

EVALUACIÓN VISCOSIMÉTRICA DEL QUITOSANO DERIVADO DE LA QUITINA DE LANGOSTA

Nilia de la Paz¹, Dania Pérez², Mirna Fernández^{3*}, Orestes Darío López¹, Antonio Nogueira¹, Manuel Rapado Paneque⁴, Sonia Altanés Valentín⁴, Caridad M. García¹

1) Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Avenida 26 No. 1605 e/ Puentes Grandes y Boyeros, Plaza. La Habana. Cuba.

2) Departamento de Química Básica, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. San Lázaro y L, Vedado. Plaza de la Revolución. La Habana. Cuba.

3) Departamento de Tecnología y Control de Medicamentos, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Calle 23 No. 21425 e/214 y 222, La Lisa. La Habana. Cuba. Correo electrónico: mirnafc@ifal.uh.cu, mirnafc@yahoo.com

4) Grupo de Química de las radiaciones y dosimetría de altas Dosis. Departamento de Radiobiología, Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). Calle 30 No. 502 e/ 5ta y 7ma, Playa. La Habana. Cuba.

Recibido: Noviembre 2012; Aceptado: Enero 2013

RESUMEN

El quitosano es un polisacárido natural obtenido, por desacetilación termoalcalina, a partir de quitina. El grado de desacetilación del quitosano y su masa molecular son dos propiedades fundamentales de este polímero pues influyen en sus aplicaciones, tales como solubilidad en ácidos diluidos, viscosidad de las soluciones, así como en su actividad biológica. Muestras de quitosano fueron obtenidas a escala industrial a partir de quitina de langosta (*Panulirus Aarhus*). Se determinó la masa molecular promedio viscosimétrica, M_v , utilizando un viscosímetro capilar tipo *Ubbelohde*. La viscosidad intrínseca fue calculada gráficamente usando la ecuación de *Huggins*, mientras que para la M_v se empleó la de *Mark-Houwink-Sakurada*. La viscosidad de las soluciones fue dependiente de la concentración del polímero. La disolución de quitosano fue caracterizada como un fluido newtoniano, la masa molecular del biopolímero fue de 310.000 g/mol y una viscosidad de $51,8 \pm 3,1$ mPa·s. El quitosano derivada de la quitina de langosta mostró adecuadas propiedades físicas, de acuerdo con quitosanos comerciales, reflejando su utilidad para uso farmacéutico.

Palabras claves: Quitosano, langosta, masa molecular viscosimétrica, reología, viscosidad

ABSTRACT

Chitosan is a natural polysaccharide derived from chitin by alkaline deacetylation. The degree of chitosan deacetylation and molecular weight are two fundamental properties of this polymer for many applications, such as solubility in dilute acids, viscosity of the obtained solutions, as well as on their biological activity. Samples of chitosans were obtained an industrial scale from chitin of lobster (*Panulirus Argus*). The viscosity average molar mass, M_v , was determined using a capillary viscometer type *Ubbelohde*. The intrinsic viscosity was calculated by the graphical method using the equation of *Huggins*, while the M_v by *Mark-Houwink-Sakurada* equation. The viscosities of the solutions were dependent on the concentration of the polymer. The solution of chitosan was characterized as a newtonian fluid, the molecular weight of biopolymer was 310,000 g/mol and a viscosity of 51.8 ± 3.1 mPa·s. Chitosan derived from chitin of lobster showed appropriated physical properties, according with commercial chitosans, reflecting it's usefulness to pharmaceutical uses.

Keywords: chitosan, lobster, molar mass, reology, viscosity.

1. INTRODUCCIÓN

El quitosano fue descubierto por *Rouget* en 1895, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos y la nombró quitina modificada. Más tarde, *Hoppe-Seyler*, en 1894, lo denominó quitosano [1].

Es un polisacárido presente en las paredes celulares de algunos hongos en pequeñas

concentraciones, por lo cual su principal forma de obtención es a partir de la quitina, mediante la hidrólisis en medio alcalino muy concentrado, usualmente hidróxido de potasio o sodio, a altas temperaturas, ocurriendo la desacetilación. El quitosano constituye el derivado más importante de la quitina y presenta propiedades significativamente diferentes a ella [2, 3].

