

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO ENTRECruzADO CON ÁCIDO CÍTRICO

Adrián Chávez Huerta^{1*}, Sabrina Acevedo¹, Enmanuel Luzardo¹, Ana Valbuena²,
Marinela Colina³

¹ Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT). Mcpo. La Cañada de Urdaneta, Venezuela.

² Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Carretera Panamericana, km 11, Altos de Pipe, Venezuela.

³ Empresa Mixta Innovación Ambiental Quitosano CA. (INNOVAQUITO CA). Mcpo. San Francisco, Sector el Bajo.
Correo electrónico: ajchavez3000@gmail.com.

Recibido: Agosto de 2018; Aceptado: Septiembre de 2018

RESUMEN

En esta investigación se estudió el entrecruzamiento de quitosano con ácido cítrico. El proceso para la obtención de quitosano se realizó a partir de la desproteización, desmineralización, despigmentación y desacetilación empleando exoesqueletos de cangrejo. Las muestras fueron caracterizadas química y estructuralmente mediante espectrometría infrarroja con transformada de *Fourier* (FTIR), difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido en modo ambiental (ESEM). Se obtuvieron bandas características en el espectro de FTIR correspondientes al quitosano, donde se observó una banda a 1.650 cm^{-1} del grupo acetamido (amida I) y la tensión N–H a 1.580 cm^{-1} del grupo amino. Se realizaron dos tipos de reacciones de entrecruzamiento de quitosano; la primera fue la amidación entre el grupo amino del quitosano y la segunda reacción mediante una esterificación. Para la primera reacción se observó en el difractograma, picos característicos de quitosano, con disminución y desplazamientos de los picos indicando una baja cristalinidad en las muestras debido al entrecruzamiento de quitosano con el ácido cítrico, para la segunda reacción se observaron picos bien definidos, diferentes a los observados en el quitosano, lo que indica un cambio en la estructura. En los espectros de FTIR se observaron para la primera reacción bandas del grupo amida en 1.710 cm^{-1} y en la segunda reacción la esterificación del grupo hidroxilo del quitosano con ácido cítrico, en 1.730 y 1.200 cm^{-1} . La morfología de los compuestos se estudió mediante ESEM. Los resultados indicaron que ambas reacciones pueden ser empleadas para realizar el entrecruzamiento de quitosano.

Palabras clave: Quitosano, ácido cítrico, entrecruzamiento, amidación, esterificación.

ABSTRACT

The crosslinking of chitosan with citric acid has been studied in this research. Chitosan was obtained by deproteinization, demineralization, depigmentation and deacetylation of crab exoskeletons. The samples were chemically and structurally characterized by infrared spectroscopy with *Fourier* transform (FTIR), X-Ray diffraction and environmental scanning electron microscopy (ESEM). Characteristic bands for chitosan were obtained in the FTIR spectrum, where bands were observed in 1.650 cm^{-1} for the acetamide group (amide I) and the N–H stretching in 1.580 cm^{-1} for the amine group. Two types of chitosan crosslinking reactions were carried out; the first was the amidation between the amine group in the chitosan, and the second reaction by an esterification. For the first reaction, chitosan characteristic peaks were observed in the diffractogram, with decrease and displacement of the peaks, indicating a low crystallinity in the samples due to the chitosan crosslinking with citric acid. For the second reaction, well defined peaks were observed, different from the ones observed in the chitosan, indicating a change in the structure. In the FTIR spectra, it was observed for the first reaction the bands for the amide group in 1.710 cm^{-1} , and in the second reaction, the esterification of the hydroxy group from the chitosan with citric acid in 1.730 and 1.200 cm^{-1} . The morphology of the compounds was studied by ESEM. Results indicated that both reactions can be used to achieve the crosslinking of chitosan.

Keywords: chitosan, citric acid, crosslinking, amidation, esterification.

INTRODUCCIÓN

La quitina, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, se encuentra en los crustáceos, en el exoesqueleto de algunos insectos y en las paredes celulares de muchos hongos y algas. El quitosano, su derivado, se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina en medio

alcalino y es un polisacárido compuesto de dos subunidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, las cuales se encuentran enlazadas por enlaces glucosídicos α (1-4). Los grupos amino primarios N-desacetilados confieren una densidad catiónica alta y un pH neutro [1].

