

OBTENCION DE QUITINA Y QUITOSÁN POR UN MÉTODO SUSTENTABLE A PARTIR DE CÁSCARAS DE LANGOSTINO

OBTAINING OF CHITIN AND CHITOSAN BY A SUSTAINABLE METHOD FROM PRAWN SHRIMPS

Virginia Pasotti ⁽¹⁾*, Adelaida Ávila ⁽¹⁾, Marisa Martinelli ⁽²⁾

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta 1 s/Nº, Km 4, CP 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

²Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas. Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA). CONICET. Córdoba, Argentina.

vir_p76@hotmail.com

RESUMEN

En los últimos años, la investigación científica ha buscado orientar sus esfuerzos en la protección del medio ambiente con el objetivo de disminuir el impacto negativo de la acumulación de residuos y aprovechar recursos naturales desperdiciados para aumentar su valor. La Quitina (Qi) es el material de sostén presente en el exoesqueleto de artrópodos como langostinos y centollas. Los caparazones de langostino constituyen parte del residuo de la industria pesquera de particular preocupación en la costa Patagónica de nuestro país, por lo que existe una continua búsqueda de tecnologías efectivas para permitir su reutilización y capitalización. La obtención de Qi por fermentación láctica a partir de este residuo proporciona un método óptimo, sin generar exceso de residuos químicos. Por otro lado, permite aprovechar un subproducto de la industria láctea como es el lactosuero. El objetivo del presente trabajo fue aplicar una metodología sustentable para obtener Qi a partir de caparazones de langostino recolectados en el Golfo San Jorge y su conversión a Quitosán (Qh), por desacetilación alcalina, caracterizar el producto obtenido y evaluar su capacidad para formar películas. El Qh puede hincharse en medio acuoso, ligeramente ácido, formando *films* con amplia variedad de aplicaciones como las biomédicas. La caracterización estructural se realizó por espectroscopía infrarroja FTIR. Se obtuvo un mayor rendimiento

gravimétrico cuando se realizó la fermentación láctica durante 11 días y el Qh de langostino obtenido mostró un patrón de bandas similar al comercial.

PALABRAS CLAVE: fermentación, lactosuero, langostino, quitina, quitosán, sustentabilidad.

ABSTRACT

In recent years, scientific research has sought to guide its efforts in protecting the environment with the aim of reducing the negative impact of the accumulation of waste and taking advantage of wasted natural resources to increase their value. Chitin (Qi) is the support material present in the exoskeleton of arthropods such as prawns and spider crabs. Shrimp shells constitute part of the residue of the fishing industry of particular concern on the Patagonian coast of our country, so there is a continuous search for effective technologies to allow their reuse and capitalization. Obtaining Qi by lactic fermentation from this residue provides an optimal method, without generating excess chemical residues. On the other hand, it allows to take advantage of a by-product of the dairy industry such as whey. The objective of this work was to apply a sustainable methodology to obtain Qi from shrimp shells collected in the San Jorge Gulf and its conversion to Chitosan (Qh), by alkaline deacetylation, to characterize the product obtained and evaluate its capacity. to form films. Qh can swell in a slightly acidic, aqueous medium, forming films with a wide variety of applications such as biomedical. The structural characterization was carried out by infrared spectroscopy FTIR. A higher gravimetric yield was obtained when lactic fermentation was carried out for 11 days and the shrimp Qh obtained showed a band pattern similar to the commercial one.

KEY WORDS: fermentation, whey, shrimp, chitin, chitosan, sustainability.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una revolución en el desarrollo de biomateriales con nuevas propiedades y control de su biodegradabilidad. Los materiales más "verdes" son ampliamente utilizados, y la investigación química presta más atención al desarrollo de procesos sustentables. En este sentido, los estudios sobre polímeros

naturales como la quitina (Qi) y el quitosán (Qh), juegan un papel central en este momento. Debido a la creciente necesidad de reemplazar parte de los polímeros sintéticos, derivados del petróleo, cobra relevancia, en las últimas décadas, el estudio de la obtención de polímeros naturales derivados de fuentes renovables, como los polisacáridos, con

amplia utilidad en la industria biotecnológica y biomédica, Castro *et al.* (2011). Los polisacáridos, en general, son de carácter hidrofílico, no son tóxicos, son biocompatibles y biodegradables. Muchas de estas propiedades particulares son debidas a los grupos funcionales específicos que poseen dichas moléculas, como el grupo amino, el grupo acetamida y el grupo carboxilo que son susceptibles de modificación química para elaborar materiales funcionales avanzados (Kurita, 2006). La importancia del Qh como biomaterial, se sustenta en estas conocidas ventajas de biocompatibilidad y biodegradabilidad (Youseff y Lucian, 2012). Por otro lado, la industrialización y comercialización de crustáceos como el langostino, la centolla y el camarón en las costas del Golfo San Jorge generan grandes recursos económicos y a la vez, la producción de grandes toneladas de residuo tras la extracción de la parte comestible y el descarte de los caparazones. El residuo, en la provincia de Chubut es actualmente depositado sobre la playa, o bien enterrado en piletas naturales cavadas en la arena. Esto genera un impacto ambiental negativo, debido al desarrollo de microorganismos patógenos que utilizan estos depósitos como medio de cultivo y generan una cadena de descomposición difícil de resolver. Se producen alteraciones en el agua

subterránea con los productos de degradación (nitrogenados o fosforados) y la proliferación de vectores sanitarios (roedores, insectos, gaviotas), además de la generación de olores nauseabundos. La posibilidad de obtener biopolímeros, por un método sustentable, a partir de estos residuos, ha captado la atención de investigadores en los últimos años con el fin de resolver dos grandes inconvenientes, uno industrial y otro ambiental (Ambrosio, 2016). La especie más recogida de langostino en las costas patagónicas es el *Pleoticus muelleri*, del cual se desecha aproximadamente un 13% de caparazón total húmedo. La composición del caparazón de langostino, presenta un 15– 40% de Qi (α -quitina), proteínas alrededor del 20 al 40% y carbonato de calcio entre 20–50% como componentes principales, y presenta en menor cantidad pigmentos y otras sales metálicas (Ávila *et al.*, 2007). La Qi es un polisacárido, está presente en el exoesqueleto de artrópodos y en la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras. También se encuentra en las alas y en las cutículas de algunas especies de insectos (Colina *et al.*, 2014). Es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza luego de la celulosa (Jelen, 2003). La Qi (Figura 1) da por desacetilación el Qh (Figura 2), ambos son copolímeros lineales de residuos de N-

