

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Optimización de la extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón para la elaboración de membranas empleando la técnica de electrospinning

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica

EMILY JOSEFA ARIAS DE PRADA

Quito, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas de la Srta. Emily Josefa Arias De Prada ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dra. Lorena Meneses

Directora de la Disertación

Quito, 15 de enero del 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas de la Srta. Emily Josefa Arias De Prada ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Lorena Meneses
Directora de la Disertación
Quito, 15 de enero del 2019

DEDICATORIA

A mi Ángel de luz, mi papá, la persona más sabia e inteligente; quien me enseñó a siempre ser mejor en todo aspecto y que ahora está cuidándome desde el cielo.

A mi mamá, mi más grande ejemplo de lucha, entrega y sobretodo amor.

Y a mi hermana, que siempre ha sido mi modelo a seguir, una persona admirable.

Esto es por y gracias a
ustedes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco infinitamente a mis padres, por todas las enseñanzas y las oportunidades que me han brindado.

Agradezco a Tefi, mi hermana, quien ha sido mi apoyo incondicional, la persona que nunca me ha defraudado y no ha permitido que me rinda.

A Camila, que no puede faltar en esta lista, por ser mi “compañera en el crimen” y por haber compartido conmigo esta etapa llenándola de experiencias inolvidables. No hay palabras para agradecer su amistad y paciencia.

A mis compañeros de clase en general, pero sobre todo a Dominique, quien siempre estuvo para mí.

Agradezco a mi directora de titulación, Dra. Lorena Meneses, por su orientación en este trabajo y por darme la oportunidad de aprender cosas nuevas.

Muchas gracias al Ing. Christian Narváez, y la Universidad de las Fuerzas Armadas, quienes me abrieron las puertas del proyecto y me colaboraron con todas las facilidades en cuanto se refiere a materiales y equipos para la ejecución de este trabajo.

Gracias a la Escuela de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica y a todas las personas que la conforman, por su apoyo y colaboración.

Finalmente agradezco a todos mis familiares, amigos y a las personas que estuvieron conmigo en el transcurso de estos años.

Gracias a todos los que creyeron en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE ECUACIONES.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	14
2.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 TOMA DE MUESTRA.....	15
3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	15
3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO PROCEDENTE DE CÁSCARAS DE CAMARÓN.....	16
3.3.1 MÉTODO 1 PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO.....	16
3.3.2 MÉTODO 2 PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO.....	18
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO OBTENIDO EMPLEANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA FTIR.....	20
3.5 ELABORACIÓN DE MEMBRANAS NANOMÉTRICAS CON QUITOSANO EMPLEANDO LA TÉCNICA DE ELETROSPINNING.....	21
3.6 EXAMINACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS CON QUITOSANO OBTENIDAS EMPLEANDO LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	24

3.7	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	24
3.7.1	REPORTE DE RESULTADOS DE EXTRACCIÓN.....	24
3.7.2	REPORTE DE RESULTADOS DE LAS MICROGRAFÍAS DE LAS MEMBRANAS OBTENIDAS POR SEM	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	26
4.1.1	PREPARACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE CAMARÓN	26
4.1.2	EXTRACCIÓN DEL QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARAS DE CAMARÓN 27	
4.1.3	EXTRACCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARAS DE CAMARÓN POR EL MÉTODO 1	30
4.1.4	EXTRACCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARAS DE CAMARÓN POR EL MÉTODO 2	38
4.2	CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO EXTRAÍDO POR FTIR-ATR	45
4.3	ELABORACIÓN DE MEMBRANAS DE POLÍMERO CON QUITOSANO MEDIANTE ELECTROSPINNING.....	53
4.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS POR MICROSCOPIA SEM	59
5.	CONCLUSIONES	72
6.	RECOMENDACIONES.....	74
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8.	ANEXOS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidad de quitina	3
Figura 2. Unidad de quitosano	4
Figura 3. Esquema común de un equipo de Electrospinning	9
Figura 4. Etapas del proceso de extracción general de quitosano a partir de cáscaras de camarón	16
Figura 5. Formato para la codificación de cada ensayo en la extracción de quitosano por el Método 1 (DP = desproteínización; DC = desacetilación).....	18
Figura 6. Formato para la codificación de cada ensayo en la extracción de quitosano por el Método 2 (DM = desmineralización; DC = desacetilación).....	19
Figura 7. Inyección de la jeringa para la elaboración de las membranas por electrospinning, A (ánodo), B (cátodo).....	22
Figura 8. Distancia entre la punta de la jeringa de inyección de la solución polimérica y la placa colectora de las fibras para la elaboración de membranas por electrospinning.....	23
Figura 9. Proceso de desacetilación de quitina para obtener quitosano utilizando hidróxido de sodio.....	29
Figura 10. Histograma de datos experimentales para los porcentajes promedio de desacetilación en el Método 1 de extracción de quitosano	37
Figura 11. Histograma de datos experimentales para los porcentajes promedio de desacetilación en el Método 2 de extracción de quitosano	44
Figura 12. Espectro IR de quitosano grado industrial obtenido bajo las mismas condiciones que los espectros de las muestras de quitosano experimental.....	46
Figura 13. Espectro IR de quitosano reportado en bibliografía	46
Figura 14. Espectro FTIR de muestra de quitina reportada en bibliografía.....	48
Figura 15. Espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (A: CA1b; B: CA2c; C: CA3a; D: CB1a; E: CC2b) y de quitosano grado industrial.....	49

Figura 16. Espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (A: LA1a; B: LB1a; C: LB2a; D: LC2c) y de quitosano industrial.....	51
Figura 17. Formación del cono de Taylor en la gota de la solución polimérica quitosano (extraído experimentalmente)/PVA disuelto en ácido acético.....	55
Figura 18. Ejemplo de una membrana elaborada con la solución polimérica que contenía el quitosano extraído experimentalmente por el Método 1.....	58
Figura 19. Micrografía SEM de electrohilado de quitosano extraído experimentalmente mediante el Método 1 (quitosano/PVA) disueltos en ácido acético, a una concentración 1:1; A (CA1b), B (CA2c), C (CA3a), D (CB1a), E (CB2b), F (CB3b), G (CC1c), H (CC2b), I (CC3b).....	59
Figura 20. Micrografía SEM de electrohilado de quitosano extraído experimentalmente mediante el Método 2 (quitosano/PVA) disueltos en ácido acético, a una concentración 1:1 A (LA1a), B (LA2a), C (LA3c), D (LB1a), E (LB2a), F (LB3b), G (LC1a), H (LC2c), I (LC3c).....	60
Figura 21. Primer ejemplo de formación de <i>beads</i> en las micrografías obtenidas por SEM.....	61
Figura 22. Segundo ejemplo de formación de <i>beads</i> en las micrografías obtenidas por SEM.....	62
Figura 23. Membrana elaborada con quitosano industrial 2% con ácido acético 70% + PVA 10% disuelto en agua	63
Figura 24. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra CB1a correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones.....	64
Figura 25. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra CB1a.....	65
Figura 26. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra CB3b correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones.....	66
Figura 27. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra CB3b.....	67

Figura 28. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra CC2b correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones.....	68
Figura 29. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra CC2b	69
Figura 30. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra LB1a correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones.....	70
Figura 31. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra LB1a..	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Rango de trabajo empleado en la técnica de electrospinning para la elaboración de las membranas nanométricas con el quitosano obtenido experimentalmente.....	22
Tabla 2. Condiciones de trabajo del SEM para micrografías de las membranas.....	24
Tabla 3. Porcentaje de rendimiento de extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón a partir del Método 1.	31
Tabla 4. Porcentaje de desacetilación del quitosano obtenido experimentalmente a partir del porcentaje teórico de quitina en las cáscaras de camarón correspondientes al Método 1.	33
Tabla 5. Color correspondiente al quitosano extraído por el Método 1 de los ensayos realizados.....	35
Tabla 6. Prueba t pareada para resultados de la extracción de quitosano por el Método 1.....	36
Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón a partir del Método 2. (Los resultados marcados en rojo fueron descartados para los cálculos respectivos por su evidente variación).....	39
Tabla 8. Porcentaje de desacetilación de los resultados experimentales a partir del porcentaje teórico de quitina en las cáscaras de camarón correspondiente al Método 2. (Los resultados marcados en rojo fueron descartados para los cálculos respectivos por su evidente variación).	41
Tabla 9. Prueba t pareada para resultados de la extracción de quitosano (Método 2).....	43
Tabla 10. Porcentaje de correlación obtenido de los espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (Método 1) comparados con un espectro de quitosano grado industrial.	50

Tabla 11. Porcentaje de correlación obtenido de los espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (Método 2) comparados con un espectro de quitosano grado industrial.	52
Tabla 12. Muestras seleccionadas para la elaboración de membranas por electrospinning.....	53
Tabla 13. Condiciones experimentales para la elaboración de las membranas de quitosano/PVA por electrospinning.	57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Peso inicial de las cáscaras de camarón y peso final del quitosano obtenido en la metodología de extracción por el Método 1.....	82
Anexo 2. Peso inicial de las cáscaras de camarón y peso final del quitosano obtenido en la metodología de extracción por el Método 2.....	83
Anexo 3. Espectros infrarrojos de muestras de quitosano experimental extraído por el Método 1	83
Anexo 4. Espectros infrarrojos de muestras de quitosano experimental extraído por el Método 2.....	90

RESUMEN

La quitina es un polímero abundante del que es posible extraer quitosano por desacetilización. El quitosano cuenta con varias propiedades biocompatibles que lo hace atractivo para diferentes aplicaciones en el campo medicinal, alimenticio, farmacéutico, entre otros. En la presente disertación se tuvo como objetivo la optimización de la extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón para elaborar membranas por medio de la técnica de electrospinning. Se propusieron dos métodos de extracción. Después de la extracción se realizó una caracterización por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier; en el caso de los espectros correspondientes al quitosano extraído por el Método 1, se obtuvieron espectros con un porcentaje promedio de correlación del 79,92 % comparándolos con un espectro de quitosano grado industrial tomado como referencia. Por otra parte, con los espectros del quitosano extraído con el Método 2 se obtuvo un porcentaje de correlación del 32,26 %, por lo que no se logró obtener quitosano o se obtuvo un quitosano de baja pureza. De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron 9 muestras de cada método para la elaboración de las membranas por electrospinning utilizando una solución polimérica preparada con las muestras de quitosano experimental y polivinil alcohol. Las membranas que contenían quitosano del Método 1 fueron elaboradas de manera óptima en comparación de las que contenían quitosano proveniente del Método 2. Finalmente, se caracterizaron las membranas por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y las que resultaron de mejor apariencia fueron aquellas elaboradas con el quitosano por el Método 1. La membrana que tuvo los mejores resultados morfológicos fue aquella que utilizó quitosano del Método 1, bajo las condiciones de 75 °C en la etapa de desproteínización y 65 °C en la etapa de desacetilación, obteniendo un rendimiento del 76 %. Se concluyó que fue posible la obtención de quitosano y la elaboración de membranas con mejores resultados morfológicos mediante el Método 1.