Existen diferentes investigaciones de entrecruzamiento de diferentes compuestos con quitosano los cuales pueden ser útiles en la formación de películas. El entrecruzamiento se produce cuando hay más de dos lugares reactivos en uno de los compuestos (monómeros), el polímero formado puede crecer en forma de red con enlaces transversales. Debido a la estructura única de la macromolécula combinada con su polifuncionalidad, el quitosano tiene la capacidad de formar geles. La reticulación (o entrecruzamiento) se produce cuando un reactivo (un agente entrecruzante) introduce puentes intermoleculares y/o enlaces cruzados entre las macromoléculas del polisacárido. El agente entrecruzante puede reaccionar con macromoléculas de cadena lineal o ramificadas (reticulación/entrecruzamiento) y/o consigo mismo (polimerización), dependiendo de la naturaleza del agente entrecruzante y las condiciones de reacción. Cuando el grado de entrecruzamiento es alto, el material es poco cristalino [2].

Los materiales entrecruzados poseen varias características, propiedades y ventajas. Son fáciles de preparar con reactivos relativamente económicos y disponibles en una variedad de estructuras, con distintas propiedades y también en numerosas configuraciones, por ejemplo, geles, partículas, membranas, revestimientos, películas, fibras, cápsulas y esponjas. Son insolubles en medios ácidos y alcalinos así como en disolventes orgánicos. Se vuelven más resistentes al corte, a altas y bajas temperaturas y pH, en comparación con los polisacáridos primarios [3].

Los polímeros entrecruzados de quitosano muestran mejores resultados en términos biológicos y mecánicos, cuando se compara con el quitosano. Comúnmente se emplea para el entrecruzamiento de este tipo de polímeros dos compuestos: la epíclorhidrina y el glutaraldehído. De estos dos compuestos el primero es un contaminante ambiental cancerígeno y el segundo es un agente neurotóxico. Trabajar a escala industrial con estos compuestos tiene un impacto ambiental negativo en la salud en los ecosistemas adyacentes. El ácido cítrico se ha empleado para formar complejos con el quitosano, para entrecruzar almidón, quitosano, carboximetilquitosano, quitosano con celulosa, quitosano con alginato, ciclodextrinas, y en la preparación de nanopartículas. El entrecruzamiento con ácido cítrico o un derivado de este ácido, es una solución ambientalmente aceptable en la búsqueda de un agente entrecruzante para el quitosano, siendo esto útil para producir materiales con distintas propiedades y por ende distintas aplicaciones. En las reacciones de entrecruzamiento se han empleado el uso de ácidos carboxílicos como agentes entrecruzantes debido a que no son tóxicos, de este tipo de reacciones ya se han reportado varios ejemplos. En esta

investigación se tiene como objetivo realizar reacciones de entrecruzamiento de quitosano empleando ácido cítrico [4]

MÉTODOS

Muestras. Las muestras de los exoesqueletos de cangrejo fueron suministradas por la empresa *Clifford de Venezuela C.A.*, de crustáceos provenientes del *Lago de Maracaibo, Venezuela*.

Obtención de quitosano. Los exoesqueletos de cangrejo fueron, lavados, limpiados y secados durante 1 hora a 100°C, luego fueron triturados hasta obtener un tamaño de partícula de aproximadamente 4 mm de diámetro. La desproteinización de exoesqueletos de cangrejos se realizó calentando (100 g) en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10% m/V y tiosulfito de sodio (Na₂SO₃) al 0,1% m/V por 1 hora. Se desmineralizó agregando una solución 6 M de ácido clorhídrico (HCl) a temperatura ambiente por 1 hora. Se despigmentó con lavados continuos de etanol (CH₃CH₂OH). La desacetilación de la quitina se realizó con una solución acuosa de NaOH al 30% m/V y Na₂SO₃ al 0,1% m/v a temperaturas de entre 100–110°C durante 4 horas repitiendo 2 veces este procedimiento. Al finalizar la muestra se lavó con agua desionizada, se filtró y se secó a temperatura ambiente. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Reacciones de entrecruzamiento de quitosano. La primera reacción de entrecruzamiento se realizó por medio de la amidación, entre el quitosano y un éster del ácido cítrico. Se realiza *in situ* la formación del éster y la reacción de entrecruzamiento, en la cual se mezcló 0,1 g del ácido cítrico con 50 mL de metanol y 1 g de quitosano, el procedimiento se realizó en condiciones de reflujo.