glucosamina (D-GlcN) y N-Acetil glucosamina (D-GlcNAc) distribuidos al azar y unidos mediante enlace β -1,4 y producen una estructura rígida no ramificada. Se diferencian en el número de grupos acetilados en la molécula (Romero Peñalosa, 2011). El contenido de grupos acetilo ($-\text{COCH}_3$) residuales (grado de acetilación), es el porcentaje de grupos acetilo aún presentes en la cadena de Qi, parcial o totalmente desacetilada (Rinaudo, 2006). La Qi es soluble en soluciones de dimetilacetamida o N-metilpirrolidona conteniendo del 5 al 7% de cloruro de litio. Es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes. Las metodologías de extracción utilizadas para obtener Qi se dividen en químicas y enzimáticas (Felse y Panda, 1999). Las primeras consisten en sucesivas etapas de desproteinización con hidróxido de sodio en caliente, desmineralización con ácido clorhídrico frío y blanqueo con hipoclorito de sodio. A pesar de que existen numerosos progresos en las metodologías químicas de obtención; el uso de soluciones concentradas de ácido y álcali continúan generando grandes cantidades de desechos corrosivos, presentan efectos en el peso molecular de los biopolímeros y en consecuencia en sus aplicaciones, además de hacer difícil la recuperación de sub-productos como hidrolizados proteicos, calcio y pigmentos. La

fermentación láctica es un proceso prometedor para la obtención de Qi, debido a la disminución de residuos químicos y la reutilización del suero de leche descartado en la industria láctea (Colina *et al*, 2014). De esta manera, la aplicación de procesos no agresivos favorece la recuperación de subproductos aumentando la sustentabilidad del proceso. Por su parte, el Qh, se obtiene a partir de un proceso de desacetilación de la Qi por métodos enzimáticos o químicos (Marcia *et al*, 2011). Es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos, debido a la presencia de grupos amino libres que, al ser protonados, promueven la solubilización. Se considera que el Qh posee un alto potencial para la elaboración de películas (*films*), con aplicaciones biomédicas, ya que tiene propiedades antimicrobianas que le permiten inhibir una amplia variedad de bacterias. Las películas elaboradas con este material son transparentes, con una tonalidad levemente amarillenta, cuentan con buenas propiedades mecánicas y presentan baja permeabilidad al O_2 y CO_2 . Su principal inconveniente es que son altamente permeables al vapor de agua. Sin embargo, esta dificultad puede minimizarse incorporando algunos aditivos o combinándolo con otro tipo de biopolímeros. La utilidad de estas películas está determinada por sus

propiedades mecánicas y de barrera, las cuales dependen de la microestructura y composición, aspectos básicos que aportan datos útiles y permiten caracterizar a las películas desarrolladas para su aplicación industrial (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltrán, 2012). Otro de los componentes que se incluyen en las formulaciones son los plastificantes; los cuales ayudan a mantener la integridad de las películas, ya que reducen su fragilidad, aumentando la flexibilidad y la resistencia a la ruptura (López, 2011). Debido a su origen natural, tanto la Qi como el Qh no presentan una estructura química única, sino que constituyen una familia de polímeros que presentan una alta variabilidad en el tamaño de las cadenas

(pesos moleculares de 50 kDa a 2000 kDa) y en sus propiedades fisicoquímicas (Hidalgo *et al*, 2009). La diferencia en su estructura química, respecto de la celulosa, debido a la presencia de grupos acetamida y amino le confieren a la Qi propiedades únicas y diferentes (Prashanth y Tharanathan, 2007).

Para lograr el objetivo del presente trabajo se aplicó la fermentación láctica, buscando obtener Qi por una metodología sustentable a partir de caparazones de langostino, con un rendimiento óptimo y Qh, mediante un proceso de desacetilación alcalina de la primera. Se caracterizó el Qh obtenido por espectroscopía infrarroja y se evaluaron sus propiedades.

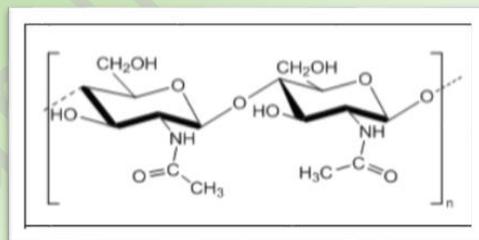


Figura 1. Estructura química de la quitina.

Figure 1. Chemical structure of chitin.

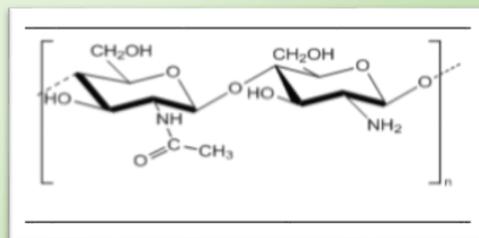


Figura 2. Estructura química del quitosán.

Figure 2. Chitosan chemical structure.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se trabajó con caparazones de langostinos (*Pleoticus muelleri*) proporcionados por industrias pesqueras de Comodoro Rivadavia, que recogen estos y otros productos de mar de las costas del Golfo San Jorge-Patagonia-Argentina.

Reactivos

Quitosán comercial ($C_{13}H_{14}O_9N_2$ LW, Aldrich), Ácido acético ($C_2H_4O_2$, Wiener, HAc), Hidróxido de sodio (NaOH, Wiener), Cloruro de Sodio (NaCl, Cicarelli), Ácido Clorhídrico (HCl, Cicarelli), Leche (descremada La Serenísima), Buffer pH 4 y 7 (Biopack).

Equipos

Equipo de fermentación (Figura 3), Microscopio infrarrojo FT-IR (Thermo Fisher Nicolet iN10), Balanza analítica (Mettler Toledo New Classic MF-Modelo MS 204S), Viscosímetro de Ostwald, Baño termostático, Peachímetro (Oakton pHtester2), Agitador Magnético (DLAB

MS-H-S), Estufa (Dalvo Instrumentos), Centrífuga (Arcano).