Su nombre químico es poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos] y su estructura aparece en la Figura 1. Al igual que la quitina, el quitosano no se presenta como una molécula única. Adicionalmente, sus moléculas pueden variar en los valores de masa molecular y grados de desacetilación promedio o grupos aminos libres, lo cual determina la calidad y el uso de estos polímeros [4].

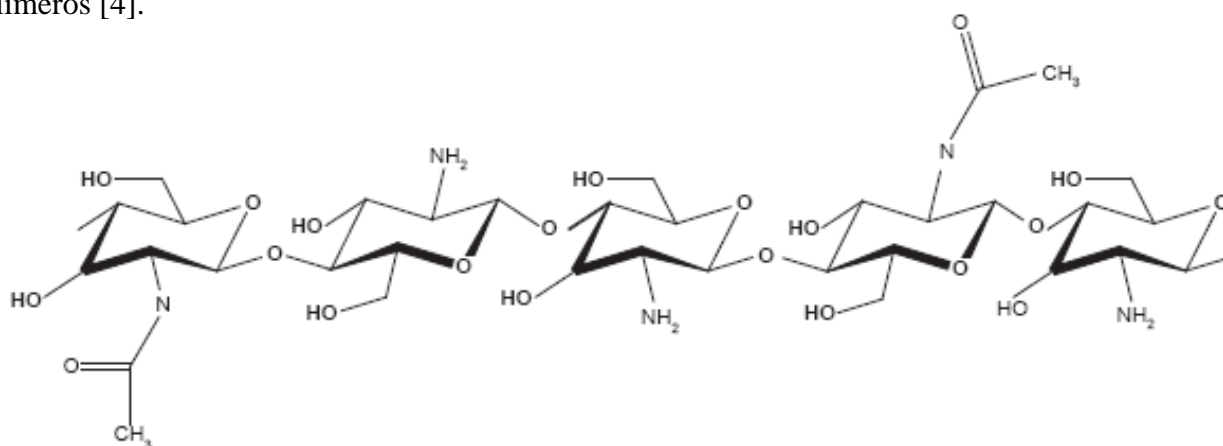


Figura 1. Estructura química del quitosano.

Debido a su alto peso molecular y a su estructura lineal no ramificada, el quitosano es un potente agente viscosante en medio ácido. La viscosidad de las soluciones de quitosano aumenta al incrementarse la concentración de esta, mientras que disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación del producto [5].

El quitosano es un sólido en forma de escamas, de color blanco-crema. Es insoluble en agua, álcalis y disolventes orgánicos comunes, pero es soluble en disoluciones acuosas de ácidos orgánicos (ácidos fórmico, cítrico, láctico, acético, etc.). Su solubilidad y viscosidad dependen del grado de desacetilación y degradación del polímero, pero también pueden verse incrementada por la adición de formaldehído, cloruros de acilo, anhídridos o sales de metales alcalinos [6].

Al igual que la quitina, es un polisacárido biodegradable, biocompatible, de baja toxicidad [7], además es naturalmente abundante y renovable [1]. Usualmente su peso molecular es muy alto (de varios cientos a algo más de un millón de $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), lo cual depende del material de partida y de las condiciones de su tratamiento, pero en algunos casos la aplicabilidad para un propósito particular y su efectividad en una acción específica depende de su peso molecular [8-10].

El método viscosimétrico es muy útil en la caracterización de polímeros naturales debido a su sencillez y bajo costo. Utilizando la ecuación de *Mark-Houwink-Sakurada* se puede determinar la

relación entre la viscosidad intrínseca y la masa molecular relativa del polímero [8,9].

