de quitosano y la fracción soluble obtenida luego del proceso de purificación resultó ser de  $11,7 \pm 0,4$  % y  $11,6 \pm 0,7$  %, respectivamente. La similitud de los resultados en ambas muestras se debe a que el tratamiento realizado al quitosano de partida para liberarlo de las fracciones insolubles no altera su composición química original de manera significativa, es decir, ambas muestras contienen prácticamente el mismo polisacárido, con mayor (quitosano purificado) o menor (muestra inicial) GDD y/o porcentaje de entrecruzamiento.

Por otra parte, los porcentajes de ceniza resultaron ser de  $3,4 \pm 0,4$  % y  $3,8 \pm 0,3$  % para el quitosano de partida y la fracción soluble, respectivamente. El aumento del porcentaje de ceniza en la fracción soluble resulta algo extraño pero pudiera ser atribuido a la presencia de acetato de sodio que queda ocluido cuando se precipita con NaOH el quitosano disuelto en ácido acético, durante el tratamiento de purificación de dicha fracción. En relación al valor obtenido para el porcentaje de ceniza en la muestra inicial, donada gentilmente por la empresa InnovaQuito CA, la cual fue tratada con HCl durante el proceso de desmineralización (según se reporta en su envase de procedencia), éste no difiere sustancialmente del valor reportado por Colina y cols. 4,48 % para muestras de quitosano de la misma procedencia y tratados con HCl durante el proceso de desmineralización [13]. Similarmente, el contenido de humedad reportado para dichas muestras fue de 13,16 %, el cual es un valor aproximado

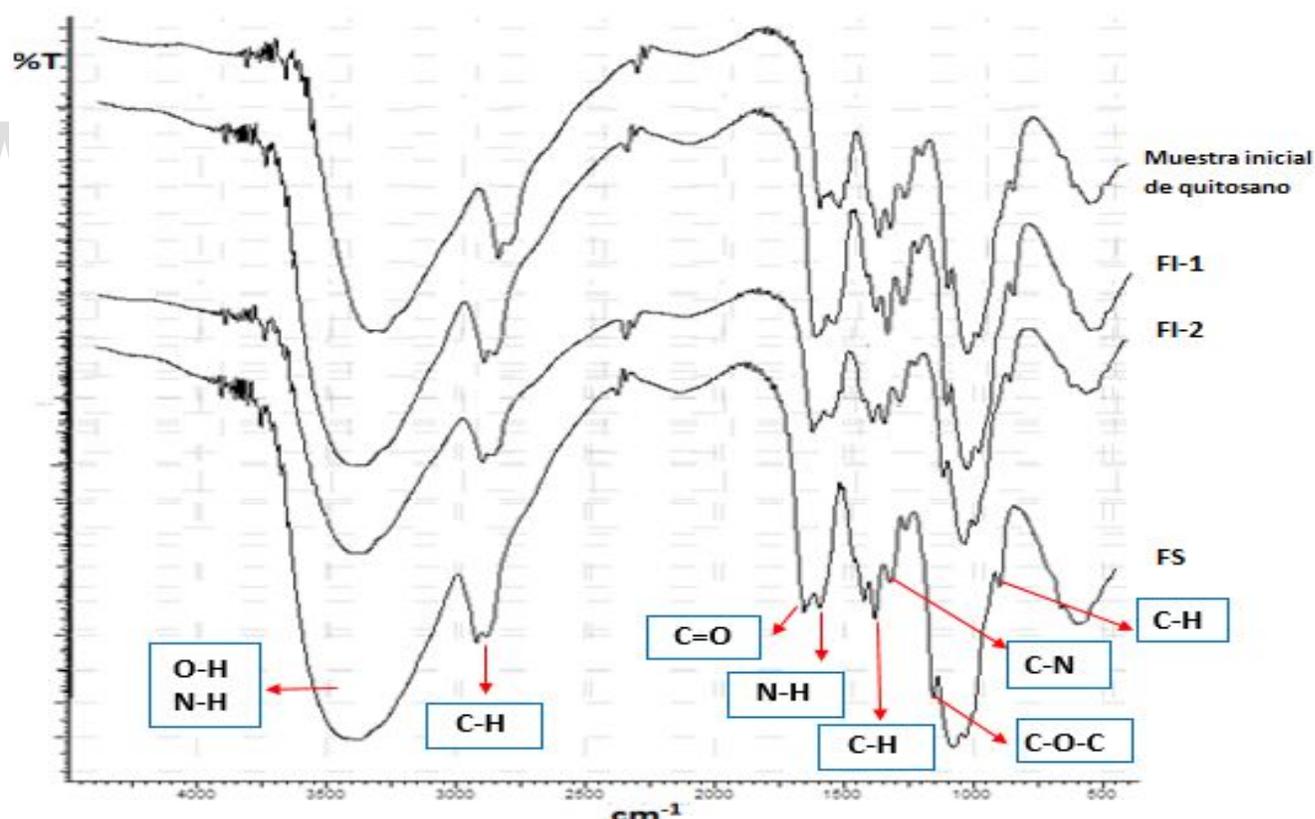
al encontrado para la muestra inicial analizada en el presente trabajo. Las pequeñas diferencias pueden ser fácilmente justificadas por la mayor o menor exposición de las muestras al ambiente, previo al proceso de cuantificación de la humedad, lo cual obviamente incidirá en el porcentaje de ceniza que se obtenga.

**Tabla 11:** Contenido de humedad y porcentaje de ceniza de la muestra inicial de quitosano y la fracción soluble.

Experiencia	Quitosano de partida		Fracción soluble	
	% Humedad	% Ceniza	% Humedad	% Ceniza
1	11,2887	3,8767	11,8408	3,5054
2	12,0117	3,1311	10,8082	3,8760
3	11,8227	3,263	12,1302	4,0039
<b>X ± ΔX</b>	<b>11,7 ± 0,4</b>	<b>3,4 ± 0,4</b>	<b>11,6 ± 0,7</b>	<b>3,8 ± 0,3</b>

### Espectroscopia FT-IR

En la figura 13 se muestran los espectros de FT-IR para la muestra inicial de quitosano y sus fracciones FI-1, FI-2 y FS obtenidas durante el proceso de purificación. Se puede apreciar que existe gran similitud entre los espectros de cada una de las muestras.



**Fig. 13:** Espectros FT-IR del quitosano de partida y las fracciones FI-1, FI-2 y FS obtenidas durante el proceso de purificación. Las muestras se prepararon como pastillas de KBr.

En la tabla 12 se presenta la asignación de las principales señales reportadas para el quitosano en pastillas de KBr e igualmente las principales señales de las diferentes muestras estudiadas en este trabajo.

**Tabla 12:** Asignación de las principales señales de los espectros FT-IR del quitosano de partida y sus fracciones FI-1, FI-2 y FS obtenidas durante el proceso de purificación.

Bandas	Muestra Inicial (cm <sup>-1</sup> )	FI-1 (cm <sup>-1</sup> )	FI-2 (cm <sup>-1</sup> )	FS (cm <sup>-1</sup> )	Reportado [16] (cm <sup>-1</sup> )
v (O-H)	3445	3448	3444	3450	3450
v (N-H)	3280	3282	3286	3282	3292
v (C-H)	2920-2872	2920-2874	2920-2872	2920-2872	2919-2862
v (C=O) Amida I	1656	1656	1656	1654	1655
v (-NH <sub>2</sub> )	1580	1580	1582	1584	1580
v (C-H)	1418	1418	1418	1418	1420
v (C-N)	1322	1320	1322	1322	1313
v <sub>as</sub> (C-O-C)	1154	1154	1154	1154	1154
v anillo sacárido	1078-1032	1076-1030	1074-1032	1076-1032	1082-1032
v (C-H)	896	898	898	898	896

v: vibración de tensión; as: asimétrica.

A continuación se asignan las principales señales que aparecen en el espectro de la fracción soluble, destacándose entre ellas las siguientes:

- En 3450 cm<sup>-1</sup> la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace O-H
- En 3282 cm<sup>-1</sup> se puede observar la vibración de tensión del enlace N-H que se encuentra solapada por la banda del enlace O-H
- Entre 2920 y 2872 cm<sup>-1</sup> aparece la vibración de tensión del enlace C-H
- En 1654 cm<sup>-1</sup> se observa la vibración de tensión C=O de la amida I
- En 1584 cm<sup>-1</sup> aparece la vibración de flexión del enlace N-H para el grupo -NH<sub>2</sub>
- En 1418 cm<sup>-1</sup> se observa la vibración de deformación del enlace C-H
- En 1322 cm<sup>-1</sup> se observa la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-N de la amida III
- En 1154 cm<sup>-1</sup> aparece la vibración de tensión asimétrica del puente glucósido C-O-C
- Entre 1076 y 1032 cm<sup>-1</sup> se observan las vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranósica
- En 898 cm<sup>-1</sup> la vibración de tensión C-H de los grupos anoméricos

#### Determinación del grado de desacetilación

Espectroscopia de FTIR: la espectroscopia infrarroja, además de servir para identificar las principales bandas del polímero en estudio, tiene la potencialidad de permitir la determinación del GDD del quitosano, mediante la relación entre las absorbancias (A) de una banda de evaluación (BE) que cambia de intensidad con el GDD y una banda de referencia (BR) que no lo hace [16]. Como se mencionó en el apartado 5.3, este parámetro puede ser determinado mediante los métodos propuestos por Brugnerotto y cols. así como por Baxter y cols.

Utilizando las líneas bases seleccionadas, presentadas en la tabla 13 para todas las muestras (y mostradas en color azul como ejemplo en el espectro de la fracción soluble en la figura 14), se obtiene un valor promedio del GDD, que resulta de aplicar ambos métodos, según las ecuaciones 12, 13 y 14.

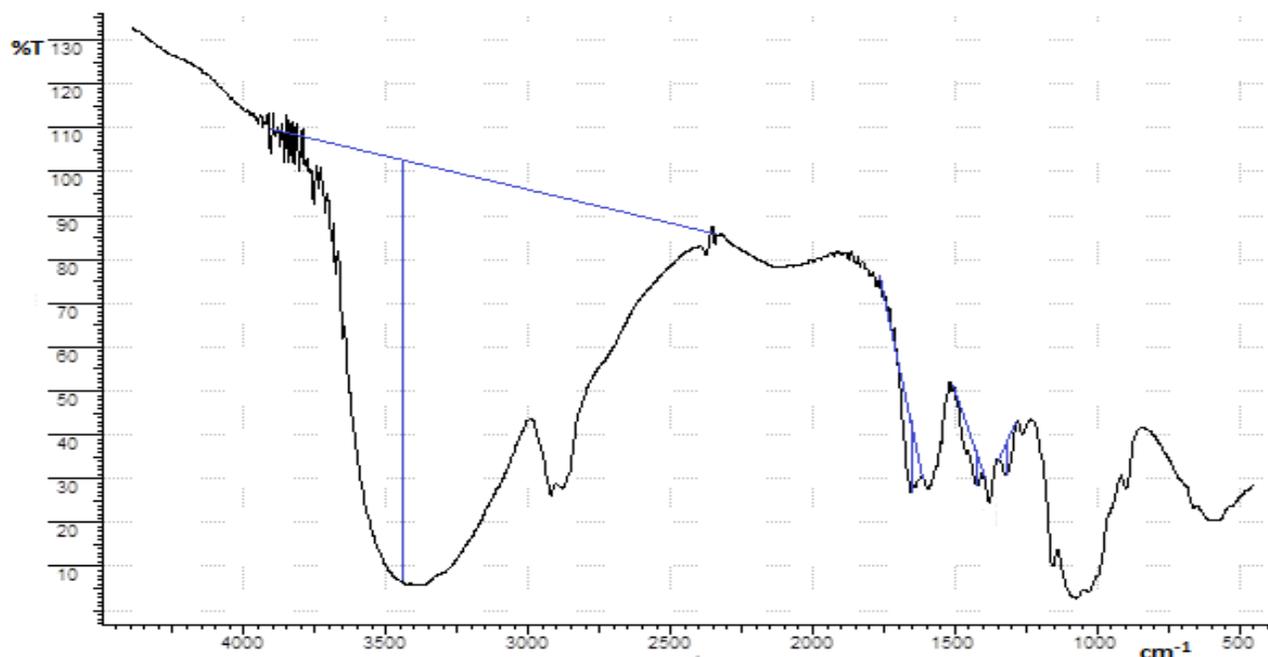


Fig. 14: Espectro FT-IR con las señales indicadas para determinar el GDD.

