

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE CARBOXIMETILQUITINA (CMQ) A PARTIR DE QUITINA DE CAMARON DE LA ESPECIE *Heterocarpus vicarius*

Alejandro Meléndez-Navas^{1*}, José Vega-Baudrit^{2,3}, María Sibaja-Ballesteros², Sergio Madrigal-Carballo², Melissa Camacho-Elizondo³

- 1) Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: amelendezn@gmail.com
- 2) Laboratorio de Polímeros POLIUNA, Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- 3) Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC-CeNAT-CONARE, San José, Costa Rica.

Recibido: Marzo 2013; Aceptado: Agosto 2013

RESUMEN

En esta investigación se implementó la metodología para la síntesis de la carboximetilquitina CMQ llevada a cabo con quitina de camarón de la especie *Heterocarpus vicarius*, bajo las condiciones del Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional, posteriormente se realizó su respectiva caracterización por métodos espectroscópicos, reológicos y térmicos.

Para la caracterización espectroscópica se realizaron análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de *Fourier* (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN). En cuanto a análisis térmico se utilizó análisis termogravimétrico (TGA), y los reológicos se determinaron por análisis viscosímetro capilar. La CMQ obtenida será utilizada en la modificación superficial de materiales nanoestructurados con potenciales aplicaciones tecnológicas.

Palabras claves: carboximetilquitina, análisis termogravimétrico, quitina

ABSTRACT

In this research a methodology was implemented for the synthesis of carboxymethylchitin CMQ with shrimp chitin *Heterocarpus vicarius* species under laboratory conditions of the Polymers National University, the respective characterization by spectroscopic, rheological and thermal methods was made.

For spectroscopic characterization, analyzes were performed by infrared spectroscopy *Fourier* Transform (FTIR), and nuclear magnetic resonance (NMR). For thermal analysis was used thermogravimetric analysis (TGA), and rheological analyzes were determined by capillary viscometer. The CMQ obtained will be used for the surface modification of nanostructured materials with potential technological applications.

Keywords: carboxymethylchitin, thermogravimetric analysis, chitin

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a esa escala. En lo que respecta a polímeros, se ha aplicado para realizar estudios sobre las propiedades de éstos, aumentando de esta manera su rango de utilidad.

Desde el punto de vista social, recientemente se abordan temas relacionados con la nanotecnología, el progreso de los países en vías de desarrollo, y la relación entre ambos. Algunos autores coinciden que la nanotecnología podría brindar nuevas y mejores opciones de desarrollo a estos países. Sin embargo, sin un adecuado apoyo y educación, inevitablemente la nanotecnología aumentará la brecha entre los países pobres y los ricos. A nivel mundial, la nanotecnología podría solucionar problemas en áreas como agua, agricultura, nutrición, salud, energía, medio ambiente,

entre otros [1].

Con lo anterior, considerando el avance científico–tecnológico, se sustenta la búsqueda de una alternativa más que contemple el uso de los desechos marinos, enmarcado en la obtención de nuevos materiales de alta tecnología, con potenciales aplicaciones en materiales compuestos. En lo que respecta a los desechos marinos, la cascara de camarón posee un alto contenido de quitina, en general de un 14 a un 35%, asociada a proteínas, pigmentos y depósitos de calcio siendo los residuos de proteína los que generan los mayores problemas de contaminación debido a su fácil descomposición, lo cual produce un ambiente adecuado para el desarrollo de insectos y otros animales que actúan como vectores en la transmisión de enfermedades infecciosas [2].

La quitina es uno de los principales componentes del exoesqueleto de artrópodos, crustáceos y de las paredes celulares de algunos hongos y levaduras. Después de la celulosa, es el segundo material más abundante en la naturaleza y como resultado de su estructura es muy insoluble, por lo que su uso está limitado [3]. Por lo tanto, para algunas de sus aplicaciones, es necesaria la obtención de derivados entre ellos el quitosano o la carboximetilquitina (CMQ).

El sustrato carboximetilquitina (CMQ), por sus características tanto físicas como químicas le dan versatilidad para diversas aplicaciones, entre ellas se tiene: la activación de macrófagos desarrollando una resistencia a células cancerígenas, elaboración de lociones limpiadoras, cremas, cosméticos básicos que necesitan calentamiento para su esterilización. [4], en la industria farmacéutica, en lo que a la liberación controlada de drogas se refiere, también en la fabricación de aparatos ortopédicos y adhesión de tejidos [5].

La introducción de grupos carboxílicos en la quitina y el quitosano aprovecha la capacidad aniónica o anfotérica de esta molécula. La carboximetilación con ácido monocloroacético, en condiciones alcalinas fuertes, es el método más conveniente para introducir grupos carboxílicos en el hidroxilo presente en la quitina [6].