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al determinar el comportamiento reológico, la masa molecular y viscosidad aparente del quitosano obtenida por desacetilación termoalcalina heterogénea, a escala industrial, a partir de la quitina de la langosta (*Panulirus Argus*).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales. El quitosano fue suministrado por la Planta de Producción de Productos Naturales y Sintéticos del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), el ácido acético glacial p.a y el cloruro de sodio por *Merck* (Alemania).

Los lotes de quitosano, obtenidos a nivel de banco, piloto e industrial, cumplieron con las especificaciones de calidad establecidas para esta materia prima por *Rowe et al.* [10] y *Paz et al.* [11].

2.2. Comportamiento reológico. Se empleó un rotoviscosímetro *Haake*, modelo RV 20 (Alemania) acoplado a un ordenador mediante un *Rheocontroller*, modelo RC 20 como interfase y un ultratermostato, modelo F 3, ambos de la firma *Haake*, utilizando el sistema de medición M 5 y el sensor NV std de cilindros concéntricos, en un intervalo de gradiente de velocidad comprendida entre 0 y 500 s⁻¹, a una temperatura de 20 ± 0,1°C. El programa utilizado para el análisis de los datos fue el ROT 2.3 de la propia firma.

Se preparó una disolución de quitosano al 4% en ácido acético glacial al 10% empleando 9 mL como porción de ensayo, el análisis se realizó por triplicado.

2.3 Masa molecular. El lote de quitosano obtenido a nivel industrial (Lote 11003), se correspondió con un polvo con 6,3% de humedad, 0,5% de cenizas sulfatadas, 0,3% de material insoluble y 79,9% de grado de desacetilación [11].

Tabla 1. Parámetros viscosimétricos.

<i>Nombre común</i>	<i>Símbolo y ecuación que lo define</i>
Viscosidad relativa	$\eta_r = \eta / \eta_o = t / t_o$
Viscosidad específica	$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = (\eta - \eta_o) / \eta_o \cong (t - t_o) / t_o$
Viscosidad reducida	$\eta_{red} = \eta_{sp} / C$
Viscosidad inherente	$\eta_{inh} = (\ln \eta_r) / C$
Viscosidad intrínseca	$[\eta] = (\eta_{sp} / C)_{C=0} = [(\ln \eta_{red}) / C]_{C=0}$

Para determinar la masa molecular promedio viscoso (M_v) se utilizó un viscosímetro capilar tipo *Ubbelohde* No. 2121R, equipado con un baño termostático controlado por un recirculador de

agua (Haake, Alemania), a $25,0 \pm 0,01^\circ\text{C}$. Las muestras de quitosano se prepararon utilizando el sistema disolvente ácido acético 0,1 mol/L y cloruro de sodio 0,2 mol/L. La concentración inicial del polímero fue $9,6 \cdot 10^{-3}$ g/mL en todos los casos y se prepararon cuatro diluciones ($7,68 \cdot 10^{-3}$, $5,76 \cdot 10^{-3}$, $1,92 \cdot 10^{-3}$ y $9,6 \cdot 10^{-4}$ g/mL). Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a medir el tiempo de caída de cada una de las disoluciones poliméricas, con cinco réplicas, para determinar los parámetros viscosimétricos (Tabla 1).

La viscosidad intrínseca fue determinada gráficamente, empleando la ecuación de Huggins que relaciona la viscosidad reducida con la concentración [6,8]:

$$\eta_{\text{red}} = [\eta] + k_{\text{H}} [\eta]^2 C$$
$$k_{\text{H}} = \text{Constante de Huggins}$$

Una vez calculada la viscosidad intrínseca, esta se utilizó para determinar la masa molecular promedio viscoso, M_v , a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada [6, 8]:

$$[\eta] = K \cdot M^a$$

donde K y a son dos constantes que dependen del sistema tampón.

Los valores reportados de K y α para el quitosano en el disolvente utilizado fueron $1,81 \cdot 10^{-3}$ y 0,93, respectivamente [6,8,12].

2.4. Viscosidad. Se determinó la viscosidad de los quitosanos obtenidas a escala de banco, piloto e industrial. La medición de la solución del biopolímero se realizó en un viscosímetro rotatorio (Fungilab S.A, España) empleando el husillo R2, a una velocidad de 200 rpm a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y un fondo de escala superior al 15%.