Tabla 13: Valores del GDD obtenidos mediante espectroscopia de FT-IR.

Muestras	Método (cm <sup>-1</sup> )	Bandas	Abs.	Línea base V <sub>inc.</sub> -V <sub>fin.</sub> (cm <sup>-1</sup> )	GA (%)	GA promedio (%)	GDD (%)
Muestra inicial	Brugnerotto	1322	19	3755 - 2995	19,7±3,4	19,4 ±0,4	80,6 ± 0,4
		1424	19	1710 - 1625			
	Baxter	1656	40	1510 - 1410	19,1±0,6		
		3372	241	1355 - 1265			
FI-1	Brugnerotto	1320	21	3750 - 3000	25,0±3,8	22,4 ± 3,7	77,6 ± 3,7
		1422	18	1710 - 1620			
	Baxter	1656	40	1510 - 1400	19,7±0,5		
		3424	234	1350 - 1260			
FI-2	Brugnerotto	1320	16	3750 - 2995	24,3±4,9	23,5 ±1,2	76,5 ± 1,2
		1424	14	1705 - 1630			
	Baxter	1656	33	1510 - 1400	22,6±0,8		
		3370	168	1350 - 1260			
FS	Brugnerotto	1322	20	3750 - 3000	11,4±2,1	16,2 ± 6,7	83,8 ± 6,7
		1422	27	1700 - 1630			
	Baxter	1654	39	1510 - 1400	20,9±0,6		
		3370	214	1345 - 1270			

Los resultados de la tabla anterior muestran que el GDD de la fracción soluble resultó ser superior 83,8 % al de las fracciones insolubles y al de la muestra inicial, tal como se esperaba. Para la muestra inicial se obtuvo un valor intermedio del GDD = 80,6 %, el cual puede explicarse porque éste resulta de la contribución de las fracciones insolubles (que tienen GDD más bajos, entre 76,5 y 77,6 %, pero representan un menor porcentaje p/p de la muestra) y la fracción soluble (con una GDD más alto y un mayor porcentaje p/p en la muestra). Los relativamente altos valores de GDD obtenidos para las fracciones insolubles indican que la insolubilidad de este material no está determinada por entrecruzamientos físicos originados en interacciones hidrofóbicas de largos segmentos de cadena que contienen grupos acetamida (como en el caso de la quitina). Por ello, es necesario pensar en otros tipos de interacciones, especialmente aquellas que derivan de entrecruzamientos químicos.

Titulación potenciométrica: los resultados de la titulación se representan mediante una curva de titulación, la cual, en este caso específico, presenta dos puntos de inflexión (figura 15). Los volúmenes de titulante correspondientes a estos dos puntos de inflexión se obtuvieron gráficamente de la primera derivada de la curva de titulación ( $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$ ); de la diferencia entre ellos ( $V_2 - V_1$ ) se pueden obtener los equivalentes del ácido consumido para la protonación de los grupos amino del quitosano. En el primer punto de inflexión ocurre la neutralización de los protones libres (no asociados como  $\text{NH}_3^+$  en la cadena polimérica) y en el segundo punto de inflexión ocurre la neutralización de los protones totales en la solución.

El método potenciométrico se aplicó solamente a la fracción soluble. Para la determinación del GDD se utilizaron las ecuaciones 15 y 16, mostradas en el apartado 5.3; el análisis se realizó por triplicado y los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 14, donde se aprecia que el GDD promedio resultó de  $81 \pm 1 \%$ .

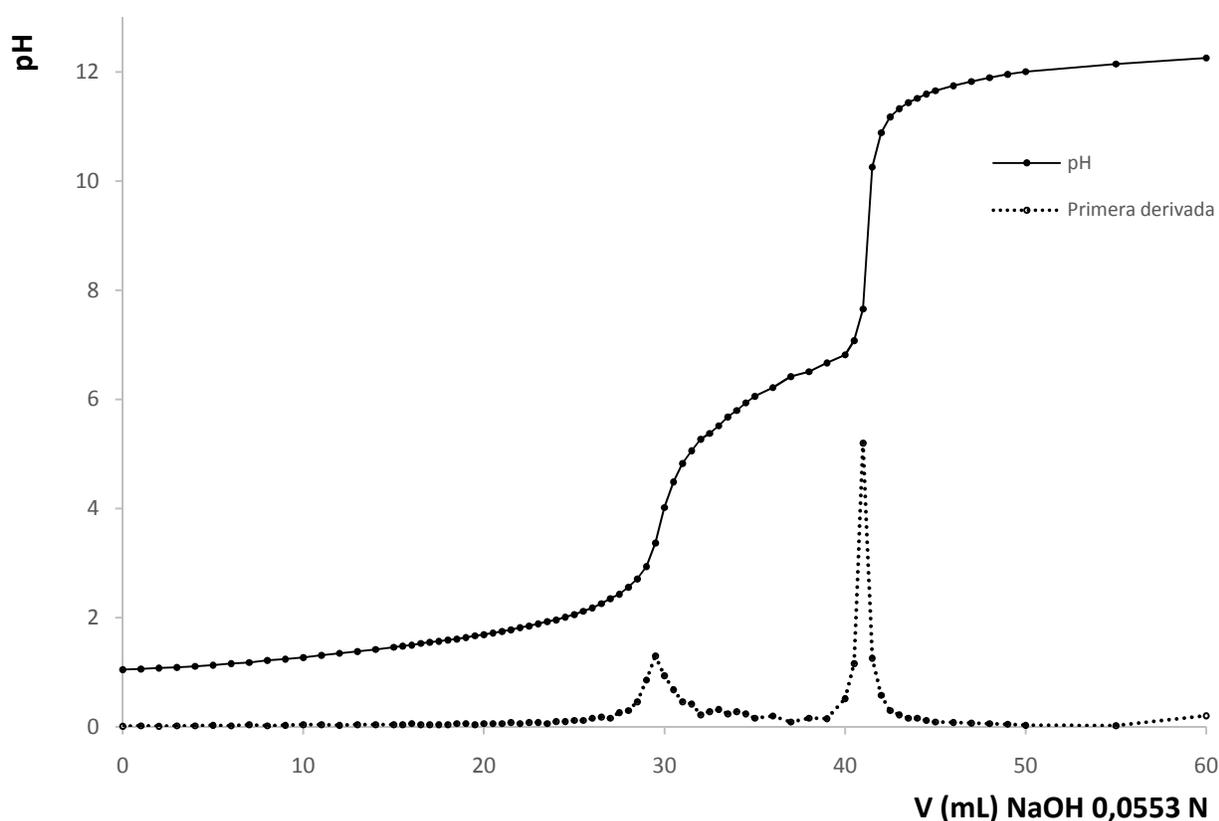


Fig. 15: Curva de valoración potenciométrica de la fracción soluble de quitosano.

Tabla 14: Resultados obtenidos de la valoración potenciométrica para la fracción soluble.

Experiencia	$N_{\text{NaOH}}$ (eq/L)	$V_1$ (l)	$V_2$ (l)	$m_q$ (g)	$[\text{NH}_3^+] \times 10^{-3}$ (eq/g)	GDD (%)
1	0,0553	29,5	41,0	0,1504	4,7860	80,96
2	0,0553	29,5	41,0	0,1512	4,7606	80,53
3	0,0553	29,5	41,5	0,1541	4,8741	82,45
$\bar{X} \pm \Delta X$						<b>81,3 ± 1,0</b>

Titulación conductimétrica: al igual que en el método anterior, una solución de quitosano en exceso de HCl se valora con NaOH estandarizado, pero en este caso se va midiendo la conductividad de la solución titulada (figura 16). Inicialmente, la neutralización del exceso de ácido (protones libres presentes en la solución) se manifiesta como una disminución pronunciada y casi lineal de la conductividad de la solución, hasta llegar a un punto donde la disminución de la conductividad se hace menos pronunciada y que corresponde a la zona donde se neutralizan los protones asociados a los grupos amino del quitosano; finalmente, luego de alcanzarse un valor mínimo en la zona anterior, comienza una zona de conductividad pronunciadamente ascendente que corresponde a la conductividad asociada al exceso de grupos  $\text{OH}^-$  que se va añadiendo.

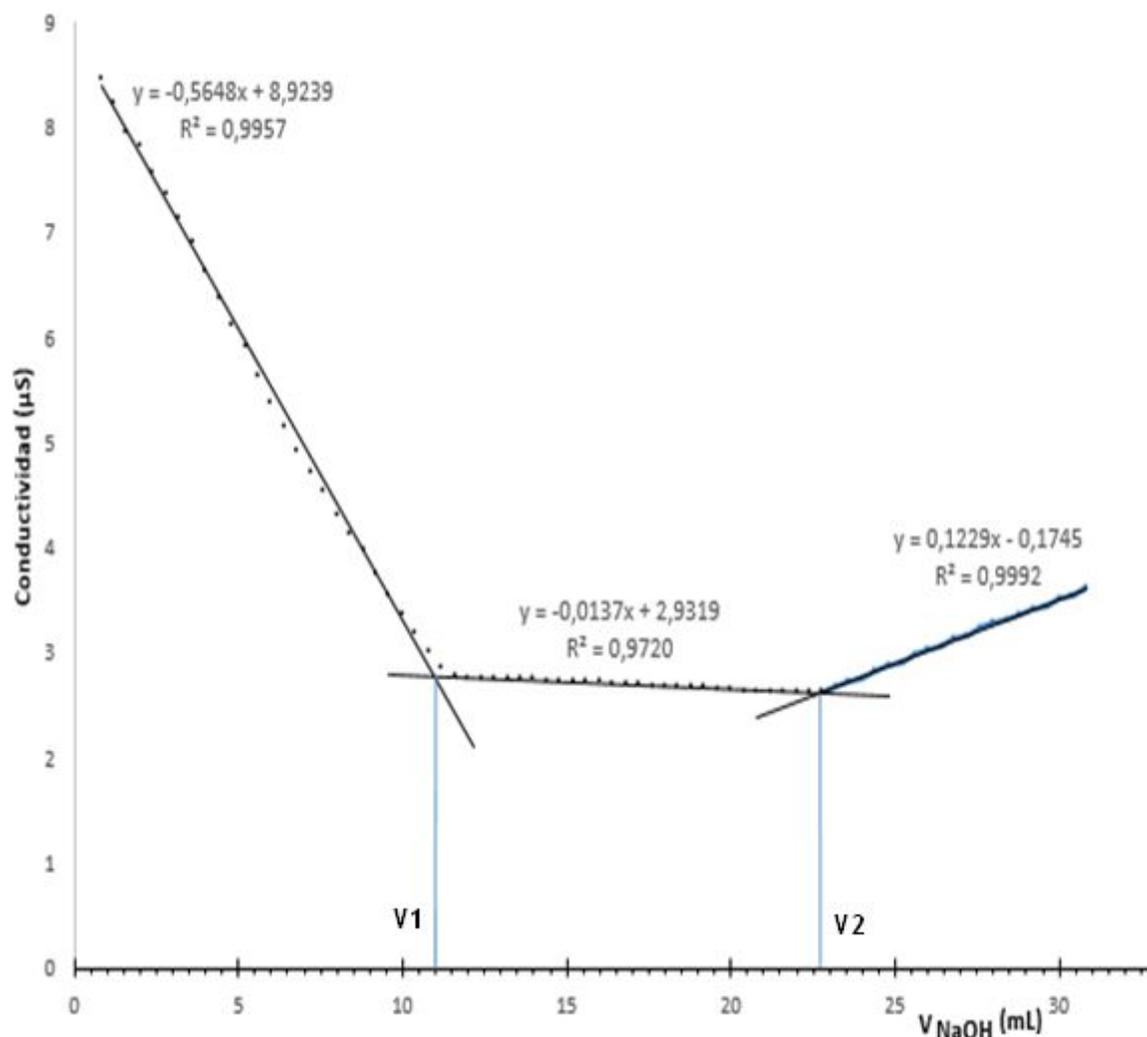


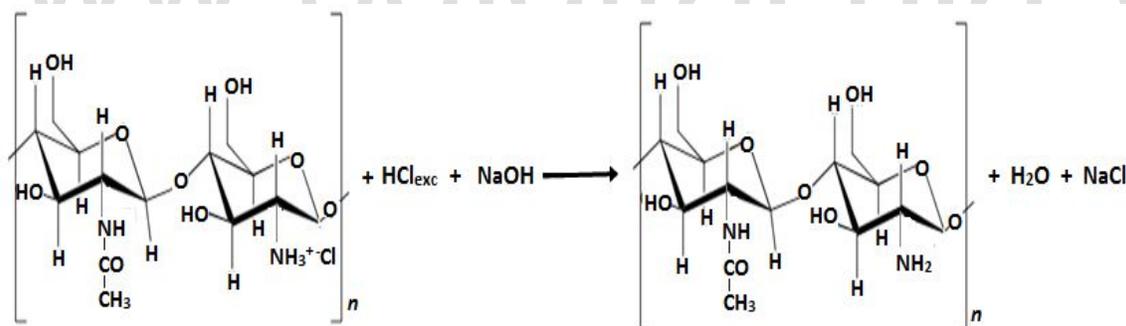
Fig. 16: Curva de valoración conductimétrica de la fracción soluble de quitosano.