Por estas cualidades la CMQ puede ser utilizada en la modificación orgánica de sustratos que permite la obtención de materiales hidrófobos con alta superficie específica. La síntesis de estos materiales puede llevarse a cabo mediante cuatro vías: silanización; recubrimiento de la superficie de nanopartículas de sílice con grupos alquil–trialcoxisilanos; preparación monofásica mediante la técnica sol–gel incorporando funcionalidades orgánicas a la superficie de la sílice, y unión de bases orgánicas a la superficie de una sílice pirogénica.

En este trabajo se plantea la síntesis de carboximetilquitina a partir de desechos de la industrialización del camarón para ser utilizada en la modificación superficial de materiales nanoestructurados con potenciales aplicaciones tecnológicas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materia prima. La quitina grado técnico extraída de la cáscara de camarón de la especie “*Heterocarpus vicarius*” fue procesada y suministrada por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA).

Síntesis de carboximetilquitina a partir de quitina de “*Heterocarpus vicarius*”. Se siguió la metodología descrita por *Sini et al.* [7] modificada para mejorar el rendimiento según las condiciones de la reacción. Se mezclaron 10 g de quitina con 40 mL de hidróxido de sodio al 60% (m/m) y dodecilsulfato de sodio (DDS) para una concentración de 2% de DDS, en el reactor de tres bocas en un baño con hielo por 1 hora. Posteriormente se dejó la mezcla en congelación a una temperatura de -18°C por tres días. La quitina alcalina se suspendió en 200 mL de isopropanol con agitación mecánica, se añadió poco a poco ácido monocloroacético hasta llegar a pH neutro se agitó mecánicamente hasta temperatura ambiente (aproximadamente por 4 horas). La masa viscosa blanca obtenida se disolvió en 1 L de agua destilada. Se trató con 5 L de acetona hasta obtener un precipitado, posteriormente se filtró. La CMQ obtenida fue redisuelta en agua destilada y dializada en agua durante dos días para posteriormente liofilizarse.

Análisis por espectroscopia infrarroja (FTIR). Para los análisis se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de *Fourier* (FTIR), del POLIUNA, marca *Perkin Elmer*, modelo *Paragon 1000 PC*, para el análisis de los grupos funcionales presentes en la muestra se siguió el método ASTM–E 1252–98, en el cual se utilizaron pastillas de muestra en bromuro de potasio (KBr) al 1% [8].

Análisis resonancia magnética nuclear (RMN). Se preparan 4 mL de carboximetilquitina, suspendida en DMSO y se realiza la medición a 400 MHz, en un RMN *Varian YH-400* por un período de 2 minutos.

Grado de acetilación (GA). Se determinó siguiendo el método descrito por *Dumszy et al.*, [9], por espectroscopia de infrarrojo, donde relaciona las absorbancias obtenidas a las bandas de 1.655 y 3.450 cm^{-1}

$$GA = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1,33} \quad (1)$$

Grado de sustitución (GS). El grado de sustitución (GS) se determinó según lo descrito por *Nahálka et al.* [10], por espectroscopia de infrarrojo, por medio de la proporción de las absorbancias a 1.418 y 1.321 cm^{-1} , con una corrección de línea base entre 1.488 y 1.224 cm^{-1}

$$GS : \frac{A_{1321}}{A_{1418}} \times 100 \quad (2)$$

Análisis termogravimétrico (TGA). Se utilizó para el análisis un equipo *TA Instrument* modelo Q 500. Se pesó una masa de 4,91 mg aproximadamente, colocados en una cápsula de porcelana abierta, el análisis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: atmósfera de nitrógeno con flujo de 40 mL·min⁻¹, velocidad de barrido de 20°C/min y temperatura final de 1.000°C.

Análisis reológicos. Se utilizó un baño de temperatura constante a 30,00 ± 0,01°C. Se prepararon disoluciones de CMQ a concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0% (g/dL), se sumergió el viscosímetro la muestra hasta llegar a un equilibrio térmico. Se midieron los tiempos de recorrido de la muestra a diferentes concentraciones a través del viscosímetro.

Porcentaje de rendimiento. El porcentaje de rendimiento se obtuvo de la siguiente manera

$$\% R = \frac{M_{\text{experimental}}}{M_{\text{Teórico}}} \times 100 \quad (3)$$

donde M es la masa medida gramos y M_{Teórico} se obtuvo de la siguiente manera:

$$M_{\text{teórico}} = \left[\left(GS \times \frac{M_{\text{quitina}}}{MM_{\text{quitina}}} \times MM_{\text{carboximetil}} \right) + \left(M_{\text{Quitina}} \times (1 - GS) \right) \right] \quad (4)$$

donde MM son las respectivas masas moleculares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de haber llevado a cabo la síntesis de la carboximetilquitina, se obtuvo un sustrato color hueso, el cual se pulverizó en un mortero para llevar a cabo los análisis correspondientes. Posteriormente se comparó con CMQ comercial marca *Chemos GmbH* por medio de la hoja de certificado de análisis y los resultados de los métodos de caracterización descritos anteriormente.

Tabla1. Bandas presentes en una muestra de CMQ [11].

