

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE QUÍMICA



“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL Y  
CROMATOGRFÍA DE PERMEACIÓN”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:  
KARLA MARÍA CRISTALES VILLACORTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA,

SAN SALVADOR,

NOVIEMBRE DE 2004

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE QUÍMICA



“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL Y  
CROMATOGRFÍA DE PERMEACIÓN”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:  
KARLA MARÍA CRISTALES VILLACORTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ASESORES:  
Dr. LUIS GILBERTO PARADA GÓMEZ  
Lic. GUILLERMO DÍAZ CRESPIÁN

CIUDAD UNIVERSITARIA,

SAN SALVADOR,

NOVIEMBRE DE 2004

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE QUÍMICA

TRABAJO DE GRADUACION:

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL Y  
CROMATOGRFÍA DE PERMEACIÓN”

PRESENTADO POR:

KARLA MARÍA CRISTALES VILLACORTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ASESORES: Dr. LUIS GILBERTO PARADA GÓMEZ \_\_\_\_\_

Lic. GUILLERMO DÍAZ Crespín \_\_\_\_\_

CIUDAD UNIVERSITARIA,

SAN SALVADOR,

NOVIEMBRE DE 2004

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

RECTORA  
Dra. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ

SECRETARIA GENERAL  
Dra. ALICIA MARGARITA RIVAS DE RESINOS

FISCAL  
Lic. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

DECANO  
M. Sc. HÉCTOR ELÍAS DÍAZ

DIRECTORA ESCUELA DE QUÍMICA  
M. Sc. ROSARIO AMANDA RIVAS de ZEPEDA

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Todopoderoso  
Por permitirme lograr este triunfo

A mi Madre  
Por su apoyo y amor

A mi novio  
Por su amor y confianza

A mis familiares  
Por su apoyo

A mis Asesores  
Por facilitar la realización de este trabajo

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>6</b>
<b>FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
2.1 QUITINA Y QUITOSANO. ASPECTOS GENERALES	8
2.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	11
2.3 CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GEL	14
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>23</b>
3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	24
3.2 OBTENCIÓN DE LA QUITINA	24
3.3 OBTENCIÓN DEL QUITOSANO	25
3.4 ANÁLISIS CALORIMÉTRICO	26
3.5 CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GEL	27
3.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	27

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
4.1 ANÁLISIS CALORIMÉTRICO DEL QUITOSANO	30
4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL QUITOSANO	37
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 4.1</b> Tiempos de reacción, temperaturas y entalpías de vaporización del agua para las muestras de quitina y quitosano.	33
<b>Tabla 4.2</b> Tiempos de reacción, temperaturas y entalpías de degradación para las muestras de quitina y quitosano	35
<b>Tabla 4.3</b> Resultados del análisis del grado de acetilación por espectroscopía infrarroja de las muestras de quitosano.	36
<b>Tabla 4.4</b> Características de los patrones monodispersos de poli(óxido de etileno) utilizados para hacer curva de calibración.	39
<b>Tabla 4.5</b> Resultado del análisis de los cromatogramas para las muestras de Quitosano en análisis.	44

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Estructura de la unidad repetitiva de la quitina.	8
<b>Figura 2.2</b> Estructura de la unidad repetitiva del quitosano.	9
<b>Figura 2.3</b> Reacción de desacetilación de la quitina.	9
<b>Figura 2.4</b> Representación esquemática de la calorimetría diferencial de barrido.	12
<b>Figura 2.5</b> Termograma que muestra tres tipos de transiciones en un polímero.	13
<b>Figura 2.6</b> Proceso de separación al interior de una columna de permeación en gel.	16
<b>Figura 2.7</b> Esquema del mecanismo de separación en cromatografía de permeación en gel.	18
<b>Figura 2.8</b> Curva de calibrado de GPC empleando polímeros monodispersos.	20
<b>Figura 2.9</b> Cromatograma para el cálculo de los pesos moleculares promedio.	21
<b>Figura 4.1</b> Termogramas de (a) quitina, (b) quitosano-A, (c) quitosano-B, (d) quitosano-C y (e) quitosano-D, entre 20 y 500 °C.	30
<b>Figura 4.2</b> Termogramas de (a) quitina, (b) quitosano-A, (c) quitosano-B, (d) quitosano-C y (e) quitosano-D, entre 20 y 220 °C. Primer Barrido.	31
<b>Figura 4.3</b> Termogramas de (a) quitina, (b) quitosano-A, (c) quitosano-B, (d) quitosano-C y (e) quitosano-D, entre 20 y 220 °C. Segundo Barrido.	32

<b>Figura 4.4</b> Espectros infrarrojos para Quitosano-A, Quitosano-B, Quitosano-C y Quitosano-D, en la región de 1150 a 1980 $\text{cm}^{-1}$ .	36
<b>Figura 4.5</b> Curva de calibración cúbica para la columna PL aquagel-OH 40 con poli(óxido de etileno) a 25 °C.	40
<b>Figura 4.6</b> Curva de calibración lineal para la columna PL aquagel-OH 40 con poli(óxido de etileno) a 25 °C.	41
<b>Figura 4.7</b> Curvas cromatograficas para (a) quitosano-A, (b) quitosano-B, (c) quitosano-C y (e) quitosano-D.	43

## RESUMEN

El presente documento contiene los resultados de la caracterización de cuatro muestras de quitosano obtenidas por desacetilación química de la quitina extraída de exoesqueletos de camarón, a diferentes tiempos de reacción. Los métodos utilizados para la caracterización fueron la calorimetría diferencial de barrido y la cromatografía de permeación en gel.

Los resultados del análisis calorimétrico revelan que hay diferencias en el comportamiento térmico de las cuatro muestras de quitosano con respecto al de la quitina. Sin embargo, los termogramas correspondientes a las muestras de quitosano son prácticamente idénticos entre sí, lo que indica que el grado de acetilación es similar en todos los casos. Este resultado fue confirmado a partir del análisis de las muestras con espectroscopía infrarroja. Los datos obtenidos por cromatografía de permeación en gel demuestran que los pesos moleculares promedio de las cuatro muestras de quitosano son bastante similares.

# **INTRODUCCIÓN**

La quitina y el quitosano son polímeros naturales importantes. La quitina es un polisacárido que forma parte de la estructura de los exoesqueletos de camarón (también se encuentra en insectos, moluscos y hongos); es uno de los biopolímeros más abundantes. Está compuesta de unidades 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4). El quitosano es un biopolímero de carácter poliamínico, que se obtiene de la quitina por una reacción de N-desacetilación mediante un tratamiento con álcalis, está compuesto principalmente por unidades 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa.

El quitosano ha sido propuesto para muchas aplicaciones, entre ellas destaca el uso en el tratamiento de aguas residuales, en cosméticos, en la industria farmacéutica y la biomédica; esto se debe a sus propiedades características, ya que es un recurso abundante y de bajo costo.

En este informe se presentan los resultados de la caracterización de quitina extraída de exoesqueletos de camarón, y de cuatro muestras de quitosano obtenidas a diferentes tiempos de reacción. Se ha realizado el proceso de síntesis del quitosano, tomando como criterios de control de calidad del material la medida del peso molecular y del grado de acetilación, dado que estos parámetros ejercen gran influencia en varias de las propiedades como la solubilidad, actividad fisiológica, reactividad química y biodegradabilidad.

En la caracterización de los biopolímeros obtenidos se ha aplicado el método de calorimetría diferencial de barrido (DSC), una poderosa herramienta termoanalítica utilizada para monitorear cambios en las características químicas y físicas de los polímeros, ya que proporciona curvas únicas para una composición específica de material. Esta técnica detecta cambios leves en la estructura química o la arquitectura molecular, que se manifiestan como variaciones discretas y reproducibles en los termogramas. Por lo tanto la calorimetría diferencial de barrido permite determinar cambios ocurridos durante la modificación química de la quitina, tales como la desacetilación.

La cromatografía de permeación en gel (GPC), es una técnica en la que los componentes de una mezcla se separan en función de sus tamaños en disolución; lo cual la convierte en una importante herramienta de análisis para sustancias poliméricas. Los resultados esenciales que proporciona son los pesos moleculares promedio; dichos datos son necesarios para caracterizar los polímeros ya que las variaciones de estos conducen a diferencias en las propiedades y aplicaciones.

Además de esta introducción, el trabajo consta de otros cuatro capítulos. En el capítulo 2 se presentan los fundamentos teóricos relacionados con la temática en estudio. La descripción de las técnicas usadas en el trabajo experimental se realiza en el capítulo 3, mientras que en el 4 se describen los resultados obtenidos y se hace una discusión de ellos. Para finalizar, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones correspondientes.

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el quitosano obtenido por medio de la modificación química de la quitina, mediante el uso de la calorimetría diferencial de barrido y la cromatografía de permeación en gel.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Obtener quitina por un tratamiento químico partiendo del exoesqueleto de camarón.
- 2) Modificar la quitina para obtener cuatro muestras de quitosano, variando los tiempos de reacción.
- 3) Caracterizar las propiedades térmicas de los productos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.
- 4) Determinar los promedios de peso molecular mediante el empleo de cromatografía de permeación en gel.

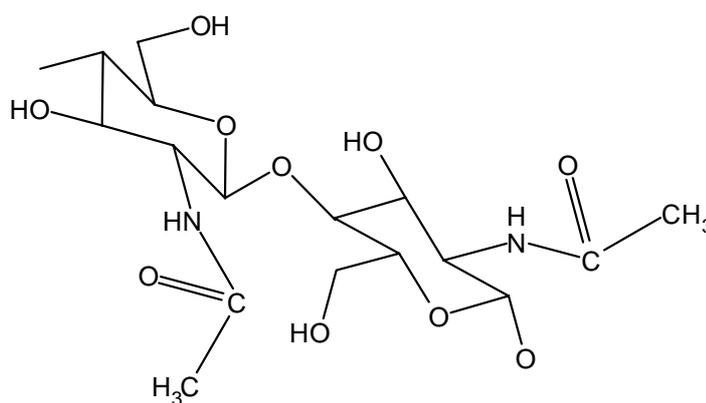
# **FUNDAMENTO TEÓRICO**

## 2.1 QUITINA Y QUITOSANO. ASPECTOS GENERALES

La quitina es un polisacárido considerado a menudo como un derivado de la celulosa, la diferencia en su estructura se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual en la quitina ha sido sustituido por el grupo acetamida y cuyo monómero es: 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa; la quitina es blanca, dura, inelástica y la mayor fuente de contaminación en áreas costeras [1,2].