Se preparó una disolución de quitosano al 1% en ácido acético al 1% empleando 500 mL como porción de ensayo. La determinación se realizó por triplicado [12].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento reológico. El resultado del estudio reológico se presenta en las curvas fluidimétricas de la Figura 2 y en la Tabla 2, describiéndose, el carácter de flujo que posee la solución de quitosano.

Tabla 2. Análisis matemático del comportamiento reológico.

Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
$\tau = 0,2594$ D	$\tau = 0,2726$ D	$\tau = 0,2887$ D
$\eta = 259,4$ mPas	$\eta = 272,6$ mPas	$\eta = 288,7$ mPas
$R^2 = 1$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$

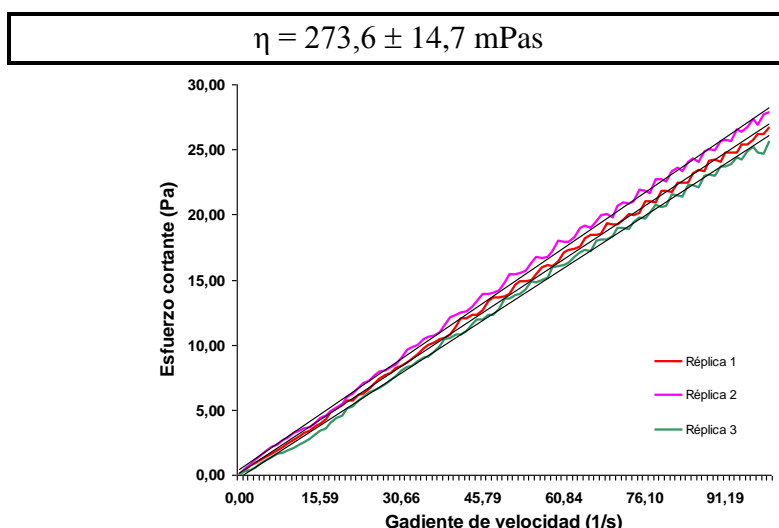


Figura 2. Curvas fluidimétricas de la disolución de quitosano.

La solución de quitosano se caracterizó reológicamente como un cuerpo de tipo newtoniano, pues como se puede observar los gráficos de las curvas fluidimétricas presentan un comportamiento lineal que parte del origen de las coordenadas manteniendo una relación constante entre el esfuerzo cortante y el gradiente de velocidad (τ/D). Las curvas fueron ajustadas empleando el *Software 2.3 Haake*, obteniéndose, en todos los casos, una ecuación de ajuste con un coeficiente de correlación igual a 1,00, demostrando un ajuste perfecto. A partir de estos resultados fue calculada la viscosidad de la solución, utilizando la siguiente ecuación:

$$\tau = \eta * D$$

donde τ es el esfuerzo cortante (Pa), D el gradiente de velocidad (s^{-1}) y η la viscosidad absoluta (Pa·s). Por lo tanto, la viscosidad de la solución de quitosano, en las condiciones de estudio, fue de $273,6 \pm 14,7$ mPa.s. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por *Fernández et al.* [13].

Masa molecular. Los resultados obtenidos en la aplicación de la técnica de viscosimetría capilar para la determinación de la masa molecular del quitosano, se muestran en la Tabla 3. En la misma se resumen los tiempos de caída (t) para las disoluciones del biopolímero en el sistema disolvente seleccionado a $25^{\circ}C$. Estos tiempos son el promedio de cinco mediciones. Los parámetros viscosimétricos calculados, a partir de estos resultados se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 3. Tiempos de caída para cada disolución ensayada.

<i>Disolución</i>	<i>Concentración g/mL</i>	<i>Tiempo de caída s</i>
1	$9,60 \cdot 10^{-3}$	361,68
2	$7,68 \cdot 10^{-3}$	280,56
3	$5,76 \cdot 10^{-3}$	208,20
4	$1,92 \cdot 10^{-3}$	111,96

5	$9,60 \cdot 10^{-4}$	88,80
Disolvente	–	72,24

Tabla 4. Análisis viscosimétrico del quitosano, a 25°C en NaCl/Hac.