Banda (cm ⁻¹)	Vibración	Inferencia
3.450	Estiramiento	O-H
3.300	Estiramiento	N-H
1.735	Estiramiento	C=O
1.640-1.550	Flexión	N-H
1.330-1.320	Estiramiento	C-N
1.375	Flexión	C-H
1.410-1.490	Flexión	O-H
1.320-1.210	Estiramiento	C-O

Espectroscopia infrarroja FTIR. La espectroscopia infrarroja es una técnica para determinar los grupos funcionales presentes en un analito con el fin de identificarlo. La Tabla 1 presenta las principales bandas que deberían apreciarse en el espectro infrarrojo de la muestra de CMQ.

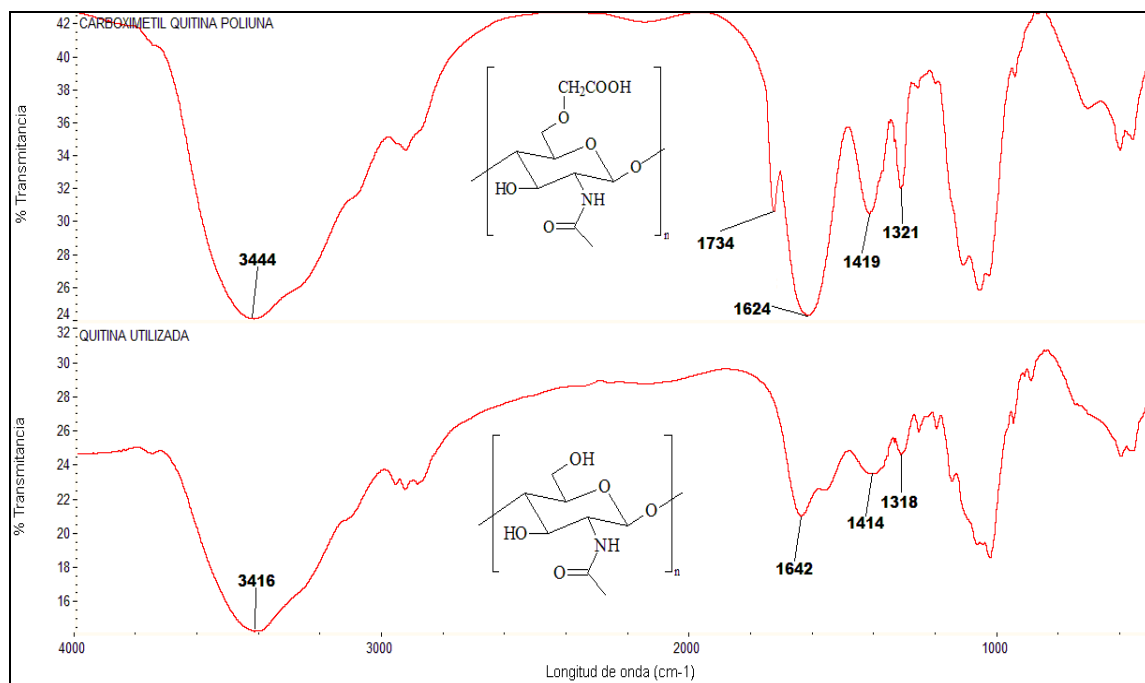


Figura 1. Espectro infrarrojo (FTIR) de la CMQ obtenida y la quitina utilizada.