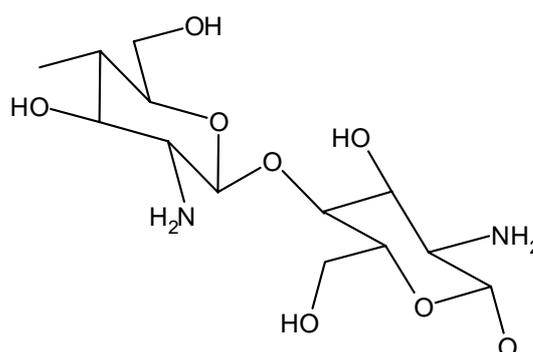
El quitosano es el derivado N-desacetilado de la quitina, contiene un grupo amino primario, su monómero es 2-amino-2-desoxi-D-glucosa; sin embargo, la N-desacetilación generalmente nunca es completa. La quitina y el quitosano son recomendados como probables sustituyentes de los polímeros sintéticos debido a que tienen excelentes propiedades tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad, toxicidad nula, etc. [3].

La quitina poli( $\alpha$ -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa) fue descrita por primera vez en 1811, se obtiene generalmente por un tratamiento químico de exoesqueletos de crustáceos, entre ellos el camarón (también lo encontramos en hongos, insectos y moluscos), su estructura se presenta en la figura 2.1.



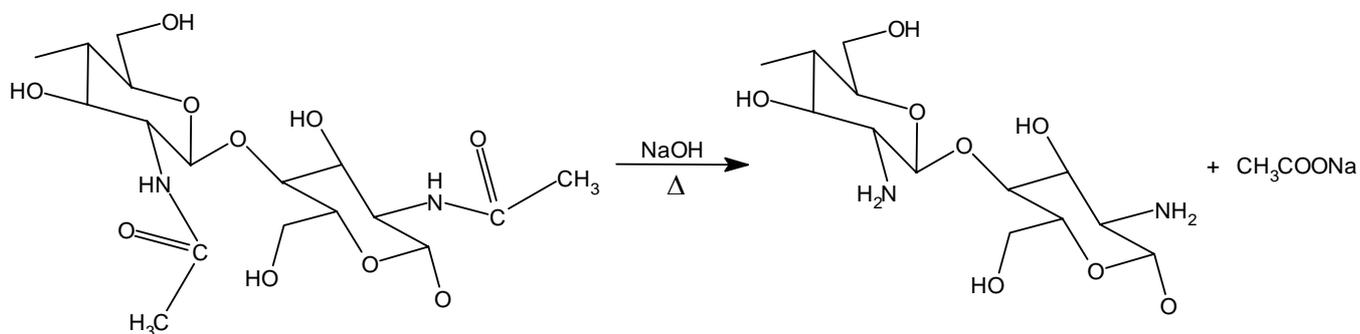
**Figura 2.1** Estructura de la unidad repetitiva de la quitina

El quitosano poli( $\alpha$ -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa), cuya estructura se presenta en la figura 2.2, es un polímero que se obtiene por modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el producto obtenido posee un comportamiento marcadamente básico debido al grupo amino libre en su estructura, lo cual además le proporciona ciertas características fisicoquímicas de gran interés industrial.



**Figura 2.2** Estructura de la unidad repetitiva del quitosano

La reacción de desacetilación para obtener el quitosano se realiza mediante el uso de un tratamiento con álcali concentrado y caliente, con el fin de retirar la mayor cantidad de unidades acetilo de la estructura del polímero [1]; la ecuación química correspondiente al proceso se presenta en la figura 2.3. Es importante aclarar que el proceso de desacetilación nunca es completo y, por tanto, el quitosano puede considerarse como un copolímero compuesto por unidades 2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa y 2-amino-2-desoxi-D-glucosa.



**Figura 2.3** Reacción de desacetilación de la quitina.

Al igual que la celulosa, la quitina realiza en la naturaleza funciones estructurales como polisacárido de soporte, pero difiere de la celulosa en sus propiedades. La quitina es altamente hidrofóbica e insoluble en muchos solventes orgánicos. El quitosano es soluble en ácidos diluidos como ácido acético y ácido fórmico.

La presencia de grupos amino en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto y obtención de películas entrecruzadas, de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc. [4].

En la caracterización del quitosano es importante determinar la distribución de pesos moleculares y su grado de acetilación, es decir la razón entre las unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y 2-amino-2-desoxi-D-glucosa. Estos parámetros tienen un efecto marcado en las propiedades mecánicas, térmicas y químicas del polímero.

Entre las diversas herramientas analíticas que se aplican para determinar el grado de acetilación están la espectroscopía infrarroja, la espectrofotometría ultravioleta y las valoraciones potenciométricas [5,6]. Otras técnicas utilizadas en la caracterización de estos polímeros es la calorimetría diferencial de barrido y la cromatografía de permeación en gel.

Los métodos térmicos, como la termogravimetría (TGA) la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis térmico diferencial (DTA) son técnicas utilizadas para monitorear los cambios en las características físicas y químicas en los polímeros naturales y sintéticos. Los termogramas son únicos para una composición en particular de un material, incluso cuando existan cambios sutiles en la estructura química y composición o en la arquitectura molecular, ya que estos darán una variación discreta y reproducible en el termograma [7].

La cromatografía de permeación en gel (GPC), también conocida como cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), es una variante de la cromatografía líquida en la cual los componentes de una mezcla se separan en función de sus tamaños. Dicha técnica tiene la particularidad de que, a diferencia de otras como la osmometría que sólo proporciona un promedio o momento en la distribución de pesos moleculares, permite calcular cualquier promedio pues nos proporciona el conocimiento de la propia distribución de pesos moleculares [8].

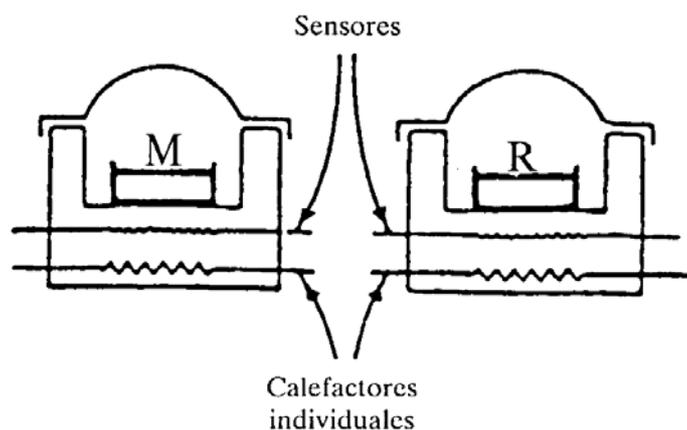
## 2.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis térmico diferencial (DTA), pertenecen junto con otras técnicas al análisis térmico, en las que se mide una propiedad física de una sustancia o de sus productos de reacción en función de la temperatura [9,10].

Estos métodos tienen una gran aplicación tanto en el control de calidad como en la investigación de nuevos materiales, tales como los polímeros, arcillas, minerales, metales y aleaciones, y presentan como ventajas la rapidez en la medida y la pequeña cantidad de muestra que necesitan (5-20 mg) [11].

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica en la que se miden las diferencias en la cantidad de calor, entre una sustancia y una referencia, en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado. Una pequeña cantidad de muestra problema se deposita en una cápsula, normalmente de aluminio, y es colocada en un compartimiento metálico. En otro compartimiento se coloca, como referencia, otra cápsula del mismo material empleado para depositar la muestra problema. Esta cápsula habitualmente está vacía o llena de un material inerte, que no sufre ninguna transición térmica en el intervalo de temperaturas de interés

para realizar el análisis. Los crisoles de la muestra (M) y la referencia (R) son calentados individualmente y la temperatura de ambos es también registrada individualmente (véase la figura 2.4).



**Figura 2.4** Representación esquemática de la calorimetría diferencial de barrido.

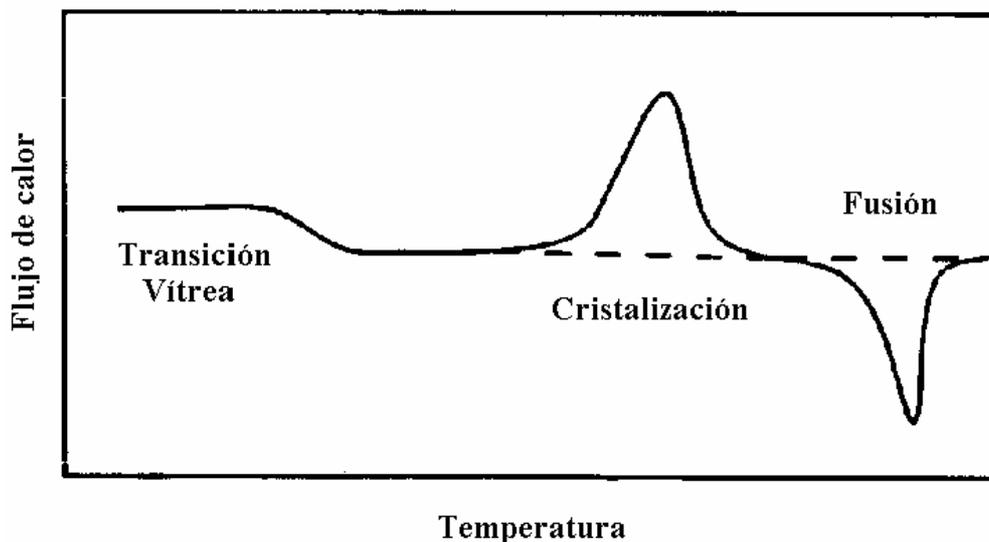
La celda de la muestra y la de la referencia son mantenidas a la misma temperatura, mediante un ajuste automático de la potencia calorífica, mientras ambas son calentadas o enfriadas a una velocidad constante,  $R=dT/dt$ . En cada instante se registra una señal proporcional a la diferencia entre la potencia calorífica suministrada a la muestra y a la referencia,  $(\partial H/\partial t)_p$ . A partir de esta señal y de la velocidad de calentamiento puede calcularse la capacidad calorífica de la muestra,  $C_p$ , tras adecuados calibrados del instrumento, ya que:

$$C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p = \left( \frac{\partial H}{\partial t} \right)_p \left( \frac{\partial t}{\partial T} \right)_p \quad (1)$$

La figura 2.5 ilustra un termograma de DSC de un polímero semicristalino. La disminución inicial en el flujo calorífico es debida a la transición de vidrio o transición vítrea, un fenómeno observado inicialmente cuando se calientan la mayoría de los

polímeros. Esto es debido a que estos materiales son sólidos formados por un rápido enfriamiento hasta temperaturas inferiores al punto de fusión encontrándose entonces inicialmente en un estado vítreo.

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), es la temperatura característica a la cual los polímeros amorfos vitrificados se hacen flexibles o parecen gomas debido a que se inicia el movimiento simultáneo de largos segmentos de moléculas del polímero, es decir que al ser calentado a una cierta temperatura el material pasa de vidrio a goma. Tales transiciones son acompañadas por un cambio en la capacidad calorífica, pero no un cambio en la entalpía ( $\Delta H = 0$ ). Dicha transición aparece en la curva de DSC como un discontinuidad en la línea base. El cambio de nivel en el termograma es proporcional a la diferencia de capacidad calorífica, de la muestra antes y después de la transición vítrea. La  $T_g$  puede tomarse como la temperatura en la cual tiene lugar la mitad del cambio de la capacidad calorífica,  $\Delta C_p$ .