Parámetro viscosimétrico	Disolución				
	1	2	3	4	5
η_r	5,01	3,88	2,88	1,55	1,23
η_{inh} (mL/g)	167,79	176,67	183,77	228,20	214,99
η_{sp}	4,01	2,88	1,88	0,55	0,23
η_{red} (mL/g)	417,36	375,48	326,75	286,37	238,79
$[\eta]$ (mL/g)	231,50				

Se observa una disminución de la viscosidad reducida (η_{red}) a medida que la concentración del polímero disminuye, lo que indica que se cumple la expresión de *Huggins* para el polímero en estudio, en las condiciones de trabajo utilizadas. Según esta ecuación, la viscosidad intrínseca no es más que el valor de la viscosidad reducida extrapolada a concentración cero. Se construyó el gráfico de viscosidad reducida (η_{red}) en función de la concentración (Figura 3).

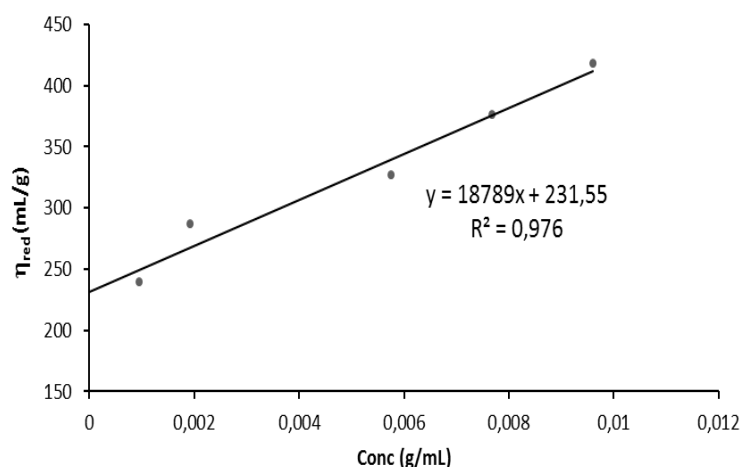


Figura 3. Representación de *Huggins*, a 25°C en NaCl/HAc, para el quitosano.

A partir de la ordenada en el origen de la línea recta obtenida se determinó la viscosidad intrínseca, $[\eta] = 231,55 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$. La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el disolvente y la temperatura de trabajo. Para un sistema polímero–disolvente a una temperatura determinada, la expresión de *Mark–Houwink–Sakurada* puede utilizarse para determinar la masa molecular promedio viscosa de un polímero. Para el quitosano en el disolvente 0,1 mol·L Hac – 0,2 mol·L NaCl a 25°C se tiene que:

$$M_V = \left(\frac{[\eta]}{1,81 \cdot 10^{-3}} \right)^{1/0,93}$$

Se debe señalar que las constantes de K y α reportadas en la literatura no tienen valores únicos como los tendría otro polímero para un sistema polímero–disolvente–temperatura dados, ya que se ha comprobado que la composición del quitosano, en términos de proporción de unidades N–acetiladas en sus cadenas, influye en su comportamiento reológico en solución y, por tanto, en los valores de K y α para un mismo sistema quitosano–disolvente–temperatura. Por lo que en el presente trabajo se utilizaron los valores reportados por *Parada et al.* [8] y *Fernández et al.* [12] para el intervalo de grado de desacetilación correspondiente al de la muestra analizada.

El valor de la constante de *Huggins* (k_H) obtenido (0,35), indica que la mezcla compuesta por ácido acético 0,1 mol/L y cloruro de sodio 0,2 mol·L⁻¹ es un buen disolvente para el quitosano a 25°C, pues es inferior a 0,50 lo que demuestra que no existen procesos de agregación [8].