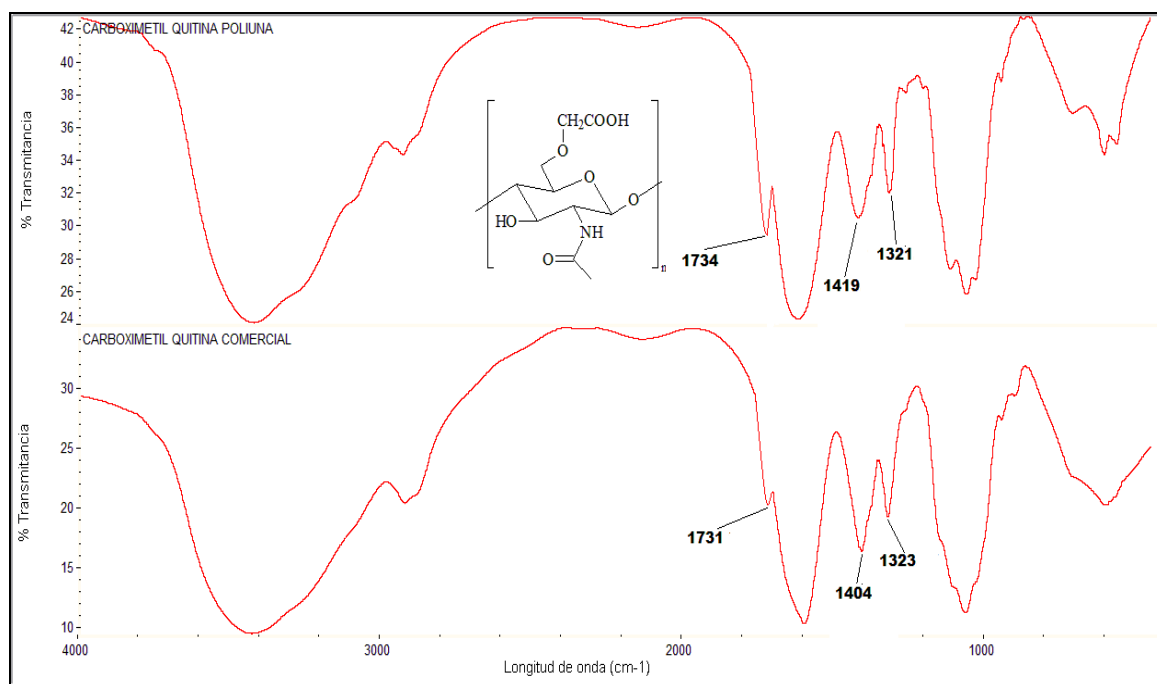


Figura 2. Espectro infrarrojo (FTIR) de CMQ sintetizada y comercial.

Los espectros fueron normalizados aplicando el programa *OMNIC E.S.P.* 5.1 para efectos de

comparación. La Figura 1 presenta los espectros infrarrojo de la muestra de CMQ obtenida y el de la quitina utilizada. Se puede apreciar que el espectro obtenido para la CMQ muestra una banda a 1.735 cm^{-1} correspondiente a la presencia del estiramiento del enlace C=O del grupo carboxilo, según lo que establece *Muzarelli* [4] esta banda no se puede apreciar en el espectro de la quitina. En ambos espectros se identifica el grupo amino, a una longitud de onda de 1.620 cm^{-1} . A 1.321 cm^{-1} se aprecia una señal correspondiente a C–O presente el grupo carboximeto, misma que se utiliza para determinar el grado de sustitución.

Según lo expuesto por *Panya et al.* El cual manifiesta que la intensidad del pico presente a 1.735 cm^{-1} es proporcional al grado de sustitución. El espectro de CMQ sintetizada es similar al espectro de CMQ comercial, según lo indica la Figura 2.

En esta Figura también se puede apreciar la señal a los 3440 cm^{-1} perteneciente a la señal de estiramiento del enlace O–H libre. A 1.420 cm^{-1} se observa la flexión del O–H del carboxilo [3]. Entre 1.000 y 1.100 cm^{-1} se observa la señal correspondiente al C–O del hemiacetal (éter).

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esta es una técnica de análisis que involucra cambios en el estado de spin del núcleo de un átomo inducido por un campo electromagnético. Los núcleos son ^{13}C y ^1H [8].

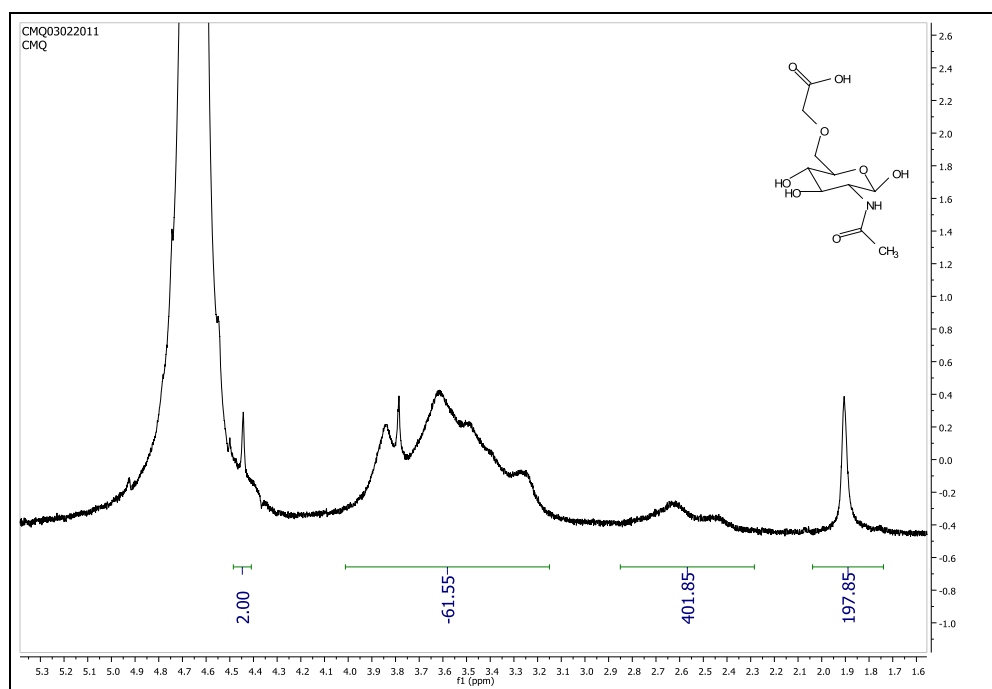


Figura 3. Espectro de CMQ sintetizada obtenido por H–RMN.