**Figura 2.5** Termograma que muestra tres tipos de transiciones en un polímero.

A bajas temperaturas la muestra y la referencia están a la misma temperatura, cuando se alcanza la región de temperaturas correspondiente a la transición vítrea, se requiere un incremento en el flujo de calor hacia la muestra para compensar el cambio

brusco en la capacidad calorífica sufrido por ésta y mantener así muestra y referencia a la misma temperatura.

Tras pasar la transición vítrea el polímero adquiere movilidad y cristaliza desprendiendo calor. Por tanto, en esta región de temperaturas, el flujo de calor que se envía a la muestra debe ser menor que el flujo de calor que se envía a la referencia, a fin de mantener ambas a la misma temperatura. La diferencia entre los dos flujos de calor a lo largo del tiempo que dura el evento térmico produce un pico, cuya área es proporcional a la entalpía de cristalización. A temperaturas más altas ocurre la fusión que es un proceso endotérmico. Por tanto, el flujo de calor hacia la muestra es más alto que hacia la referencia y se obtiene un pico en sentido opuesto al anterior. El área bajo dicho pico endotérmico es proporcional a la entalpía de fusión.

## 2.3 CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GEL

Sin duda, el modo más comúnmente utilizado para realizar las separaciones analíticas es la cromatografía, un método que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. La cromatografía en columna fue inventada y denominada así, justo a principio del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett, quien empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, haciendo pasar las disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método ( del griego *chroma* “color”, y *graphein* “escribir” ) [11].

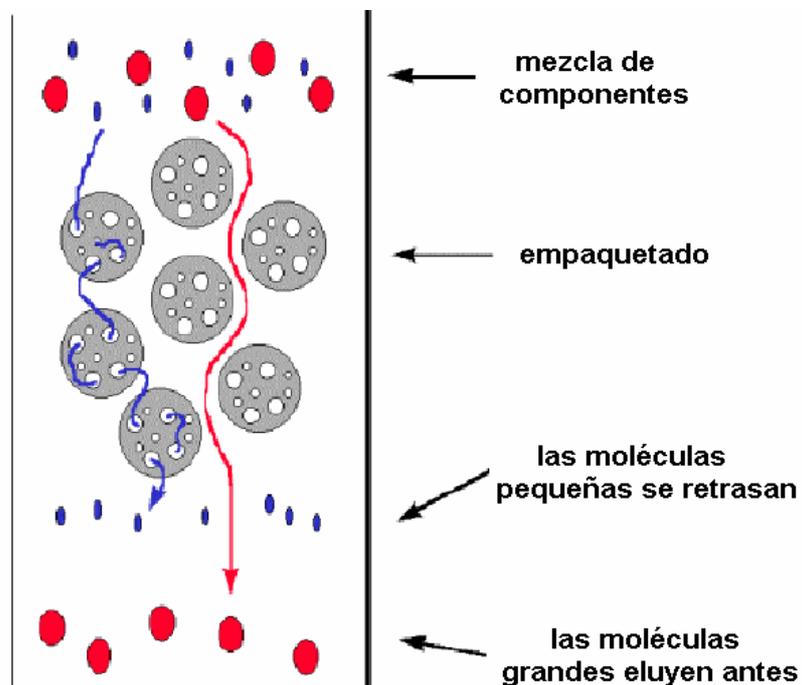
En todas las separaciones cromatográficas, la muestra es desplazada por una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes se distribuyan de modo distinto entre la fase estacionaria y móvil.

Aquellos componentes que son retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente con la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cuantitativa y cualitativamente [12].

Existen tres clases generales de cromatografía: cromatografía de gases, cromatografía de fluidos supercríticos y cromatografía de líquidos, dentro de esta última destaca la cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC, donde la fase móvil es un líquido. Existen cuatro tipos básicos de cromatografía de líquidos de alta resolución, la utilizada en este trabajo fue la cromatografía de exclusión por tamaños. La cromatografía de exclusión por tamaños SEC, que también se ha denominado cromatografía de permeación en gel (GPC) o de filtración en geles, es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular [13].

La GPC se basa en la diversa penetrabilidad en poros de las moléculas. No se trata de fuerzas claramente establecidas como adsorción, iónicas, partición, es decir no implica ninguna interacción química o física entre el analito y la fase estacionaria sino de una mayor o menor probabilidad de entrar en mayor o menor grado en los poros que poseen las partículas de relleno. Los rellenos para GPC están constituidos por pequeñas partículas ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) poliméricas o de sílice que contienen una red de poros uniformes en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente.

En consecuencia, si se dispone de un relleno poroso, con poros de un tamaño determinado, las moléculas de gran magnitud molecular, como no pueden entrar en los poros, permanecen menos tiempo en la columna, pues su trayectoria es lineal y no tan tortuosa como las moléculas de menor peso, lo que supone entrar por todos los poros que encuentre en su camino. En forma análoga, las moléculas pequeñas, que si pueden entrar en los poros ( siempre que sean mayores que su propia magnitud molecular), recorrerán un camino más sinuoso y por tanto, más largo, saliendo y eluyendo más tarde.



**Figura 2.6** Proceso de separación al interior de una columna de permeación en gel.

Cuanto menor es la magnitud molecular, mayor es la penetrabilidad y por ello, más largo el camino recorrido y en suma, mayor la retención; ver figura 2.6. Puesto que la penetrabilidad es diferencial para distintos pesos moleculares, es posible separar, con base en una emigración diferencial, muestras cuyos componentes o solutos tengan magnitudes de peso molecular apreciablemente diferentes.

Una ventaja que proporciona la cromatografía de permeación es la posibilidad de trabajar en fase normal o en fase reversa; en realidad, la GPC no admite en forma estricta el término fase normal o fase reversa, pues la polaridad del relleno no está condicionada por el tipo de solvente empleado. Sin embargo, se considera fase normal el utilizar una fase móvil orgánica, relativamente apolar y fase reversa al emplear una fase móvil acuosa, relativamente polar.

Por analogía a la nomenclatura derivada de los métodos de geles, la cromatografía de exclusión que opera en fase normal (con solventes orgánicos, para muestras lipófilas) se llama cromatografía de permeación en gel GPC, y para aquella que lo hace en fase reversa, (con solventes acuosos, para muestras hidrófilas) en ocasiones recibe el nombre de cromatografía de filtración en gel GFC, son iguales, pero con distinto modo operativo, rellenos, etc. [14].

El volumen total  $V_t$ , de una columna rellena con gel de sílice o polímero poroso viene dado por:

$$V_t = V_g + V_i + V_o \quad (2)$$

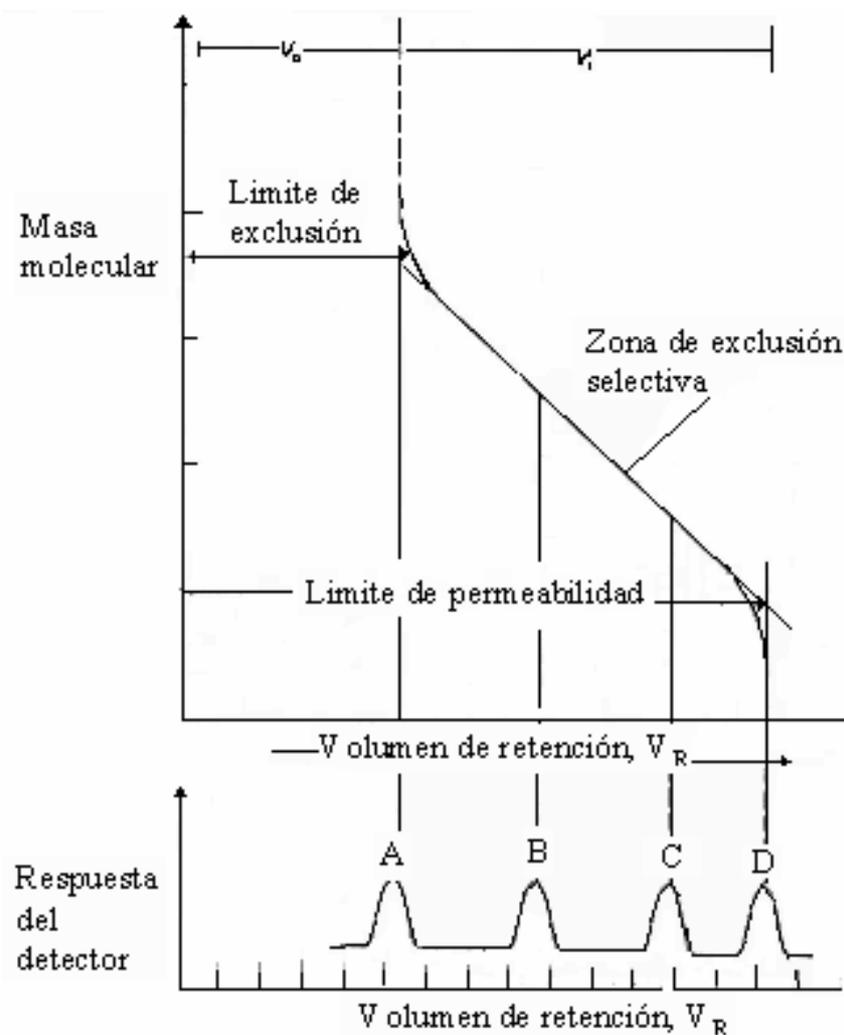
donde  $V_g$  es el volumen ocupado por la matriz sólida del gel,  $V_i$  es el volumen del disolvente en sus poros, y  $V_o$  es el volumen libre exterior a las partículas del gel. Asumiendo que no hay mezcla ni difusión,  $V_o$  también representa el volumen teórico de disolvente que es necesario para transportar a través de la columna a los componentes que son demasiado grandes para entrar en los poros del gel. Sin embargo, de hecho tiene lugar algo de difusión y de mezcla, y como consecuencia de ello los componentes que son retenidos aparecen originando una curva de forma Gaussiana con una concentración máxima en  $V_o$ . Los máximos de banda de los componentes que son suficientemente pequeños para entrar libremente por los poros del gel, aparece al final de la columna con un volumen de elución que corresponderá a  $(V_i + V_o)$ . Por lo general,  $V_i$ ,  $V_o$  y  $V_g$  son del mismo orden de magnitud y, por tanto, una columna de gel permite separar con un volumen mínimo de eluyente los componentes grandes de los pequeños en una muestra.