Palabras clave: Quitosano, Extracción, Electrospinning.

ABSTRACT

Chitin is an abundant polymer from which it is possible to extract chitosan by deacetylation. Chitosan has several biocompatible properties that make it attractive for different applications in medicinal, food and pharmaceutical fields, among others. The aim of the present dissertation was to optimize the extraction of chitosan from shrimp shells to produce membranes using the electrospinning technique. Two extraction methods were proposed. After the extraction, an infrared spectrophotometry characterization with Fourier transform was carried out; in the case of the spectra corresponding to the chitosan extracted by Method 1, spectra were obtained with an average correlation percentage of 79.92 % comparing them with a spectrum of industrial grade chitosan taken as reference. On the other hand, with the spectra of the chitosan extracted with Method 2, a correlation percentage of 32.26% was obtained, so it was not possible to obtain chitosan or a very low purity chitosan was obtained. According to the results obtained, 9 samples of each method were selected for the preparation of the membranes by electrospinning using a polymer solution prepared with the samples of experimental chitosan and polyvinyl alcohol. The membranes containing chitosan of Method 1 were elaborated in a more optimal way compared to those containing chitosan from Method 2. Finally, the membranes were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and the ones of better appearance were those elaborated with the chitosan of Method 1. The membrane that presented the best morphological results was the one with the chitosan obtained by Method 1, under the conditions of 75 °C in the deproteinization stage and 65 °C in the stage of deacetylation, obtaining a yield of 76 %. In conclusion, it was possible to obtain chitosan and elaborate membranes with better morphological results using Method 1.

Keywords: Chitosan, Extraction, Electrospinning.

1. INTRODUCCIÓN

La quitina es uno de los biopolímeros de origen natural más abundantes – después de la celulosa– que proviene de la unión de cadenas lineales de N-acetil-D-glucosaminas con un peso molecular alto. La quitina está presente como componente conformante en las paredes celulares de hongos y en los exoesqueletos de algunos artrópodos como insectos, crustáceos, arácnidos, entre otros (Escobar-Sierra, Urrea-Llano, Gutiérrez-Guerra, y Zapata-Ocampo, 2014). Fue descubierta por Henri Braconnot en 1811 mientras realizaba un estudio de las sustancias derivadas de hongos. De la misma manera, Antonie Odier, en un estudio acerca de insectos, encontró la presencia de la misma sustancia reportada por Braconnot y se la denominó “quitina” a partir del griego tunic, que significa envoltura (Velásquez, 2003).

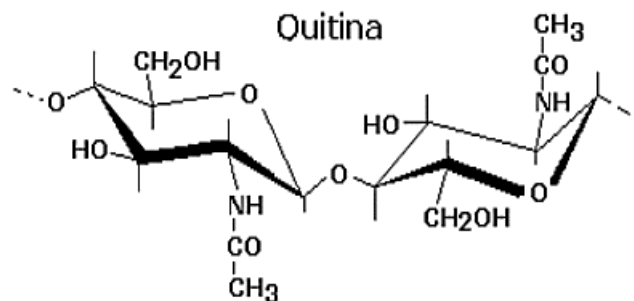


Figura 1. Unidad de quitina

A partir de la quitina (Figura 1), mediante un proceso químico denominado desacetilación, que consiste en la pérdida de los grupos acetilo (grupos funcionales acetamidas) presentes al tratarla con álcalis fuertes, se puede obtener un compuesto llamado quitosano (β -1,4-D-glucosamina). Al liberar grupos aminos en la desacetilación, el quitosano se convierte en una sustancia natural policatiónica que tiene afinidad con sustancias cargadas negativamente como son las grasas, proteínas u otros polisacáridos, esta característica le brinda un comportamiento polielectrolito catiónico (Arias, 2017).

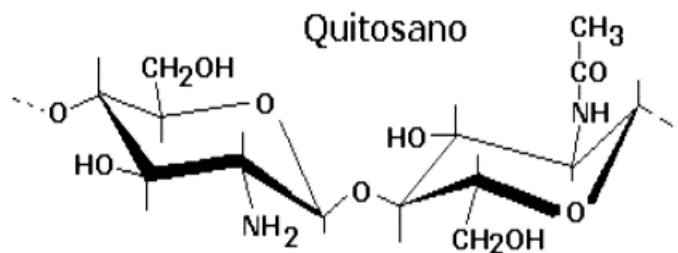


Figura 2. Unidad de quitosano

El quitosano (Figura 2) cuenta con propiedades biodegradables y biocompatibles, y a su vez tiene una citotoxicidad nula, por esta razón se han estudiado propiedades fisicoquímicas de quitosano extraído de diversas fuentes (específicamente de calamares, langostas, cangrejos, camarones y del capullo de gusano de seda), sin embargo, al ser obtenido principalmente de la quitina, se lo considera como producto sintético. Es soluble en ácidos orgánicos y gelifica o coagula cuando se encuentra en medios neutros o de acidez débil. A su vez, es un material versátil, puesto que puede ser partícipe en varias modificaciones, como por ejemplo, reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, entre otros (Lárez-Velásquez, 2006), de las cuales es posible obtener materiales con varias propiedades útiles para diferentes aplicaciones en agricultura, medicina, biotecnología, etc. (Velásquez, 2003).

El quitosano fue descubierto debido a que el profesor C. Rouget, en el año de 1859, trató quitina con hidróxido de potasio en solución y notó que se obtenía un producto que llegaba a ser soluble en ácidos orgánicos. Este producto se coloreaba a violeta en soluciones de yoduro y ácido, mientras la quitina, en dichas soluciones, se coloreaba verde. En el año 1894, Hoppe-Seyler nombró a esta sustancia como “quitosano”(Velásquez, 2003).

La quitina se encuentra presente en las cáscaras de camarón como alfa-quitina y está agrupada con proteínas, minerales y lípidos. Por ello, para poder obtener quitina, primeramente se deben eliminar estos constituyentes de la cáscara del camarón (Percot, Voton y Domard, 2003).

A pesar de la cantidad de diferentes estudios de extracción de quitina que se han realizado, no existe un método estándar para la obtención de la misma con resultados homogéneos y con un nivel de pureza definido. Los tratamientos eficientes para eliminar la mayoría de los componentes agrupados, están basados en tratamientos con bases fuertes diluidas para eliminar las proteínas, y tratamientos ácidos fuertes diluidos para eliminar los metales.

El primer paso a seguir en el procedimiento de extracción es el de la desproteínización, en el cual las proteínas son disueltas en la solución alcalina - hidrólisis básica- (Hong y Meyers, 1989; Chaussard y Domard, 2004). A continuación es necesaria la eliminación de los minerales en la muestra obtenida después de la eliminación de los enlaces proteína con quitina. Para ello se utiliza hidrólisis ácida, dicho paso se denomina desmineralización. Después de esta etapa se puede asegurar que lo obtenido es quitina. Para la obtención de quitosano a partir de quitina, se necesita eliminar los grupos acetilo presentes, por medio de una hidrólisis de los grupos acetamidos. Con esto se logra la conversión de quitina a quitosano, el cual tiene de 25 a 30 unidades menos de glucosamina que la quitina, dicha etapa se denomina desacetilación.

Varios estudios de extracción se han propuesto en la actualidad, principalmente por métodos químicos, ya sea para optimizar la metodología o para proponer aplicaciones, como en el trabajo realizado por Beltrán (2010), en donde extrajo quitosano para la liberación del ácido acetilsalicílico desde hidrogeles elaborados con quitosano. Sin embargo, existen otros métodos de extracción de quitina y quitosano importantes de mencionar, como por ejemplo los métodos biológicos. En un estudio realizado por López (2010), se propuso la extracción

mediante una fermentación ácido láctico que solubiliza los minerales y activa enzimas que son capaces de cumplir con la desproteínización.

Actualmente se sigue estudiando la extracción tanto de quitosano como de quitina, para lograr una obtención más pura y con menor daño de las cadenas principales de este polímero, debido a todas las aplicaciones que éstos pueden presentar (Chaussard y Domard, 2004).

Se han estimado alrededor de doscientas aplicaciones potenciales tanto de la quitina como del quitosano. Primeramente, se utilizaban en tratamiento de aguas y efluentes, procesamiento de alimentos y en la quelación de iones de metales; sin embargo, su empleo se ha direccionado en la producción de industrias como cosmética, alimenticia, medicina y farmacéutica (Lárez-Velásquez, 2006).

Entre toda la cantidad de aplicaciones, se pueden resaltar las más destacadas en los campos en donde se ha presentado mayor relevancia. En la agricultura se ha utilizado quitosano para recubrir semillas con la finalidad de conservarlas mientras están almacenadas (Alegría, Simón y Villarruel, 2014). También se lo ha empleado en sistemas liberadores de fertilizantes y como agente bactericida para la protección de plantaciones (Melaj y Daraio, 2012). En medicina se ha utilizado tanto quitina como quitosano para acelerar el proceso de cicatrización de heridas, a su vez se han producido suturas quirúrgica con quitina, gasas y vendajes con quitosano, entre otros (Viloria, Gonzalez y Ortiz, 2012). En cuanto se refiere al tratamiento de aguas, al ser biocompatibles –la quitina y el quitosano- se han utilizado como coagulantes primarios para aguas residuales con turbidez y alcalinidad alta, como floculantes para la remoción de coloides sólidos y aceites, y finalmente como captadores de metales pesados y pesticidas (Verma y Gupta, 2015). En la industria cosmética se ha utilizado quitosano para la elaboración de cápsulas para adelgazar debido a su propiedad atrapagrasa, se han elaborado una serie de productos como jabón, champú, cremas, entre otros

(García y Roca, 2008). Finalmente, se puede resaltar la aplicación del quitosano como biosensor, ya que es útil para detectar glucosa en la sangre humana, fenoles en aguas de desecho de industrias y para detectar la inmovilización de nanopartículas (Lárez-Velásquez, 2006).