La segunda reacción de entrecruzamiento se realizó por medio de una esterificación, para esto; se pesó 1 gramo de quitosano y se disolvió en una solución de ácido acético al 3% m/v, a esta solución resultante se le agregó ácido cítrico (0,1 g) para formar el entrecruzamiento con la formación de enlaces éster. Esta reacción se realizó en calentamiento y agitación a un máximo de 90°C [5].

Las muestras derivadas del entrecruzamiento se caracterizaron química y estructuralmente, por medio de las técnicas; difracción de rayos X de polvo (DRX), para ello se empleo un difractómetro de polvo marca *Brucker D8* en el intervalo de análisis desde 2 hasta 50° de 2θ y por espectroscopía de infrarrojo con transformada de *Fourier* (FTIR), empleando un espectrofotómetro de infrarrojo marca *Perkin Elmer Spectrum GX*, preparando pastillas de KBr. Además se estudió la morfología de los derivados por microscopía electrónica de barrido (SEM), para ello se utilizo un microscopio electrónico de barrido marca *FEI Quanta 200*, en modo ambiental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reacción de entrecruzamiento mediante amidación. La primera reacción propuesta para el entrecruzamiento fue la amidación del quitosano con el éster del ácido cítrico la cual se muestra en la Figura 1. El ácido cítrico se esterifica en primer lugar, empleando un alcohol (metanol) y trazas de ácido como catalizador; la catálisis se produce debido a la protonación del grupo carbonilo del ácido cítrico, quedando más susceptible al ataque nucleófilo. Este éster de ácido formado en la primera etapa, reacciona con el grupo amino del quitosano formando enlaces amida (amidación), entrecruzando el compuesto. Esta reacción no debe realizarse con quitosano disuelto en ácido acético, debido a que el ácido acético reacciona con el alcohol formando un éster, lo cual interfiere en la reacción [5, 6].

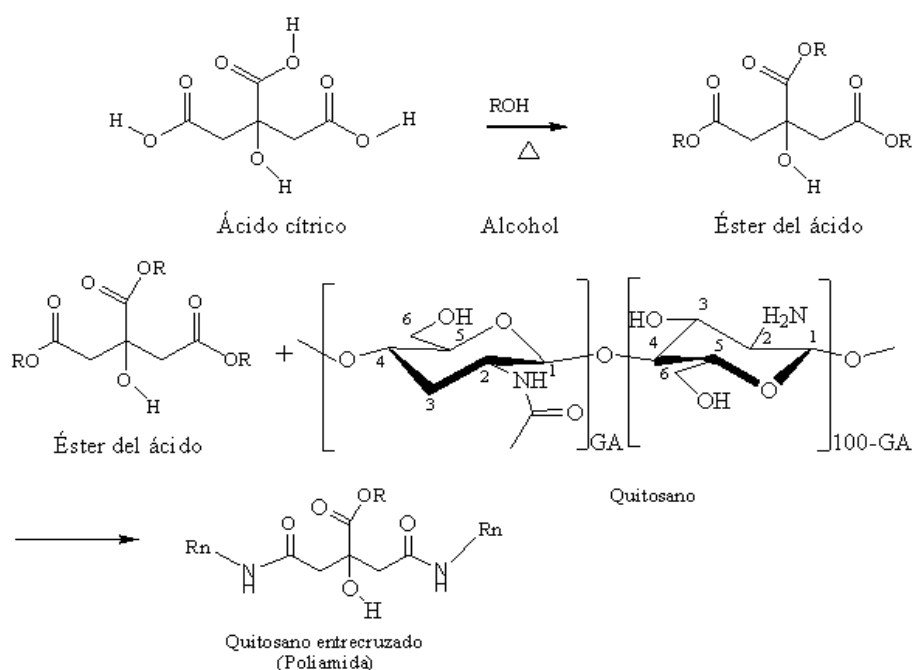


Figura 1. Reacción de entrecruzamiento propuesta por medio de amidación del quitosano.

En la Figura 2, se muestra el espectro del compuesto entrecruzado por medio de amidación del quitosano. El espectro de FTIR exhibe bandas del grupo carbonilo ($C=O$) (Figura 2-a) alrededor de 1.710 cm^{-1} , y de alargamiento del $C-O$ de ésteres (1.100 cm^{-1}), la banda ancha intensa, a 3.500 cm^{-1} solapa alargamientos $N-H$ y $O-H$. El espectro de la Figura 2b) corresponde a quitosano. No se muestra la banda característica a 1.100 cm^{-1} de los ésteres alifáticos. El material obtenido es insoluble en ácido acético [7].