Las moléculas de tamaño intermedio pueden transferirse a una fracción  $K$  del disolvente que ocupa los poros; el volumen de elución  $V_e$  (el volumen de elución se define

como  $V_e = Ft$ , donde  $F$  es el flujo en mL/min y  $t$  el tiempo en minutos), para esas moléculas retenidas es:

$$V_e = V_o + KV_i \quad (3)$$

la ecuación anterior se aplica a todos los solutos que pasan por la columna. Para las moléculas que son demasiado grandes para entrar en los poros,  $K = 0$  y  $V_e = V_o$ ; para las moléculas que pueden entrar en los poros libremente,  $K = 1$  y  $V_e = V_o + V_i$ .



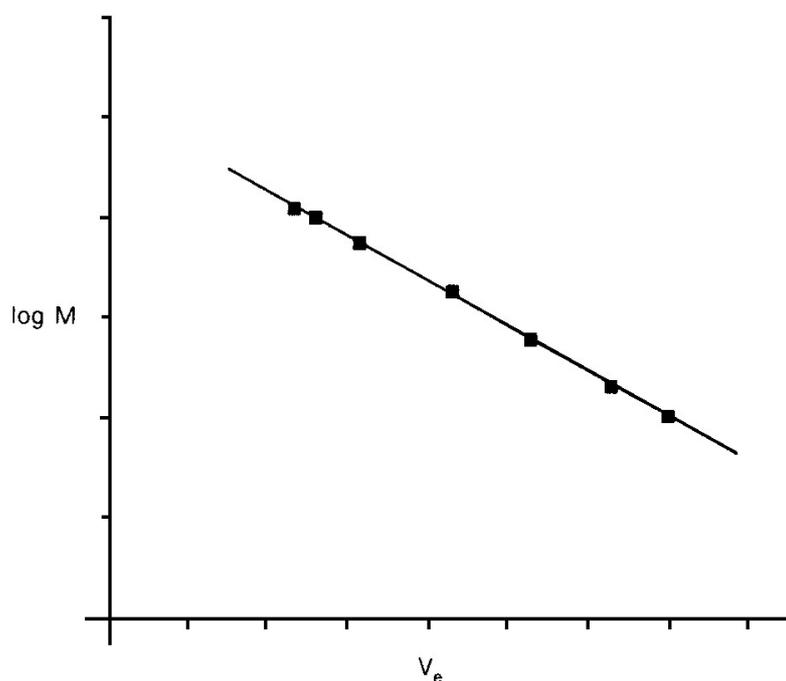
**Figura 2.7** Esquema del mecanismo de separación en cromatografía de permeación en gel.

Al deducir la ecuación (3), se considera que no existe interacción alguna, como la absorción, entre las moléculas del soluto y la superficie del gel. Si hubiera adsorción, la cantidad de soluto retenido intersticialmente aumentaría; y en tal caso, a las moléculas pequeñas les correspondería un valor de  $K$  mayor que la unidad.

El intervalo útil de pesos moleculares para una determinada columna de exclusión por tamaño, se obtienen convenientemente de una curva como la que se esquematiza en la figura 2.7. El límite de exclusión determina el peso molecular por encima del cual no existe retención. Todas las especies que tengan pesos moleculares mayores que el límite de exclusión, son tan grandes que no se retienen, y eluyen conjuntamente para dar el pico A en el cromatograma que muestra la figura.

El límite de permeabilidad es el peso molecular por debajo del cual las moléculas de soluto pueden penetrar completamente en los poros. Por debajo de este peso molecular todas las moléculas de soluto son tan pequeñas que eluyen en una sola banda, la indicada como D. A medida que los pesos moleculares disminuyen con respecto al límite de exclusión, las moléculas de soluto pasan cada vez más tiempo en los poros de las partículas y de este modo se mueven cada vez con mayor lentitud. Es en la región de permeabilidad selectiva en la que tienen lugar el fraccionamiento, dando lugar a picos de soluto individuales tales como los picos de B y C en la figura 2.7.

Una de las aplicaciones más útiles de la GPC consiste en la separación de moléculas de alto peso molecular y a la vez la determinación rápida de sus pesos moleculares, o de la distribución de pesos moleculares [9]. En el cromatograma la ordenada es la respuesta del detector, que es proporcional a la cantidad de polímero que eluye en cada instante; la abscisa es el volumen de elución, que está relacionado con el tamaño en disolución de las moléculas que van saliendo, aunque no exactamente con su peso molecular. Este razonamiento ilustra el hecho de que esta técnica no sea, en principio, una técnica absoluta de determinación de pesos moleculares sino que requiera la ayuda de alguna técnica auxiliar.



**Figura 2.8.** Curva de calibrado de GPC empleando polímeros monodispersos.

Se necesita, por tanto, relacionar el volumen de elución que se mide con el peso molecular de las cadenas que están saliendo en ese momento. Esto se puede llevar a cabo a través de un calibrado, existen tres formas fundamentales de calibrar, de nuestro interés será el calibrado con patrones monodispersos. En este tipo de calibrado se representa el logaritmo de los pesos moleculares de una serie de patrones de un mismo polímero, en función de los volúmenes de elución correspondientes a los máximos de sus respectivos cromatogramas. Estos patrones deben abarcar un variado intervalo de pesos moleculares y su polidispersidad debe ser menor a 1.1. En estas condiciones se tiene que todos los promedios de pesos moleculares son prácticamente coincidentes, es decir,  $\bar{M}_n \cong \bar{M}_v \cong \bar{M}_w$  y cualquiera de los promedios determinados empleando técnicas absolutas coinciden con el máximo del cromatograma ( $M_p$ ). Estas representaciones  $\log M$  vs  $V_e$  son usualmente lineales, ver figura 2.8, y siguen una ley del tipo:

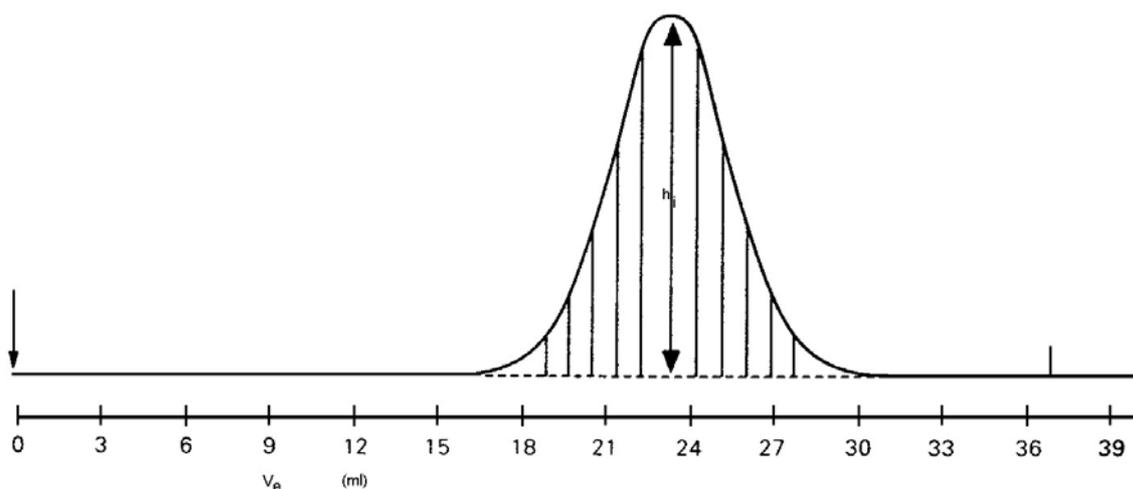
$$\log M = a + bV_e \quad (4)$$

donde A y B son dos constantes para la columna que estén empleando, fase móvil, caudal y polímero empleado [9].

Un cromatograma como el de la figura 2.9 proporciona una imagen de la distribución en disolución de las diferentes cadenas que constituyen la muestra y, por ende, de la distribución de pesos moleculares correspondiente. Para obtener los distintos pesos moleculares promedio de una muestra polimérica, en primer lugar, se interpola la línea base del detector a través del cromatograma y luego se divide éste en porciones equiespaciadas, como se indica en la figura. A continuación se determina la altura de cada porción con respecto a la línea base,  $H_i$ , que será proporcional a la cantidad o masa  $m_i$  de las moléculas eluídas al volumen  $V_i$ , es decir:

$$H_i = km_i \quad (5)$$

donde k es una constante de proporcionalidad, idéntica para todas las muestras.



**Figura 2.9** Cromatograma para el cálculo de los pesos moleculares promedio.

Así, el peso molecular promedio en número definido según la expresión:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum m_i}{\sum m_i / M_i} \quad (6)$$

en la que  $N_i$  se refiere al número de moléculas de peso molecular  $M_i$ , se transforma utilizando la expresión (5):

$$\bar{M}_n = \frac{\sum H_i}{\sum H_i / M_i} \quad (7)$$

de donde se deduce fácilmente que para obtener el peso molecular a partir de los datos cromatográficos es suficiente con conocer la altura en el cromatograma para un determinado volumen de elución, y el peso molecular correspondiente, que se determina utilizando la curva de calibración.

Análogamente el peso molecular promedio en peso puede calcularse a partir de las mismas variables como:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum m_i M_i}{\sum m_i} = \frac{\sum H_i M_i}{\sum H_i} \quad (8)$$

# **PARTE EXPERIMENTAL**

En la parte experimental se realizó la síntesis de quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón. Además, se efectuó la caracterización de las muestras por calorimetría diferencial de barrido y por cromatografía de permeación en gel. En este apartado se describen los procedimientos seguidos para la obtención de ambos polímeros, así como los procedimientos de las técnicas experimentales empleadas en su caracterización.

### **3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Los exoesqueletos de camarón fueron obtenidos en el mercado central de Santa Ana, sin haber seleccionado una especie en particular.

Las muestras fueron lavadas con abundante agua potable, se molieron en una licuadora convencional y se secaron por 3 días a 80°C. Posteriormente se tamizaron usando una malla Mesh N°40. La harina obtenida se colocó en un frasco de vidrio tapado y a temperatura ambiente.

### **3.2 OBTENCIÓN DE LA QUITINA**

La obtención de la quitina es un proceso en tres pasos: despigmentación química, desmineralización y desproteínización.

#### **a) Despigmentación química.**

Se colocan 20 gramos de exoesqueletos de camarón secados y tamizados en un balón de 3 bocas de 500 ml. Se añaden 200 ml de disolvente extractor: una mezcla de éter, acetona y agua en proporciones de 15:75:10.

Se cubre el balón con papel aluminio y se mantiene con agitación constante a temperatura ambiente, durante 2 horas. A continuación se procede a lavar la muestra varias veces con agua destilada y finalmente con acetona. Se coloca el producto en la estufa a 60°C el tiempo necesario para que se seque completamente.

b) Desmineralización.

En un balón de 500 ml se colocan 10 gramos de harina despigmentada y se añaden lentamente 150 ml de ácido clorhídrico 1n, mediante el uso de una ampolla de separación. el sistema se mantiene con agitación constante y a temperatura ambiente por tres horas. el producto se filtra y se lava hasta neutralizar con agua destilada, posteriormente se le hace un lavado con acetona y se seca en una estufa a 60°C.

c) Desproteinización.