La Figura 3 muestra un espectro H–RMN de la muestra de CMQ sintetizada en el POLIUNA. En este espectro se puede observar un multiplete de picos superpuestos lo que produce un engrosamiento entre 3,1 y 4,0 ppm. Esto es común en muestras amorfas de materiales poliméricos,

producto de varios protones vecinos. Por lo general esto ocurre en muestras que están en estado gel o coloidal [7].

Debido a la dificultad para apreciar con claridad los picos en el espectro, se aplicó en la investigación del mismo, el programa *ChemDraw*, el cual posee un simulador de espectros, donde se introduce la estructura de la muestra y éste calcula por medio de su base de datos el espectro que se debería obtener, los resultados de este análisis se pueden observar en la Figura 4.

Se observa una señal obtenida por la simulación a 4,31 ppm, correspondiente a 2 protones presentes en el carbono α del grupo carboximetil, se puede apreciar que esta señal también está presente en el espectro de la muestra sintetizada (Figura 3). En conclusión se puede afirmar que se llevó a cabo la sustitución en el carbono 6 según indica la simulación.

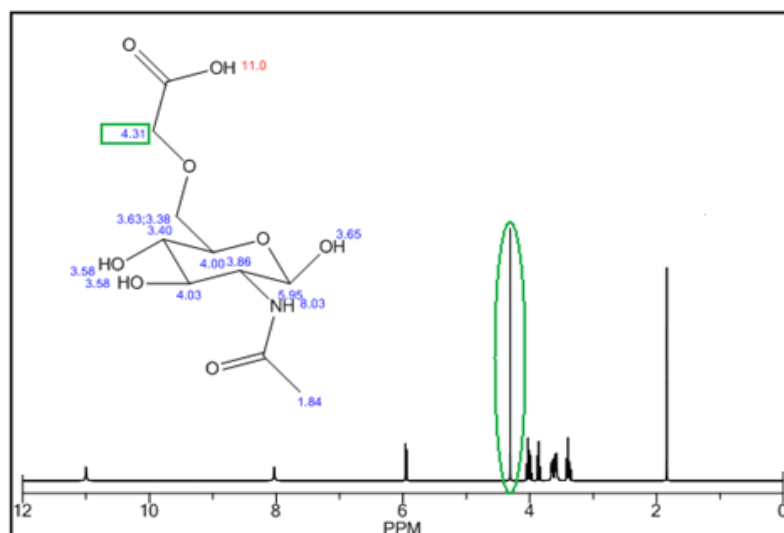


Figura 4. Espectro H-RMN simulado para una muestra de CMQ (*ChemDraw, Varian*).

Grado de acetilación (GA) y sustitución (GS). El GA de la quitina y de los dos tipos de carboximetilquitina se determinó aplicando la técnica desarrollada por *Dumszy et al.*, [8]. El objetivo fue valorar la presencia del grupo acetilo y cuantificar asimismo la reacción de sustitución, del acetilo por el grupo carboximetilo.

El método citado *Dumszy et al.* [9], relaciona las absorbancias obtenidas a las bandas de 1.655 y 3.450 cm^{-1} . Aplicando la ecuación (1) y con base en los datos obtenidos presentados en la Figura 5 se obtiene un valor de 70%.

Respecto al grado de sustitución de la reacción de carboximetilación se determinó aplicando lo indicado por *Nahálka et al.*, [10] por medio de la proporción de las absorbancias a 1.418 cm^{-1} (absorbancia C) y 1.321 cm^{-1} (absorbancia D), con una corrección de línea base entre 1.488 y 1.224 cm^{-1} y siguiendo lo indicado en la ecuación (2). Según los datos obtenidos se observa un grado de

sustitución de 90%.

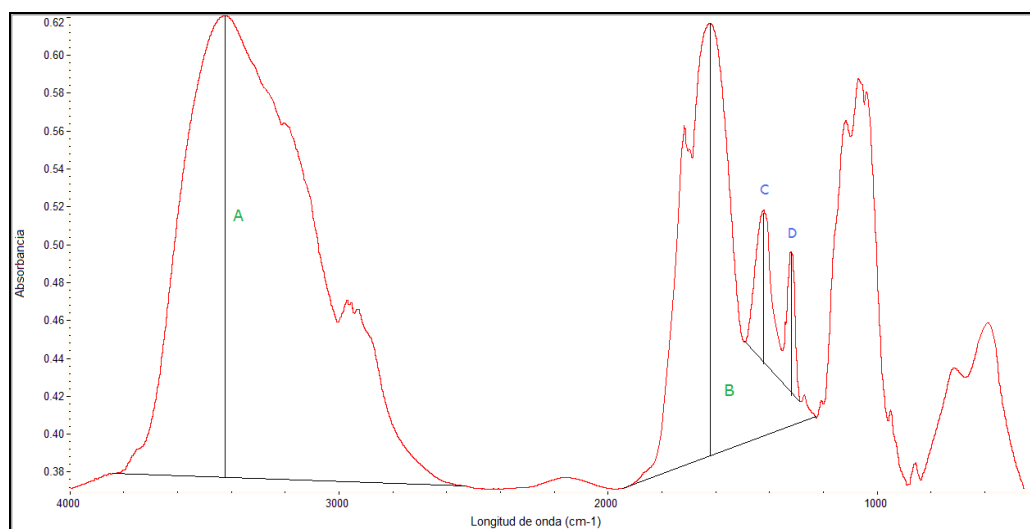


Figura 5. Espectro infrarrojo de CMQ donde se muestran las líneas bases para la determinación del grado de acetilación y sustitución.