Obtención de Quitina (Qi)

Los caparazones de langostinos fueron lavados para extraer restos de materia orgánica. Se descartaron las colas, las patas y las cabezas. Finalmente fueron secados a temperatura ambiente y triturados con mortero hasta obtener un tamaño de partícula de 1 cm de lado aproximadamente. Se colocaron en el equipo de fermentación, dentro de un vaso de precipitados con el suero de leche, en una proporción 1:2 de material sólido/líquido. Para obtener el suero, previamente, se realizó una precipitación ácida, en caliente, de la leche líquida y se separó la parte sólida precipitada del suero sobrenadante. La fermentación se realizó a temperatura ambiente por un período 7 a 12 días. La mezcla se agitó cada 6 horas en forma manual. Luego de este tiempo, el sólido se separó y se lavó con abundante agua para finalmente secarse en estufa a 30°C hasta peso constante. El ensayo se realizó por triplicado.



Figura 3. Equipo de fermentación.
Figure 3. Fermentation equipment.

Obtención de Quitosán (Qh)

La Qi obtenida, en diferentes períodos de fermentación, fue desacetilada para obtener quitosán de langostino (Qhl). La reacción de desacetilación se llevó a cabo con solución de NaOH al 50% en una proporción 1:2 sólido/líquido a 100°C en baño de arena, durante 1,5 h. Se realizaron dos procedimientos de desacetilación a cada muestra de Qi. El sólido así obtenido se lavó con agua acidificada con HCl hasta pH neutro y se secó en estufa a 30°C hasta peso constante. Se determinó el rendimiento gravimétrico (RG) de cada muestra de Qhl obtenida, luego de 1 y 2 procedimientos de desacetilación a partir de la Qi. A partir de este paso se trabajó con la muestra seleccionada: quitosán de langostino obtenido a partir de quitina con 11 días de fermentación. (Qhl₁₁)

Determinación del Peso Molecular Promedio Viscosimétrico (Mv) del Qhl₁₁

El peso molecular del Qhl₁₁ se determinó por viscosimetría capilar utilizando un

viscosímetro de Ostwald y aplicando las ecuaciones de Huggins y Mark – Houwink – Sakurada. Se determinó primero la constante B del viscosímetro, para lo cual se calibró el instrumento con un buffer de ácido acético 0.1 M y NaCl 0.2 M sumergido en un baño termostático a 25°C (Kassai, 2007). Una vez calibrado, se preparó una solución de Qhl₁₁ al 2% p/v en buffer HAc 0,1 M y NaCl 0,2 M. A partir de esta última se prepararon diluciones de concentraciones 0,001, 0,003, 0,005, 0,007, 0,009, y 0,01 g/mL a las cuales se les midió el tiempo de escurrimiento, en el viscosímetro, por triplicado. A partir del valor obtenido para la viscosidad intrínseca $[\eta]$ se calculó el peso molecular promedio viscosimétrico del polímero. La viscosidad intrínseca tiene unidades de volumen/masa y está directamente relacionada con el peso molecular promedio del polímero en solución. (Mv)

Porcentaje de Desacetilación (DD) del Qhl₁₁

Para determinar el porcentaje de desacetilación del Qhl₁₁ se utilizó el método potenciométrico. Para ello, se preparó una disolución de 0,5 g del Qhl₁₁ en 20 mL de HCl 0,3 M (Jiang *et al*, 2003). A continuación, se tituló con una solución valorada de NaOH 0,1 M. El peachímetro se calibró a pH 4, 7 y 10. La valoración se llevó a cabo midiendo el pH cada 2 mL de base añadida, la adición se realizó de forma lenta y con agitación continua para homogeneizar la solución. Las medidas se realizaron por duplicado. Se realizó el mismo procedimiento con Qhc.

Preparación de los films de Qhc y Qhl₁₁ mediante Cold Casting

La técnica de Cold Casting consiste en verter sobre una caja de Petri de polipropileno, de 5 mm de diámetro, limpia y seca, 40 mL de la mezcla homogénea y centrifugada del polímero y dejar secar a temperatura ambiente. Para obtener los *films* de Qhl₁₁ y Qhc se preparó 40 mL de solución de cada polímero al 2% en HAc 5% v/v y se agitó por 48 h a 40°C en agitador magnético. Cada una de las mezclas se centrifugó y se volcó en la caja de Petri correspondiente. Se dejaron secar por 24-48 h a temperatura ambiente hasta peso constante. Los *films* obtenidos se conservaron a temperatura

ambiente (20°C, 30% HR) hasta su utilización. Se retiraron de la placa y se les midió su espesor con calibre en escala micrométrica.

Índice de Hinchamiento en el Equilibrio (Esw) de los films preparados

La capacidad de absorción de agua de los *films* se determinó mediante medidas de índice de hinchamiento en soluciones buffers a distintos pH (4,0 y 7,0), a temperatura ambiente. Para ello un trozo de cada film, de masa conocida (entre 100 y 200 mg) se introdujo en solución buffer durante 2 h, hasta alcanzar el equilibrio. Los trozos de *films* hinchados fueron colectados a diferentes tiempos de exposición, secados superficialmente y pesados en balanza analítica. El valor del índice de hinchamiento en el equilibrio (Esw) se calculó, luego, a partir de los datos medidos experimentalmente según las ecuaciones correspondientes (Schott, 1992).

Permeabilidad al Vapor de agua (WVP) de los films

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según una modificación del método desecante, descrito en la norma ASTM E96M-10. Cada *film* de aproximadamente 3,14 cm² (sin defectos como rajaduras, burbujas, etc.) se colocó dentro de un recipiente de permeación (2,0

cm de diámetro y 2,5 cm de profundidad) que contiene CaCl₂ anhidro. Una vez armado cada recipiente, se llevó a una cámara de humedad controlada. Los recipientes de permeabilidad con los *films* se pesaron en intervalos de 24 h, durante 7 días. Posteriormente se graficó la variación de la masa (g) de la cápsula (Δm) en función del tiempo (h). Se determinó la velocidad de transmisión al vapor de agua y la permeabilidad al vapor de agua según las ecuaciones correspondientes para el método utilizado. Esta determinación se realizó para los *films* preparados con Qhc y con Qhl₁₁.

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización del Qhl₁₁ se realizó mediante espectroscopía infrarroja y se comparó con el espectro del Qhc. Las mediciones se realizaron con un

Microscopio infrarrojo FT-IR (Thermo Fisher Nicolet iN10) en el Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC.