Se colocan 10 gramos de harina despigmentada y desmineralizada en un balón de tres bocas de 500 mL de capacidad; se añaden 150 mL de NaOH al 10% y se mantiene a 65°C con agitación constante por 3 horas. Pasadas las 3 horas se suspende la reacción, se extrae el sobrenadante del balón y se repite el mismo proceso por 2 horas. El producto es quitina, que se lava con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad y finalmente se lava con acetona. El producto obtenido se seca en una estufa a 60°C.

### 3.3 OBTENCIÓN DEL QUITOSANO

Se colocan 150 mL de NaOH al 70% en un balón de tres bocas de 500 mL de capacidad provisto de condensador, termómetro y una varilla de seguridad. Se calienta en un baño de aceite a 140°C y se adicionan 5 gramos de quitina, manteniendo el sistema con agitación constante. Para obtener las cuatro muestras de quitosano se varió el tiempo de reacción, los cuales fueron de 60, 90, 120 y 150 minutos; pasado el tiempo el contenido se vierte sobre hielo para detener la reacción.

El producto es filtrado y lavado con agua hasta neutralización, finalmente se lava con acetona y se seca en la estufa a 60°C.

### 3.4 ANÁLISIS CALORIMÉTRICO

El análisis térmico diferencial (DTA) moderno permite transformar, con ayuda de un calibrado previo, el incremento de temperatura medido en una señal proporcional a los cambios de calor producidos durante el ensayo. La calorimetría diferencial de barrido (DSC), se basa en hacer que  $\Delta T$  sea nulo y así medir la diferencia de potencia o calor que se suministra a la muestra o a la referencia para conseguirlo. Para ello es necesario disponer de calentadores individuales para muestra y referencia. Es evidente que este último método es más apropiado puesto que se está midiendo directamente la propiedad que se desea estudiar. En la actualidad los aparatos utilizados son una mezcla de estos dos extremos, se trata generalmente de sistemas de termopares con una fuente de calor única.

Los termogramas que se presentan en este trabajo fueron hechos en un calorímetro diferencial Mettler, modelo DSC30, en el Grupo de Nuevos Materiales de la Universidad del País Vasco. Para realizar las medidas calorimétricas se utilizaron entre 5 y 10 mg de muestra, que se introdujeron en crisoles de aluminio; como referencia se utilizó un crisol vacío. Los experimentos consistieron en dos series separadas: un calentamiento de las muestras de -10 a 550°C y otro en el rango de 10 hasta 220°C. En el segundo caso, las muestras fueron calentadas hasta 220°C, enfriadas hasta 10°C y calentadas nuevamente en el mismo rango de temperaturas. Para cada serie se prepararon cuatro crisoles diferentes para cada muestra, los análisis se realizaron bajo un flujo continuo de nitrógeno de 10 ml/min y a una velocidad de calentamiento de 20°C/min.

### 3.5 CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GEL

La cromatografía de permeación en gel (GPC), es una variante de la cromatografía líquida en la cual los componentes de una mezcla se separan en función de sus tamaños en disolución. En esta técnica, las moléculas grandes eluyen primero de la columna, seguidas de las moléculas más pequeñas, lo cual constituye una importante herramienta de análisis para sustancias poliméricas. Los resultados esenciales que se obtienen son los pesos moleculares promedio, que son necesarios para caracterizar los polímeros ya que las variaciones de estos conducen a diferencias en las propiedades y aplicaciones.

Las medidas cromatográficas se realizaron en la Facultad de Ciencias y Farmacia de la Universidad de Navarra, en un cromatógrafo equipado con una bomba Waters 600 controller, automuestreador Waters 717plus, detector de índice de refracción Waters 2414 un inyector Rheodine, 7125, una columna Polymer Laboratories PL aquagel-OH 40 8  $\mu\text{m}$ , 300 x 7.5 mm y su respectivo ordenador. El volumen inyectado fue de 100  $\mu\text{l}$  en todos los casos y la velocidad de flujo de 1.0  $\text{cm}^3/\text{min}$ .

La curva de calibración se preparó a partir de nueve muestras monodispersas de polióxido de etileno suministradas por Polymer Laboratories, y cuyas características se describen en el apartado (4.2).

Las disoluciones de los patrones y de las muestras de quitosano se prepararon a una concentración de 2  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , utilizando como disolvente una disolución acuosa de AcOH (0.3 M)/NaOAc (0.2 M). Las soluciones se filtraron antes de la inyección en membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### 3.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

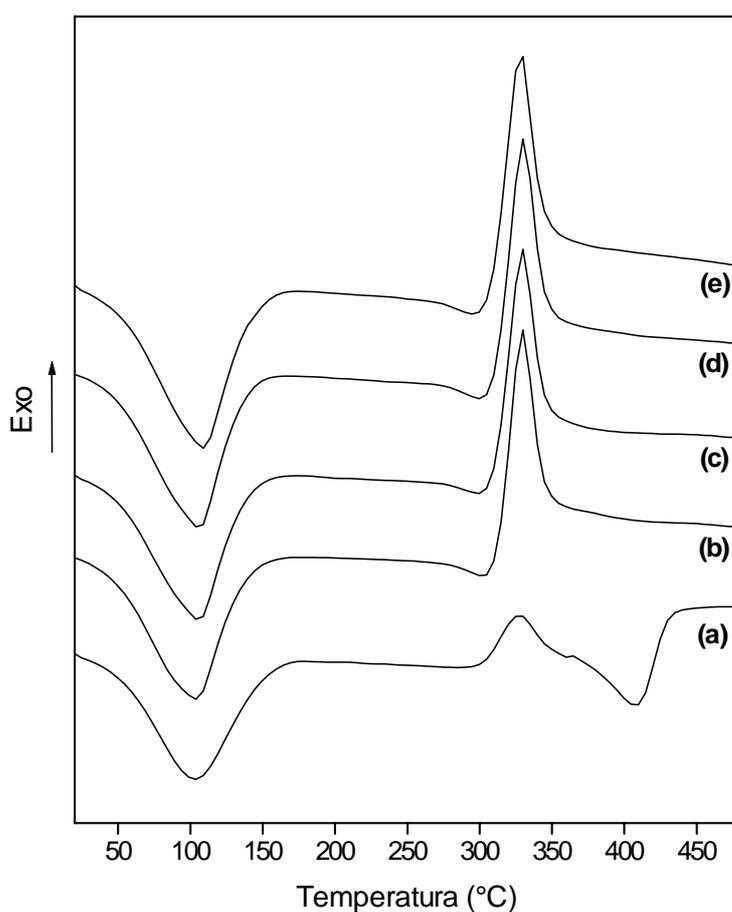
Los espectros infrarrojos de los polímeros fueron realizados en el Laboratorio de Instrumental de la Escuela de Química de la Universidad de El Salvador, con un equipo

ThermoNicolet modelo avatar 330 FT-IR. Este equipo permite trabajar en el IR medio ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) y dispone de un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). El almacenamiento de datos se efectúa en un ordenador. Los espectros se obtuvieron con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , y corresponden al promedio de 40 barridos en una muestra sólida de polímero en bromuro potásico (KBr).

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

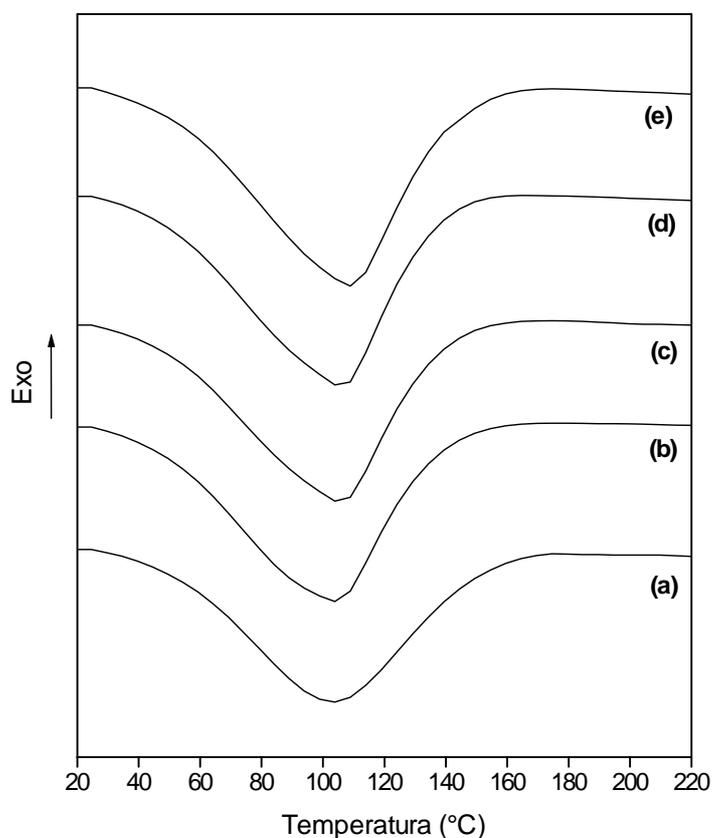
#### 4.1 ANÁLISIS CALORIMÉTRICO DEL QUITOSANO

En este apartado se presentan los resultados del análisis calorimétrico de la quitina y cuatro muestras de quitosano derivadas de ésta, obtenidas por desacetilación a diferentes tiempos de reacción. Los termogramas se muestran en la figura 4.1, éstos han sido determinados mediante un barrido en el intervalo de 20 a 500°C, a una velocidad de calentamiento de 20°C min<sup>-1</sup>.



**Figura 4.1** Termogramas de (a) quitina, (b) quitosano-A, (c) quitosano-B (d) quitosano-C y (e) quitosano-D, entre 20 y 500°C.