Los puntos de neutralización se calculan por intersección de las rectas obtenidas y a partir de ellos se obtienen los volúmenes de titulante que neutralizan los protones libres (V1) y los protones totales (V2); la diferencia entre estos volúmenes corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los protones asociados a los grupos amino protonados del quitosano [16]. El GDD se determina mediante las ecuaciones 15 y 16 mostradas en el apartado 5.3. El análisis se realizó por triplicado y los resultados son mostrados en la tabla 15, obteniéndose por este método un valor promedio para el GDD = 80,5 ± 1,3 %.

**Tabla 15:** Resultados de la determinación conductimétrica del GDD para la fracción soluble de quitosano.

Experiencia	N <sub>NaOH</sub> (eq/L)	V <sub>1</sub> (l)	V <sub>2</sub> (l)	m <sub>q</sub> (g)	[NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] x 10 <sup>-3</sup> (eq/g)	GDD (%)
1	0,0548	11,0	22,75	0,1504	4,8458	81,97
2	0,0548	11,5	23,0	0,1518	4,6989	79,48
3	0,0548	11,5	23,0	0,1507	4,7332	80,06
<b>X ± ΔX</b>						<b>80,5 ± 1,3</b>

En la figura 17 se presenta la reacción de neutralización ácido/base asociada a los procesos de la titulación potenciométrica y conductimétrica mientras que en la tabla 16 se comparan los resultados del GDD obtenidos mediante los tres métodos utilizados, espectroscopia FT-IR, titulación potenciométrica y conductimétrica, para el análisis de la fracción soluble resultante del proceso de purificación aplicado. Se puede apreciar que los valores obtenidos mediante los tres métodos aplicados son bastantes similares.



**Fig. 17:** Ecuación para la reacción de titulación potenciométrica y conductimétrica del quitosano disuelto en exceso de ácido con NaOH.

**Tabla 16:** Comparación de los resultados obtenidos para el GDD por espectroscopia IR y titulación potenciométrica.

FT-IR	GDD (%)	
	Potenciometría	Conductimetría
83,8 ± 6,7	81,3 ± 1,0	80,5 ± 1,3

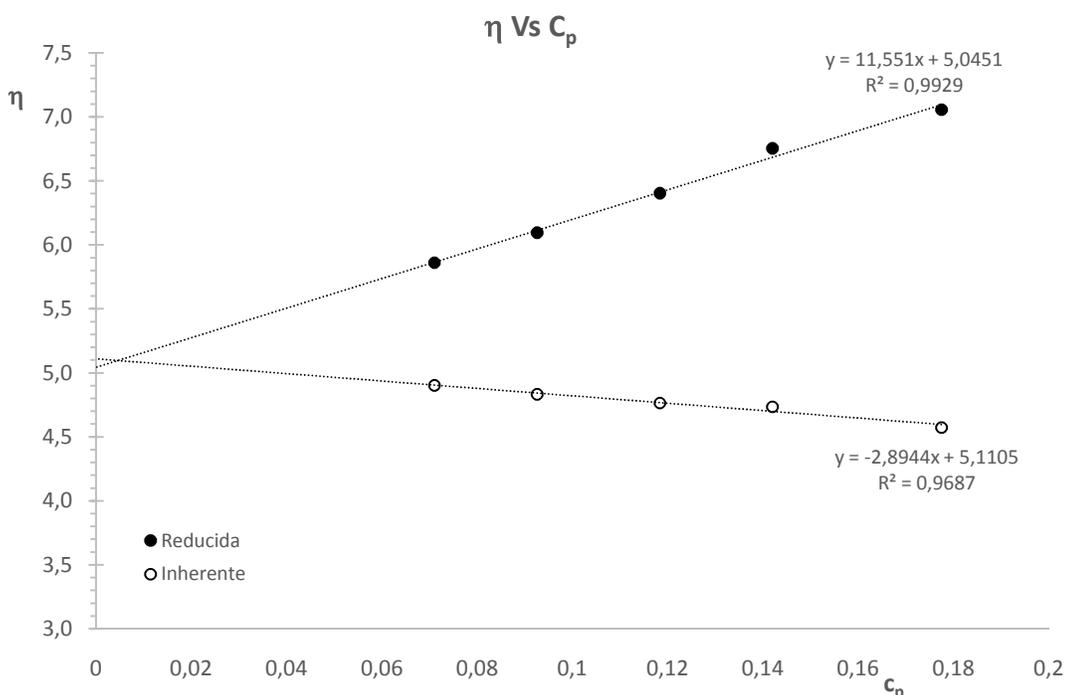
#### Determinación del peso molecular viscosimétrico

Los valores experimentales promedios de los tiempos de elución del polímero en estudio se transforman en valores de viscosidad relativa ( $\eta_r$ ), viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ), viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) y viscosidad inherente ( $\eta_{inh}$ ) según las ecuaciones 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Los resultados de dicha transformación para cada una de las concentraciones de trabajo, se muestran en la tabla 17.

La determinación de la viscosidad intrínseca se realizó mediante un procedimiento gráfico que hace uso de la ecuación de Huggins o la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. La figura 18 muestra el gráfico de la viscosidad reducida e inherente en función de la concentración del polímero, usando los datos obtenidos para la primera de las tres réplicas que se realizaron. De esta manera se determina la viscosidad intrínseca como el intercepto en el eje “y” de la recta que surge de graficar  $\eta_r$  (o  $\eta_{inh}$ ) vs.  $c_p$ .

**Tabla 17:** Tiempos de caída del buffer y las soluciones de la fracción soluble durante las mediciones viscosimétricas.

	Soluciones	Tiempo de elución (S)	$c_p$	$\eta_r$	$\eta_{sp}$	$\eta_{red}$	$\eta_{inh}$
Exp.1	Buffer	62,28	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00
	Sol. 1	140,31	0,1775	2,25	1,15	7,06	4,58
	Sol. 2	122,02	0,1420	1,96	0,96	6,75	4,74
	Sol. 3	109,48	0,1183	1,76	0,76	6,40	4,77
	Sol. 4	97,44	0,0926	1,56	0,56	6,09	4,83
	Sol. 5	88,21	0,0710	1,42	0,42	5,86	4,90
Exp.2	Sol. 1	139,39	0,1775	2,24	1,24	6,97	4,54
	Sol. 2	121,89	0,1420	1,96	0,96	6,74	4,73
	Sol. 3	108,88	0,1183	1,75	0,75	6,32	4,72
	Sol. 4	98,15	0,0926	1,58	0,58	6,22	4,91
	Sol. 5	89,48	0,0710	1,44	0,44	6,15	5,10
Exp.3	Sol. 1	140,59	0,1775	2,26	1,26	7,08	4,59
	Sol. 2	122,19	0,1420	1,96	0,96	6,77	4,75
	Sol. 3	110,85	0,1183	1,78	0,78	6,59	4,87
	Sol. 4	97,86	0,0926	1,57	0,57	6,17	4,88
	Sol. 5	88,58	0,0710	1,42	0,42	5,95	4,96



**Fig. 18:** Gráfico de  $\eta_r$  y  $\eta_{inh}$  vs  $c_p$  para las soluciones de la fracción soluble del quitosano en el buffer acetato de sodio/ácido acético.

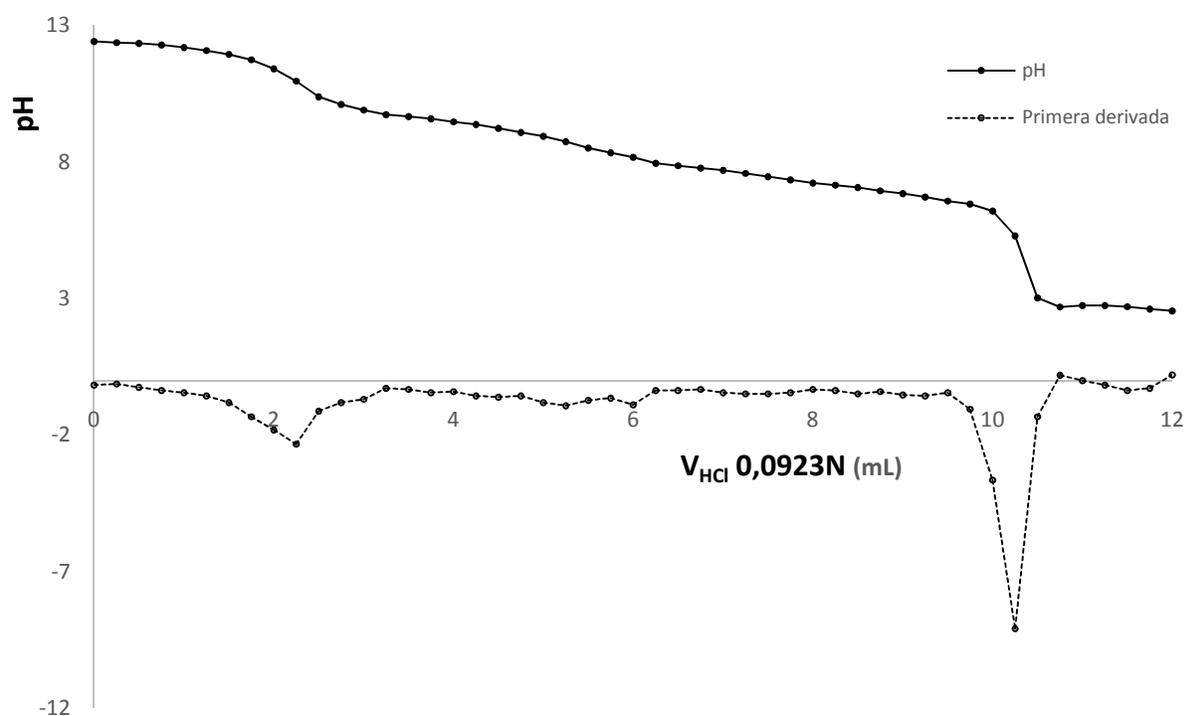
El valor de  $[\eta]$  se obtiene como el promedio de los interceptos obtenidos de ambas rectas. El peso molecular promedio viscoso de la muestra se calcula mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (ecuación 8), utilizando los valores de  $[\eta]$  obtenidos y las constantes  $\alpha$  y  $K$  reportadas [16], las cuales dependen del sistema polímero/disolvente y de la temperatura a la cual se realizan las medidas. En la tabla 18 se presentan los resultados obtenidos de las tres experiencias realizadas así como el valor del peso molecular promedio viscoso que resultó ser de 116.479,13 g/mol.

**Tabla 18:** Valores de  $M_v$  obtenidos para la fracción soluble de quitosano por el método viscosimétrico.

Experiencia	$\eta$	$\alpha$	$K \times 10^5$	$M_v$ (kDa)
1	5,08			111,6741
2	5,44	0,76	74	122,2597
3	5,21			115,5036
<b>Promedio</b>				<b>116 ± 5</b>

### 6.3. Preparación, purificación y caracterización del oleato de sodio

Previo a la preparación del OS se realizaron valoraciones potenciométricas del ácido oleico disuelto en NaOH con HCl, con la finalidad de determinar la cantidad de NaOH necesaria para la formación estequiométrica de la sal. En la figura 19 se muestra una titulación potenciométrica típica obtenida para este sistema (formalmente una retrotitulación); en ella se observan dos puntos de inflexión bien definidos: el primero alrededor de  $pH_1 = 11$ , corresponde a la neutralización de los grupos  $OH^-$  en exceso, mientras que el segundo, a un valor de  $pH_2$  aproximado de 4, corresponde a la neutralización de todos los grupos  $OH^-$  presentes. La diferencia entre los volúmenes de titulante correspondientes a estos puntos de inflexión ( $V_2 - V_1$ ) provee los equivalentes de HCl necesario para neutralizar los grupos  $OH^-$  que neutralizaban una cantidad equivalente de ácido oleico. Los datos detallados de la titulación se muestran en la tabla 19. Con base en estos resultados se preparó el OS en una mayor proporción (tabla 20).