RESULTADOS Y DISCUSION

Rendimiento Gravimétrico

El rendimiento gravimétrico del Qhl obtenido por desacetilación de la Qi se calculó con la Ecuación 1 y se compararon los resultados de los periodos de 7 a 12 días de proceso de fermentación. En la Tabla I se detallaron, para los distintos días de proceso de fermentación (columna 1), la masa inicial de cáscara de langostino de la que se partió (columna 2), las masas finales, en g, luego de 1 (mDD₁) y 2 (mDD₂) procedimientos de desacetilación (columnas 3 y 4 respectivamente) y los porcentajes de rendimiento gravimétrico (RG₁ y RG₂) correspondientes (columnas 5 y 6).

Tabla I. Rendimientos de la obtención de quitosán a partir de quitina, obtenida por fermentación láctica en diferentes días.

Table I. Yields of obtaining chitosan from chitin, obtained by lactic fermentation on different days.

Días de fermentación	Masa inicial cáscara (g)	mDD₁ (g)	mDD₂ (g)	RG₁ (%)	RG₂ (%)
7	5,00	1,27	0,93	25,40	18,60
8	5,01	1,42	0,91	28,34	18,16
9	5,11	1,63	0,92	31,90	18,00
10	5,03	2,31	1,23	45,92	24,45
11	5,02	2,51	1,14	50,00	22,71
12	6,81	2,91	1,77	42,73	25,99

La muestra de Qi obtenida con 11 días de fermentación arrojó el mayor rendimiento con dos procedimientos de desacetilación, 50% en la primer desacetilación y 22,71% en la segunda, por lo que este es el tiempo seleccionado para el proceso y el quitosán de langostino obtenido (Qhl₁₁) se utilizó para las próximas determinaciones. El rendimiento de quitosán obtenido a partir de cáscaras de langostino por fermentación láctica depende en parte de la materia prima de partida y de las variables de la técnica implementada: tiempo de reacción, pH y agitación, entre otras. Por otro lado, puede ocurrir pérdida de masa inherente al proceso de lavado. En bibliografía se encontraron valores de rendimiento algo superiores, de 29,1% en la obtención de Qi a partir de caparazones de langostinos (*Pleoticus muelleri* argentine) por método químico y de 76,8 % para el quitosán obtenido por desacetilación con NaOH concentrado al 50%. El método de fermentación, sin embargo, aporta las ventajas de no generar residuos químicos y reutilizar el suero de la industria láctea (Dima *et al*, 2013). Se plantea seguir realizando futuros trabajos para mejorar los rendimientos gravimétricos del proceso.

$$RG \% = \frac{PESO\ PRODUCTO}{PESO\ DE\ CAPARAZONES} \times 100$$

Ecuación 1

Peso Molecular Promedio Viscosimetrico (Mv) del Qhl₁₁

El valor obtenido de Mv para el Qhl₁₁ fue de 4,64x10⁵ g/mol y la [η] fue de 337,1 Poise. Se determinó primero la constante B del viscosímetro, para lo cual se calibró el instrumento con una solución de HAc al 0,1 M y NaCl al 0,2 M, aplicando la ecuación 2 donde:

η = Coeficiente de viscosidad de la solución HAc/NaCl

B = Constante B del viscosímetro

δ = densidad de la solución HAc/NaCl a 25 °C.

t = tiempo requerido para que el fluido atraviese la marca desde el menisco superior al inferior.

La constante B determinada para el viscosímetro fue de 2,22 x 10⁻⁶ mL/s²cm.

La viscosidad intrínseca, [η] se determinó con la Ecuación 3 donde:

c = concentración en gramos de soluto en 100 mL de solución

η_{sp} = viscosidad específica

η = viscosidad de la solución

η₀ = viscosidad del solvente puro.

Se confeccionó un gráfico de $\left(\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0}\right)$ en función de c, este tiene una dependencia lineal con la concentración a concentraciones bajas, lo que permite extrapolar a concentración cero para hallar el valor de la [η]. La viscosidad intrínseca [η] del polímero se determinó entonces

extrapolando a concentración cero la gráfica de viscosidad reducida en función de la concentración en masa de las soluciones (Figura 4). Este valor se reemplazó en la ecuación 4 para calcular el peso molecular promedio viscosimétrico del polímero, donde la constante K y α son $1,81 \times 10^{-3}$ y 0,93 respectivamente, en las condiciones empleadas (densidad de la solución a 25°C, coeficiente de viscosidad de la solución: 1.056×10^{-5} poise) (Kassai,

2007). En la Tabla II se detallaron los resultados obtenidos.

$$\frac{\eta}{\delta} = Bt$$

Ecuación 2

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0} \right)$$

Ecuación 3

$$[\eta] = KMv^{\alpha}$$

Ecuación 4

Tabla II. Determinación de Peso Molecular del quitosán de langostino (Qh₁₁) por viscosimetría.
Table II. Determination of Molecular Weight of shrimp chitosan (Qh₁₁) by viscometry.

C (g/mL)	δ (g/mL)	t (s)	n (poise)	nsp/c (mL/g)
0	1,0032	4,742	$1,06 \cdot 10^{-5}$	
$1,00 \cdot 10^{-3}$	1,0329	6,760	$1,55 \cdot 10^{-5}$	$4,68 \cdot 10^{+2}$
$3,00 \cdot 10^{-3}$	1,0339	11,73	$2,04 \cdot 10^{-5}$	$5,16 \cdot 10^{+2}$
$5,00 \cdot 10^{-3}$	1,0345	22,83	$2,54 \cdot 10^{-5}$	$7,93 \cdot 10^{+2}$
$7,00 \cdot 10^{-3}$	1,0356	39,91	$3,03 \cdot 10^{-5}$	$1,10 \cdot 10^{+3}$
$9,00 \cdot 10^{-3}$	1,0360	49,54	$3,52 \cdot 10^{-5}$	$1,09 \cdot 10^{+3}$
$1,10 \cdot 10^{-3}$	1,0368	73,80	$4,02 \cdot 10^{-5}$	$1,51 \cdot 10^{+3}$