Para analizar el quitosano extraído es común utilizar la espectrometría infrarroja. La misma se basa en las frecuencias de vibración que tienen los enlaces de los niveles de energía de las moléculas, dichas frecuencias dependen de la forma de la geometría molecular, las masas atómicas y el acoplamiento vibracional. Para que una vibración aparezca en el espectro IR, la molécula debe variar en su momento dipolar durante la vibración. Los enlaces pueden vibrar de diferentes maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación, giro y *wag*. Para el análisis por FTIR, se transmite un rayo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida en un rango de longitudes de onda de 4000-400 cm^{-1} para obtener un espectro. Esta técnica es exclusiva para enlaces covalentes en compuestos orgánicos (UNAM, s/f).

La técnica de electrospinning se refiere a un procedimiento mediante el cual es posible la obtención de fibras gracias al estiramiento de una solución viscoelástica (Teo y Ramakrishna, 2006); dichas fibras cuentan con diámetros micrométricos e incluso nanométricos, razón por la cual tienen características como: áreas superficiales grandes en comparación al volumen (Fang, Zhang, Sutton, Wang y Lin, 2012) flexibilidad, alta porosidad y alto rendimiento mecánico (Li, Vepari, Jin, Kim y Kaplan, 2006). Estas propiedades hacen que las fibras tengan una amplia cantidad de aplicaciones, entre las cuales se presentan tejidos, cobertores de heridas e implementos médicos (Dersch, Steinhart, Boudriot, Greiner y Wendorff, 2005), textiles (Srinivasan y Reneker, 1995), medios filtrantes (Zhang, Yao y Zhu, 2010), membranas especiales (Ma, Kotaki, Inai & Ramakrishna, 2005), entre otros.

Para realizar las fibras, se debe hacer girar soluciones poliméricas por medio de campos eléctricos altos, con la finalidad de aplicar fuerzas eléctricas que logren superar las fuerzas de tensión superficial que están en la solución polimérica, para ello se maneja un voltaje determinado que logra que chorros delgados sean expulsados desde un cono inyector hacia una superficie; en esta superficie, las fibras se solidificarán formando las membranas deseadas (Chew, Wen, Dzenis y Leong, 2006).

Las membranas son láminas delgadas y flexibles que cuentan con propiedades de permeabilidad y selectividad; estas forman un sistema sólido que contiene un espesor sumamente pequeño a comparación de su superficie. Las membranas separan dos fases y son las encargadas de controlar la transferencia de energía y materia entre dichas fases (Ramírez, 2013).

Para la elaboración de las membranas se utilizan específicamente polímeros, como el PVA y el quitosano, debido a que cuentan con propiedades, tanto físicas como químicas, necesarias para que las fibras sean resistentes, elásticas, duraderas y en ciertos casos biodegradables (Gamboa, Mantilla y Castillo, 2018). En un estudio realizado por Ohkawa, Cha, Kim, Nishida y Yamamoto (2004), se comprobó que no es posible obtener fibras al emplear ácido fórmico, ácido acético, ácido clorhídrico y ácido dicloroacético con quitosano, pero que al emplear PVA si se logró realizar las fibras e incluso, que a medida de que se aumentaba la proporción de PVA, las fibras resultaban de mejor calidad. En el presente trabajo experimental se tomó en consideración dicho estudio y se trabajó con PVA.

El alcohol polivinílico o PVA, es un polímero del alcohol vinílico cuya fórmula molecular es $(C_2H_3OR)_n$. Este alcohol es capaz de formar películas con propiedades adhesivas y emulsionantes con una gran resistencia a la tensión (Bolívar, 2018). Una ventaja de las partículas de PVA es su capacidad para producirse en varios tamaños distintos. El PVA es un material atáctico, sin

embargo muestra características cristalinas, debido a que los grupos hidroxilo son lo suficientemente pequeños como para encajar en la conformación de red, sin perjudicar su orden (Vernon, 2011).

El quitosano es empleado en las elaboración de las membranas puesto que contiene bajas proporciones de grupos N-acetilo, lo cual es apto para su fabricación; así mismo, los polímeros de quitosano son solubles en soluciones acuosas ácidas, a comparación de la quitina que es insoluble (Martin, 1995).

En la Figura 3, se puede apreciar el esquema más común de un equipo para realizar las fibras; en este se observa el campo eléctrico, el mismo que es aplicado entre los dos polos opuestos, los cuales son el sistema de inyección y la placa metálica con potencial 0.

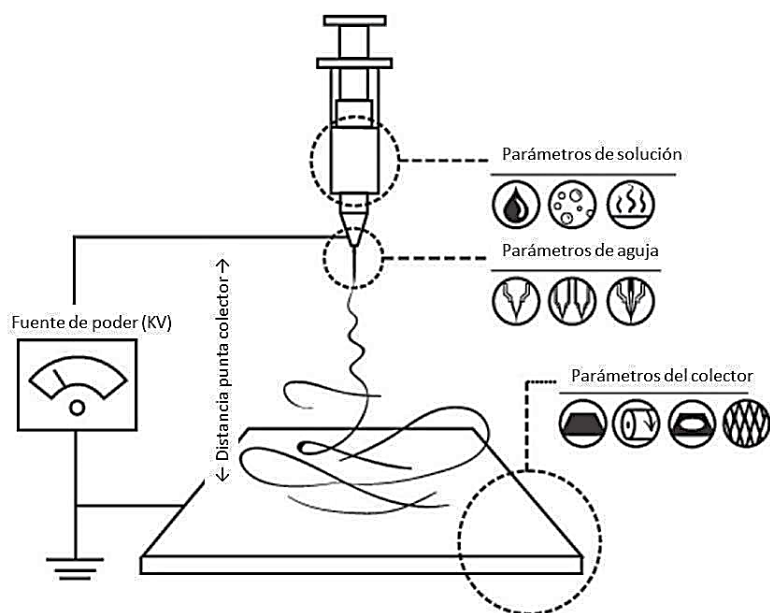


Figura 3. Esquema común de un equipo de Electrospinning (Sanchez, Rodríguez y Lopez, 2013).

Para iniciar el procedimiento, el polímero debe estar disuelto en un solvente o una combinación de solventes que sean capaces de disolverlo para evitar el taponamiento del cono capilar y, a su vez, que las fibras se puedan formar homogéneamente. Los polímeros tienen la propiedad de ser dieléctricos, es decir,

que en presencia de un campo eléctrico, son un arreglo de dipolos eléctricos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no logran coincidir, por lo tanto, estos se mantienen en su posición por acción de fuerzas atómicas y moleculares, logrando cambiar su posición solamente al ser sometidos a fuertes campos eléctricos externos, lo que explica el por qué se presenta el estiramiento de la solución en el electrospinning (Li y Wang, 2013). Cuando ya se tiene la solución en la jeringa o en el punto de inyección, se inicia la aplicación del alto voltaje, haciendo que las cargas se acumulen en forma de una gota en la punta del cono o capilar. Mientras se va incrementando la intensidad del campo eléctrico, dicha gota se alarga creando una forma cónica estable conocida con el nombre de “cono de Taylor” (Sánchez, Lozano, y Orts, 2016). La fuerza que genera el campo eléctrico es capaz de superar a las fuerzas de cohesión de la solución como su tensión superficial, y esto ayuda a que la solución forme una especie de hilos estirados que se transportan de la punta del cono o capilar hasta la placa colectora, mientras esto ocurre, el disolvente se evapora gradualmente y se obtiene las fibras solidificadas en la placa colectora (Lannutti, Reneker, Ma, Tomasko y Farson, 2007).

Hay parámetros que deben ser cumplidos para lograr las fibras deseadas, en primera instancia, se tiene a las características de la solución del polímero. Una de las primeras características de la solución que hay que tomar en cuenta es la concentración, de la cual depende el tamaño y morfología de las fibras, así como la viscosidad y la tensión superficial final de la solución; lo ideal es que la solución esté diluida de tal forma que no tenga alta viscosidad para que pueda pasar por el capilar, pero que tenga la viscosidad suficiente para que los hilos que se forman en el campo eléctrico no se rompan (Sill y von Recum, 2008). A su vez, es importante considerar la conductividad, debido a las cargas a las cuales va a ser sometida (Bhardwaj y Kundu, 2010) y el efecto de disolvente que se vaya a utilizar, para asegurar que la solución tenga una constante dieléctrica que facilite el procedimiento del electrospinning (Li y Wang, 2013).

Además de las propiedades que debe tener la solución polimérica, de igual forma, hay que considerar los parámetros con los que se debe trabajar en el proceso. Se puede decir que el voltaje es el parámetro más importante dentro del electrospinning, debido a que la formación de las fibras principalmente se da por la aplicación correcta de las cargas eléctricas, entre mayor sea el voltaje sometido, el fluido se transporta en mayor estiramiento debido a mayor fuerza de Coulomb, resultando fibras con diámetros menores (Li y Wang, 2013). Otro parámetro importante es el flujo de salida que permite a la solución llegar a la placa colectora, este debe ser menor para que el disolvente tenga más tiempo de evaporarse y que así se pueda evitar fallas en las fibras; por ello se debe alcanzar un flujo que sea capaz de mantenerse para formar un cono de Taylor estable y que se formen las membranas uniformemente en las placas. Finalmente, otro parámetro que hay que cuidar es la distancia entre la punta del cono o capilar y la placa colectora, ya que dependiendo de la solución polimérica, la morfología de las fibras pueden variar dependiendo de qué tan lejana esté la placa desde el punto de inyección; con distancias grandes, las fibras pueden romperse por el peso, y si son muy pequeñas, al solvente le podría llegar a faltar tiempo para evaporarse (Sánchez, Rodríguez y López, 2013).

Debido al tamaño de las membranas y a la estructura del quitosano las aplicaciones de las membranas elaboradas por electrospinning son varias; por ejemplo, la utilización de dichas membranas como bioembalajes en alimentos para la conservación de los mismos por su alta actividad contra patógenos, como hongos, levaduras, bacterias gram-positivas y negativas (Valenzuela y Arias, 2012). También se aplican en filtros de agua para la eliminación de iones de metales pesados (Mora-Molina, Starbird-Pérez, Chaves-Barquero y Araya-Marchena, 2011), como biomateriales aloplásticos para regeneración ósea (Paredes, Ortega, González, Bustillos y Velazco, 2014), entre otros.