**Fig. 19:** Curva de titulación potenciométrica para la neutralización con HCl del ácido oleico (●) y su primera derivada (○).

Tabla 19: Resultados obtenidos en la retrotitulación potenciométrica del ácido oleico con HCl 0,0923 N.

Experiencia	$m_{\text{ac. oleico}}$ (g)	$V_1$ (mL)	$V_2$ (mL)	$V_{\text{HCl}(0,0923\text{N})}$ (eq/L)
1	0,2027	2,25	10,25	8,00
2	0,2049	2,00	10,25	8,25
3	0,2019	2,25	10,50	8,25
$X \pm \Delta X$	<b>0,203 ± 0,002</b>	<b>2,17 ± 0,14</b>	<b>10,33 ± 0,14</b>	<b>8,17 ± 0,14</b>

Tabla 20: Cantidades usadas en la preparación del oleato de sodio.

$m_{\text{ac. oleico}}$ (g)	$V_{\text{NaOH } 0,097\text{N}}$ (eq/L)	$m_{\text{oleato de sodio}}$ (g)
6,0617	243,7	6,0739

El ácido oleico utilizado para la obtención del oleato de sodio fue caracterizado por espectroscopia FT-IR. En el espectro obtenido (figura 20) puede apreciarse que la señal de tensión del enlace O-H es bastante amplia (entre 3400 y 2400  $\text{cm}^{-1}$ ) y solapa parcialmente las absorciones típicas del enlace C-H [39]; la vibración de tensión del enlace  $\text{C-H}_{\text{sp}^2}$  se muestra en 3000  $\text{cm}^{-1}$ ; la vibraciones de tensión  $\text{C-H}_{\text{sp}^3}$  para el metilo y el metileno se observan en 2926 y 2853  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. En 1713  $\text{cm}^{-1}$  aparece una señal intensa correspondiente al estiramiento del carbonilo  $\text{C=O}$ ; se observa una señal en 1464  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de deformación del enlace C-H; en 1414  $\text{cm}^{-1}$  se tiene la vibración de flexión fuera del plano del enlace O-H; además se observa una señal en 1287  $\text{cm}^{-1}$  relacionada a la vibración de tensión del enlace C-O. También se aprecia una banda ancha de torsión fuera del plano del carboxilo en 935  $\text{cm}^{-1}$  y una señal en 722  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del enlace  $\text{C-H}_{\text{sp}^3}$  para el metileno de la cadena hidrocarbonada. La figura 21 permite apreciar que el espectro descrito es similar al reportado para el ácido oleico [40]. En la tabla 21 se muestran las longitudes de onda experimentales y reportadas para el ácido oleico.

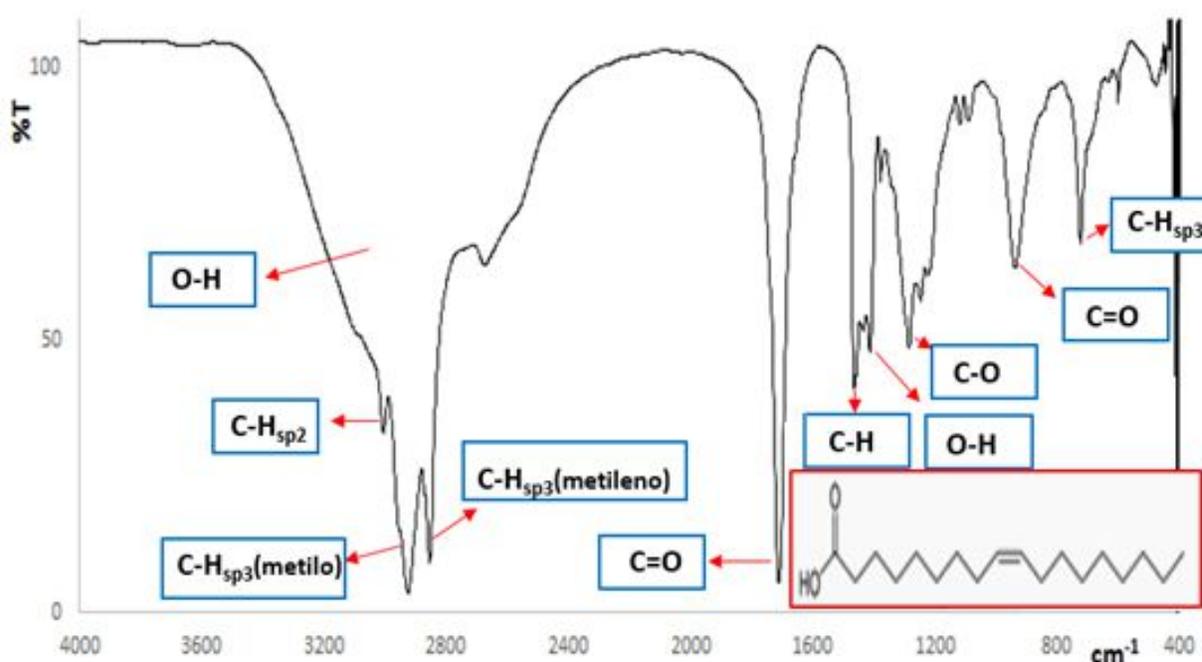


Fig. 20: Espectro FT-IR del ácido oleico utilizado para la obtención del oleato de sodio.

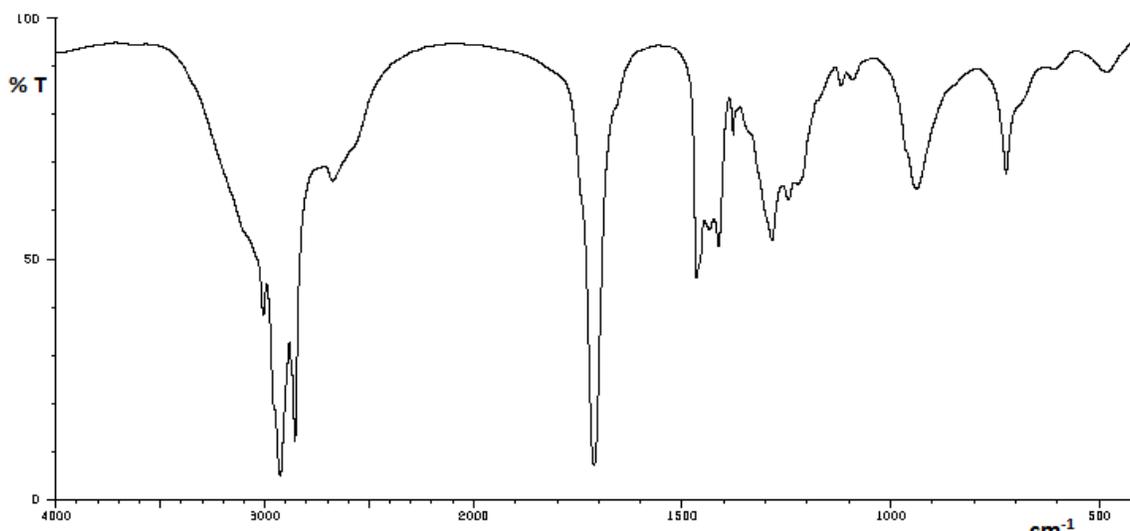


Fig. 21: Espectro FT-IR reportado para el ácido oleico [40].

Tabla 21: Asignación de las principales señales del espectro FT-IR para el ácido oleico.

Bandas	Descripción	Ácido oleico preparado (cm <sup>-1</sup> )	Ácido oleico reportado [40] (cm <sup>-1</sup> )
(O-H)	Vibración de tensión	3000-2000	3000-2200
(C-H) <sub>sp2</sub>	Vibración de tensión simétrica	3000	3007
(C-H) <sub>sp3</sub> (metilo)	Vibración de tensión	2926	2927
(C-H) <sub>sp3</sub> (metileno)	Vibración de tensión	2853	2855
(C=O)	Vibración de tensión	1713	1711
(C-H)	Vibración de deformación	1464	1467
(O-H)	Vibración de flexión fuera del plano	1414	1413
(C-O)	Vibración de tensión	1287	1285
(C=O)	Vibración de flexión fuera del plano	935	938
(C-H) <sub>sp3</sub> (metileno)	Vibración de flexión fuera del plano	722	720

Al igual que el ácido oleico, el OS obtenido fue caracterizado por espectroscopia FT-IR, observándose en su espectro IR (figura 22) las siguientes señales características: la vibración de tensión del enlace C-H<sub>sp2</sub> se muestra en 3002 cm<sup>-1</sup>; la vibración de tensión C-H<sub>sp3</sub> para el metilo y el metileno se observan en 2923 y 2853 cm<sup>-1</sup>, respectivamente; una señal fuerte en 1557 cm<sup>-1</sup> característica del estiramiento del enlace C=O. y en 1452 cm<sup>-1</sup> se observa la señal correspondiente a la vibración de deformación del C-H. El espectro obtenido muestra gran similitud con el reportado para el OS [40] (figura 23). En la tabla 22 se muestran las longitudes de onda para las principales señales que aparecen en el espectro de la muestra de OS usada en este trabajo así como también las reportadas.

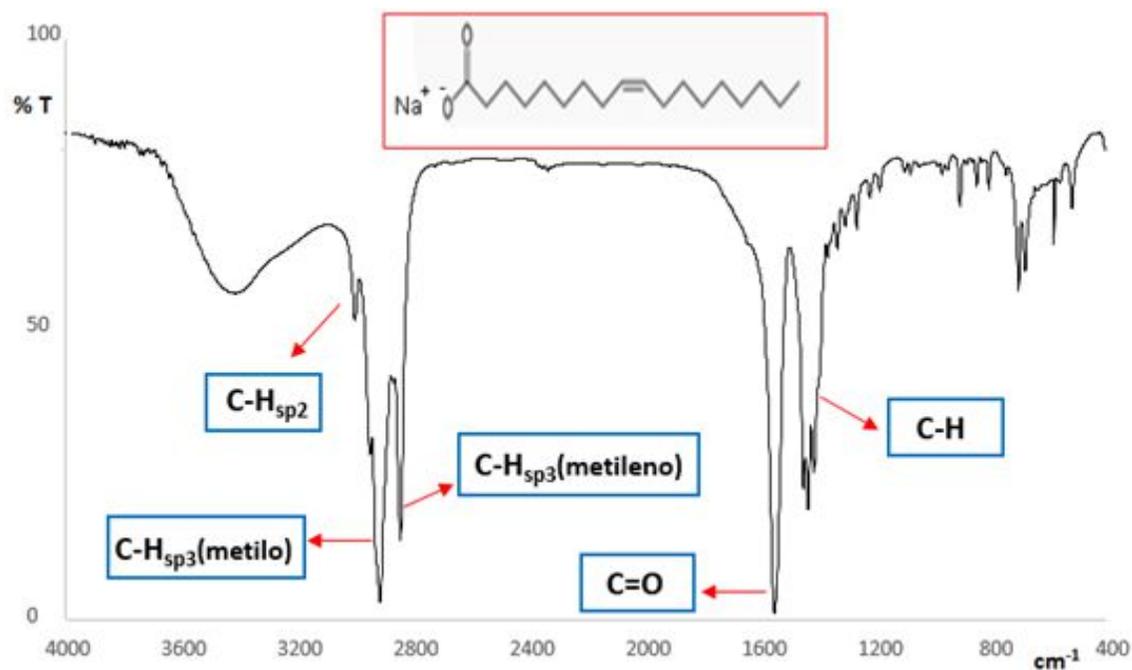


Fig. 22: Espectro FT-IR del oleato de sodio obtenido.