La masa molecular calculada del quitosano obtenida fue de 310.000 g·mol⁻¹, cuyo valor está en concordancia con los determinados, previamente, por *Fernández et al.* [12] y *Rowe et al.* [10].

Viscosidad. En la Tabla 4 se observan los valores de viscosidad del quitosano obtenida a diferentes escalas. Estos resultados se pueden comparar con los valores reportados para quitosanos comerciales, determinados en iguales condiciones.

Tabla 4. Valores de la viscosidad.

<i>Réplicas</i>	<i>Viscosidad (mPa·s)</i>				
	<i>Banco</i>	<i>Piloto</i>	<i>Industrial</i>	<i>Quitosano Primex</i>	<i>Quitosano Aldrich</i>
1	48,3	47,5	47,7	59,9*	53,0*
2	54,0	50,6	49,6		
3	53,3	45,3	52,5		
Promedio ± DS	51,8 ± 3,1	47,8 ± 2,7	49,3 ± 2,4		

* Datos del proveedor.

Se demuestra que el quitosano obtenida a escala de banco, piloto e industrial, tienen viscosidades similares y se corresponden con el valor de las comerciales, encontrándose en el intervalo de 20 – 200 mPa.s, cumpliendo con la especificación para este parámetro establecido en los certificados de calidad de los proveedores referidos, así como lo reportado por *Rowe et al.* [10]. Por lo que se corrobora la calidad del biopolímero obtenido siguiendo el procedimiento establecido previamente por *Paz et al.* [11].

4. CONCLUSIONES

La disolución de quitosano en medio ácido exhibe un comportamiento de flujo newtoniano, con una masa molecular viscosimétrica de $310.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ y una viscosidad que oscila entre 20 – 200 mPa·s. Por lo que, el quitosano derivada de quitina de langosta, presentó adecuadas propiedades viscosimétricas, acorde a lo reportado para los quitosanos comerciales, corroborando la calidad del biopolímero y sus potencialidades para uso farmacéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Singla AK, Chawla M, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1047 (2001)
- [2] Kurita K, “Chemical modifications of chitin and chitosan”. En: Muzzarelli C, Jeuniaux GW, *Chitin in Nature and Technology*. New York (USA): Gooday Eds., 1986, p. 287–293.
- [3] Roberts GAF, “Structure of chitin and chitosan”. En *Chitin Chemistry*. New York (USA): Macmillan Press., 1992, p. 1–100.
- [4] Peniche CC. *Estudios sobre Quitina y Quitosano*, Tesis Doctoral. Habana, Cuba. Facultad de Química, Universidad de la Habana, 2006.
- [5] Skaugrud O, *Drug Cosmetic Ind.*, **148**, 24 (1991)
- [6] Ravi Kumar MNV, *Reactive & Functional Polymers*, **46**, 1 (2000)
- [7] Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T, *J. Surg. Res.*, **133**, 185 (2006)
- [8] Parada L, Crespín G, Miranda R, Katime I, *Rev. Iberoam. Polím.*, **5**, 1 (2004)
- [9] Paredes M, Altanés S, Rapado M, *Revista CENIC Ciencias Químicas*, **36**, No. Especial (2005)
- [10] Rowe RC, Sheskey PJ., Quinn ME., “Chitosan”. En *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (Italia): Pharmaceutical Press, 2009, Versión electrónica.
- [11] Paz N, Fernández M, López O, Nogueira A, García C, Pérez D, Tobella J, Montes de Oca Y, Díaz D, *Rev. Iberoam. Polím.*, **13**, 3 (2012)
- [12] Fernández M, Heinämäki J, Räsänen M, Maunu SL, Karjalainen M, Nieto OM, Iraizoz A, Yliruusi J, *Carbohydr. Polym.*, **58**, 401 (2004)
- [13] Fernández M, Heinämäki J, de la Paz N, López O, Maunu SL, Virtanen T, Hatanpää T, Antikainen O, Nogueira A, Fundora J, Yliruusi J, *AAPS Pharm.Sci.Tech.*, **12** (2), 637 (2011)