En la Figura 3a) se observa el difractograma del compuesto entrecruzado por medio de la amidación y en la Figura 3b) quitosano. En el difractograma del compuesto entrecruzado, se puede observar los picos aproximadamente en 12 y 18° , con menor intensidad que los picos del quitosano a 10 y 20° [1]. Lo que indica que éste pierde su estructura cristalina natural luego de ser

entrecruzado, lo que sugiere que el material cambia de un estado cristalino a un estado amorfo. La reacción de entrecruzamiento no es selectiva y origina sitios entrecruzados y otros no, dada la dificultad de la reacción y de la disponibilidad física de los grupos funcionales [1].

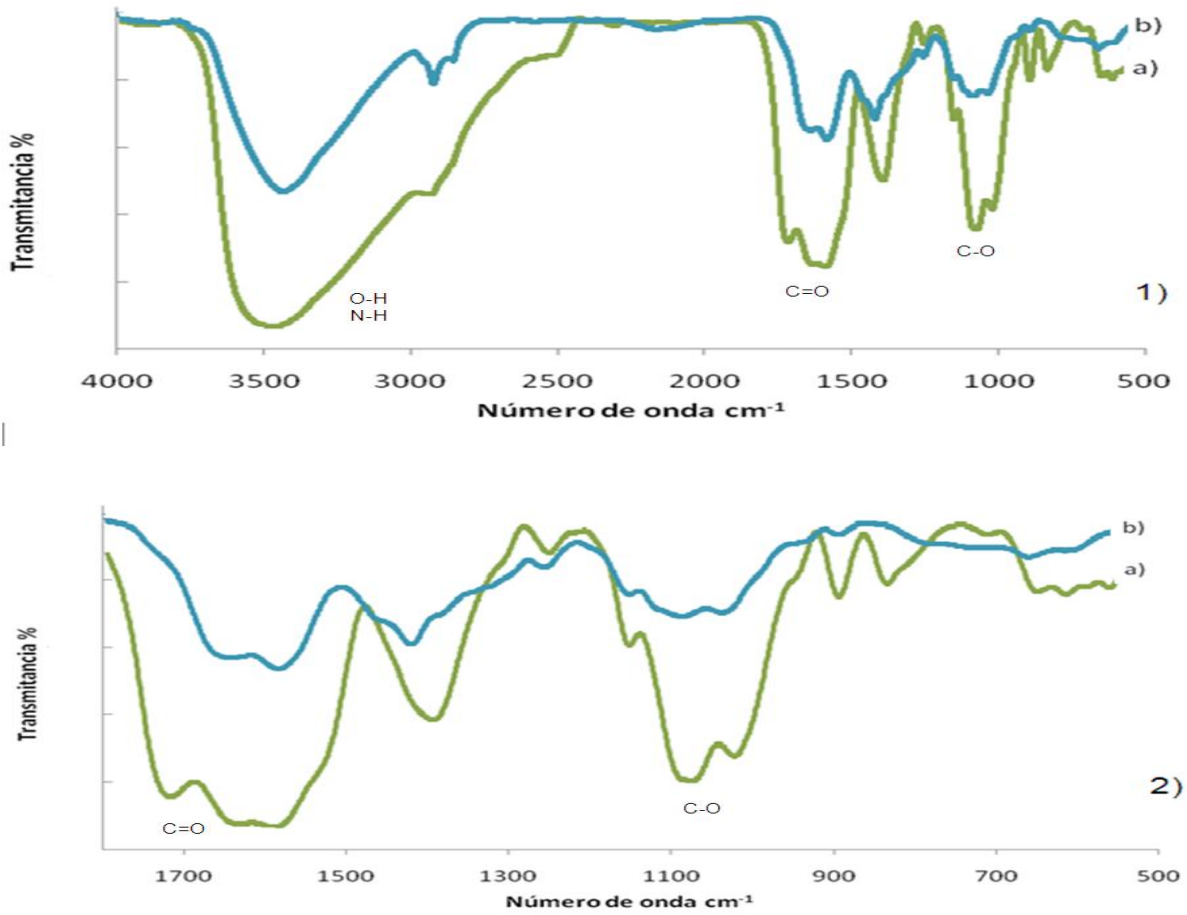


Figura 2.1) Espectro FTIR de a) entrecruzamiento de quitosano por amidación, y b) quitosano. 2.2) Ampliación de 2.1 desde 1.700 hasta 500 cm⁻¹.