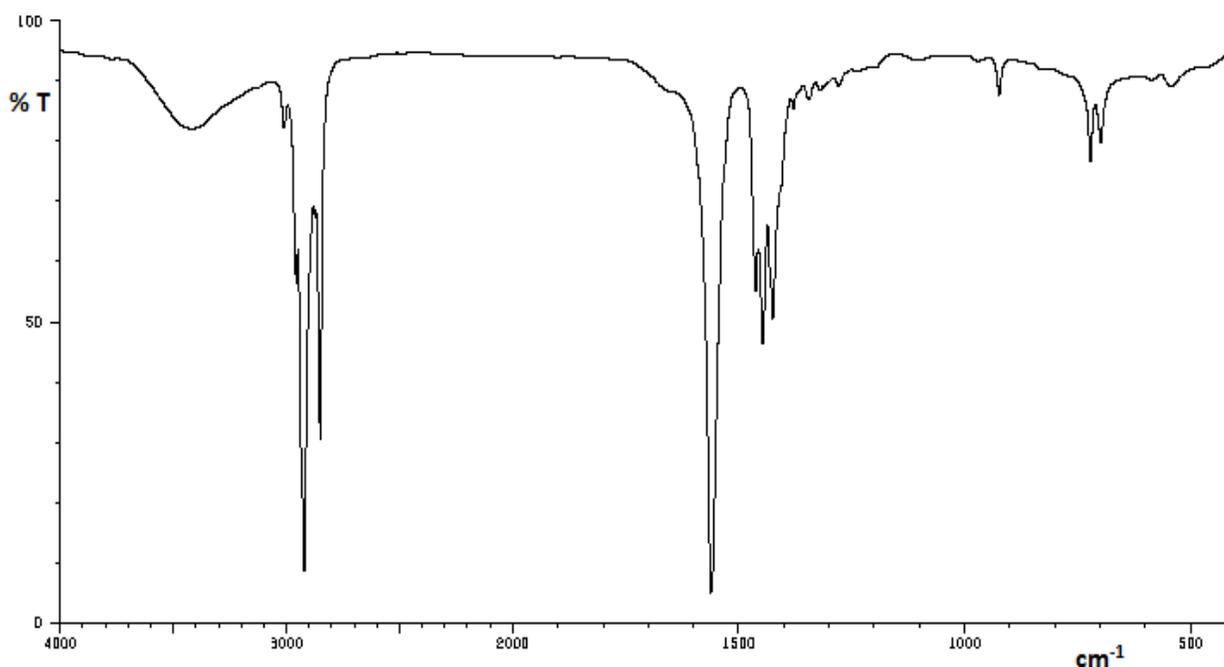


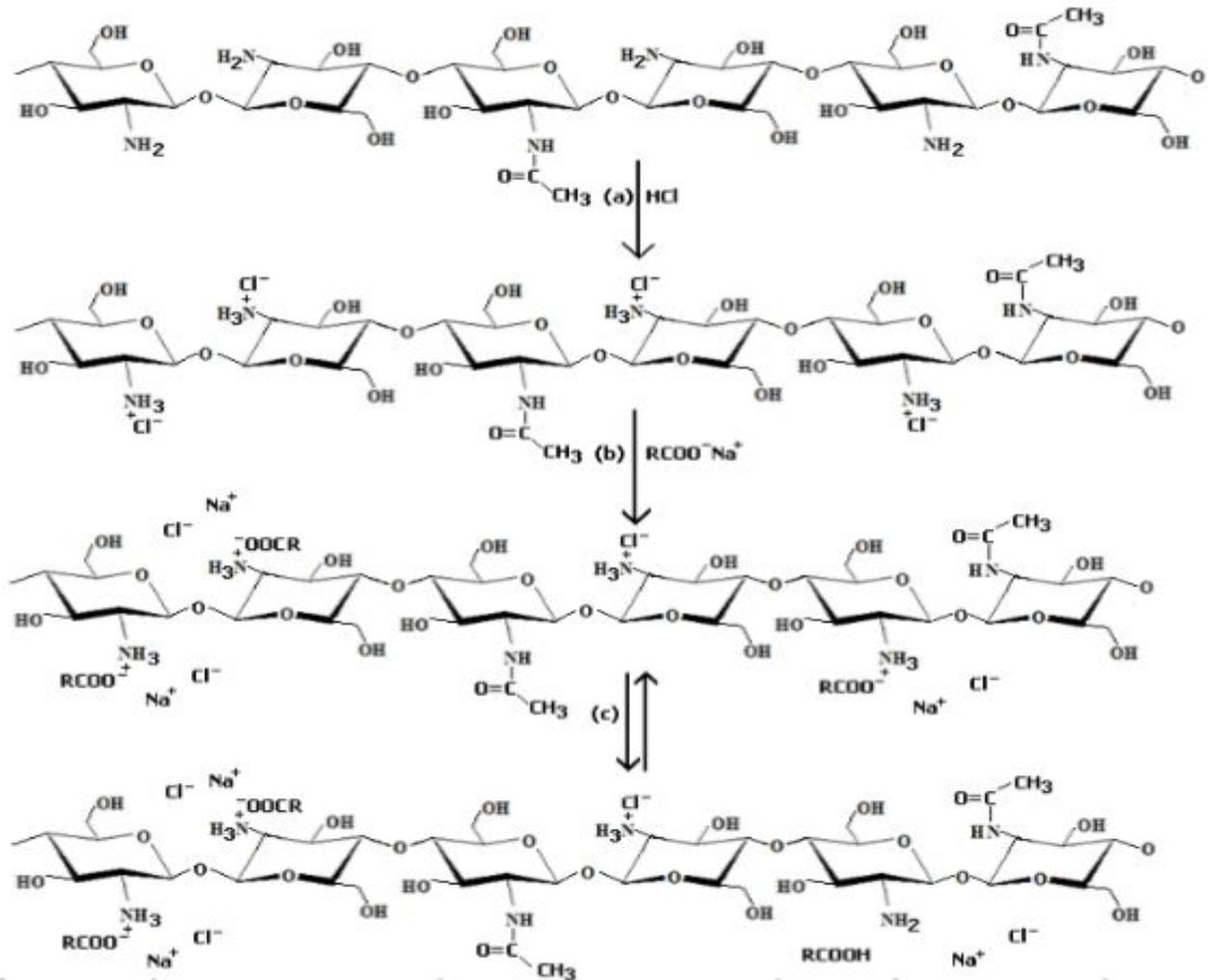
Fig. 23: Espectro FT-IR reportado para el oleato de sodio.

Tabla 22: Asignación de las principales señales del espectro FT-IR para el oleato de sodio.

Bandas	Descripción	OS preparado (cm <sup>-1</sup> )	OS reportado [11] (cm <sup>-1</sup> )
(C-H) <sub>sp2</sub>	Vibración de tensión simétrica	3002	3010
(C-H) <sub>sp3</sub> (metilo)	Vibración de tensión	2923	2922
(C-H) <sub>sp3</sub> (metileno)	Vibración de tensión	2853	2851
(C=O)	Vibración de tensión	1557	1561
(C-H)	Vibración de deformación	1452	1453

#### 6.4. Preparación y caracterización de complejos de quitosano con oleato de sodio

Debido a su condición de polielectrolito, en condiciones ácidas, el quitosano es capaz de formar complejos electrostáticos con un surfactante de carga opuesta, como por ejemplo el OS. En este caso, el proceso de formación de los complejos ocurre en primera instancia mediante la protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido (figura 24, paso a) y luego, al añadir el OS a la solución de quitosano, se forma el complejo entre el polielectrolito catiónico (quitosano protonado) y el anión oleato (figura 24, parte b) debido a la interacción iónica entre los dos grupos cargados opuestamente. El grado de sustitución de los aniones  $\text{Cl}^-$  en el quitosano protonado por parte del anión oleato depende, entre otros factores, de la concentración del oleato añadida.

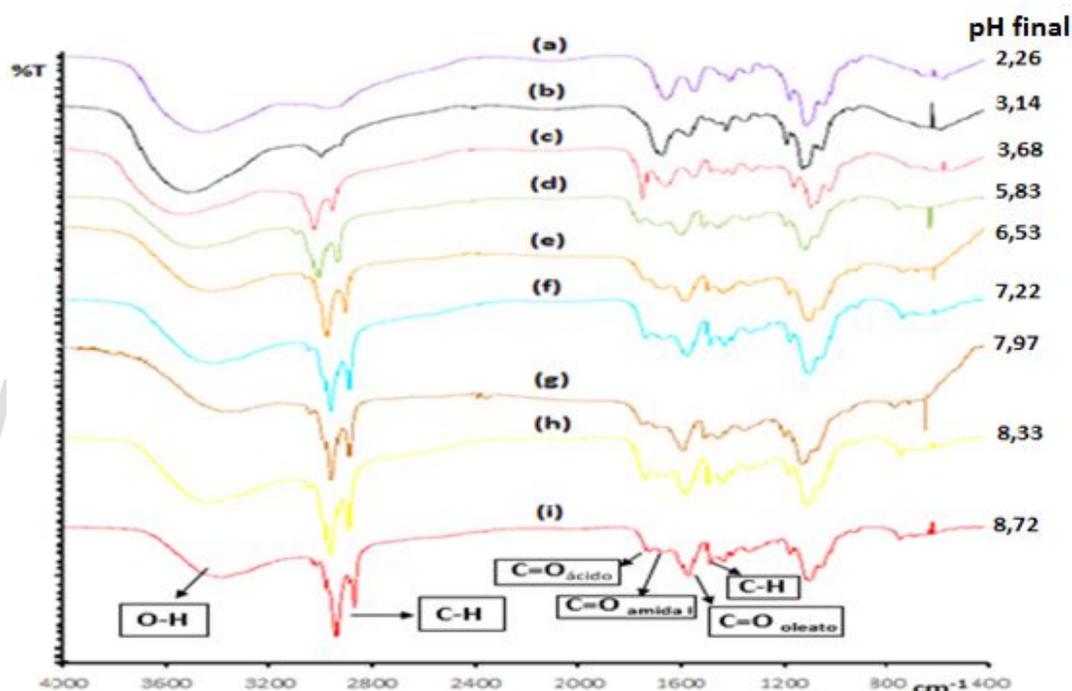


**Fig. 24:** Formación del complejo polielectrolito/surfactante mediante la interacción electrostática entre el policationo quitosano protonado y los aniones oleato [38].

En la figura 25 se aprecian los espectros de FT-IR de los complejos quitosano/OS para diferentes porcentajes de sustitución del OS. En todos ellos se puede observar la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace O-H en  $3400 \text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, indicando que estos grupos continúan inalterados como en el quitosano de partida; la vibración de tensión C-H<sub>sp2</sub>, C-H<sub>sp3</sub> para el metilo y el metileno se muestran en  $3000$ ,  $2926$  y  $2855 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente; la intensidad de estas señales van aumentando en la medida que aumenta el porcentaje de sustitución con el OS. A  $1650 \text{ cm}^{-1}$  aproximadamente se aprecia la vibración de tensión del enlace C=O de la amida I del quitosano, donde se observa que a medida que se aumenta la concentración de OS esta banda va disminuyendo;

alrededor de  $1550\text{ cm}^{-1}$  se observa una señal característica del estiramiento del enlace C=O del oleato de sodio (ausente en el espectro de quitosano no sustituido), como es de esperarse, esta señal va aumentando a medida que se incrementa la concentración de OS; en  $1460\text{ cm}^{-1}$  se observa una señal correspondiente a la vibración de deformación del enlace C-H que también aumenta a medida que se incrementa la concentración de OS. En la tabla 23 se muestran las longitudes de onda para las principales señales que aparecen en el espectro de los complejos de quitosano/OS.

Por otra parte, es importante señalar que en los espectros de los complejos también aparece, con mayor o menor intensidad, una señal aguda en  $1710\text{ cm}^{-1}$ . Esta señal corresponde al estiramiento del carbonilo C=O para el ácido oleico, lo que apunta a que en estas reacciones parte de OS precipita en su forma ácida al mezclarse con la solución de quitosano en medio ácido. Probablemente esta precipitación ocurre debido a problemas de homogeneización cuando se mezclan los dos reactivos. Esta banda es especialmente pronunciada en el caso del complejo quitosano/40 % OS.