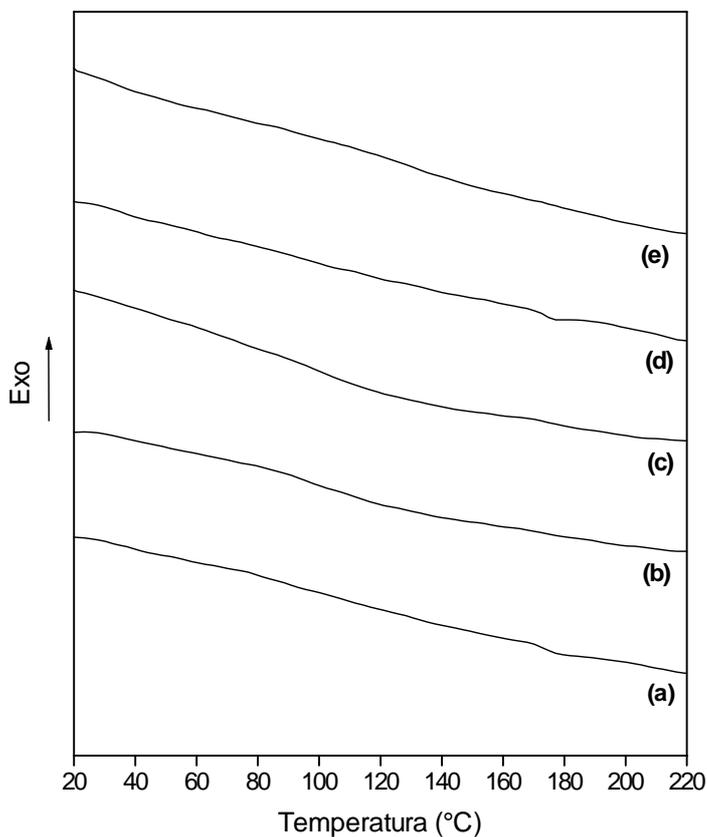
El primer evento térmico observado en todas las muestras es un pico endotérmico muy ancho, centrado aproximadamente a 106°C, que es debido a la evaporación del agua presente en las muestras [7]. Los valores para las temperaturas de evaporación y de sus correspondientes entalpías se presentan en la tabla 4.1.



**Figura 4.2** Termogramas de (a) quitina, (b) quitosano-A, (c) quitosano-B (d) quitosano-C y (e) quitosano-D, entre 20 y 220°C. Primer barrido.

El calentamiento de las muestras desde 10 hasta 220°C, a 20°C min<sup>-1</sup>, seguido de un segundo barrido realizado inmediatamente, en el mismo rango de temperaturas, produce un termograma en el que no se observa el pico endotérmico, lo cual confirma que en el primer

barrido calorimétrico ocurre la evaporación del agua asociada a las muestras (figuras 4.2 y 4.3).



**Figura 4.3** Termogramas de (a) quitina, (b) quitosano-A, (c) quitosano-B (d) quitosano-C y (e) quitosano-D, entre 20 y 220°C. Segundo barrido.

El intervalo de trabajo para los termogramas de las figuras 4.2 y 4.3 fue elegido por dos razones importantes: a) para obviar la señal endotérmica debida a la fusión del agua congelada alrededor de 0°C y b) para evitar la posible degradación de las muestras debida a los procesos que se observan arriba de los 300°C. Lo más importante a destacar es que ni la quitina ni las muestras de quitosano presentan el fenómeno de transición vítrea en el intervalo de trabajo, lo que está de acuerdo con lo que ha sido predicho por otros autores [15].

Los polisacáridos usualmente tienen una fuerte afinidad por el agua, en el estado sólido estas macromoléculas tienen estructuras desordenadas que pueden ser fácilmente hidratadas. La capacidad de hidratación de estos polisacáridos depende de su estructura primaria y supramolecular [16, 17]. Por tanto, se espera que la endoterma relacionada con la evaporación del agua refleje los cambios físicos y moleculares que suceden durante la desacetilación de la quitina.

**Tabla 4.1** Tiempos de reacción, temperaturas y entalpías de vaporización del agua para las muestras de quitina y quitosano.

Muestra	$\tau_R$ (min)	$T_V$ (°C)*	$\Delta H_V$ (mJ mg <sup>-1</sup> )*
Quitina	00.00	103.21	+218.76
Quitosano A	60.00	104.26	+335.08
Quitosano B	90.00	105.86	+341.81
Quitosano C	120.00	105.87	+343.12
Quitosano D	150.00	108.71	+349.65

\*Se presenta el promedio de dos determinaciones

Los resultados del análisis calorimétrico revelan que hay diferencias en el área de los picos endotérmicos de las cuatro muestras de quitosano, con respecto al de la quitina. Esto indica que estas macromoléculas difieren en su capacidad de almacenamiento de agua

y en la fuerza de interacción agua-polímero. El hecho de que la entalpía de vaporización incrementa al desacetilar la quitina (Tabla 4.1) indica que existe una correlación definida entre la capacidad de almacenamiento de agua y la estructura química y supramolecular de estos polímeros.

En la quitina las moléculas de agua están asociadas con grupos hidroxilo que son hidrofílicos. Cuando ocurre la desacetilación, los grupos amino formados constituyen nuevos centros hidrofílicos, que son capaces de enlazar una mayor cantidad de moléculas de agua a la cadena del polisacárido. Además, la disminución del orden de la estructura, debida a la modificación química, puede contribuir significativamente al aumento de la cantidad de agua absorbida.

Otro aspecto a destacar es que, a pesar de que las entalpías de vaporización de las cuatro muestras de quitosano obtenidas aumentan con el tiempo de reacción, las diferencias no son muy pronunciadas. Este resultado indicaría que los polímeros en cuestión tienen una capacidad de absorción de agua muy similar, y por tanto grados de acetilación bastante parecidos.

Es importante destacar las diferencias sustanciales que existen entre el termograma de la quitina (a) y los correspondientes a las muestras de quitosano (b)-(e), en la región comprendida entre 300 y 450°C (figura 4.1). Esa zona está dominada por eventos térmicos relacionados con procesos de degradación de estos polímeros.

El pico exotérmico que aparece para la quitina y el quitosano en el rango de 327 a 331°C, incrementa en intensidad a medida que aumenta el tiempo de reacción de las muestras. Sin embargo, sólo hay una diferencia marcada entre la entalpía de degradación de la quitina asociada a dicho pico, con respecto a la de las muestras de quitosano (véase la Tabla 4.2). Este comportamiento sugiere que la eficiencia de descomposición de la quitina

es diferente a la de sus análogos desacetilados, dado que existen diferencias obvias en el mecanismo de ruptura de las correspondientes estructuras.

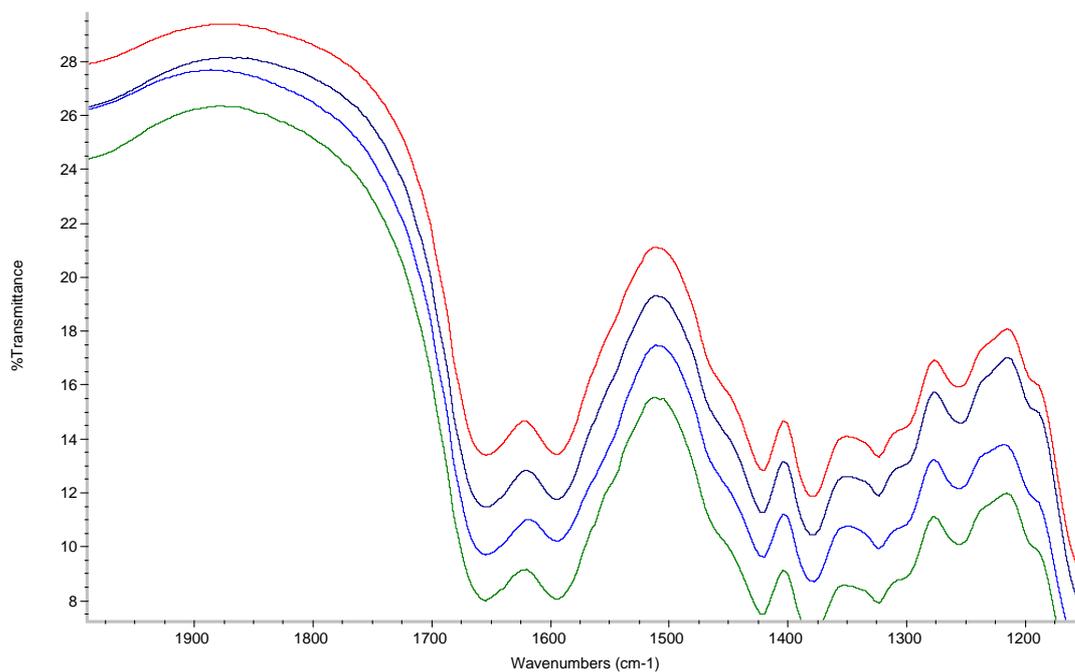
**Tabla 4.2** Tiempos de reacción, temperaturas y entalpías de degradación para las muestras de quitina y quitosano.

Muestra	$\tau_R$ (min)	$T_D'$ ( $^{\circ}\text{C}$ )*	$\Delta H_D'$ ( $\text{mJ mg}^{-1}$ )*
Quitina	00.00	327.89	-55.22
Quitosano A	60.00	330.13	-192.24
Quitosano B	90.00	330.09	-205.12
Quitosano C	120.00	330.84	-210.71
Quitosano D	150.00	328.76	-213.13

\*Se presenta el promedio de dos determinaciones

Trabajos previos han demostrado que cuando hay diferencias marcadas en el peso molecular, y por tanto en el grado de polimerización de las muestras de quitosano, se observa un desplazamiento en la posición del pico de degradación exotérmico de hasta  $10^{\circ}\text{C}$ ; asimismo, cuando hay diferencias importantes en el grado de desacetilación pueden observarse desplazamientos superiores a los  $100^{\circ}\text{C}$  [7].

En nuestro caso los valores de temperatura de degradación fluctúan en  $2.1^{\circ}\text{C}$ , por lo que cabría esperar que las muestras obtenidas no presenten mayores diferencias en el valor de los promedios de pesos moleculares, ni en el grado de desacetilación. Estos resultados concuerdan con los valores de grado de acetilación determinados por espectroscopía infrarroja.



**Figura 4.4** Espectros infrarrojos para Qitosano-A (—), Qitosano-B (—), Qitosano-C (—) y Qitosano-D (—), en la región de 1150 a 1980  $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 4.3** Resultados del análisis del grado de acetilación por espectroscopía infrarroja de las muestras de quitosano. Método de Baxter et al [5].

Muestra	$A_{1655} (\text{cm}^2)$	$A_{3450} (\text{cm}^2)$	$A_{1655}/A_{3450}$	$\text{GA}^*$ $(A_{1655}/A_{3450}) \times 115$
Quitosano A	0.1848	0.8103	0.2281	26.26% $\pm$ 0.27
Quitosano B	0.1735	0.7343	0.2363	25.32% $\pm$ 1.55
Quitosano C	0.1458	0.7008	0.2080	24.07% $\pm$ 0.73
Quitosano D	0.1485	0.7575	0.1960	23.93% $\pm$ 1.27

\*Se presenta la media de tres experimentos con su desviación estándar

## 4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL QUITOSANO

La determinación de los pesos moleculares promedio y la polidispersidad para las muestras de quitosano en estudio se realizaron por cromatografía de permeación en gel, en las condiciones descritas en la parte experimental. Las muestras de quitosano con un grado de acetilación inferior al 50% son solubles en disoluciones ácidas diluídas, en las cuales el polímero se comporta como un polielectrolito catiónico. En contraste con los polímeros hidrofílicos neutros, la caracterización de polielectrolitos por cromatografía de permeación en gel acuosa es más compleja. En primer lugar, el tamaño de las moléculas de polielectrolito es altamente dependiente de la fuerza iónica y, por tanto, de su concentración y de la presencia de otras especies iónicas. En segundo lugar, se presentan los efectos de la inclusión iónica. La exclusión iónica puede ser superada adicionándole a la fase móvil un electrolito apropiado de bajo peso molecular [18].