En la Tabla 2 se presenta los resultados obtenidos de estos análisis para los materiales involucrados.

Tabla2. Cuadro comparativo entre CMQ obtenida, CMQ comercial y quitina utilizada.

	<i>CMQ obtenida (%)</i>	<i>CMQ Comercial (%)</i>	<i>Quitina Utilizada (%)</i>
GA	70,391	**70	*82
GS	89,930	**80	—

* Dato suministrado por el *POLIUNA*

**Hoja de certificado de análisis

Como se puede observar no hay una diferencia significativa en el grado de acetilación de ambas carboximetil quitinas, con respecto a la diferencia del GA (12%) de la quitina utilizada como sustrato y de la carboximetilquitina sintetizada en este trabajo, se puede deducir que, en el proceso de reacción se llevó a cabo posiblemente una sustitución en el grupo amino de la quitina como lo indica *Morimoto et al.* [6] en la Figura 6.

Según los datos de la Tabla 2, se obtuvo un grado de sustitución relativamente alto comparado con el obtenido en la CMQ comercial que es de 80%.

Se puede inferir que el GS alto también se podría atribuir a que un 12% se sustituyó en el grupo amino, lo que podría llevar a la conclusión que el grupo hidroxilo del carbono 6 se sustituyó un 78%.

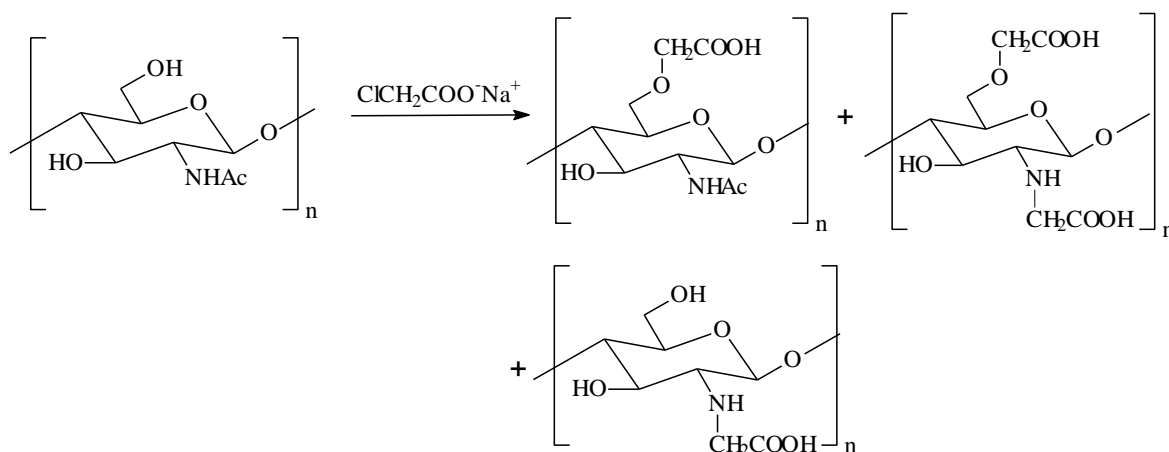


Figura 6. Reacción de síntesis de CMQ con los productos principales.

Análisis termogravimétrico (TGA). En la Figura 7 se presenta en forma comparativa las dos curvas de la degradación térmica de ambas carboximetilquitina (sintetizada y la comercial). Se nota a simple vista diferencias en el grado de pureza del producto, la temperatura inicial de descomposición y la masa residual.