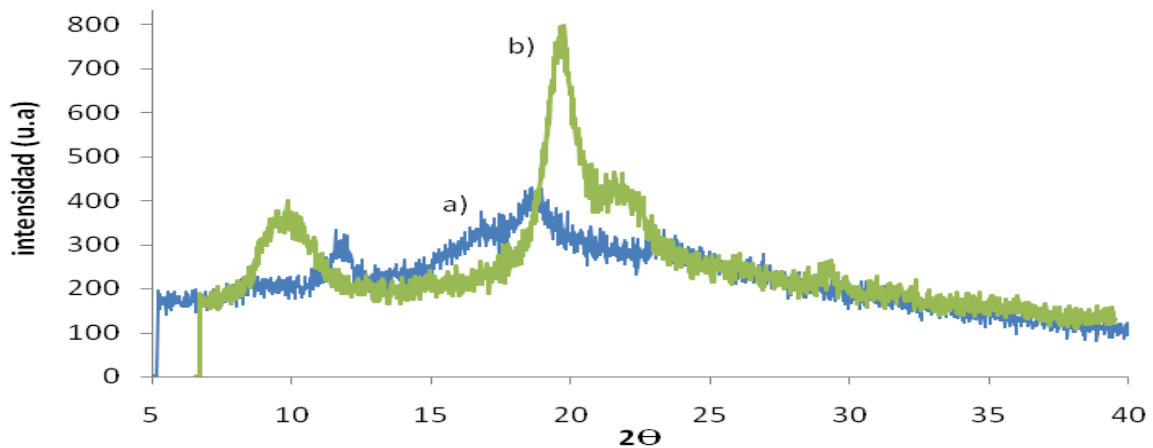


Figura 3. Difractograma de a) quitosano entrecruzado por medio de amidación b) quitosano.

En la Figura 4 se observa las micrografías del quitosano entrecruzado a 800, 3.000, 6.000, y 12.000X de magnitud, donde se puede observar que superficialmente el compuesto está constituido de material amorfo y a su vez presenta un tipo de fibras (Figuras 4.2 y 4.3), la formación de fibras es una característica común en la quitina y el quitosano [8].

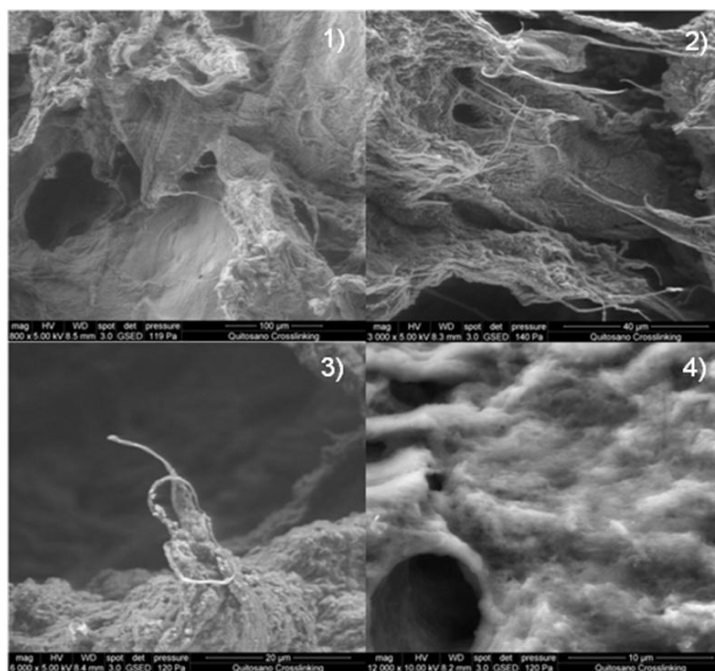


Figura 4. Micrografías de quitosano en polvo entrecruzado con ácido cítrico y metanol. 1) 800, 2) 3.000, 3) 6.000 y 4) 12.000 X.

Reacción de entrecruzamiento mediante esterificación. En la Figura 5 se muestra la segunda reacción propuesta de esterificación para el entrecruzamiento de quitosano con ácido cítrico. En esta reacción el grupo 6-hidroxilo del quitosano reacciona con los grupos carboxílicos del ácido cítrico, formando enlaces tipo éster, entrecruzando las moléculas [5, 9].