Actualmente, en el ámbito de exportación ecuatoriano, los camarones conforman parte del grupo de crustáceos más exportados, es decir, influyen

fuertemente en el mercado y a su vez en la economía del país (Organismo Evaluador de la Conformidad - Ecuador, 2017), razón por la cual, en el presente trabajo de titulación se desea proponer una alternativa de aprovechamiento de dicho recurso como fuente de materia prima para la obtención de quitina y a su vez, quitosano.

El método de extracción que se utilice es de suma importancia, debido a que se necesita conseguir un quitosano óptimo que permita obtener fibras con gran área superficial y alta porosidad, sin que presente dificultad de disolución o que precipite al momento de la elaboración de las membranas. En este caso se realizó una extracción utilizando dos métodos en los cuales se variarán grados de temperatura y concentraciones de disoluciones para evaluar con qué condiciones se logrará obtener un quitosano que resulte mejor para la elaboración de las membranas.

Para la elaboración de membranas propuestas como nanofibras poliméricas se puede emplear una serie de diferentes técnicas como: estiramiento, síntesis de plantillas, separación de fases, autoensamblaje y electrospinning (Li y Wang, 2013), sin embargo, en el caso del presente trabajo experimental, se empleó la técnica de electrospinning debido a su versatilidad, repetibilidad, facilidad de montaje y bajo costo.

Se han realizado membranas por electrospinning en varios estudios, por ejemplo en la Universidad de las Fuerzas Armadas, se realizaron fibras en rangos micrométricos con fibroína de seda, variando parámetros de voltaje y concentración de soluciones, con la finalidad de emplear este polímero biodegradable en membranas que puedan llegar a ser implementadas en el campo de la biomedicina y en la elaboración de fármacos (Aules y Quijije, 2016). De igual manera se ha estudiado la eficiencia de membranas poliméricas con quitosano para calcular su capacidad de remoción de iones de cadmio, cobre y cromo en agua para proporcionar sistemas filtrantes biocompatibles, se obtuvieron

resultados eficientes y se comprobó que dichas membranas son capaces de remover los iones, principalmente el cromo (Mora, Chavez, Araya y Starbird, 2012).

Para el análisis de las membranas poliméricas se utiliza un microscopio electrónico de barrido (SEM) el cual genera una imagen utilizando electrones en lugar de luz; para ello el equipo cuenta con un filamento encargado de generar un haz de electrones que iluminan la muestras, estos electrones resultantes de la interacción con la superficie son detectados para la creación de la imagen en donde se refleja las características de la superficie, como formas, textura, entre otros (SCAI, s/f). Para poder observar las características morfológicas de las membranas elaboradas por electrospinning, el análisis mediante SEM es una herramienta indispensable puesto que gracias a las micrografías que resultan de esta técnica, se puede observar la calidad y forma de las mismas, así también ayuda establecer una comparación entre las membranas elaboradas y analizar cual resultó de mejor calidad.

2. OBJETIVOS

2.1.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar el procedimiento de extracción de quitosano, procedente de cáscaras de camarón, mediante la modificación de concentración de las soluciones empleadas y variación de la temperatura de trabajo, para la elaboración de membranas empleando la técnica de electrospinning.

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Seleccionar las mejores condiciones de extracción para obtener un porcentaje de rendimiento adecuado y que el quitosano obtenido sea óptimo para la elaboración de membranas por electrospinning.

Caracterizar el quitosano obtenido de los dos métodos propuestos mediante espectrofotometría FT-IR.

Determinar la morfología de las membranas elaboradas con quitosano mediante microscopia de barrido electrónico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología llevada a cabo en la presente disertación fue desarrollada sistemáticamente siguiendo las siguientes etapas:

- Toma de muestra
- Preparación de muestra
- Optimización de Extracción de quitosano
 - o Método 1 para la extracción de quitosano
 - o Método 2 para la extracción de quitosano
- Caracterización del quitosano obtenido empleando la técnica de Espectrofotometría FTIR
- Elaboración de membranas nanométricas con quitosano empleando la técnica de Eletrospinning
- Examinación morfológica de las membranas con quitosano obtenidas empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido

3.1 TOMA DE MUESTRA

Los exoesqueletos de camarón que fueron empleados para las extracciones de quitosano se recolectaron en el Mercado de Ñaquito, ubicado al Norte de la ciudad de Quito. En total, se recolectaron 6,5 kg de cáscaras de camarón húmedas.

3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las cáscaras de camarón recolectadas, fueron lavadas con abundante agua para asegurar su debida limpieza y descartar cualquier posible interferencia que no corresponda a las cáscaras. Posteriormente fueron sometidas a temperatura de congelación por tres días, se las lavó nuevamente y se las secó en

una estufa marca Binder ED 115 a 80 °C por 4 días. Cuando se apreció que las cáscaras de camarón se encontraban completamente secas, se procedió a triturarlas en un molino marca Ika Werke Mf 10 basic para reducir su tamaño de partícula. Finalmente se tamizó el polvo de cáscaras obtenido con un tamiz con malla de 250 micras.

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO PROCEDENTE DE CÁSCARAS DE CAMARÓN

Las dos metodologías de extracción empleadas para la optimización se basan en etapas generales, las cuales se resumen en el diagrama presentado en la Figura 4.

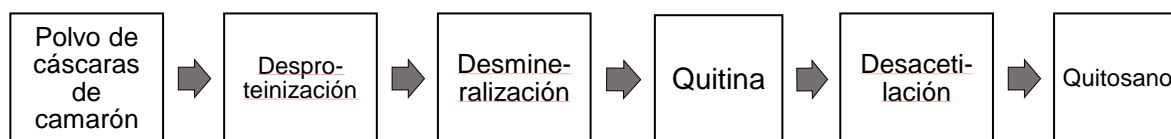


Figura 4. Etapas del proceso de extracción general de quitosano a partir de cáscaras de camarón

3.3.1 MÉTODO 1 PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO

Tomando como referencia la metodología de Cárdenas (2015), se pesaron 10 gramos de polvo de camarón en una balanza marca Mettler Toledo PI303 y se le agregaron 40 mL de xileno grado reactivo J.T.Baker con agitación constante por 24 horas, después se lo calentó a 50 °C en una placa de calentamiento marca Velp Scientifica ARE *heating magnetic stirrer* por 24 horas. Al producto seco, para la desproteínización, se le añadió 40 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio grado reactivo Merk 6 N a 65 °C con agitación constante por 24 horas, se centrifugó a 4000 rpm en una centrífuga marca P Selecta Mixtasel por 5 min y se decantó el sobrenadante, se lavó el decantado con 300 mL de agua desionizada y

se filtró para eliminar toda la sosa agregada. Para la desmineralización, al filtrado se le agregaron 40 mL de una solución acuosa de ácido clorhídrico marca Fisher Scientific 6 N durante 24 horas con agitación constante. Se lavó, filtró y al producto se lo neutralizó con agua destilada. Finalmente, para desacetilizar y obtener quitosano a partir de quitina, se agregaron 40 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio 70 % durante 24 horas a 65 °C con agitación constante. Se centrifugó eliminando el decantado, se neutralizó el producto con gotas de una solución acuosa de ácido clorhídrico 6N y secó a 50 °C en la estufa por 24 horas.

Se realizaron dos cambios de condiciones para la optimización de este método, en los cuales se varió la temperatura en la evaporación del xileno (55 °C, 65 °C y 75 °C) y la temperatura en la desacetilación (55 °C, 65 °C y 75 °C). Se realizaron 9 ensayos con 3 repeticiones para cada variante, obteniendo un total de 27 ensayos, como se muestra en la Figura 5.

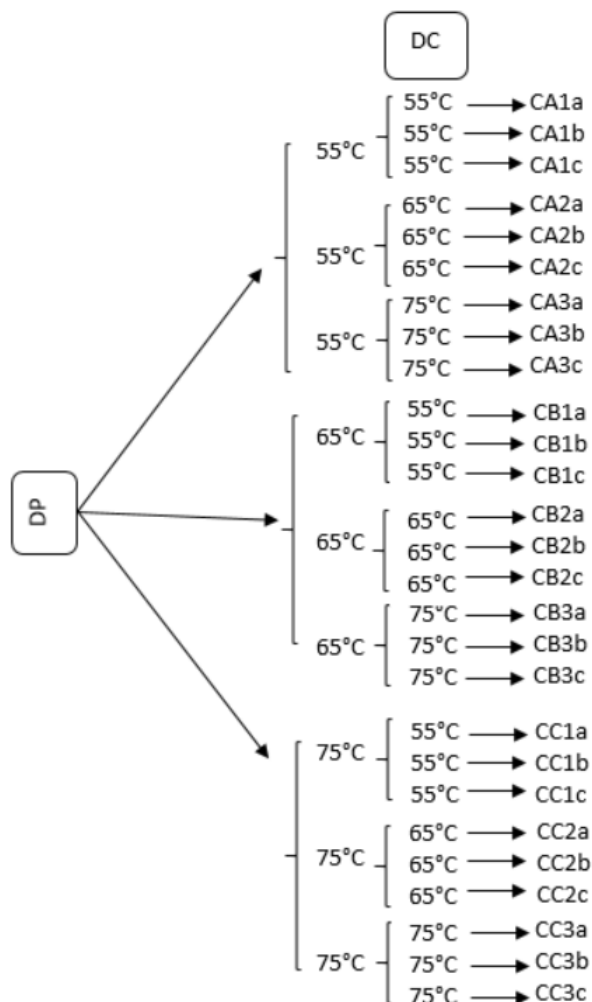


Figura 5. Formato para la codificación de cada ensayo en la extracción de quitosano por el Método 1 (DP = desproteínización; DC = desacetilación).

3.3.2 MÉTODO 2 PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO

Según el protocolo sugerido por Luna (2012), se pesaron 10 gramos de polvo de camarón y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 3 % en una relación 2:3 (p/p) con agitación constante durante 30 minutos a 80 °C para eliminar las proteínas presentes; se filtró el resultante realizando un lavado con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad del medio. Después, para la desmineralización, se agregó una solución acuosa de ácido clorhídrico 2 N en una relación 1:3 (p/p) a temperatura ambiente durante 60 minutos y se secó a 50 °C

durante 6 horas. Finalmente, para desacetilar y obtener quitosano a partir de quitina, al producto seco se le agregó una solución de hidróxido de sodio 45 % en una relación 1:10 (p/p) con agitación constante durante 60 minutos a 130 °C y finalmente se secó a 50 °C durante 6 horas.