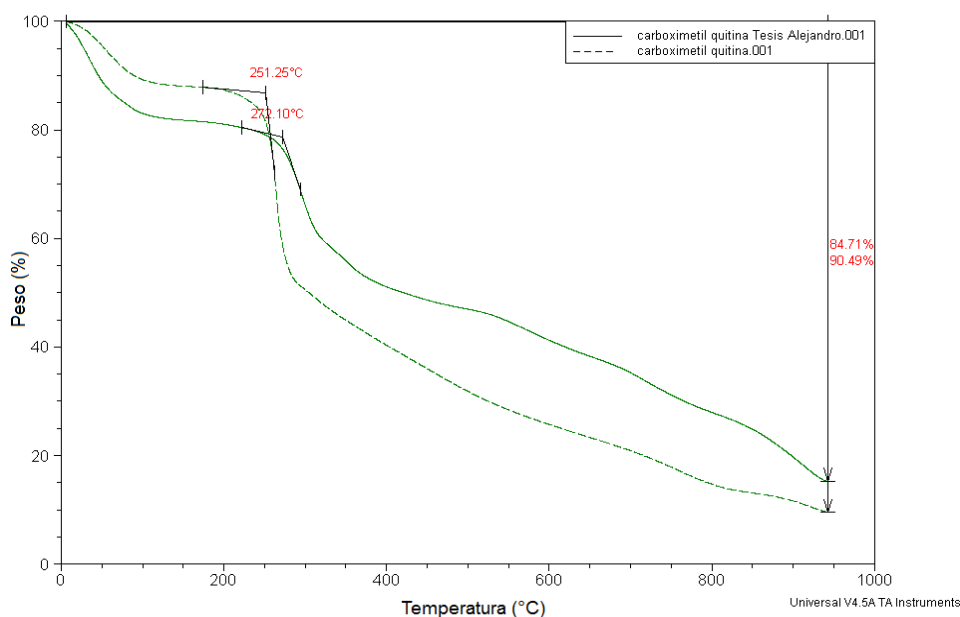


Figura 7. Análisis de CMQ sintetizada y comercial comparativo por TGA.

Un análisis más detallado de ambas curvas de degradación se puede observar en la Figura 8. El valor de T_{d1} indica el valor de la temperatura inicial de degradación. T_{d2} corresponde el valor a la máxima velocidad de descomposición, obtenido por la primera derivada de la curva de TGA.

Con respecto a los datos obtenidos, el primer evento térmico observado se le atribuye a la

liberación de humedad presente, que corresponde primeramente a un 18% para la muestra sintetizada y un 12% para la CMQ comercial. Además, se puede observar como para el sustrato obtenido la temperatura inicial de descomposición es de 272°C, aproximadamente 21°C mayor que la CMQ comercial. La temperatura a la que se da la mayor velocidad de descomposición es de 293,8°C para la CMQ obtenida y 267,24°C para la CMQ comercial. Estas diferencias en las T_{d1} y T_{d2} se podrían atribuir a dos factores muy importantes: una mayor estructura cristalina por parte de la CMQ obtenida [11], posteriormente el segundo factor se atribuye al mayor grado de sustitución que presenta este sustrato con respecto al comercial, también a la presencia de posibles contaminantes.

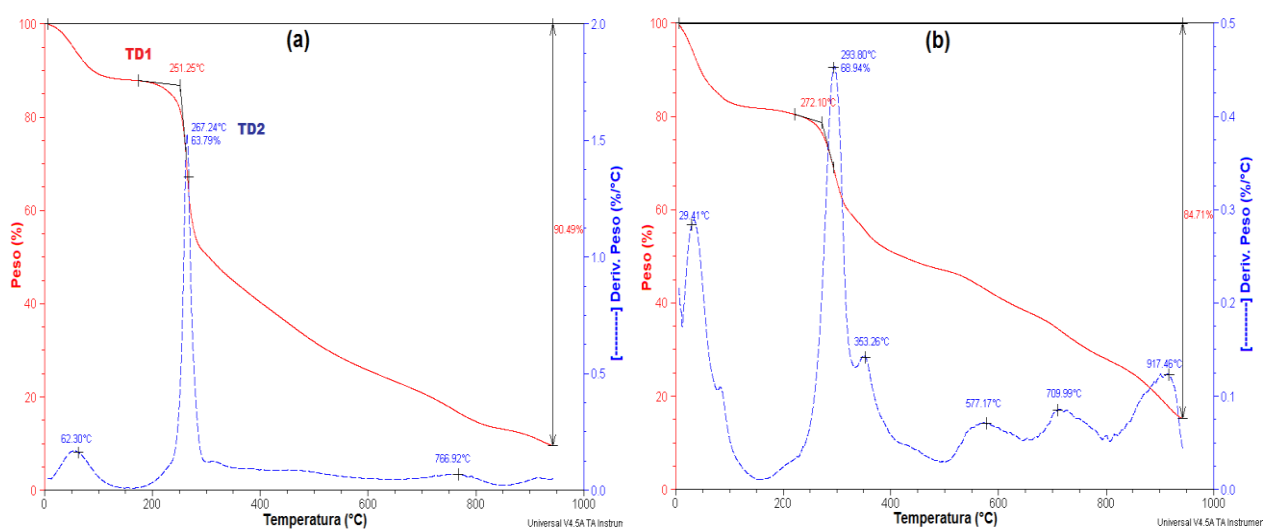


Figura 8. Análisis termogravimétrico de CMQ comercial (a) y de CMQ sintetizada (b).

A modo de síntesis, en la Tabla 3, se presentan las principales características de ambos productos.

Tabla 3. Principales características obtenidas de los análisis termogravimétricos de los diferentes productos.