Debido a su alto peso molecular y a su estructura lineal no ramificada, el quitosán es un potente agente viscosante en medio ácido. El método viscosimétrico es uno de los más empleados en las determinaciones de pesos moleculares de polímeros por su exactitud y sencillez, y puede ser aplicado a todo el rango de masas macromoleculares, exceptuando el caso de

macromoléculas esféricas o muy ramificadas, debido a que en ellas la viscosidad es independiente del peso molecular. En la determinación de la viscosidad se emplean viscosímetros capilares del tipo Ostwald, entre otros (De la Paz *et al*, 2013). Para un fluido incompresible fluyendo a través de un capilar vertical, el flujo está gobernado por

la ley de Poiseuille. En soluciones poliméricas diluidas la viscosidad intrínseca $[\eta]$ es una medida del tamaño de una molécula en solución, dependiendo no sólo del tamaño de la macromolécula sino también de su conformación y de la naturaleza del solvente. La $[\eta]$ es una propiedad que viene determinada por la longitud y la conformación de las cadenas de quitosán, las cuales adquieren una forma de hélice extendida cuando se encuentran en solución, y aporta información sobre el peso molecular promedio del polímero (Weinhold *et al*, 2009). La viscosidad de las soluciones de quitosán aumenta al incrementarse la concentración de esta, mientras que disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación del producto (Kassai, 2007). Se hallaron en bibliografía valores de peso molecular de $2,39 \times 10^5$ y $3,1 \times 10^5$ g/mol para quitosán de langostino

(*Pleoticus muelleri argentine*) y cangrejo (*Ovalipes trimaculatus*) respectivamente, provenientes de Chubut, Argentina. Otros autores reportaron un peso molecular promedio de $4,40 \times 10^5$ g/mol para quitosán de cáscara de camarón (*Penaeus Vannamei*) proveniente de Quito, Ecuador (Dima *et al*, 2013), y de $5,54 \times 10^5$ g/mol para quitosán de cáscara de camarón (*Litopenaeus Vannamei*) proveniente de Lima, Perú (Rivera-Toapanta, 2013). La fuente de Qi y los incontrolados procesos de desacetilación son los principales factores que afectan las propiedades finales del producto (Pacheco López, 2010; Jáuregui- Nongrados, 2015). El peso molecular depende del proceso mediante el cual el Qh ha sido extraído; en general, condiciones severas de temperatura y concentración de reactivos provocan un acortamiento de la cadena (Tsaih y Chen, 2003).

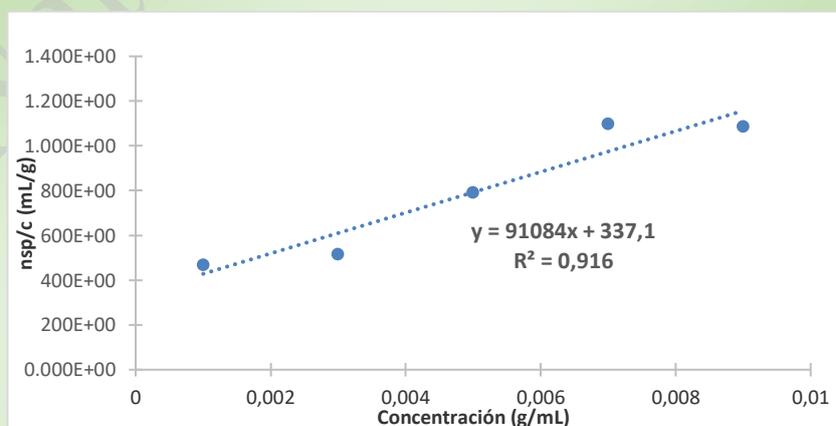


Figura 4. Gráfica de viscosidad reducida en función de la concentración en masa de las soluciones de quitosán para determinar el Mv de Qh₁₁ por viscosimetría.

Figure 4. Graph of reduced viscosity as a function of the mass concentration of chitosan solutions to determine the Mv of Qh₁₁ by viscometry.

Porcentaje de Desacetilación (DD) del Qh_{l11}

El contenido de grupos amino en el quitosán representa la proporción de unidades de D-glucosamina con respecto al número total de unidades en el biopolímero. Es una de las propiedades más importantes en la caracterización del quitosán pues, dependiendo de su valor, el polímero tendrá diferentes aplicaciones. Las propiedades fisicoquímicas del quitosán se atribuyen en gran medida al grupo amino, el cual a pH 6.4 o menor se encuentra protonado. El método utilizado en este trabajo fue la titulación potenciométrica. Se realizó una curva de titulación, gráfico de pH vs volumen de NaOH, (Figura 5) y luego se buscó la diferencia entre los dos puntos de inflexión que corresponden a la cantidad

de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosán (Hernández-Cocoletzi *et al*, 2009). (Figura 6) El DD se determinó de acuerdo a la Ecuación 5, donde (V₂-V₁) es la diferencia entre los dos puntos de inflexión mencionados, M es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso en gramos de la muestra seca de Qh_{l11} utilizada y 16,1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosán (Parada *et al*, 2004).

$$\%NH_2 = 16,1 \left(\frac{V_2 - V_1}{w} \right) M$$

Ecuación 5

El grado de desacetilación obtenido para el Qh_{l11} fue de 78,45% y para el Qhc de 69,91% (Tabla III).

Tabla III. Resultados de la valoración potenciométrica del quitosán comercial (Qhc) y de langostino (Qh_{l11}) Determinación del % DD.

Table III. Results of the potentiometric titration of commercial chitosan (Qhc) and shrimp chitosan. (Qh_{l11}) Determination of % DD.

Muestra	Conc NaOH (M)	(V ₂ -V ₁)	%DD
Qh _{l11}	0,097	10	78,45
Qhc	0,098	22	69,91

Usualmente, en el caso del Qhc se establece que el grado de desacetilación se encuentre comprendido entre el 60 y 95% (Dima et al, 2013). El conocimiento de este parámetro estructural es fundamental, ya que influye en la solubilidad, hidrofiliidad, densidad de carga, cristalinidad e incluso en la biodegradabilidad del quitosán. La desacetilación completa difícilmente se logra (Ramirez et al, 2016). Se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación de 0,66, es decir, que dos de cada tres de sus unidades se encuentran

acetiladas. Si bien existen a la fecha una gran cantidad de métodos reportados para estimar el DD de quitosán como espectrofotometría UV-Vis (Wu y Zivanovic, 2008), resonancia magnética nuclear (RMN) (Fernandez-Megia et al, 2005), espectroscopia de infrarrojo (FTIR) (Brugnerotto et al, 2001) y recientemente espectroscopia Raman (Zajac et al, 2015), la titulación potenciométrica es uno de los métodos más simples utilizado por la industria del quitosán debido a su bajo costo en reactivos y equipamiento (Jiang et al, 2003).