Se realizaron dos cambios de condiciones para la optimización de este método, en los cuales se varió la concentración del ácido clorhídrico en la desmineralización (0.6 N, 1.5 N y 2 N) y la temperatura en la desacetilación (120 °C, 130 °C y 140 °C). Se realizaron 9 ensayos con 3 repeticiones para cada variante, obteniendo un total de 27 ensayos, como se muestra en la Figura 6.

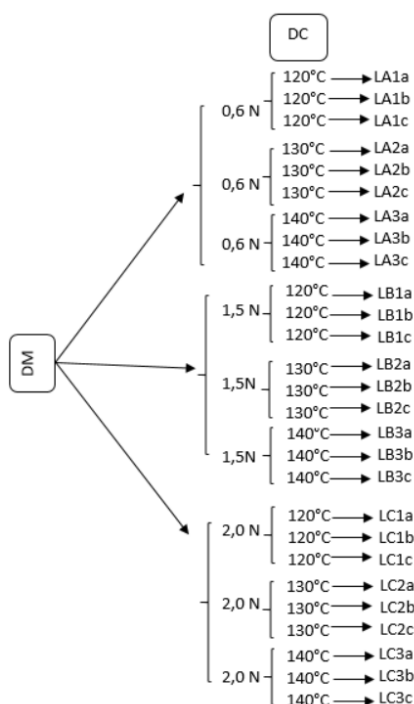


Figura 6. Formato para la codificación de cada ensayo en la extracción de quitosano por el Método 2 (DM = desmineralización; DC = desacetilación).

Para el cálculo del porcentaje de rendimiento, para los dos casos de extracción propuestos, se empleó la Ecuación 1:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{pf * 100}{pi} \quad (1)$$

Donde

- *Pf*: peso final del producto de la extracción (chitosano obtenido experimentalmente)
- *Pi*: peso inicial del polvo de cáscaras de camarón

Para el cálculo del porcentaje de rendimiento, para los dos casos de extracción propuestos, empleando un valor teórico de quitina presente en las cáscaras de camarón, se empleó la Ecuación 2:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{pf * 100}{pt} \quad (2)$$

Donde

- *Pf*: peso final del producto de la extracción (chitosano obtenido experimentalmente)
- *Pt*: peso teórico de quitina presente en las cáscaras de camarón.

3.4 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO OBTENIDO EMPLEANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA FTIR

Para la caracterización, se realizó una comparación de los espectros IR obtenidos del chitosano de cada ensayo con un estándar de chitosano grado industrial al 90 % marca Alzor. Los espectros fueron obtenidos en un espectrofotómetro infrarrojo marca Perkin Elmer FTIR system Spectrum BX con un accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) y Software Spectrum v5.0.1.

Para realizar cada lectura, en primer lugar, se limpió el portamuestras correspondiente al ATR con algodón embebido en isopropanol para asegurar que no haya interferencias, a continuación, se realizó una lectura de background y después se procedieron con las lecturas correspondientes a las muestras de cada ensayo. Los espectros obtenidos de los ensayos se realizaron a $4000-520\text{ cm}^{-1}$ de rango de longitud de onda, 5 barridos, 4 cm^{-1} de resolución, 2 cm^{-1} de intervalo, en unidades de %T (transmitancia) y con una celda ATR en el equipo Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformadas de Fourier.

3.5 ELABORACIÓN DE MEMBRANAS NANOMÉTRICAS CON QUITOSANO EMPLEANDO LA TÉCNICA DE ELETROSPINNING

Para la elaboración de las membranas, se tomó como referencia la metodología de Caicedo (2015). Fue necesario un tratamiento previo de las muestras de los ensayos, que consistió en preparar soluciones de quitosano con polivinil alcohol (PVA) con la finalidad de asegurar la solubilidad de las muestras en la solución inyectable. Para ello, se preparó una solución acuosa de polivinil alcohol (PVA) marca J.T. Baker al 10 % a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas, para asegurar la solubilidad total; a continuación, se preparó una solución acuosa de ácido acético marca J.T. Baker al 70 % a la que se agregó 3 % de quitosano, y a esta mezcla se le agregó el PVA previamente preparado (se realizó el mismo procedimiento para cada muestra). Finalmente, esta solución se procedió a inyectar en una jeringa Nipro. El caudal dependió del diámetro de la inyección, y el voltaje dependió de la capacidad que tenía cada solución para que se forme el cono de Taylor y que se mantenga estable (Caicedo, 2015). Se estableció un rango de valores de trabajo como se observa en la Tabla 1. Se empleó un equipo de electrospinning con una bomba de inyección marca Cole Palmer 788110C alimentado por una fuente de alto voltaje Genvolt 73030. A su vez, para apreciar la formación del cono de Taylor en la inyección, se empleó una cámara marca Imaging source DFK 22BUCO3 con sensor CMOS.

Tabla 1. Rango de trabajo empleado en la técnica de electrospinning para la elaboración de las membranas nanométricas con el quitosano obtenido experimentalmente.

Método de Extracción	Condición de trabajo	
	Caudal (mL/h)	Voltaje (kV)
Método 1	0,25 - 0,40	6,9 - 16,1
Método 2	0,25 - 0,40	9,0 -12,3

El ánodo fue ubicado en la punta de la jeringa y el cátodo fue ubicado en la placa recolectora (superficie conductora conectado con tierra) cubierta con papel aluminio a una distancia de 14 cm de la jeringa. La disposición de los polos positivo y negativo se puede observar en la Figura 7.

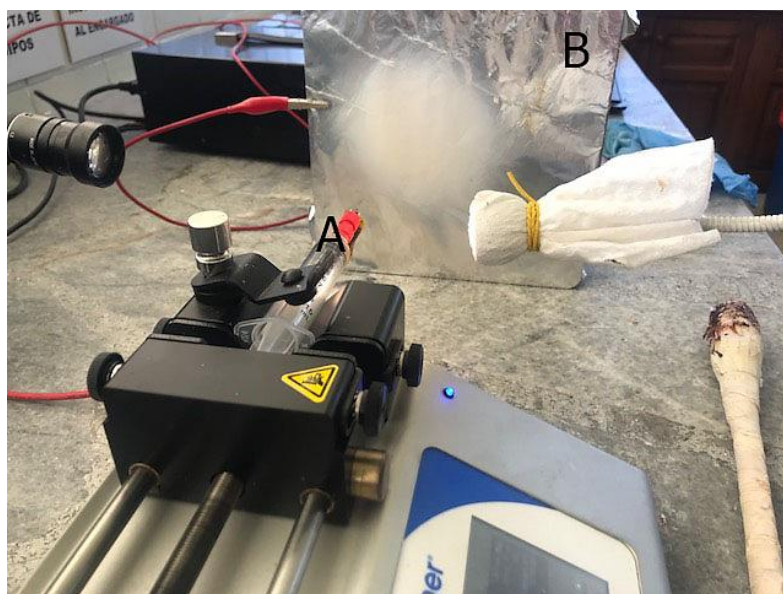


Figura 7. Inyección de la jeringa para la elaboración de las membranas por electrospinning, A (ánodo), B (cátodo).

Se estableció una distancia entre la jeringa y la placa colectora de 14 cm, como se puede observar en la Figura 8.

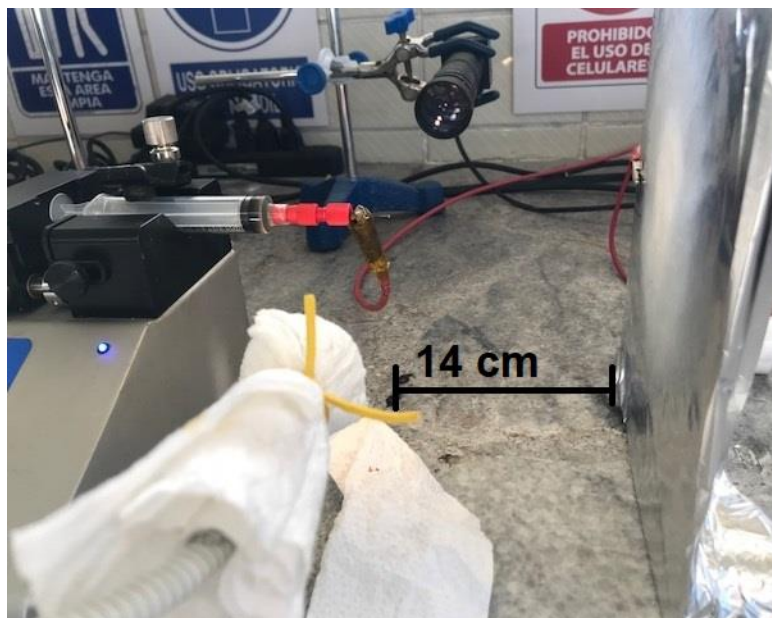


Figura 8. Distancia entre la punta de la jeringa de inyección de la solución polimérica y la placa colectora de las fibras para la elaboración de membranas por electrospinning.

No se realizaron membranas de todas las muestras, debido a que después de la caracterización del quitosano obtenido con la comparación de los espectros FTIR, se trabajó con una de las tres repeticiones (la cual reflejaba mejor resultado). En total se realizaron 9 membranas para cada extracción; es decir, nueve membranas para la extracción correspondiente al Método 1 y nueve membranas para del Método 2.

3.6 EXAMINACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS CON QUITOSANO OBTENIDAS EMPLEANDO LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La examinación morfológica de las membranas se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido marca TESCAN MIRA 3XM; para el efecto, se tomó una porción de la membrana y se la colocó en el soporte de muestras, para ello se empleó una cinta de carbono con doble cara adhesiva. Se procuró evitar tener contacto, en lo posible, con la muestra, con la finalidad de evitar contaminación superficial. A continuación se procedió a observar la microestructura de la membrana y se realizaron 9 micrografías de diferentes sitios de la membrana y se las dividió en tres grupos, bajo las condiciones que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de trabajo del SEM para micrografías de las membranas.

Micrografías	#1, #4, #7	#2, #5, #8	#3, #6, #9
Voltaje de aceleración (kV)	5	5	5
Campo de visualización (μm)	20,7	41,5	208
Magnificación	10 kx	5 kx	1000 x

3.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

3.7.1 REPORTE DE RESULTADOS DE EXTRACCIÓN

Se promediaron los resultados de cada grupo de ensayos y se reportaron las desviaciones estándar correspondientes a cada método de extracción empleado. Se realizó un análisis estadístico (prueba de t student) con los

resultados obtenidos versus los datos reportados en la bibliografía (Escobar, Urrea, Gutierrez y Zapata, 2014).