En la Figura 6a) se observa el espectro FTIR del entrecruzamiento por esterificación. La figura 6 b) corresponde al espectro del ácido cítrico. Se pueden observar algunas diferencias entre los espectros del compuesto entrecruzado y el espectro del ácido cítrico. En el espectro del ácido cítrico (véase la Figura 6b) se identifican bandas características en 1.410 , 1.300 , y 1.120 cm^{-1} las cuales no se observan en el espectro del compuesto entrecruzado (figura 6 a). Por otra parte, en el espectro del quitosano entrecruzado se observa la presencia de la banda a 1.650 cm^{-1} debido a los grupos amida residuales de quitina y la ausencia de la correspondiente al grupo amino del quitosano, a 1.590 cm^{-1} [5].

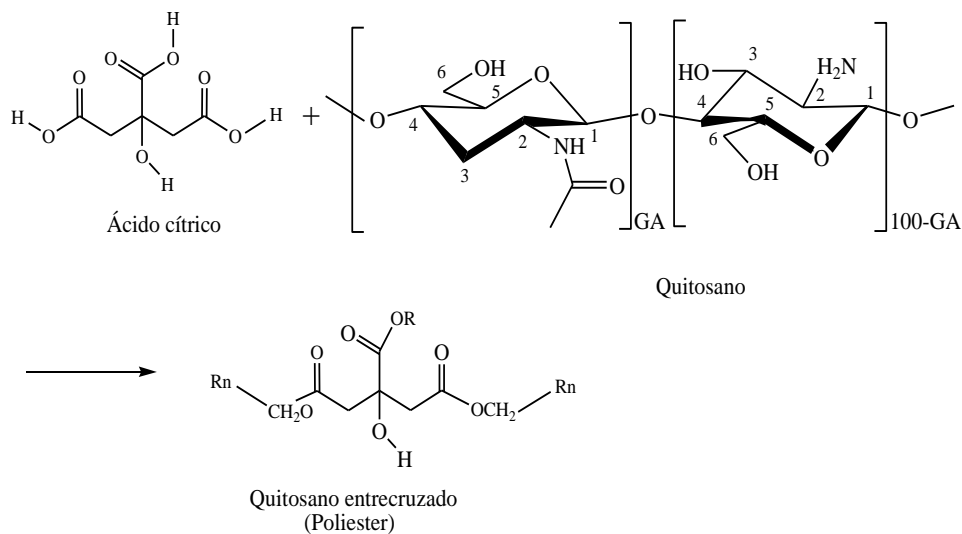


Figura 5. Reacción de entrecruzamiento propuesta para la formación de enlaces éster.