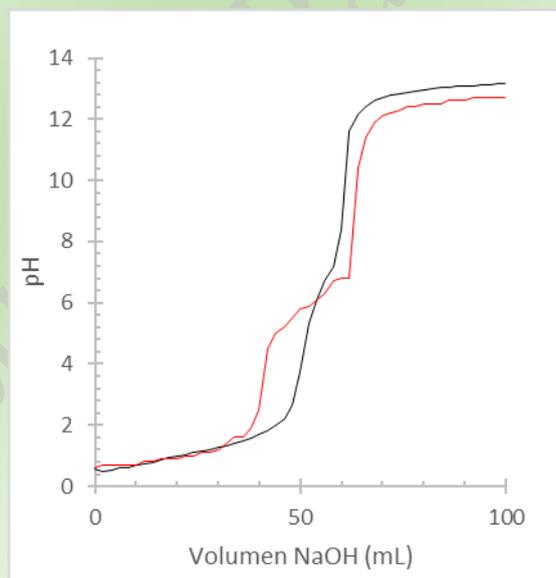


Figura 5. Curva de titulación potenciométrica del Qhl₁₁ y Qhc.
Figure 5. Potentiometric titration curve of Qhl₁₁ y Qhc.

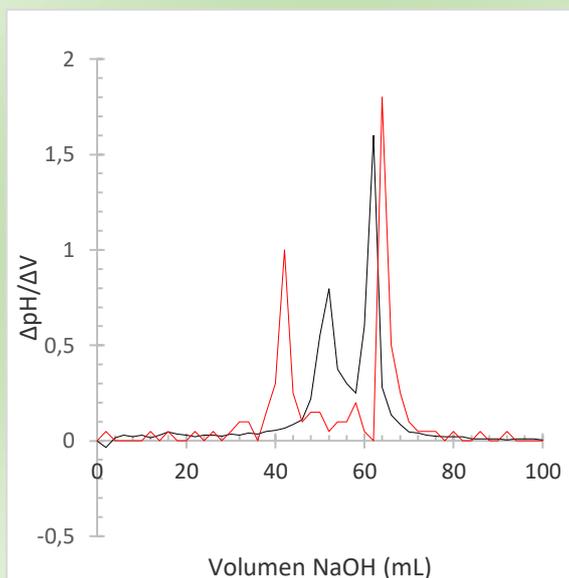


Figura 6. Determinación de grupos NH_2 del Qhl_{11} y Qhc .
Figure 6. Determination of NH_2 groups of Qhl_{11} y Qhc .

Preparación de los films

Se observa que los *films* obtenidos de Qhc y Qhl_{11} son uniformes, homogéneos, sin burbujas de aire en su superficie, delgados y levemente amarillentos. En 48 h se encuentran secos y se pueden retirar de la placa de polipropileno con facilidad presentando buena flexibilidad. Poseen un espesor de aproximadamente $50 \mu\text{m}$.

Índice de Hinchamiento en el Equilibrio (E_{sw}) de los films preparados

El índice de hinchamiento en equilibrio (E_{sw}) de los *films* fue calculado de acuerdo a la Ecuación 6, en soluciones buffers a pH 4,0 y 7,0, a temperatura ambiente, donde w_s es la masa en equilibrio de hinchamiento y w_0 la masa inicial de los *films*. Los valores de hinchamiento en el equilibrio para el Qhl_{11} fueron de 590 % a pH 4 y de 670 % a pH

7 (Figura 7). A pH 4, el *film* de Qhl_{11} alcanzó un valor de hinchamiento máximo de aproximadamente un 600%, mientras que el Qhc mostró un valor significativamente mayor de alrededor de 1000 %. A pH 7 el valor máximo de hinchamiento fue cercano a un 700% para el *film* de Qhl_{11} y 800% para el *film* de Qhc . De esta manera, se observó un alto incremento en el hinchamiento a pH 4 para el Qhc . Es importante destacar que tanto los *films* de Qhc como de Qhl_{11} fueron estables a ambos valores de pH mostrando un alto valor de hinchamiento y una rápida disolución en poco tiempo. El quitosán por ser un hidrogel, tiene la capacidad de absorber una gran cantidad de agua, aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento. La difusión incluye la migración de buffer en los espacios

preexistentes o dinámicamente formados entre las cadenas del hidrogel (Katime *et al*, 2001). El hinchamiento del hidrogel implica un aumento de la distancia de separación entre las cadenas del mismo. Debido a las múltiples posibilidades de aplicación de los polímeros hinchables, el mecanismo de difusión de solventes a

través de la red tridimensional de estos materiales ha recibido considerable atención en los últimos años (Benítez *et al*, 2011).

$$E_{sw} = \frac{w_s - w_o}{w_o} \times 100$$

Ecuación 6.

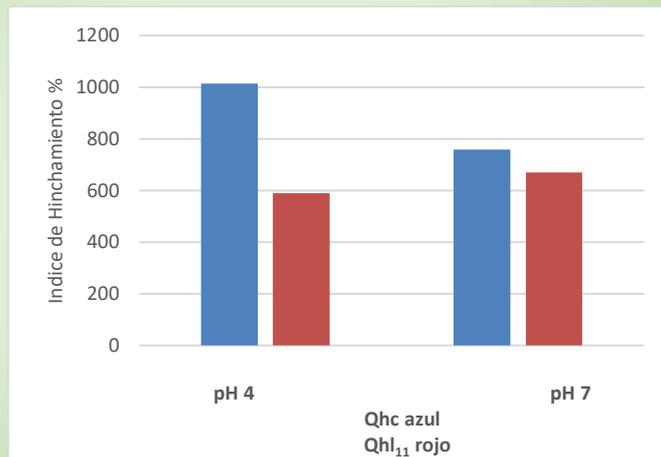


Figura 7. Índice de Hinchamiento en el equilibrio (Esw%) de los *films* de Qhc y Qhl₁₁ a diferentes pH.
Figure 7. Swelling Index at equilibrium (Esw%) of Qhc and Qhl₁₁ films at different pH.