La densidad de carga en el polielectrolito, y la que puede estar presente en la fase estacionaria, puede causar interacciones de tipo iónico. Este fenómeno se presenta en polímeros catiónicos, porque en la mayoría de geles que son utilizados en las columnas de permeación están presentes por lo general grupos cargados negativamente. El pH de la solución es importante para controlar el grado de ionización de las especies poliméricas y de los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte. Todas estas interacciones del soluto con la fase estacionaria son indeseables en la determinación de pesos moleculares de polimeros.

Tomando en cuenta los aspectos señalados anteriormente, las medidas de cromatografía de permeación en gel de las disoluciones de quitosano se realizaron usando como fase móvil una disolución acuosa de AcOH (0.3 M)/ NaOAc (0.2 M). Es de esperar que la presencia de AcOH inhiba la ionización de grupos presentes en la superficie del soporte y, de esa forma, reducir la adsorción del quitosano. La adición de NaOAc (0.2 M) genera la suficiente fuerza iónica para evitar los efectos de la exclusión iónica; debe evitarse una concentración de sal demasiado alta dado que se produciría un incremento en el pH.

La mayoría de macromoléculas difieren de las moléculas pequeñas en que no pueden ser caracterizadas por un peso molecular único, esto se debe a que están constituidas de una distribución de cadenas de diferente longitud, y por tanto, de diferente peso molecular. Esta distribución puede ser descrita por diversos promedios del peso molecular, los más comúnmente utilizados para establecer la relación existente entre el peso molecular y las propiedades del material son el promedio en número ( $\bar{M}_n$ ) y promedio en peso ( $\bar{M}_w$ ). Estos se definen por las siguientes expresiones:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum m_i}{\sum m_i / M_i} = \frac{\sum H_i}{\sum H_i / M_i}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} = \frac{\sum m_i M_i}{\sum m_i} = \frac{\sum H_i M_i}{\sum H_i}$$

La expresión de la derecha es la utilizada para determinar los promedios a partir de los cromatogramas;  $H_i$  es la altura del cromatograma, a partir de la línea base, correspondiente a un determinado volumen de elución,  $M_i$  es el respectivo peso molecular para dicho volumen que se determina por calibración por estándares apropiados.

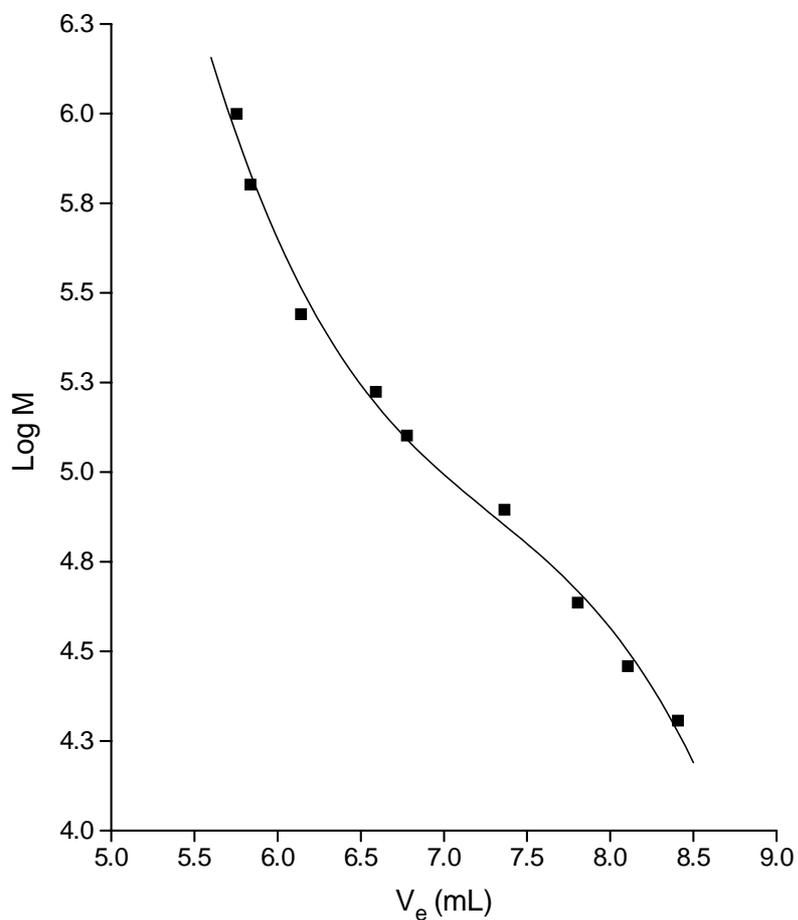
La calibración con polímeros monodispersos consiste en inyectar en el cromatógrafo muestras de polímeros de pesos moleculares conocidos ( $M_p$ ) y de baja polidispersidad, y determinar el volumen de elución correspondiente a cada muestra. La representación del logaritmo natural de los pesos moleculares frente a los volúmenes de retención se ajustan por lo general a una línea recta o a una función polinomial de tercer orden.

**Tabla 4.4** Características de los patrones monodispersos de poli(óxido de etileno) utilizados para hacer la curva de calibración.

Patrón	M (g mol <sup>-1</sup> )	$\bar{M}_w / \bar{M}_n$	V <sub>e</sub> (mL)*
POE A	20300	1.02	8.408
POE B	28700	1.04	8.107
POE C	43250	1.03	7.805
POE D	78450	1.07	7.364
POE E	126500	1.02	6.778
POE F	167700	1.02	6.591
POE G	276300	1.03	6.141
POE H	634000	1.08	5.837
POE I	997000	1.07	5.754

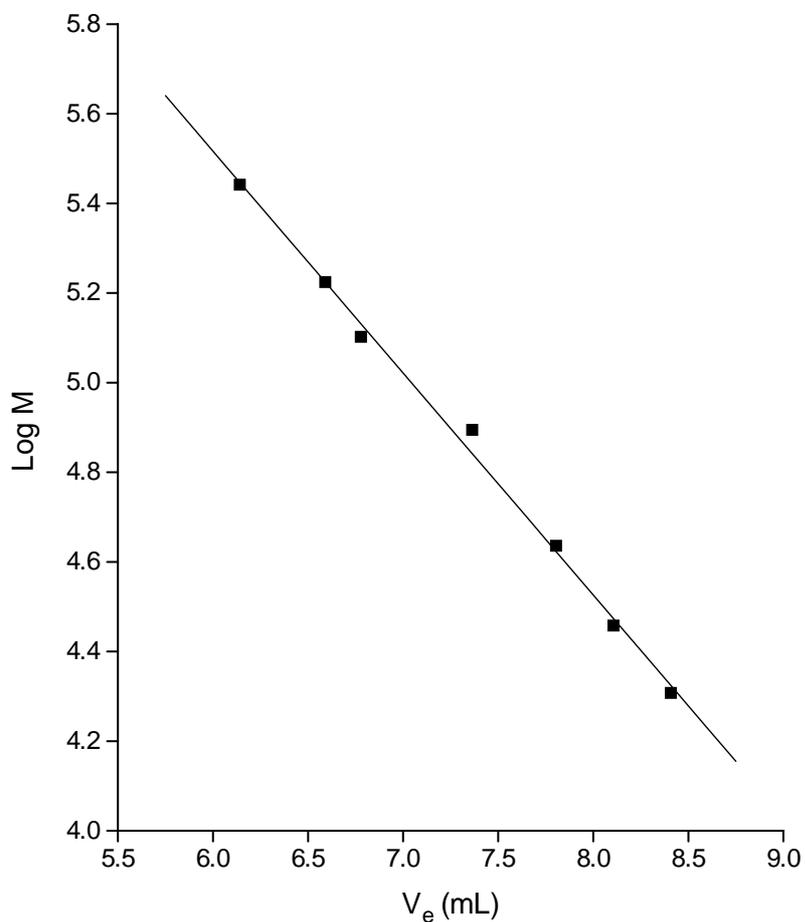
\*Se presenta el promedio de dos determinaciones

En nuestro caso, al no contar con patrones de quitosano apropiados, se realizó la curva de calibración con muestras de poli(óxido de etileno), cuyas características se presentan en la tabla 4.4. La curva de calibración que se presenta en la figura 4.5 ajusta a un polinomio cúbico, la ecuación correspondiente es  $\text{Log } M = 58.799 - 21.433V_e + 2.888V_e^2 - 0.132V_e^3$ ; con un coeficiente de correlación de 0.997.



**Figura 4.5** Curva de calibración cúbica para la columna PL aquagel-OH 40 con poli(óxido de etileno) a 25°C.  $y=58.799-21.434x+2.888x^2-0.132x^3$ ;  $r = 0.997$

Haciendo un ajuste en la zona lineal se obtiene la recta que se muestra en la figura 4.6, cuya ecuación es  $\text{Log } M = 8.487 - 0.495 V_e$  y cuyo coeficiente de correlación es -0.998. Por simplicidad, la ecuación lineal se ha utilizado en los cálculos de pesos moleculares.



**Figura 4.6** Curva de calibración lineal para la columna PL aquagel-OH 40 con poli(óxido de etileno) a 25°C.  $y = 8.487 - 0.495x$ ;  $r = -0.998$

Dado que la curva de calibración se ha construido utilizando estándares de poli(óxido de etileno), es necesario utilizar el principio de la calibración universal y la ecuación de Mark–Houwink para determinar los pesos moleculares del polímero en análisis [19]. A partir del principio de la calibración universal tenemos que:

$$[\eta]_{\text{qui}} M_{\text{qui}} = [\eta]_{\text{poe}} M_{\text{poe}}$$

donde  $[\eta]_{\text{qui}}$  y  $[\eta]_{\text{poe}}$ , son las viscosidades intrínsecas para el quitosano y el poli(óxido de etileno); mientras que  $M_{\text{qui}}$  y  $M_{\text{poe}}$  son los respectivos pesos moleculares. la ecuación de Mark–Houwink viene dada por:

$$[\eta] = k M^a$$

donde  $k$  y  $a$  son constantes que dependen de la composición del polímero, la temperatura y el disolvente. Combinando ambas expresiones se tiene que:

$$k_{\text{qui}} M_{\text{qui}}^{(1+a_{\text{qui}})} = k_{\text{poe}} M_{\text{poe}}^{(1+a_{\text{poe}})}$$