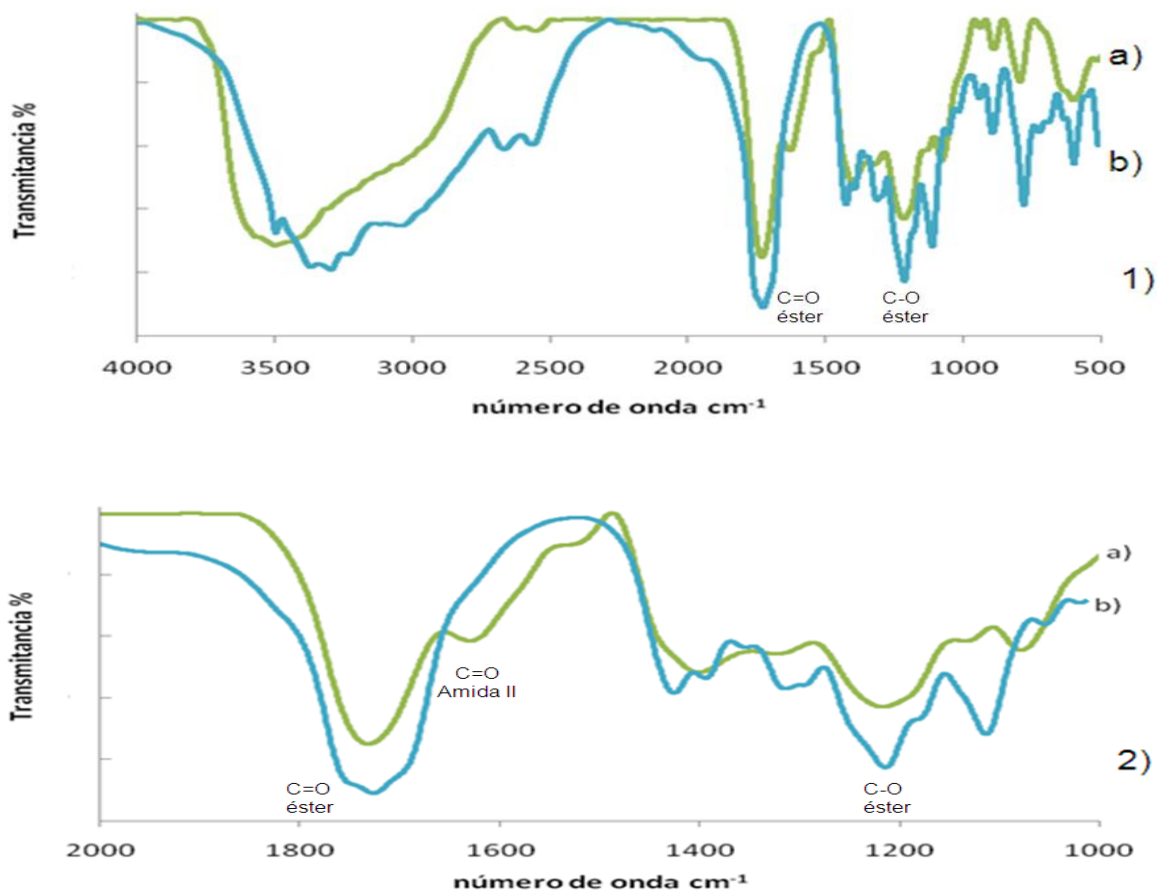


Figura 6.1) Espectro FTIR de a) quitosano entrecruzado y b) ácido cítrico. 4.2) Ampliación desde 2.000 hasta 1.000 cm^{-1} .

En la Figura 7a) se observa el difractograma del quitosano entrecruzado por esterificación; en este se observan reflexiones desde 15 hasta 40°. En el difractograma de quitosano (Figura 7b), se observan las bandas características en 10 y 20°, no se observa relación entre ambos difractogramas, lo que indica que tienen una cristalinidad diferente. Tampoco tiene relación con el difractograma de entrecruzamiento por amidación mostrado anteriormente (Figura 3), en este caso se presume que el material es cristalino, debido a que presenta varios picos bien definidos, Figura 7 a.

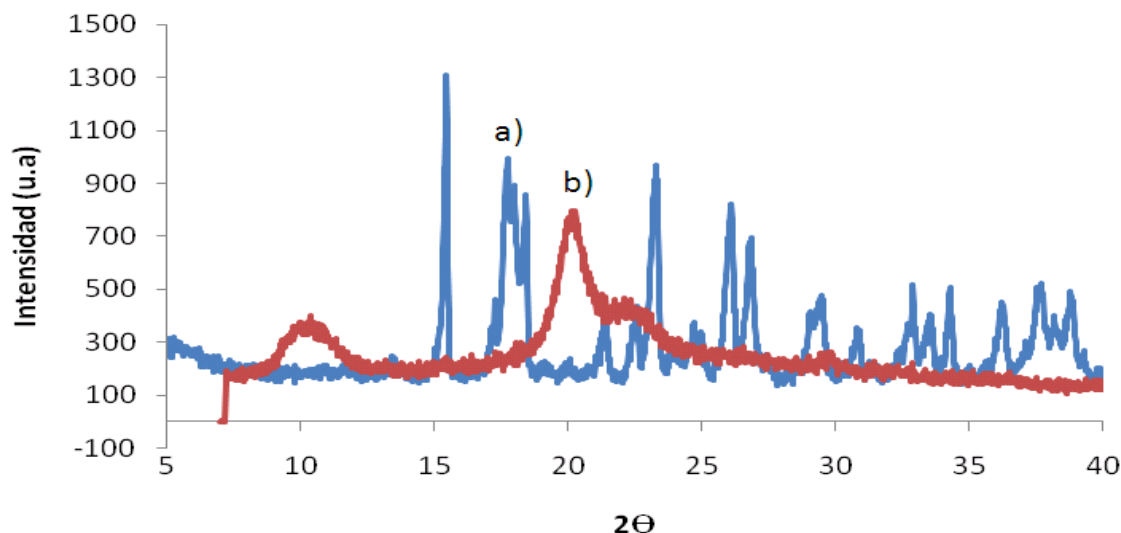


Figura 7. Difractograma de a) quitosano entrecruzado por esterificación y b) quitosano.

En la Figura 8 se muestra la micrografía a 3.000 y 6.000X de magnitud, de una película del quitosano entrecruzado por esterificación: 1) antes del secado y 2) luego del secado. El secado se realizó a 80°C durante 3 horas para eliminar el exceso de humedad. En la Figura 8.2, se puede apreciar que la superficie no es uniforme y formación de gránulos [8].