Permeabilidad al vapor de agua

Se determinó la velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR, Kg s⁻¹m⁻²) a partir de la ecuación 7 y la permeabilidad al vapor de agua (WVP, Kg m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²) a partir de la ecuación 8.

$$WVTR = \frac{F}{A}$$

Ecuación 7

$$WVP = \frac{(WVTR \cdot e)}{S_p \cdot (RH_1 - RH_2)}$$

Ecuación 8

Donde *F* es flujo (pendiente del gráfico de variación de masa en función del tiempo) (g/h), *A* es el área de trabajo (área de la boca del recipiente m²), *e* corresponde al espesor de los *films* (m), *S_p* es la presión de saturación (Pa) a la temperatura de trabajo, *RH₁* es la humedad relativa en la cámara de humedad, y *RH₂* corresponde a la humedad relativa dentro de la celda de trabajo. Los valores de permeabilidad para los *films* preparados a partir de Qhl₁₁ y Qhc (Tabla IV) mostraron un valor de WVP, según la Ecuación 8, de 1,70 x10⁻¹² (gm⁻¹s⁻¹Pa⁻¹) para el film de Qhl₁₁.

Tabla IV. Valores de permeabilidad al vapor de agua y velocidad de transmisión al vapor de agua para films de quitosán comercial y quitosán de langostino.

Table IV. Water vapor permeability and speed of transmission to water vapor values for commercial chitosan films and shrimp.

	WVTR (g/dia.m ²)	Espesor (micras)	WVP (x10 ⁻¹² g/Pa.s.m)
Qhc	1710,6	53	5,10 ± 5
Qhl ₁₁	815,6	51	1,70 ± 5

La permeación del vapor de agua a través de un *film* hidrofílico, está relacionada con la solubilidad y la difusión de las moléculas de agua en la matriz polimérica. Este parámetro, resulta útil para entender el posible mecanismo de transferencia de masa en los *films*. Las películas de quitosán, tienden a retener el agua en su estructura, lo cual conduce al hinchamiento de la misma (Aldana *et al*, 2013). Para mejorar este inconveniente es que se recurre al agregado de agentes plastificantes (Trejo *et al*, 2001). A diferencia de los materiales poliméricos sintéticos hidrófobos, el WVP de las películas preparadas a partir de biopolímeros, depende de su espesor. Otros autores atribuyen el efecto del espesor a cambios en la estructura del film ocasionados por el hinchamiento que provoca el agua en el polímero (Bertuzzi *et al*, 2002).

FTIR

El Qhl₁₁ presentó un patrón de bandas semejante al observado para el Qhc. (Figura 8) Se obtuvieron las siguientes bandas: una banda de absorción característica a 3300 cm⁻¹, la cual corresponde a las vibraciones de estiramiento del grupo -OH. La banda de absorción característica del grupo amino (3260 cm⁻¹) se encuentra enmascarada por la banda de absorción amplia del grupo -OH. En el espectro se observan también bandas del estiramiento C-H a 2800 y 2900 cm⁻¹ y otras originadas por estiramientos C=O y N-H, característicos de grupos amida, entre 1.650-1.550 cm⁻¹. La banda característica a 1600 cm⁻¹ se relaciona con el grupo C=O presente en un grupo amida (I) y la banda de absorción relativa a deformaciones del grupo amino se observa a 1500 cm⁻¹. La banda centrada en 1300 cm⁻¹ (amida III) surge de vibraciones del estiramiento del grupo

metilo (C-H) presente en el grupo acetamido (R-NHCOCH_3) residual que está allí debido a la desacetilación incompleta de la quitina (Hernández-Cocoletzi *et al*, 2009). La banda observada a 1100 cm^{-1} se debe a la tensión asimétrica del grupo C-O-C, mientras que un conjunto de bandas características situadas en el rango de 1100 a 900 cm^{-1} corresponden a la vibración de la estructura piranósica del quitosán. La Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una de las herramientas más usadas para el estudio de los polímeros. El método FTIR es rápido y sensible, sus técnicas de muestreo son fáciles, la operación del equipo es simple, así como el servicio y

mantenimiento (Brugnerotto *et al*, 2001). Dado que los niveles de energía vibracional son diferentes para cada molécula (y sus isómeros), el espectro FTIR se puede considerar como la huella digital de cada molécula (López Serrano Ramos *et al*, 2015). Se basa en las vibraciones de los átomos y grupos funcionales en las moléculas a causa de su interacción con la radiación emitida en la región infrarroja del espectro electromagnético. El espectro se obtiene haciendo pasar a través de la muestra una radiación de la longitud de onda adecuada y determinando que fracción de la energía incidente es absorbida a causa de los diferentes movimientos moleculares.

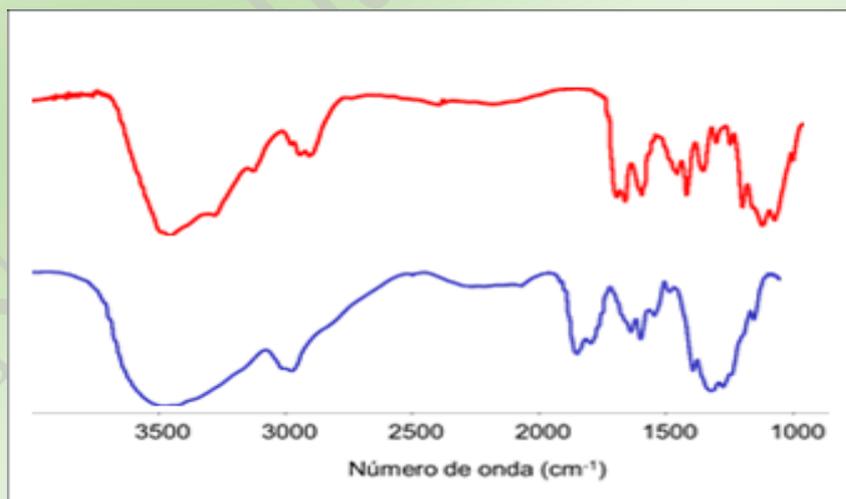


Figura 8. Espectro FTIR del Qhc y el Qhl₁₁.
Figure 8. FTIR spectrum of Qhc y el Qhl₁₁.

CONCLUSIONES

La fermentación láctica para obtener quitosán a partir quitina extraída de residuos de langostino resultó un proceso económico, efectivo y compatible con el cuidado del medio ambiente, permitiendo fundamentalmente disminuir la generación de residuos químicos como ácidos y álcalis.

El tiempo óptimo para el proceso de fermentación fue de 11 días dando un mejor rendimiento de producto obtenido.