Para el cálculo del análisis estadístico empleando la prueba t-student se empleó el programa Minitab 17 (Minitab Inc., 2000), el cual utiliza las ecuaciones 3 y 4.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1 X_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}} \quad (3)$$

$$S_{X_1 X_2} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)} \quad (4)$$

Donde

- \bar{X} : Medias muestrales del grupo 1 y 2.
- S: desviación estándar
- n: número de muestras

3.7.2 REPORTE DE RESULTADOS DE LAS MICROGRAFÍAS DE LAS MEMBRANAS OBTENIDAS POR SEM

El diámetro promedio de las fibras de las membranas se determinó seleccionando al azar 60 fibras diferentes que se visualizaban en las imágenes obtenidas por el SEM mediante el software de procesamiento ImageJ. Se reportó su desviación estándar y se obtuvo un histograma para cada membrana.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Se optimizaron dos métodos de extracción propuestos en la literatura; para ello se modificaron parámetros de temperatura y concentración de las soluciones y se determinaron cuáles eran las condiciones más adecuadas de trabajo para extraer un quitosano apto para la elaboración de membranas.

En cuanto se refiere a la calidad del quitosano extraído, el grado de desacetilación se ve afectado por la variación de tiempo, temperatura y de concentraciones en las diferentes etapas de la extracción.

4.1.1 PREPARACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE CAMARÓN

De manera general, para realizar el proceso de obtención de quitina y quitosano, es indispensable limpiar prolijamente las cáscaras de camarón para asegurar que al momento de iniciar la extracción no haya interferencias (como materia orgánica, entre otros) que puedan afectar a la misma. Para lograr dicha limpieza se necesitó lavar con abundante agua las cáscaras de camarón y, a su vez, retirar cualquier excedente que no forme parte de los exoesqueletos. No se utilizó ninguna clase de sustancia jabonosa para la limpieza ni otro material similar.

La finalidad de triturar a las cáscaras secas es que la extracción se genere de forma más uniforme con un tamaño de partícula más pequeño, ya que el área de superficie de contacto es más grande; en este caso se utilizó un tamiz de 250 micras, con lo que se consiguió un polvo fino de las cáscaras de camarón. Se realizaron pruebas previas con cáscaras únicamente molidas y con cáscaras

pulverizadas y el resultado reflejó que al estar pulverizadas, se repartían mejor las soluciones extractivas y se lograba una distribución mayor de las mismas consiguiendo una extracción óptima.

4.1.2 EXTRACCIÓN DEL QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARAS DE CAMARÓN

Los métodos empleados en este trabajo experimental son similares y se rigen a un procedimiento general, el cual está basado en una secuencia de etapas en donde se utilizan álcalis y ácidos. La diferencia entre los métodos se llega a observar en los resultados debido a la acción que realizan los compuestos químicos empleados en cada extracción.

El tratamiento inicial en la extracción fue la desproteínización, en donde se utilizó hidróxido de sodio para retirar todas las proteínas presentes en las cáscaras; para ello se trabajó con la solución básica en caliente empleando rangos de tiempos cortos evitando la despolimerización de las cadenas. Las proteínas están constituidas por cadenas de aminoácidos con secuencias primarias, secundarias y terciarias (Berg, Stryer y Tymoczko, 2007). Cuando las estructuras son secundarias o terciarias, las cadenas presentan enlaces de hidrógeno y por esta razón se rompen los enlaces iónicos de dichos hidrógenos cuando están en contacto con bases y con ácidos, ya que la proteína se despliega y se rompe de manera irreversible (Giraldo, s/f).

En la estructura de las cáscaras de camarón está presente carbonato de calcio como principal componente inorgánico, y en menor cantidad está presente fosfato de calcio. Estos dos componentes deben ser retirados para obtener la quitina deseada. Para ello, se desmineralizaron las cáscaras con las soluciones diluidas de ácido clorhídrico. Se tomó en cuenta la temperatura empleada, debido a que se puede degradar el polímero con temperaturas muy altas. La eliminación del carbonato de calcio se da de acuerdo a la Ecuación 5 (Luna, 2012).



Para extraer la quitina de las cáscaras de camarón, además de la desmineralización y de la desproteínización, se conoce que, en la pared celular de las cáscaras de camarón, la quitina está unida fuertemente en forma de complejo quitina-glucano y su separación es posible gracias a la hidrólisis básica en el C-3 de la fracción glucana, rompiendo el enlace O-glucosídico -1,3 que une al glucano con la quitina (Balanta, Grande y Zuluaga, 2010).

La obtención de quitosano a partir de quitina, se produce gracias a la eliminación de las unidades acetilo que conforman la estructura de la quitina. Para ello, las moléculas se dispersan en una solución de una base fuerte en caliente, por lo que en este caso se utilizó hidróxido de sodio. Las condiciones en las que se lleva a cabo la desacetilación heterogénea puede reducir la longitud de la cadena, por este motivo es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo y aislando el producto en cada etapa. Para disminuir la pérdida de peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante para evitar la despolimerización. En la Figura 9 se puede observar la reacción química que se lleva a cabo en esta etapa:

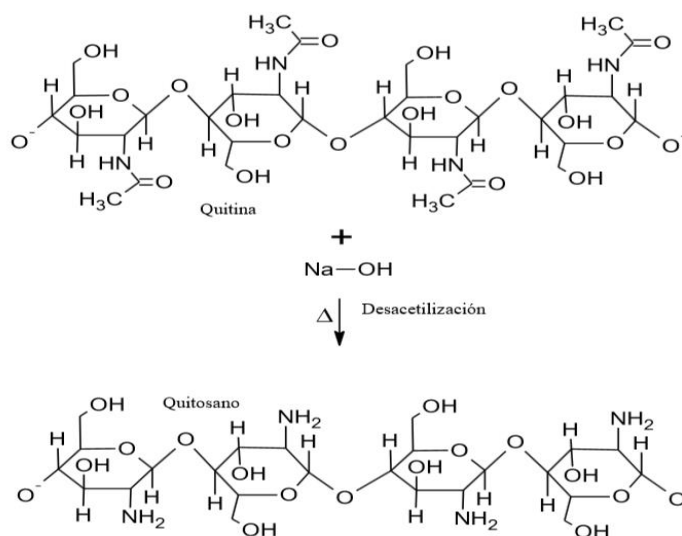


Figura 9. Proceso de desacetilación de quitina para obtener quitosano utilizando hidróxido de sodio (Cárdenas, 2015)

El rendimiento de extracción del quitosano depende fuertemente de la temperatura, puesto que a medida de que esta aumenta, el grado de desacetilación aumenta, lo que quiere decir que hay una relación; sin embargo, hay que tomar en cuenta que se puede presentar una degradación de los polisacáridos que conforman el polímero, razón por la que se debe mantener una temperatura de desacetilación que se encuentre dentro del rango de 40-150 °C.

El tiempo de reacción en el que esté en contacto la solución alcalina con la quitina también influye en la obtención del quitosano, pero el factor influyente es la concentración que tenga dicha solución básica, debido a que mientras menor sea la concentración del hidróxido en solución, la viscosidad y el tamaño de partícula del quitosano disminuye de igual forma.

En el caso del presente estudio, se modificaron dos parámetros de trabajo y se evaluó el efecto de los mismos en la extracción de quitosano. En el caso de la extracción por el Método 1, se varió la temperatura de evaporación del xileno y la

temperatura de desacetilación; para la extracción por el Método 2 se varió la concentración del ácido clorhídrico en la desmineralización y la temperatura de desacetilación. Para asegurar la veracidad de los resultados obtenidos se realizaron tres repeticiones para cada parámetro obteniendo 27 ensayos de cada metodología, completando un total de 54 ensayos.

4.1.3 EXTRACCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARAS DE CAMARÓN POR EL MÉTODO 1

En el método de extracción 1 se utilizó xileno como despigmentante, sin embargo, la finalidad de la despigmentación de las cáscaras, más allá de la eliminación de su color característico, se concentró principalmente en la eliminación de la astaxantina. Dicha sustancia es un carotenoide que se encuentra presente generalmente en animales invertebrados, como son los camarones; en la conformación del animal vivo, la astaxantina, forma complejos coloreados con otros carotenoides (azul, morado y verde) y se torna rojo cuando el animal es sometido a temperaturas de cocción (Ugaz, 1997). Es indispensable el tratamiento para la sustracción de la astaxantina, debido a que la misma puede llegar a reaccionar tanto con el ácido clorhídrico como con el hidróxido de sodio en el momento de la extracción, causando que el quitosano presente en la cáscara se encapsule, haciendo muy complicada su extracción (Cárdenas, 2015).

Al momento de adicionar el xileno en el polvo de camarón, a medida que pasó el tiempo, se podía observar cómo la solución sobrenadante de las cáscaras se tornaba de color anaranjado bastante intenso, mientras que las cáscaras variaban de tonalidad haciéndose cada vez más claras, como consecuencia, se evidenció la acción del xileno y por lo tanto la eliminación de la astaxantina de manera visual.

Se tuvo la finalidad de analizar la interacción del xileno, como solvente de preparación, para determinar si el mismo mejora el porcentaje de rendimiento de

la extracción de quitosano. Para lograrlo, se modificó en 10 °C de diferencia la temperatura de evaporación recomendada por la metodología de Cárdenas (2015), lo que quiere decir que se trabajó con 40, 50 y 60 °C en esta etapa. Posteriormente, en la desacetilación, se varió la temperatura recomendada en 10°C de la misma forma, por lo que se trabajó con 55, 65 y 75 °C en dicha etapa. En la Tabla 3 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 3. Porcentaje de rendimiento de extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón a partir del Método 1.