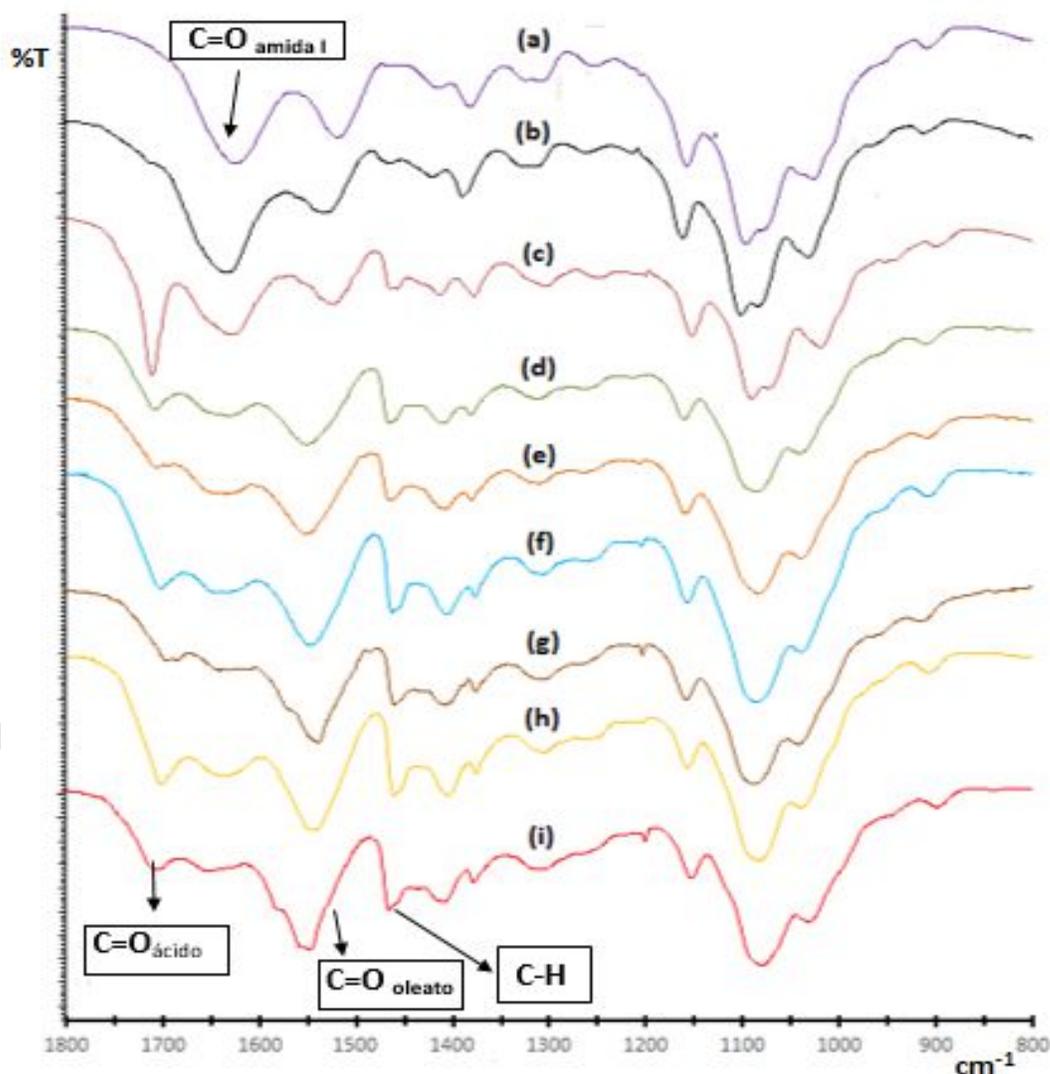


**Fig. 25:** Espectro FT-IR de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 %, (i) OS 160 %. Tomados en pastillas de KBr. Los valores de pH final se refieren al valor del pH de la solución que se forma luego de mezclar las soluciones de oleato de sodio, quitosano y agua.

**Tabla 23:** Asignación de las principales señales del espectro FT-IR para los complejos quitosano/OS.

Bandas	Descripción	Complejos quitosano/OS ( $\text{cm}^{-1}$ )
(O-H)	Vibración de tensión	3400
(C-H) <sub>sp2</sub>	Vibración de tensión simétrica	3000
(C-H) <sub>sp3</sub> (metilo)	Vibración de tensión	2926
(C-H) <sub>sp3</sub> (metileno)	Vibración de tensión	2855
(C=O) ac. oleico precipitado	Vibración de tensión	1710
(C=O) amida I	Vibración de tensión	1650
(C=O) oleato	Vibración de tensión	1550
(C-H)	Vibración de deformación	1460
(C-O-C)	Tensión asimétrica del puente glucósidico	1150

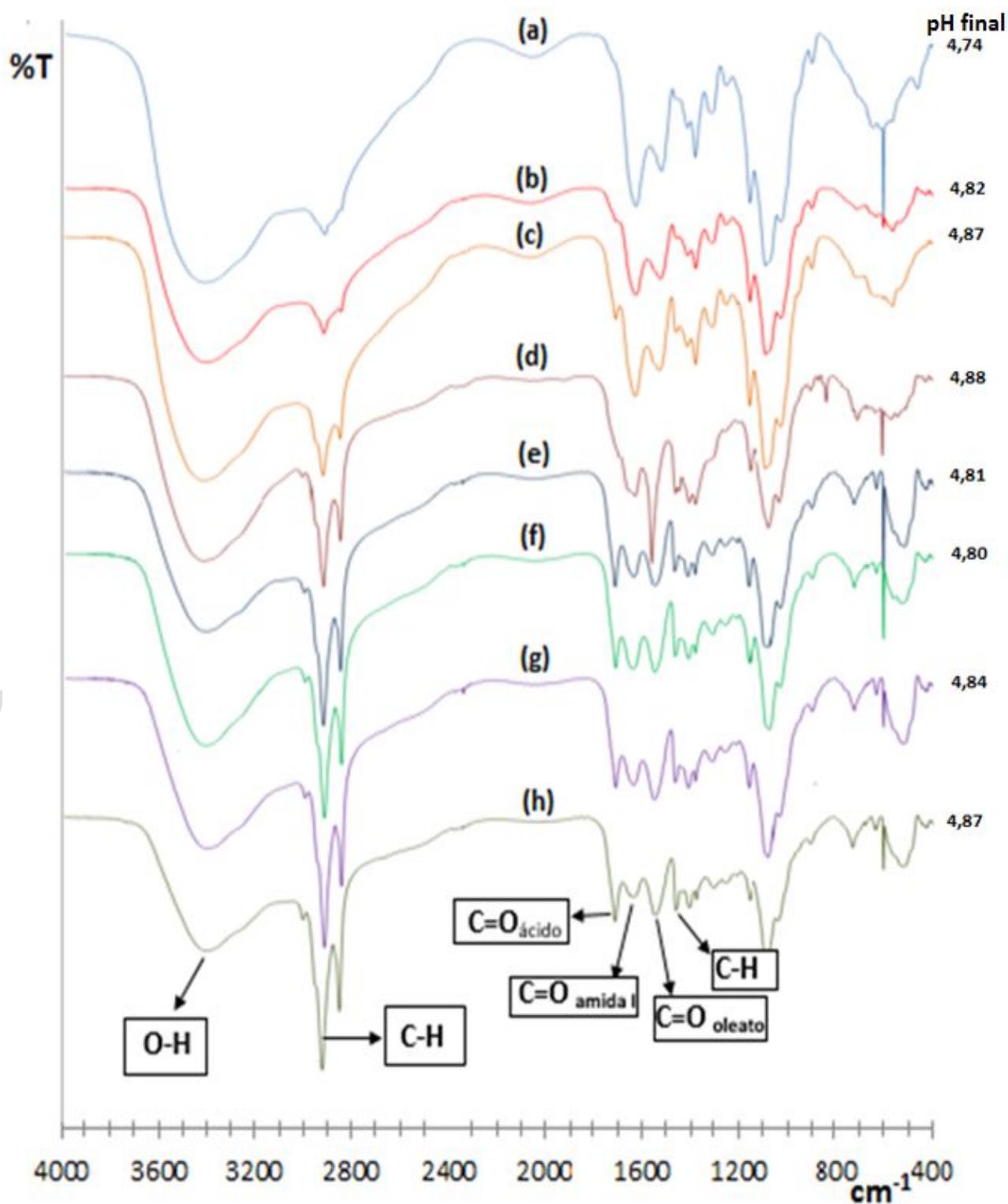
La figura 26 presenta una ampliación de los espectros obtenidos de los complejos quitosano/OS en un intervalo comprendido entre 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , permitiendo la apreciación de las bandas anteriormente descritas de manera más clara.



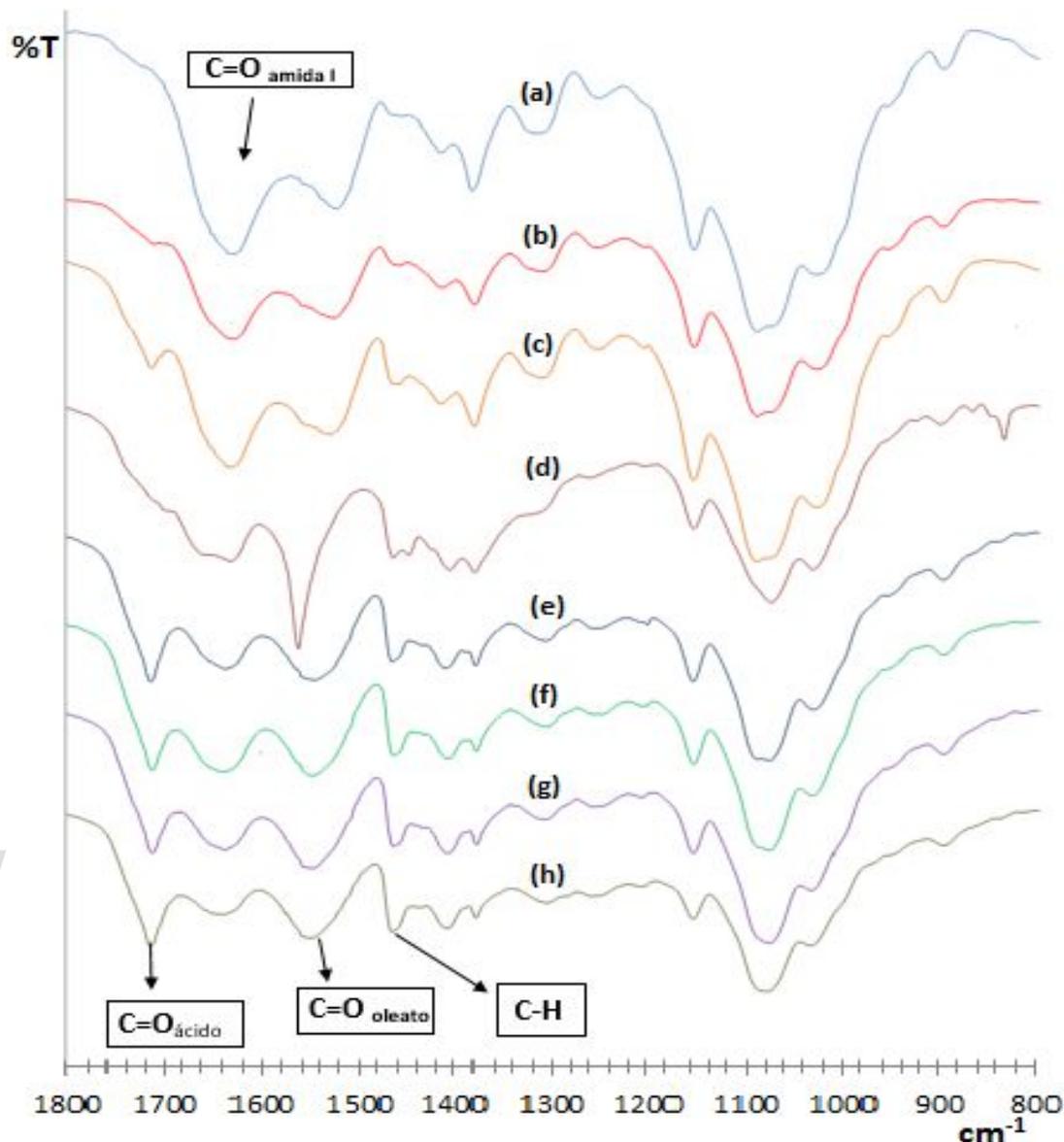
**Fig. 26:** Espectro FT-IR entre 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$  de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 %, (i) OS 160 %.

Debido a la precipitación del ácido oleico durante la preparación de los policomplejos mediante el método propuesto anteriormente (que ocurre aparentemente al azar), se decidió controlar en un valor similar el pH final de los sistemas ensayados. En este caso se mezcló primeramente la cantidad de OS y el agua desionizada para cada complejo, según la tabla 9, luego se añadió la cantidad respectiva de la solución de quitosano con agitación constante hasta un volumen final de 10 mL, luego de lo cual se controló el pH de cada sistema a 4,80 aproximadamente, siguiendo posteriormente el procedimiento descrito anteriormente, es decir, se centrifugó y se realizaron lavados con agua desionizada hasta obtener los complejos secos.