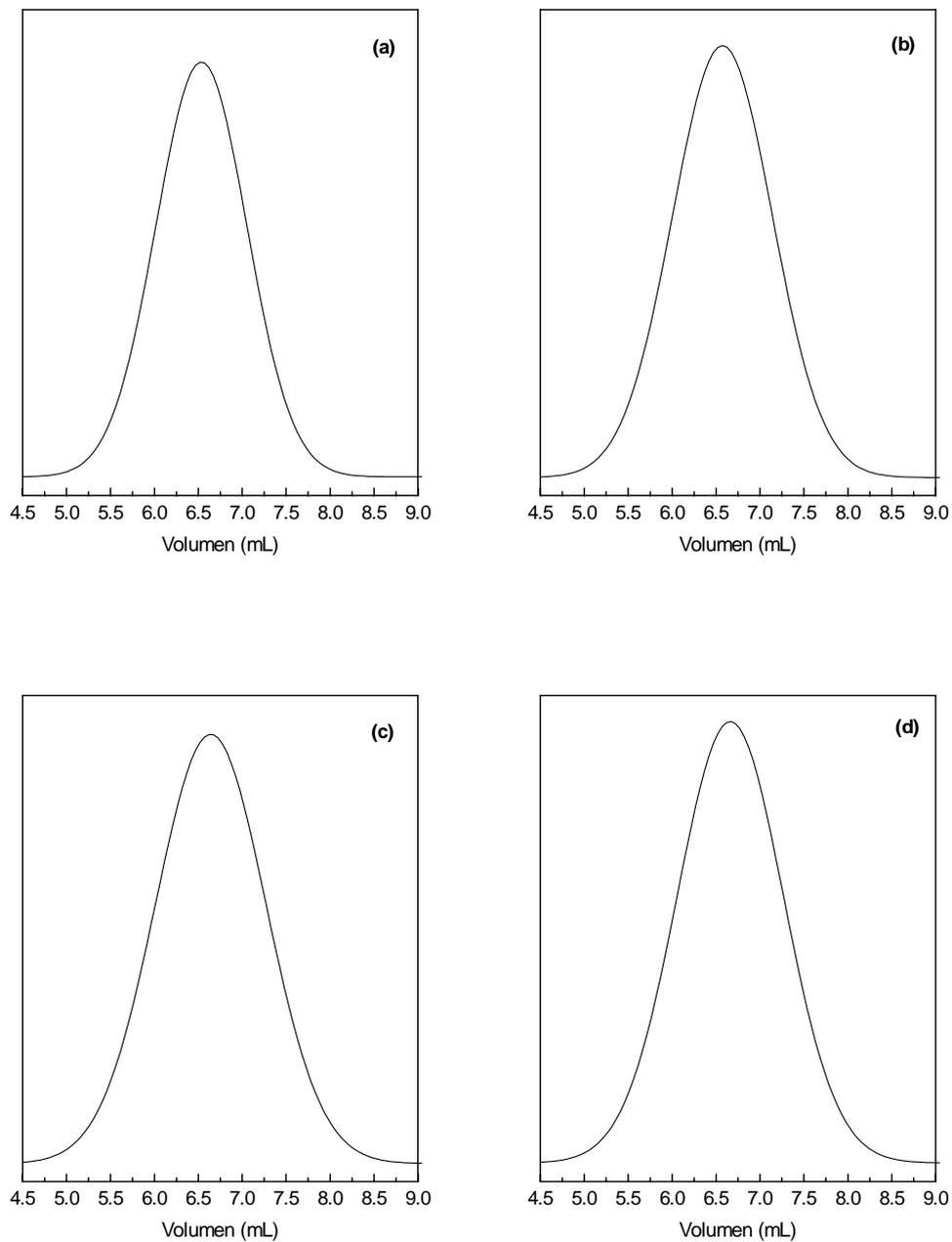
por tanto, podemos calcular el peso molecular del quitosano a partir de:

$$M_{\text{qui}} = \left[ k_{\text{poe}} M_{\text{poe}}^{(1+a_{\text{poe}})} / k_{\text{qui}} \right]^{1/1+a_{\text{qui}}}$$

sustituyendo los valores de las constantes [20,21]:

$$M_{\text{qui}} = \left[ 1.56 \times 10^{-1} M_{\text{poe}}^{(1.50)} / 1.81 \times 10^{-3} \right]^{1/1.93}$$

Las curvas cromatográficas para las muestras de quitosano obtenidas a 25°C, utilizando una columna PL aquagel-OH 40 y el par AcOH (0.3 M)/ NaOAc (0.2 M) como disolvente, se muestran en la figura 4.7. Todas las muestras eluyen dentro del rango de trabajo del sistema cromatográfico, y no se observan grandes diferencias en cuanto al volumen de elución del máximo del cromatograma entre un caso y otro, lo cual es indicativo de que las muestras poseen pesos moleculares similares.



**Figura 4.7** Curvas cromatográficas para (a) quitosano-A, (b) quitosano-B (c) quitosano-C y (d) quitosano-D

La determinación de los pesos moleculares promedio se realizó con la ayuda de una hoja de cálculo, tomando incrementos de volumen en el cromatograma de aproximadamente 0.016 mL y midiendo la intensidad respectiva (altura). Los principales parámetros para cada caso se presentan en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5** Resultado del análisis de los cromatogramas para las muestras de quitosano en análisis.

Muestra	$\Sigma H_i$	$\Sigma H_i M_i$	$\Sigma H_i / M_i$	$\bar{M}_w$ $\Sigma H_i M_i / \Sigma H_i$	$\bar{M}_n$ $\Sigma H_i / \Sigma H_i / M_i$	$\bar{M}_w / \bar{M}_n$
Quitosano A	$1.85 \times 10^{-3}$	$4.08 \times 10^2$	$1.56 \times 10^{-8}$	$2.21 \times 10^5$	$1.19 \times 10^5$	1.86
Quitosano B	$2.31 \times 10^{-3}$	$5.11 \times 10^2$	$1.96 \times 10^{-8}$	$2.21 \times 10^5$	$1.18 \times 10^5$	1.87
Quitosano C	$2.47 \times 10^{-3}$	$4.88 \times 10^2$	$2.14 \times 10^{-8}$	$1.98 \times 10^5$	$1.15 \times 10^5$	1.72
Quitosano D	$2.26 \times 10^{-3}$	$3.83 \times 10^2$	$2.17 \times 10^{-8}$	$1.69 \times 10^5$	$1.04 \times 10^5$	1.63

Los resultados del análisis por cromatografía de permeación indican que no existen diferencias marcadas en los promedios de pesos moleculares de las muestras de quitosano A, B y C. En el caso de la muestra D, se observan valores ligeramente inferiores, tanto de los promedios como de la polidispersidad ( $\bar{M}_w / \bar{M}_n$ ); este comportamiento es atribuible al hecho de que en la obtención de este polímero se utilizó un mayor tiempo de reacción, lo que podría conducir a un ligero fraccionamiento de las cadenas, reduciéndose de esa forma su tamaño promedio. Lo anterior concuerda con el hecho de que el pico de degradación exotérmico del quitosano D aparece a una temperatura inferior que el resto de muestras (tabla 4.2). Sin embargo, es evidente que el incremento del tiempo de reacción no influye en el grado de desacetilación [7].

# **CONCLUSIONES**

En el capítulo anterior se han presentado los resultados de la caracterización de quitina y de cuatro muestras de quitosano sintetizados en el Laboratorio de Polímeros de la Universidad de El Salvador. A partir del análisis de los resultados obtenidos concluimos:

- 1) Los termogramas demuestran que la quitina y el quitosano no presentan el fenómeno de transición vítrea en el intervalo de temperaturas de trabajo.
- 2) Los resultados del análisis calorimétrico revelan que existen diferencias marcadas entre la estructura de la quitina y el quitosano, esto en base a la entalpía de vaporización del agua absorbida por estos materiales, y al comportamiento observado a temperaturas superiores a los 300°C, donde ocurren procesos de degradación.
- 3) Los valores de entalpía de vaporización del agua en las cuatro muestras de quitosano obtenidos evidencian que no hay diferencias en el contenido de grupos amino al variar el tiempo de reacción, lo cual coincide con los valores de grado de acetilación determinados por espectroscopía infrarroja.
- 4) El análisis por cromatografía de permeación indica que para tiempos de reacción de 60, 90 y 120 min, no se obtienen modificaciones considerables en los pesos moleculares promedio del quitosano; cuando el tiempo de reacción es de 150 min, se produce una leve disminución en éstos, pero sin que se modifique el contenido de grupos amino en el polímero.

# **REFERENCIAS**

- [1] J.P. Zikakis (Ed.), Chitin, Chitosan and Related Enzymes, Academic Press, Orlando, 1984.
- [2] R.A.A.Muzzareli (Ed.), Natural Chelating Polymers, Pergamon Press, New York, 1973.
- [3] M.N.V. Ravi Kumar, Reactive and Functional Polymer **46**, 1 (2000).
- [4] C.L. Velásquez, Revista Iberoamericana de Polímeros **4**, 91 (2003).
- [5] A. Baxter, M. Dillon, K.D.A. Taylor, G.A.F. Roberts, Int. J.Biol. Macromol. **14**, 166 (1992).
- [6] F. Niola, N. Basora, E. Chornet, P.F. Vidal, Carbohydr, Res. **238**, 1 (1993).
- [7] F.S. Kittur, K.V.H. Prashanth, K.U. Sankar, R.N. Tharanathan, *Carbohydrate Polymers* **49**, 185(2002)
- [8] J. Areizaga, M.M. Cortázar, J.M. Elorza, J.J. Iruin, Polímeros, Editorial Síntesis, Madrid, España, 2000.
- [9] I. Katime, Química Física Macromolecular, Servicio Editorial Universidad del País Vasco, Bilbao, 1994.
- [10] R.C. Mackenzie, Termochim. Acta, 28, 1(1979).
- [11] D.A. Skoog , D.M. West, Análisis Instrumental, Mc. Graw-Hill, México D.F., 1999.
- [12] P. Sewell, B. Clarke, Chromatographic Separations, New York: Wiley, 1998.
- [13] B.J. Hunt, J.R. Holding Eds., Size Exclusion Chromatography, Chapman and Hall, New York, 1989.
- [14] A.G. Benito del Castillo, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Editorial Limusa, México D.F., 1988.
- [15] H. Jiang, W. Su, S. Caracci, J. Bunning, T. Cooper, W. Adams, J. Appl. Polym. Sci. **61**, 1163 (1998).
- [16] M. Kakurakova , P.S. Belton , J. Hirsch , A. Ebringerova , *J. of the Sci. of Food and Agr.* **77**, 38 (1998).

- [17] G.O. Phillips , S. Takigami , M. Takigami , *Food Hydrocolloids* **10**, 11 (1996).
- [18] M. Terbojevich , A. Cosani , B. Focher , E. Marsano , *Carbohydr, Res.* **250**, 301 (1993).
- [19] F. Settle, Ed, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, New York, 1997.
- [20] G. Maghami, G. Roberts, *Makromol Chem.* **189**, 195 (1988).
- [21] J. Brandrup, E.H. Immergut, Eds., *Polymer Handbook*. New York: Wiley, 1989.