MUESTRA	% Rendimiento	Desviación Estándar	Promedio (%)
CA1a	80,02	3,51	81,95
CA1b	86,00		
CA1c	79,82		
CA2a	87,99	3,60	85,83
CA2b	81,67		
CA2c	87,83		
CA3a	74,48	6,99	67,37
CA3b	67,13		
CA3c	60,50		
CB1a	72,17	1,41	71,20
CB1b	69,58		
CB1c	71,83		
CB2a	54,68	8,06	59,16
CB2b	68,46		
CB2c	54,33		
CB3a	59,77	1,58	60,66
CB3b	62,49		
CB3c	59,74		

CC1a	67,24	2,25	66,27
CC1b	63,69		
CC1c	67,87		
CC2a	74,43	0,93	75,49
CC2b	76,15		
CC2c	75,88		
CC3a	69,96	7,82	72,05
CC3b	80,71		
CC3c	65,50		

No se cuenta con un resultado en peso de la quitina, esto se debe a que en el procedimiento experimental no se podía secar la quitina extraída ya que la misma presentaba características gelatinosas y era ideal en ese estado para la desacetilación, lo que quiere decir que no se debía permitir que la quitina se seque y presente sus propiedades características, ya que hubiese sido complicado volver a su estado gelatinoso necesario para la desacetilación. Por esta razón, el resultado en porcentaje de extracción se reporta a partir del peso de las cáscaras de camarón.

En cuanto se refiere a la variación de los resultados en cada repetición (la desviación estándar de los mismos) se puede apreciar que en la mayoría de los casos es menor a 5, sin embargo si hay desviaciones mayores que pudieron haberse presentado por pérdida de la muestra al trasvasar, filtrar y decantar cada ensayo. Dichos resultados demuestran que el método resultó impreciso. El porcentaje de rendimiento promedio evidencia que las muestras CA2a, CA2b y CA2c obtienen mayor porcentaje de rendimiento, lo que quiere decir que a 55 °C en la desproteinización y 65 °C en la desacetilación es posible la extracción de más cantidad de quitosano.

Tomando en cuenta el dato teórico correspondiente al porcentaje de la quitina presente tanto en la cabeza y cuerpo del camarón (Tharanathan y Kittur,

2003), se realizaron los cálculos respectivos para estimar el grado desacetilación del quitosano obtenido experimentalmente, como se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de desacetilación del quitosano obtenido experimentalmente a partir del porcentaje teórico de quitina en las cáscaras de camarón correspondientes al Método 1.

MUESTRA	% teórico quitina	% Desacetilación	Desviación Estándar	Promedio (%)
CA1a	69,1	115,82	5,11	118,67
CA1b		124,57		
CA1c		115,63		
CA2a		127,35	5,26	124,26
CA2b		118,19		
CA2c		127,25		
CA3a		108,15	10,29	97,78
CA3b		97,61		
CA3c		87,58		
CB1a		104,61	1,99	103,43
CB1b		101,14		
CB1c		104,54		
CB2a		79,16	11,71	85,67
CB2b		99,19		
CB2c		78,65		
CB3a		87,17	2,21	88,15
CB3b		90,68		
CB3c		86,59		
CC1a		97,41	3,15	96,39
CC1b		92,86		
CC1c		98,90		

CC2a		108,38	1,11	109,64
CC2b		110,49		
CC2c		110,03		
CC3a		101,70	11,20	104,62
CC3b		116,99		
CC3c		95,17		

En la Tabla 4 se observa que los resultados obtenidos sobrepasan al valor teórico de la quitina presente en las cáscaras de camarón, puesto que como se puede observar en la Tabla 3, los valores en la mayoría de los casos para el porcentaje obtenido de quitosano son mayores al 80 %, mientras que el dato teórico de la quitina 69,1 %, es inferior (se trabajó con 6,91 debido a que se calculó el peso presente en 10 g de cáscara para simular la cantidad presente teóricamente en los ensayos). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que como se variaron las condiciones de temperatura en la metodología propuesta, la probabilidad de que no se haya desmineralizado o despigmentado por completo cada ensayo puede afectar al peso de la materia extraída, lo que quiere decir que puede que estén interferencias presentes y que aparte de quitosano estén presentes sustancias que no lograron ser retiradas de las cáscaras. Cualquier especie foránea aumenta el peso de la muestra teniendo como consecuencia un porcentaje tentativo de quitina alto, o a su vez un alto grado de desacetilación. Cabe resaltar que los porcentajes promedio de extracción de quitosano se encuentran dentro del rango de 60 a 80 % debido a que no se puede desacetilar la quitina en un 100 %, razón por la cual se obtiene en la mayoría de los casos un compuesto que contiene quitina y quitosano, sin embargo, al tener en mayor proporción quitosano y como las propiedades de la molécula pertenecen a los grupos aminos de la estructura, se le denomina únicamente quitosano y en este caso, aparte de la conformación quitina-quitosano, la muestra contaría con las demás especies que no lograron ser retiradas.

En cuanto se refiere a las características cualitativas de los productos, todos resultaron en forma de polvo fino, sin embargo variaban en cuanto a color. El color característico del quitosano industrial despigmentado es blanco y con una contextura similar a la harina. En la tabla 5 se observa el color obtenido en cada uno de los ensayos realizados.

Tabla 5. Color correspondiente al quitosano extraído por el Método 1 de los ensayos realizados.

MUESTRA	COLOR
CA1a, CA1b, CA1c, CB2a	Rojo
CA2a, CA2b, CA2c, CB1a, CB1b, CB1c, CB2b, CB2c, CB3a	Anaranjado
CA3a, CA3b, CA3c, CB3b, CB3c, CC1a, CC1b, CC1c	Amarillo
CC2a, CC2b, CC2c, CC3a, CC3b, CC3c	Blanco

Con los resultados obtenidos en este método, según la Tabla 5, las condiciones de trabajo más aptas para la extracción fueron a 75 °C en la etapa de la desproteización y 65 °C en la etapa de la desacetiación, debido a que su color fue bastante cercano al color característico del quitosano grado industrial despigmentado, lo que quiere decir que bajo esas condiciones el xileno actúa apropiadamente como despigmentante.

Se realizó un tratamiento estadístico (prueba t de student) para analizar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre el promedio individual de los resultados experimentales y el resultado reportado en la bibliografía, como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Prueba t pareada para resultados de la extracción de quitosano por el Método 1.

	n	Media	StDev	SE Mean
% desacetilación	9	103,18	12,91	4,31
% desacetilación teórico	9	80	0	0
Diferencia	9	23,18	12,92	4,31
IC del 95% por diferencia de medias: (17,75; 28,61)				
Prueba t de diferencia media = 0 (vs ≠ 0): Valor t = 8,78 Valor P = 0,000				

Donde

- n: número de muestras
- StDev: desviación estándar
- SE Mean: error estándar de la media
- IC: intervalo de confianza

En estos resultados, la estimación de la diferencia en las medias de las poblaciones para el porcentaje de desacetilación es 4,31 y se puede asegurar con un 95 % de confianza que la diferencia en las medias de las poblaciones está entre 17,75 y 28,61. La hipótesis nula indica que la diferencia media entre los porcentajes analizados en esta prueba estadística es 0. Puesto que el valor p es 0,000, que es menor que el nivel de significancia de 0,05, la decisión es rechazar la hipótesis nula y concluir que hay una diferencia estadística significativa entre los valores experimentales y el valor teórico.

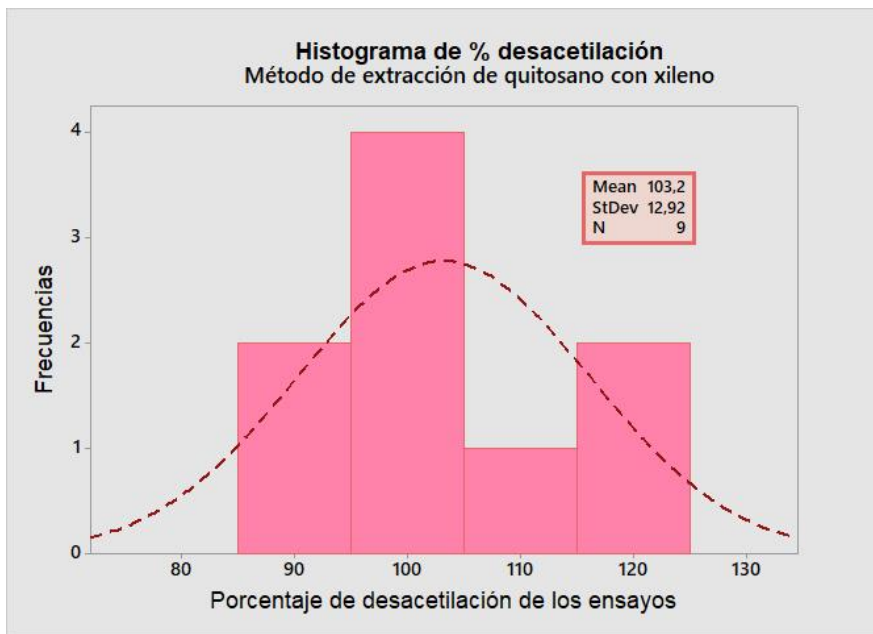


Figura 10. Histograma de datos experimentales para los porcentajes promedio de desacetilación en el Método 1 de extracción de quitosano

A su vez, se realizó un histograma (Figura 10) con los datos obtenidos para los porcentajes promedio de desacetilación, con la finalidad de examinar la dispersión de los datos y se determinó que los mismos son asimétricos, lo que quiere decir que al variar las condiciones de trabajo, en este caso la temperatura específicamente, no se logra obtener reproducibilidad y que en cada caso se obtendrán resultados evidentemente diferentes.

Finalmente, para analizar las especies presentes en la muestra y comprobar que se obtuvo en mayor proporción quitosano, para que el mismo pueda ser utilizado en la elaboración de las membranas, se realizó un análisis por medio de espectrofotometría FTIR.

4.1.4 EXTRACCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CÁSCARAS DE CAMARÓN POR EL MÉTODO 2

Se utilizó ácido clorhídrico principalmente para la descalcificación y desmineralización de los exoesqueletos de camarón, debido a que estos presentan en sus estructuras altas cantidades de calcio; también cuenta –en menor cantidad- con magnesio. Cuando se adiciona ácido clorhídrico, se aporta a la formación de complejos de cloruro de calcio, debido a que el cloro se disocia del hidrógeno y son removidos posteriormente mediante un lavado (Balanta et al., 2010).

Se pudo apreciar la acción del ácido clorhídrico al momento de la extracción en la etapa de la desmineralización, puesto que cuando se agregó el mismo, la textura del polvo de cáscaras se ablandó y perdió su volumen de manera considerable, de igual manera, el color del polvo cambió de rojo ladrillo a salmón.