Este procedimiento se realizó para tratar de obtener los complejos con una mayor pureza; sin embargo, en los espectros FT-IR que se muestran a continuación (figuras 27 y 28) se logra observar nuevamente la señal en 1710  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del carbonilo C=O para el ácido oleico, es decir, la precipitación del ácido oleico sigue ocurriendo.



**Fig. 27:** Espectro FT-IR de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 % controlando el pH. Los valores de pH final se refieren al valor del pH de la solución que se forma luego de mezclar las soluciones de oleato de sodio, quitosano y agua.



**Fig. 28:** Espectro FT-IR entre 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$  de los complejos de quitosano/OS: (a) OS 0 %, (b) OS 20 %, (c) OS 40 %, (d) OS 60 %, (e) OS 80 %, (f) OS 100 %, (g) OS 120 %, (h) OS 140 % controlando el pH.

En tal sentido, para obtener estos policomplejos de quitosano OS con una mayor pureza es preciso continuar investigando las condiciones en las cuales el proceso de precipitación del ácido oleico pueda ser minimizado; sin embargo, resulta estimulante notar que en la preparación del policomplejo sustituido a 60 % la señal a 1710  $\text{cm}^{-1}$  es muy pequeña mientras que la señal del oleato a 1550  $\text{cm}^{-1}$  resultó más aguda y más cercana a la de oleato original, indicando que en estas condiciones se pudo obtener un policomplejo de mayor pureza que en los otros casos.

## 7. CONCLUSIONES

---

Las principales conclusiones que se han alcanzado en el presente trabajo de investigación son las siguientes:

- Mediante un tratamiento de purificación del quitosano nacional (Innovaquito), basado en la solubilidad de este material en ácido acético acuoso, se cuantificó la composición del material de partida en sus distintas fracciones, soluble e insoluble en ácido acético, resultando éstas de alrededor de 51 y 25 %, respectivamente, con respecto a la muestra inicial.
- La fracción soluble obtenida en este proceso de purificación fue caracterizada en relación a su contenido de humedad (11,6 %), porcentaje de cenizas (3,8 %), GDD mediante las técnicas de espectroscopia FT-IR, titulación potenciométrica y titulación conductimétrica, resultando valores cercanos entre cada una de ellas: 83,8 %, 81,3 % y 80,5 %, respectivamente. Igualmente, se determinó para esta fracción el peso molecular promedio viscoso, obteniéndose un valor de alrededor de 116.000 g/mol.
- Con la fracción soluble obtenida del quitosano nacional se ensayaron dos métodos para la preparación de complejos polielectrolitos usando oleato de sodio (OS), empleando distintas proporciones de éste último, para tratar de preparar este tipo de materiales con una buena pureza; sin embargo, la precipitación del ácido oleico durante la mezcla de los reactivos parece ser una limitante del proceso debido a que dicha reacción aparece incluso cuando se controla el pH final de la mezcla.

www.bdigital.ula.ve

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## 8. RECOMENDACIONES

---

- En aras de lograr un mayor porcentaje de recuperación de la fracción soluble presente en el quitosano de partida sería conveniente probar con métodos de filtración a presión (o por succión) a los fines de tratar de extraer la mayor cantidad posible de dicha fracción. Este es uno de los pasos más lentos en el proceso y su aceleración podría incidir positivamente tanto en la rapidez del método como en el rendimiento del producto buscado.
- Es necesario continuar ensayando condiciones experimentales para lograr minimizar la precipitación del ácido oleico durante la preparación de los policomplejos quitosado/oleato de sodio. En tal sentido sería conveniente plantear un diseño experimental que permita realizar estos estudios de manera sistemática para su optimización.
- En vista de las limitaciones actuales, en cuanto a equipos se refiere, del Laboratorio y del país en general, queda pendiente realizar los estudios de reología con los policomplejos de quitosano/oleato de sodio, los cuales pudieran aportar información valiosa en relación a su potencial aplicación en la recuperación mejorada del crudo, debido a que éstos podrían aumentar la viscosidad de un medio acuoso determinado en función de su concentración, en el caso de lograrse un ensamblaje supramolecular apropiado.

www.bdigital.ula.ve

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. F López-Carrasquero. Fundamentos de Polímeros. Editor Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química, Mérida-Venezuela, 1-59 (2004).
2. R Morrison, R Boyd. Química Orgánica, 5ª edición, México, 1211-1238 (1998).
3. S Muñoz-Guerra. Introducción a los Polímeros: Química macromolecular, estructura y propiedades. Departamento de Ingeniería Química, Fundación Politécnica de Cataluña, Universidad Politécnica, España, 14-47 (1998).
4. R Seymour, C Carraher. Introducción a la Química de los Polímeros. Editorial Reverté, España, 181-233(2002).
5. A Pastor de Abram, I Higuera. Generalidades. En: Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Cap. 1. Págs. 25-65. Editora: Ana Pastor de Abram. Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú (2004).
6. C Lárez-Velásquez. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. **Rev. Iberoam. Polímeros**, **4(2)**, 91-109 (2003).
7. Z Mármol, G Páez, M Rincón, K Araujo, C Aiello, C Chandler, E Gutiérrez. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. **Revista Tecnocientífica URU**, N° 1, 54-55 (2011).
8. N Santoni, M Matos, C Müller-Karger, H Nicola, M Sabino, A Müller. Caracterización de hidrogeles de Quitosano entrecruzados covalentemente con genipina. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **9(3)**, 326-330 (2008).
9. L Perentena, C González, B Celis, A Valbuena, M Colina. Síntesis de bases de Schiff derivadas del quitosano por reacción con p-dimetilaminobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **16(1)**, 1-27 (2015).
10. C Lárez-Velásquez. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. **Avances en Química**, **1(2)**, 15-21 (2006).
11. F Goycoolea, E Angulló, R Mato. Fuentes y procesos de obtención. En: Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Cap. 3. Págs. 105-144. Editora: Ana Pastor de Abram. Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú (2004).
12. A Percot, C Viton, A Domard. Characterization of Shrimp Shell Deproteinization. **Biomacromolecules**, **4**, 1380- 1385 (2003).
13. M Colina, A Ayala, D Rincon, J Molina, I Medina, R Yncierte, J Vargas, B Montilla. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. **Revista Iberoamericana de polímeros**, **15 (1)**, 33-36 (2014).
14. N Acosta, C Jiménez, V Borau, A Heras. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. **Biomass and Bioenergy**, **5(2)**, 145-153 (1993).
15. A Castro. Formulación, síntesis, optimización y caracterización de dos tipos de nanosistemas de encapsulamiento basados en quitosano. Tesis de pregrado. Universidad de la República de Uruguay. Uruguay, 3-12 (2014).
16. W Arguelles, A Heras, N Acosta, G Galed, A Gallardo, B Miralles, C Peniche, J San Roman. Caracterización de quitina y quitosano. En: Quitina y quitosano: obtención, caracterización y

aplicaciones. Cap. 4. Págs. 157-195. Editora: Ana Pastor de Abram. Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú (2004).

17. C González, A Valbuena, B Celis, L Perentena, M Colina. Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrogeno. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **16(1)**, 43-68 (2015).
18. A Beato, T Pedroso, G González, M Gonzales- Quevedo. Tratamiento de las quemaduras de espesor parcial con quitina en polvo. **Rev. Médica Cubana**, **25 (1)**, 214-223 (1996).
19. T García, J Roca. Industrialización de los crustáceos para la obtención de quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. **Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial** (Universidad Nacional Mayor de San Marcos), **11(2)**, 24-32 (2006).
20. D Skoog, D West. Análisis Instrumental, Editorial McGraw Hill, 5ª edición, México, 353-355 (1989).
21. M Duarte, M Ferreira, M Marvão, J Rocha. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **Int. J. Biol. Macromol.**, **31**, 1-8 (2002).
22. I Fernández. Polímeros en solución y aplicación de los polímeros en la industria petrolera. PDVSA-Intevep. Departamento de Manejo Integrado de Producción. 1-14 (2003).
23. R Seymour, C Carraher. Introducción a la Química de los Polímeros. Editorial Reverte. Edición 3, 71-79 (1995).
24. D Escobar, A Castro, N Vergara. Determinación de la relación entre el porcentaje del grupo amino y el grado de desacetilación del quitosano. Universidad de Antioquia. 73-88 (2013).
25. D Skoog, D West, F Holler. Química Analítica. Sexta edición. Editorial McGRAW-HILL. México, 96-115, 328-356 (1995).
26. C Hidalgo, Y Suarez, M Fernández. Validation of potentiometric method to determine the degree of deacetylation of chitosan. **Ars. Pharm.**, **49 (3)**, 245-257 (2008).
27. D Balanta, C Grande, F Zuluaga. Extracción, identificación y caracterización de quitosano del Micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. **Rev. Iberoam. Polímeros**, **11(5)**, 297-316 (2010).
28. A Chirinos. Efecto del quitosano sobre la germinación y preservación sobre la semilla de calabacín (*Curcubita pepo*). Tesis de maestría. Universidad de los Andes. Venezuela, págs. 54-95 (2013).
29. S White, P Farina, I Fulton. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. **Applied and Environmental Microbiology**, **38(2)**, 323-328 (1979).
30. A Sánchez, M Sibaja, J Vega- Baudrit, S Madrigal. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. **Rev. Iberoam. Polímeros**, **8(4)**, 241-267 (2007).
31. C Lárez-Velásquez, A Rivas, W Velásquez, A Bahsas. Amidación del quitosano con cloruro de oleoil. **Rev. Iberoam. Polímeros**, **8(4)**, 229-247 (2006).
32. Y Chiu, M Chen, C Chen, P Lee, F Mi, U Jeng, H Sung. Rapidly in situ forming hydrophobically-modified chitosan hydrogels via pH-responsive nanostructure transformation. **Soft Matter**, **5(5)**, 962-965 (2009).
33. M El Fray, A Niemczyk, B Pabin-Szafko. Chemical modification of chitosan with fatty acids. **Prog. Chem. Appl. Chitin and its Derivative**, **XVII**, 29-35 (2012).

34. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, Methods 923.03 Cenizas, 16<sup>th</sup>, Edition, USA, Cap., 4, 40-42 (1990).
35. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, Methods 925.10 Humedad, 18<sup>th</sup>, Edition, USA, Cap., 4, 33-36 (2005).
36. L Parada, G Crespín, R Miranda, I Katime. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y titulación potenciométrica. **Revista Iberoamericana de polímeros**, **5 (1)**, 1-16 (2004).
37. J Sánchez. Análisis conductimétrico y viscosimétrico de polielectrolitos en disolución. Tesis de grado. Universidad de los Andes. Venezuela, Págs. 38-53 (2004).
38. J Rondón. Estudios de películas de quitosano y ácidos carboxílicos obtenidos de fuentes naturales. Tesis de grado. Universidad de los Andes. Venezuela, págs. 29-37 (2013).
39. L Wade, A Montaña, C Batalla. Química orgánica. España. Pearson Prentice Hall, Pags. 490-597 (2004).
40. SDBS (Spectral Database for Organic Compounds). [http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi).

www.bdigital.ula.ve

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## APÉNDICES

**Tabla A-1:** Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de ceniza del quitosano de partida y de la fracción soluble.

Muestra		Masa $\pm 0,0001$ (g)				
	Experiencia	Crisol vacío	Muestra	Crisol + muestra	Crisol + cenizas	% Cenizas
Quitosano de partida	1	20,8193	0,1006	20,9199	20,8232	3,8767
	2	21,4465	0,1022	21,5487	21,4497	3,1311
	3	28,2341	0,1042	28,3383	28,2375	3,2629
	<b>X <math>\pm \Delta X</math></b>					<b>3,4 <math>\pm 0,4</math></b>
Fracción soluble	1	28,7665	0,1027	28,8692	28,7701	3,5053
	2	34,8963	0,1032	34,9995	34,9003	3,8759
	3	29,9111	0,1024	30,0135	29,9152	4,0039
	<b>X <math>\pm \Delta X</math></b>					<b>3,8 <math>\pm 0,3</math></b>

**Tabla A-2:** Datos obtenidos para la determinación del contenido de humedad del quitosano de partida y de la fracción soluble.