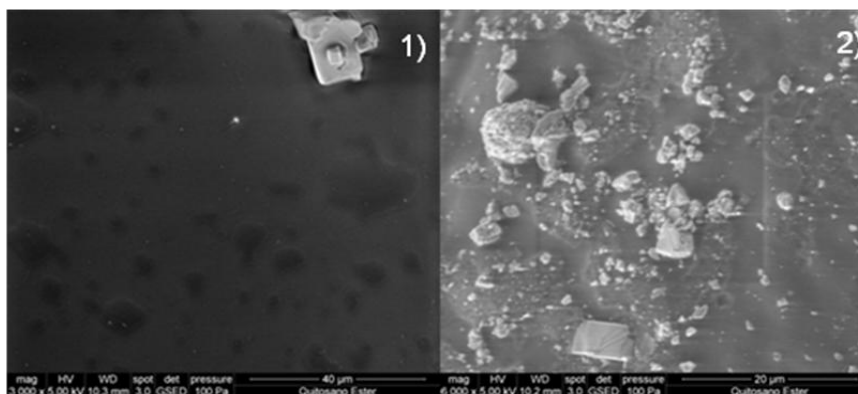


Figura 8. Micrografía de película de quitosano entrecruzado por esterificación 1) antes del secado y 2) luego del secado.

CONCLUSIONES

Por medio de dos tipos de reacciones, la amidación y la esterificación del quitosano, se obtuvieron dos derivados de quitosano entrecruzado con ácido cítrico. El compuesto obtenido por medio de amidación es insoluble en ácido acético, lo cual es una característica de los compuestos con alto grado de entrecruzamiento. En cambio el compuesto obtenido por esterificación se disuelve fácilmente y se pudo obtener una película del compuesto.

Por medio de la difracción de rayos X, en la primera reacción se observó, disminución y desplazamiento de los picos característicos del quitosano, corroborando el entrecruzamiento de quitosano con el ácido cítrico, en la segunda reacción se observan picos bien definidos, diferentes a los observados en el quitosano, lo que indica un cambio en la morfología.

Al emplear FTIR en la primera reacción se observaron bandas del grupo amida en 1.710 cm^{-1} y en la segunda reacción la esterificación del grupo hidroxilo del quitosano con ácido cítrico, en 1.730 y 1.200 cm^{-1} .

Por medio de ESEM se observaron para la primera reacción que el compuesto presenta un tipo de fibras, las cuales son características comunes para los compuestos entrecruzados de quitosano, en la segunda reacción se obtuvo una película del compuesto esterificado, la cual se observa poca uniformidad en su superficie.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la *Universidad del Zulia (LUZ)*, y al *FONACIT* por el financiamiento para la realización de este trabajo a través del *Programa Misión Ciencia*. Y al *Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT)* por prestar sus instalaciones para tal fin.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) H El Knidri, El Khalfaouy A, Laajeb A, Lahsini A “Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation” <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpsep.2016.09.020> (2016)
- 2) Oak M, Mandke R, Singh J “Smart polymers for peptide and protein parenteral sustained delivery”, *Drug. Disc. T: Tech.*, **9(2)**, 131 (2012)
- 3) Pella M, Lima M, Tenorio E, Guilherme M, “Chitosan-based hydrogels: from preparation to biomedical applications”. *Carboh. Pol.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033> (2018)
- 4) Alaba P, Oladoja N, Sani Y, Ayodele O, Mohammed I “Insight into Wastewater Decontamination Using Polymeric Adsorbents” *J. of Environ. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.019> (2018)
- 5) Alonso D, Gimeno M, Olayo R, Torres H, Sánchez J, Shirai K “Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles”, *Carboh. Pol.*, **77**, 536 (2009)
- 6) Reddy N, Yang Y “Citric acid crosslinking of starch films”, *Food Chem.*, **118**, 702, (2010)
- 7) Brugnerotto J, Lizardi J “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization”, *Polymer*, **42**, 3569 (2001)
- 8) Rasha M, Abdel R, Radim H, Abdel M, Moustafa M, Solimand A “Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity” *Int. J. of Biol. Macromol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027> (2015)
- 9) Singh J, Dutt P, Dutt J, Hunt A, Macquarri D, Clark J “Preparation and properties of highly soluble chitosan L-glutamic acid aerogel derivative”, *Carboh. Pol.*, **76**, 188, (2009)