<i>Sustrato</i>	<i>Temperatura T_{d1} °C ± 0,01</i>	<i>Temperatura T_{d2} °C ± 0,01</i>	<i>Pérdida de peso (%) ± 0,01</i>
CMQ	272,10	293,80	84,71
CMQ comercial	251,25	267,24	90,49

Masa molecular viscosimétrica (M_v). La masa molecular en la CMQ como en cualquier derivado de la quitina es uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta, ya que con esto

se puede determinar la solubilidad y sus posibles aplicaciones. Para este caso se utilizó la ecuación de *Mark-Houwinnk-Sakurada*, el valor para las constantes de esta ecuación corresponden a $K = 7,95 \cdot 10^{-5}$ y $\alpha = 1,00$; estos valores de constantes se reportan para sistemas utilizando unidades de concentraciones como $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ y disolvente cloruro sódico [12]

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (4)$$

La Tabla 4 muestra los valores obtenidos para la masa molecular viscosimétrica de la CMQ.

Tabla 4. Resultados de la masa molecular viscosimétrica para una muestra sintetizada de CMQ.

<i>Sustrato</i>	$\eta_{Red} \pm 0,002$	$\eta_{inh} \pm 0,002$	$[\eta] \pm 0,002$	$M_v/\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
CMQ	15,918	15,817	15,867	200.000

Rendimiento de la reacción. El rendimiento de reacción se llevó a cabo con la CMQ purificada. Posterior a esto se calculó la ecuación (2) donde se relacionan las masas obtenidas y la ecuación (3) y (4). En la Tabla 5 muestra los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de rendimiento de la reacción.

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de la reacción de CMQ obtenido.

<i>Sustrato</i>	<i>Valor Teórico</i> g	<i>Valor experimental</i> g	<i>Rendimiento</i> (%)
CMQ	11,34	8,47	74,69

Propiedades de la CMQ sintetizada. Estas características hacen de la CMQ obtenida un sustrato con potenciales aplicaciones en la modificación superficial de nanosílices pirogénicas, esto se puede deducir gracias a su similitud con la CMQ comercial.

Tabla 6. Resumen de las propiedades de la CMQ obtenida.

<i>Sustrato</i>	<i>CMQ</i>
M_v	200.000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
TD1	272,10
TD2	293,80
GS (%)	89,930
GA (%)	70,391
R (%)	74,69
Señal espectros	FTIR: 1734 cm^{-1} , RMN: 4,45 ppm.

CONCLUSIONES

Se demostró que la síntesis de carboximetil quitina por el método modificado da buenos resultados alcanzando un grado de sustitución del 89,93% y un rendimiento del 74,69%.

Por H-RMN se comprobó que la reacción realizada por el método propuesto se orientó en el hidroxilo presente en el carbono 6, dando como resultado en su mayor proporción la O-carboximetil quitina.

Agradecimientos. Al LANOTEC y al CONICIT por su aporte y apoyo en la conclusión de este proyecto de investigación que permitieron la realización de este artículo

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Vega J “*La Nanotecnología en Costa Rica: La experiencia en el LANOTEC*”. IX Congreso Nacional de Ciencias, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica 2007
- [2] Díaz L “*Evaluación preliminar del exoesqueleto de camarón (Penaeus spp) como fuente de quitina*”. Tesis de Licenciatura en Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 1996
- [3] Madrigal S “*Obtención de quitosano a partir del langostino (Pleuroncodes planipes) y valoración de sus propiedades farmacéuticas*. Tesis de Licenciatura en Química Industrial, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica 2003
- [4] Muzzarelli R “*Some Modified Chitosans and Their Niche Applications*” en Chitin Handbook. Muzzarelli R, Peter M. European Chitin Society, Atec, Grottammare, Italia; 47–51 (1997)
- [5] De Abreu F, Campana-Filho S “*Preparation and Characterization of Carboxymethyl chitosan*”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15(2)**, 79 (2005)
- [6] Morimoto M, Saimoto H, Shigemasa Y “*Control of Functions of Chitin and Chitosan by Chemical Modification*”, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **14(78)**, 205 (2002)
- [7] Sini T, Santhosh S, Mathew P “*Study of the Influence of Processing Parameters on the Production of Carboxymethylchitin*”, *Polymer*, **46(9)**, 3128 (2005)
- [8] Abraham G, Cuadrado T “*Métodos de Caracterización de Biomateriales*”. Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de Materiales. Mar de Plata. Argentina 2002
- [9] Dumszy JG, Roberts GAF “*Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan*”, *Makromol. Chem.*, **186**, 1671 (1985)
- [10] Nahálka J, Nahálková J, Gemeiner P, Blanárik P “*Elicitation of plumbagin by chitin and its release into the medium in Drosophyllum lusitanicum link. Suspension cultures*”, *Biotechnology Letters*, **20(9)**, 841 (1998)
- [11] Binns A “*Identificación y caracterización de quito oligómeros obtenidos por hidrólisis química del quitosano proveniente del camarón camello real (Heterocarpus vicarius)*”. Tesis de Licenciatura en Química Industrial, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica 2006
- [12] Fernández S “*Características Hidrodinámicas de Carboximetilquitina y Carboximetil quitosana*”, *Rev. Cubana Farm.*, **34**, 6 (2000)