Muestra		Masa $\pm 0,0001$ (g)				
	Experiencia	Crisol + tapa	Muestra	Crisol + muestra	Crisol + muestra desecada	% Humedad
Quitosano de partida	1	38,4121	0,1001	38,5122	38,5009	11,28871129
	2	37,1093	0,1024	37,2117	37,1994	12,01171875
	3	45,8387	0,1015	45,9402	45,9282	11,8226601
	<b>X <math>\pm \Delta X</math></b>					<b>11,7 <math>\pm 0,4</math></b>
fracción soluble	1	44,4969	0,1005	44,5974	44,5855	11,84079602
	2	51,1259	0,1027	51,2286	51,2175	10,80817916
	3	47,914	0,1014	48,0154	48,0031	12,13017751
	<b>X <math>\pm \Delta X</math></b>					<b>11,6 <math>\pm 0,7</math></b>

Tabla A-3: Datos obtenidos de la titulación potenciométrica para la determinación del GDD.

$V_{\text{NaOH}}$ (mL)	pH Titulación 1	pH Titulación 2	pH Titulación 3	pH Promedio	$V_{\text{NaOH}}$ (mL)	pH Titulación 1	pH Titulación 2	pH Titulación 3	pH Promedio
0	1,05	1,04	1,03	1,04	29,5	2,35	3,76	3,07	3,06
1	1,06	1,05	1,03	1,05	30	2,43	4,32	3,68	3,48
2	1,08	1,06	1,04	1,06	30,5	2,56	4,76	4,31	3,88
3	1,09	1,08	1,04	1,07	31	2,71	4,98	4,71	4,13
4	1,11	1,08	1,05	1,08	31,5	2,94	5,2	4,95	4,36
5	1,13	1,11	1,08	1,11	32	3,37	5,38	5,15	4,63
6	1,16	1,14	1,1	1,13	32,5	4,02	5,51	5,28	4,94
7	1,18	1,16	1,13	1,16	33	4,49	5,65	5,47	5,20
8	1,22	1,19	1,15	1,19	33,5	4,83	5,72	5,62	5,39
9	1,24	1,22	1,18	1,21	34	5,06	5,91	5,73	5,57
10	1,27	1,26	1,21	1,25	34,5	5,27	6,03	5,81	5,70
11	1,31	1,29	1,24	1,28	35	5,38	6,11	5,92	5,80
12	1,35	1,33	1,28	1,32	35,5	5,52	6,23	6,03	5,93
13	1,38	1,36	1,32	1,35	36	5,68	6,3	6,12	6,03
14	1,42	1,41	1,36	1,40	36,5	5,8	6,44	6,23	6,16
15	1,46	1,44	1,41	1,44	37	5,94	6,51	6,28	6,24
16	1,48	1,48	1,43	1,46	37,5	6,06	6,55	6,34	6,32
17	1,5	1,53	1,48	1,50	38	6,22	6,62	6,47	6,44
18	1,53	1,58	1,53	1,55	38,5	6,42	6,73	6,54	6,56
19	1,55	1,63	1,58	1,59	39	6,51	6,79	6,6	6,63
20	1,57	1,69	1,63	1,63	39,5	6,67	6,9	6,68	6,75
20,5	1,59	1,73	1,67	1,66	40	6,82	7,03	6,77	6,87
21	1,61	1,76	1,69	1,69	40,5	7,08	7,44	6,88	7,13
21,5	1,64	1,79	1,72	1,72	41	7,66	8,14	7,08	7,63
22	1,67	1,82	1,76	1,75	41,5	10,26	10,73	8,03	9,67
22,5	1,69	1,85	1,79	1,78	42	10,89	11,08	9,97	10,65
23	1,72	1,89	1,82	1,81	42,5	11,18	11,28	10,76	11,07
23,5	1,75	1,94	1,87	1,85	43	11,33	11,4	11,05	11,26
24	1,78	1,99	1,92	1,90	43,5	11,44	11,51	11,23	11,39
24,5	1,82	2,04	1,95	1,94	44	11,52	11,58	11,36	11,49
25	1,85	2,09	2	1,98	44,5	11,6	11,65	11,47	11,57
25,5	1,89	2,16	2,06	2,04	45	11,66	11,7	11,54	11,63
26	1,93	2,22	2,12	2,09	46	11,75	11,79	11,66	11,73
26,5	1,96	2,3	2,18	2,15	47	11,83	11,87	11,76	11,82
27	2,01	2,4	2,26	2,22	48	11,9	11,93	11,83	11,89
27,5	2,06	2,51	2,36	2,31	49	11,96	11,99	11,89	11,95
28	2,12	2,63	2,47	2,41	50	12,01	12,03	11,94	11,99
28,5	2,18	2,83	2,6	2,54	55	12,15	12,16	12,09	12,13
29	2,26	3,14	2,78	2,73	60	12,26	12,27	12,21	12,25

Tabla A-4: Datos obtenidos de la titulación conductimétrica para la determinación del GDD.

V <sub>NaOH</sub> (mL)	μS Titulación 1	μS Titulación 2	μS Titulación 3	μS Promedio	V <sub>NaOH</sub> (mL)	μS Titulación 1	μS Titulación 2	μS Titulación 3	μS Promedio
0	9,33	9,38	9,32	9,34	15,6	2,75	2,75	2,73	2,74
0,4	8,97	8,96	8,93	8,95	16	2,74	2,74	2,72	2,73
0,8	8,47	8,45	8,45	8,46	16,4	2,74	2,76	2,71	2,74
1,2	8,27	8,32	8,22	8,27	16,8	2,73	2,75	2,7	2,73
1,6	7,94	7,95	7,95	7,95	17,2	2,72	2,73	2,7	2,72
2	7,79	7,78	7,81	7,79	17,6	2,7	2,71	2,69	2,70
2,4	7,61	7,61	7,56	7,59	18	2,7	2,7	2,69	2,70
2,8	7,4	7,41	7,37	7,39	18,4	2,7	2,7	2,68	2,69
3,2	7,16	7,19	7,14	7,16	18,8	2,69	2,69	2,68	2,69
3,6	6,95	6,94	6,9	6,93	19,2	2,68	2,68	2,67	2,68
4	6,61	6,65	6,62	6,63	19,6	2,68	2,69	2,66	2,68
4,4	6,42	6,43	6,38	6,41	20	2,67	2,69	2,65	2,67
4,8	6,1	6,12	6,11	6,11	20,4	2,66	2,66	2,64	2,65
5,2	5,97	5,95	5,9	5,94	20,8	2,65	2,65	2,63	2,64
5,6	5,67	5,68	5,64	5,66	21,2	2,64	2,64	2,63	2,64
6	5,45	5,45	5,39	5,43	21,6	2,63	2,64	2,63	2,63
6,4	5,15	5,19	5,16	5,17	22	2,63	2,65	2,63	2,64
6,8	4,92	4,96	4,92	4,93	22,4	2,62	2,64	2,63	2,63
7,2	4,75	4,76	4,72	4,74	22,8	2,62	2,64	2,63	2,63
7,6	4,5	4,51	4,53	4,51	23,2	2,62	2,64	2,67	2,64
8	4,28	4,3	4,32	4,30	23,6	2,69	2,68	2,72	2,70
8,4	4,15	4,12	4,12	4,13	24	2,74	2,7	2,76	2,73
8,8	3,92	3,96	3,97	3,95	24,4	2,82	2,76	2,82	2,80
9,2	3,75	3,74	3,76	3,75	24,8	2,89	2,85	2,88	2,87
9,6	3,51	3,52	3,55	3,53	25,2	2,9	2,9	2,91	2,90
10	3,38	3,39	3,36	3,38	25,6	2,97	2,98	2,98	2,98
10,4	3,21	3,22	3,18	3,20	26	3,04	3,05	3,03	3,04
10,8	3,02	3,07	3,00	3,03	26,4	3,08	3,1	3,07	3,08
11,2	2,81	2,85	2,85	2,84	26,8	3,15	3,16	3,13	3,15
11,6	2,8	2,82	2,77	2,80	27,2	3,19	3,2	3,16	3,18
12	2,75	2,74	2,75	2,75	27,6	3,24	3,25	3,23	3,24
12,4	2,75	2,74	2,75	2,75	28	3,29	3,31	3,28	3,29
12,8	2,75	2,76	2,75	2,75	28,4	3,33	3,35	3,32	3,33
13,2	2,75	2,74	2,75	2,75	28,8	3,37	3,39	3,36	3,37
13,6	2,75	2,75	2,75	2,75	29,2	3,41	3,44	3,41	3,42
14	2,75	2,75	2,75	2,75	29,6	3,46	3,49	3,45	3,47
14,4	2,75	2,74	2,74	2,74	30	3,51	3,52	3,51	3,51
14,8	2,74	2,74	2,73	2,74	30,4	3,55	3,56	3,55	3,55
15,2	2,74	2,74	2,73	2,74	30,8	3,63	3,61	3,61	3,62

Tabla A-5: Datos obtenidos de la titulación potenciométrica para la neutralización del ácido oleico.

$V_{\text{HCl}}$ (mL)	pH Titulación 1	pH Titulación 2	pH Titulación 3	$V_{\text{HCl}}$ (mL)	pH Titulación 1	pH Titulación 2	pH Titulación 1
0	12,42	12,51	12,45	6,25	7,96	7,90	7,94
0,25	12,38	12,49	12,36	6,5	7,87	7,84	7,90
0,5	12,35	12,38	12,36	6,75	7,78	7,80	7,81
0,75	12,29	12,31	12,31	7	7,7	7,75	7,74
1	12,2	12,24	12,24	7,25	7,59	7,60	7,58
1,25	12,09	12,12	12,11	7,5	7,47	7,45	7,45
1,5	11,95	12,01	11,98	7,75	7,35	7,32	7,33
1,75	11,75	11,72	11,69	8	7,24	7,26	7,22
2	11,42	11,40	11,45	8,25	7,16	7,17	7,14
2,25	10,97	11,01	10,94	8,5	7,07	7,10	7,05
2,5	10,39	10,38	10,42	8,75	6,95	6,96	6,94
2,75	10,11	10,14	10,09	9	6,85	6,83	6,85
3	9,91	9,90	9,90	9,25	6,72	6,71	6,71
3,25	9,74	9,79	9,75	9,5	6,58	6,55	6,52
3,5	9,67	9,64	9,62	9,75	6,47	6,42	6,42
3,75	9,59	9,55	9,57	10	6,21	6,22	6,20
4	9,48	9,43	9,46	10,25	5,3	5,37	5,32
4,25	9,38	9,35	9,40	10,5	3,03	3,20	3,07
4,5	9,24	9,25	9,27	10,75	2,78	3,01	2,74
4,75	9,09	9,12	9,14	11	2,75	2,87	2,72
5	8,95	8,92	8,92	11,25	2,75	2,85	2,71
5,25	8,75	8,73	8,72	11,5	2,71	2,83	2,70
5,5	8,52	8,50	8,49	11,75	2,62	2,80	2,65
5,75	8,34	8,39	8,35	12	2,55	2,78	2,57
6	8,18	8,21	8,21				

**Tabla A-6:** Tiempos de elución de las soluciones durante la determinación del peso molecular viscosimétrico de la fracción soluble del quitosano.

Experiencia	[Quitosano] (g/dL)	Tiempos de elución (s)					Promedios
		1	2	3	4	5	
<b>0</b>	Buffer	62,46	62,25	62,27	62,26	62,17	62,28
	Sol. 1	140,49	140,28	140,47	140,39	139,91	140,31
<b>1</b>	Sol. 2	122,18	122,21	121,97	121,90	121,83	122,02
	Sol. 3	109,63	109,45	109,38	109,51	109,41	109,48
	Sol. 4	97,38	97,32	97,61	97,49	97,39	97,44
	Sol. 5	88,14	88,21	88,29	88,22	88,19	88,21
	Sol. 1	139,63	139,23	139,43	139,37	139,28	139,39
<b>2</b>	Sol. 2	122,06	121,78	121,81	121,78	122,02	121,89
	Sol. 3	108,84	108,69	108,91	108,97	109,00	108,88
	Sol. 4	98,13	98,15	98,21	98,12	98,15	98,15
	Sol. 5	89,61	89,42	89,51	89,47	89,41	89,48
	Sol. 1	138,98	140,20	141,14	140,59	142,04	140,59
<b>3</b>	Sol. 2	121,93	122,93	121,80	121,78	122,51	122,19
	Sol. 3	112,03	110,22	111,24	110,30	110,48	110,85
	Sol. 4	97,53	97,79	98,38	97,84	97,74	97,86
	Sol. 5	88,43	88,08	89,11	88,87	88,39	88,58

www.bdigital.ula.ve