El Qh₁₁, extraído de cáscaras de langostino, mostró características estructurales (FTIR) comparables al comercial lo que permitió la formación de *films* con propiedades comparables a los obtenidos a partir del polímero comercial. Los resultados fueron alentadores desde el punto de vista de la sustentabilidad y el cuidado del medio ambiente. Todo esto representa un impacto socio-económico importante para el área del Golfo San Jorge de la Patagonia ya que se reutilizaron, un desecho de la industria

pesquera, como materia prima, y un subproducto de la industria láctea, como reactivo, para obtener el polímero.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por la beca CIT de posgrado otorgada para la realización del Doctorado en Química.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud y Facultad de Ingeniería de la UNPSJB, Comodoro Rivadavia, Chubut.

Al Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA). CONICET.

A la Dra. Karina Bierbawer de CEPROCOR-CONICET-Córdoba.

A la directora de tesis, Dra. Marisa Martinelli de la UNC y a la co-directora Dra. Adelaida Ávila de la UNPSJB.

A la co-directora de beca CIT-CONICET Dra. María Isella Gutiérrez de la UNPSJB.

BIBLIOGRAFIA

Aldana, A.A., Strumia, M.C & Martinelli, M. 2013. Nanomodification of Chitosan Microspheres with Dendron Molecules. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **3**: 157-163.

Ambrosio, M. (2016). Procesamiento pesquero, disposición de residuos e impacto ambiental. <https://www.researchgate.net/publication/266409250>.

Ávila, A. Costamagna, V & Strumia, M. 2007. Obtención de Quitina y Quitosano a partir de caparzones de langostinos y centollas. *Naturalia patagónica*, **3**: 1-8.

Benítez, J.L., Contreras, D., Guzmán, P., Ramírez, A, Prin, J.L & Rojas de Gásque, B. 2011. Estudio de la difusión y cinética de hinchamiento en hidrogeles de poliacrilamida. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **12**: 292-299.

- Bertuzzi, M.A., Armada, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R & Jiménez, P. 2002. Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA, 1-10.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J & Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, **42**: 3569 – 3580.
- Castro, P. Nerlis, P. Olivero, V & Tadeo, J. 2011. Química verde: un nuevo reto. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, **21**: 169-182.
- Colina, M. Ayala, A. Rincón, D. Molina, J. Medina, J. Ynciarte, R. Vargas, J & Montilla, B. 2014. 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 Polimeros*, **15**: 21-43.
- De la Paz, N., Perez, N., Fernández, D., Lopez, O.D., Nogueira, A., Rapado-Paneque, M., Altanés-Valentin, S & García, C.M. 2013. Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Rev. Iberoam. Polim*, **14**: 84-91.
- Dima, J.B. Sequeiros, C. & Zaritzky, N.E. 2013. Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura. *Revista de Asociación Argentina de Ingeniería Química*, **57**: 1-19.
- Felse, P. & Panda, T. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, **20**: 505-512.
- Fernandez-Megía, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E & Riguera, R. 2005. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ¹H-NMR. *Carbohydrate Polymers*, **61**: 155 – 161.
- Hernández-Cocoletzi, H., Águila-Almanza, E., Flores, A.O., Viveros-Nava, E.L & Ramos-Cassellis, e. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, **22**: 57-60.
- Hidalgo, C. Fernández, M. Nieto, O.M. Paneque, A.A. Fernández, G & LLópiz, J.C. 2009. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **10**: 11-27.
- Jáuregui- Nongrados, J.R. 2015. Adsorción y desorción de iones plata sobre quitina y quitosano de *Litopenaeur Vannamei* (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- Jelen, P. 2003. Whey processing. Utilization and Products. In: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK. 2739-2745.
- Jiang, X. Chen, L & Zhon, W. 2003. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **54**: 457-463.
- Katime, I., Novoa, R & Zuluaga, F. 2001. Swelling kinetics and release studies of theophylline and aminophylline from acrylic acid/n-alkyl methacrylate hydrogels. *European Polymer Journal*, **37**: 1465-1471.
- Kassai, M.R. 2007. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental report viscosimetric constants data. *Carbohydr. Polym.*, **68**: 477 - 488.
- Kurita, K. 2006. Chitin y Chitosan: funcional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol*, **8**: 203 - 26.
- López, O.V. 2011. Desarrollo. Caracterización y Aplicación de Envases Biodegradables A partir de Almidón. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de La Plata.

- López Serrano Ramos, F & Mendizábal Mijares, E., Ortega Gudiño, P. 2015. Introducción a la Ciencia de los Polímeros. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Ecupei, Mexico, 155 pp.
- Marcia, E. Malespin, J. Sanchez, M & Benavente, M. 2011. Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos lácticos. *Nexo Revista Científica*, **24**: 33-42.
- Pacheco López, N.A. 2010. Extracción biotecnológica de Quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. *Food and Nutrition*. Universite Claude Bernard Lyon I. Español. NNT: 2010LYO10054.
- Parada, L., Crespin, G., Miranda, R & Katime, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Rev. Iberoam. Polim*, **5**: 1 - 16.
- Prashanth, K.H & Tharanathan, R.N. 2007. Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends Food Sci. Technol*, **18**: 117–131.
- Ramirez, C., Delgado E, & Andrade, A. 2016. Determinación del grado de desacetilación del quitosán mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*, **4**: 769-776.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci*, **31**: 603 – 632.
- Rivera-Toapanta, E.A. 2013. Evaluación de la capacidad de esferificación de quitosano como sustituto de alginato en la elaboración del falso caviar (tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Romero Peñalosa, E. L. 2011. Obtención de Hidrogeles de Quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de Cefalexina (Trabajo de Grado). Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.
- Rubio-Anaya, M & Guerrero-Beltrán, J.A. 2012. Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. **6**: 173-181.
- Schott, H. 1992. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **81**: 467–470.
- Trejo, V., Aragón, N & Miranda, P. 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Revista de la Sociedad Química de México*, **45**: 1-5.
- Tsaih, M.L & Chen, R.H. 2003. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Applied Polymer Science*, **88**: 2917 – 2923.
- Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M, Kumirska, J & Thöminga, J. 2009. Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations. *Carbohydrate Polymers*, **78**: 678 – 684.
- Wu, T & Zivanovic, S. 2008. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*, **73**: 248 – 253.
- Youseff, H & Lucian, A. L. 2012. Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials. J. Wiley & Sons, New York, 430 pp.
- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M & Dymińska, L. 2015. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **134**: 114 – 120.