Como la finalidad del análisis fue ver la interacción de diferentes concentraciones de ácido clorhídrico para la extracción de quitosano a partir de las cáscaras de camarón, se trabajó con soluciones 0.6, 1.5 y 2.0 N en la etapa de la desmineralización. Posteriormente, en la desacetilación, se varió la temperatura recomendada en 10 °C, por lo que se trabajó con 120, 130 y 140 °C en dicha etapa. En la Tabla 7 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón a partir del Método 2. (Los resultados marcados en rojo fueron descartados para los cálculos respectivos por su evidente variación).

MUESTRA	% Rendimiento	Desviación Estándar	Promedio (%)
LA1a	62,69	0,31	64,76
LA1b	66,82		
LA1c	97,10		
LA2a	92,00	0,48	92,68
LA2b	84,69		
LA2c	92,68		
LA3a	124,58	0,90	69,00
LA3b	75,26		
LA3c	62,74		
LB1a	77,72	1,06	71,42
LB1b	77,19		
LB1c	59,34		
LB2a	80,64	0,32	82,74
LB2b	80,85		
LB2c	86,74		
LB3a	72,66	0,71	65,30
LB3b	64,59		
LB3c	58,65		
LC1a	49,86	0,55	54,48
LC1b	60,70		
LC1c	52,90		
LC2a	75,15	0,61	68,16
LC2b	63,54		

LC2c	65,79		
LC3a	91,52	0,85	91,21
LC3b	82,40		
LC3c	99,71		

Cabe resaltar que en esta metodología se pesó la quitina antes de ser desacetilizada, sin embargo la misma no fue leída en el FTIR-ATR puesto que el tiempo de extracción en la metodología era el recomendado para evitar la descomposición de las muestras y la disponibilidad del equipo no era inmediata, dichos resultados se pueden observar en el Anexo 2. Sin embargo, como no se puede asegurar que en esa etapa lo que se obtuvo fue quitina, el resultado en porcentaje de extracción se reporta a partir del peso de las cáscaras de camarón.

Como se puede observar en la Tabla 7, los resultados cuentan con una desviación estándar menor a 1, excepto en un caso, por lo que se puede llegar a concluir que el método es preciso. Sin embargo, entre cada grupo de ensayos, los porcentajes de rendimiento de la extracción de quitosano varían, lo que quiere decir que la modificación de la concentración del ácido clorhídrico en la desmineralización y la temperatura en la desacetilación afecta considerablemente a la obtención del quitosano.

Tomando en cuenta el dato teórico correspondiente al porcentaje de la quitina presente tanto en la cabeza y cuerpo del camarón (Tharanathan y Kittur, 2003), se realizaron los cálculos respectivos para estimar el grado desacetilación de los promedios de los pesos obtenidos experimentalmente, con la finalidad de tener una aproximación en el caso de que se pudiera asegurar que lo obtenido era quitina, como se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de desacetilación de los resultados experimentales a partir del porcentaje teórico de quitina en las cáscaras de camarón correspondiente al Método 2. (Los resultados marcados en rojo fueron descartados para los cálculos respectivos por su evidente variación).

MUESTRA	% teórico quitina	% Rendimiento	Desviación Estándar	Promedio (%)
LA1a	69,1	91,28	4,42	110,12
LA1b		97,53		
LA1c		141,54		
LA2a		133,58	6,92	130,61
LA2b		122,70		
LA2c		135,54		
LA3a		180,85	13,08	127,33
LA3b		109,82		
LA3c		91,33		
LB1a		113,32	15,40	103,73
LB1b		111,90		
LB1c		85,96		
LB2a		117,68	4,60	120,30
LB2b		117,60		
LB2c		125,61		
LB3a		105,30	10,21	94,59
LB3b		93,50		
LB3c		84,97		
LC1a		72,66	7,93	79,08
LC1b		87,94		
LC1c		76,65		
LC2a	108,78	8,87	98,74	
LC2b	91,96			

LC2c		95,50		
LC3a		132,59		
LC3b		120,03	12,35	132,45
LC3c		144,73		

Como se puede observar en la Tabla 8, así como con la metodología de Cárdenas (2015), los porcentajes de rendimiento de la extracción son cercanos al 100 % e incluso en ciertos casos lo sobrepasa. Esto pudo deberse a que no hubo una desmineralización o desproteínización total, y así mismo que en la etapa de desacetilación no se logró extraer por completo el quitosano de la quitina y que el resultado es una muestra de quitina-quitosano. Sin embargo, cabe resaltar que en esta metodología se agrega un excedente de hidróxido de sodio debido a que es recomendado para la elaboración de hidrogeles e incluso membranas, razón por la cual, en el resultado final, el peso que se obtiene no es solamente de quitosano con interferencias de las etapas de extracción, si no que aparte podría contar con una cantidad de hidróxido de sodio concentrado que no pudo retirarse al momento de secar las muestras.

En cuanto se refiere a las características morfológicas obtenidas de los ensayos con este método, todos se presentaron finalmente en forma de polvo fino y tuvieron similar coloración (salmón).

Se realizó un tratamiento estadístico (prueba t de student) para analizar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los resultados experimentales y el resultado reportado en la bibliografía, como se puede observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Prueba t pareada para resultados de la extracción de quitosano (Método 2).

	N	Media	StDev	SE Mean
% desacetilación	9	110,77	18,33	6,11
% desacetilación teórico	9	80	0	0
Diferencia	9	30,77	18,33	6,11
IC del 95% por diferencia de medias: (16,68; 44,86)				
Prueba t de diferencia media = 0 (vs ≠ 0): Valor t = 5,04 Valor P = 0,001				

Donde

- n: número de muestras
- StDev: desviación estándar
- SE Mean: error estándar de la media
- IC: intervalo de confianza

En los resultados presentados en la Tabla 9, la estimación de la diferencia en las medias de las muestras para el porcentaje de desacetilación es 6,11 y se puede asegurar con un 95% de confianza que la diferencia en las medias de las muestras está entre 16.68 y 44.86. La hipótesis nula indica que la diferencia media entre los porcentajes analizados en esta prueba estadística es 0. Puesto que el valor p es 0,001, que es menor que el nivel de significancia de 0,05, la decisión es rechazar la hipótesis nula y concluir que hay una diferencia estadística significativa entre los valores experimentales y el valor teórico.

De igual manera, como se puede apreciar en comparación con los resultados obtenidos en la prueba t de la anterior metodología, la presente metodología cuenta con resultados que varían en mayor proporción a los teóricos, y a su vez, que los resultados obtenidos varían significativamente entre sí. Para

analizar la variación de dichos datos se realizó un histograma de los resultados, como se observa en la Figura 11.

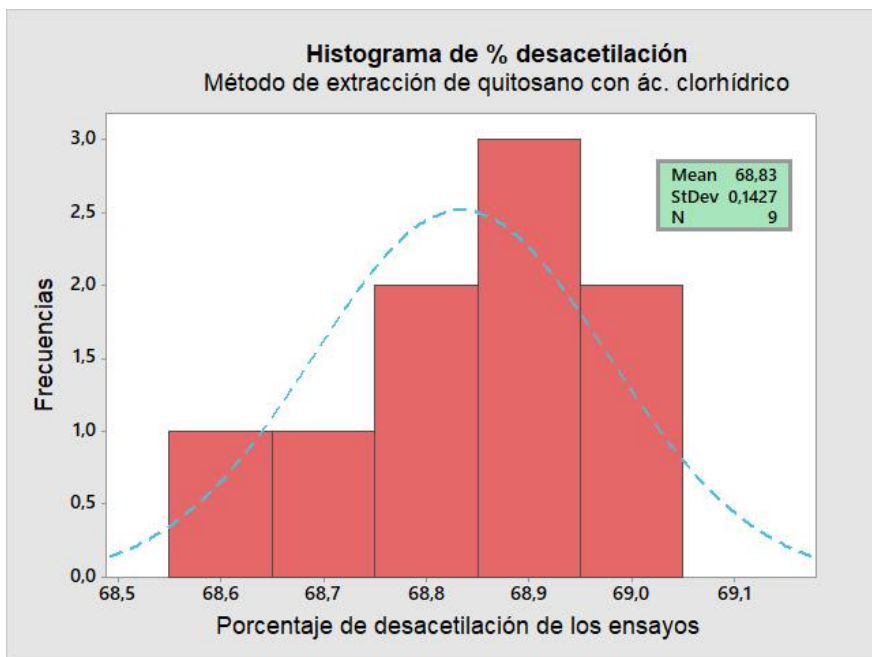


Figura 11. Histograma de datos experimentales para los porcentajes promedio de desacetilación en el Método 2 de extracción de quitosano

En la Figura 11 se puede observar que no hay reproducibilidad en el método y que los resultados obtenidos varían significativamente entre sí, no obstante, hay que tomar en cuenta que las muestras fueron sometidas a condiciones diferentes en cada ensayo y no se puede establecer una estabilidad en el método, lo que quiere decir que se esperaba que los resultados obtengan la presente variabilidad. Por lo tanto, se demostró que la concentración del ácido clorhídrico, así como la variación de la temperatura en la desacetilación, afectan en la obtención de quitosano.

De acuerdo a los resultados en las Tablas 7 y 8, las condiciones que obtuvieron mayor rendimiento de extracción fueron al trabajar con ácido clorhídrico 0,6 N y 130 °C. No es posible seleccionar las condiciones desde un criterio

cualitativo debido a que todos los productos de los ensayos resultaron bastante similares entre sí.

Finalmente, para analizar las especies presentes en la muestra y comprobar que se obtuvo en mayor proporción quitosano, para que el mismo pueda ser utilizado en la elaboración de las membranas, se realizó un análisis por medio de espectrofotometría FTIR.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO EXTRAÍDO POR FTIR-ATR

Se caracterizó el quitosano obtenido en cada ensayo y se obtuvieron los espectros mediante espectrofotometría IR, sin embargo, para la elaboración de las membranas por electrospinning se seleccionaron los espectros de las muestras que presentaban las mejores características morfológicas, es decir, aquellas de cada ensayo que tenían mejor consistencia (polvo fino), color; y a su vez que, según las Tablas 3 y 7, contaban con un porcentaje de rendimiento de extracción mayor.

Para la caracterización, inicialmente se tomó la lectura de un quitosano grado industrial al 90 % para obtener un espectro que se encuentre bajo las mismas condiciones que los espectros obtenidos de las lecturas de las muestras de quitosano experimental. No se comparó con un espectro reportado en bibliografía debido a que se deseó trabajar con un resultado obtenido en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones. El espectro obtenido y el reportado en bibliografía se observan en las Figuras 12 y 13.

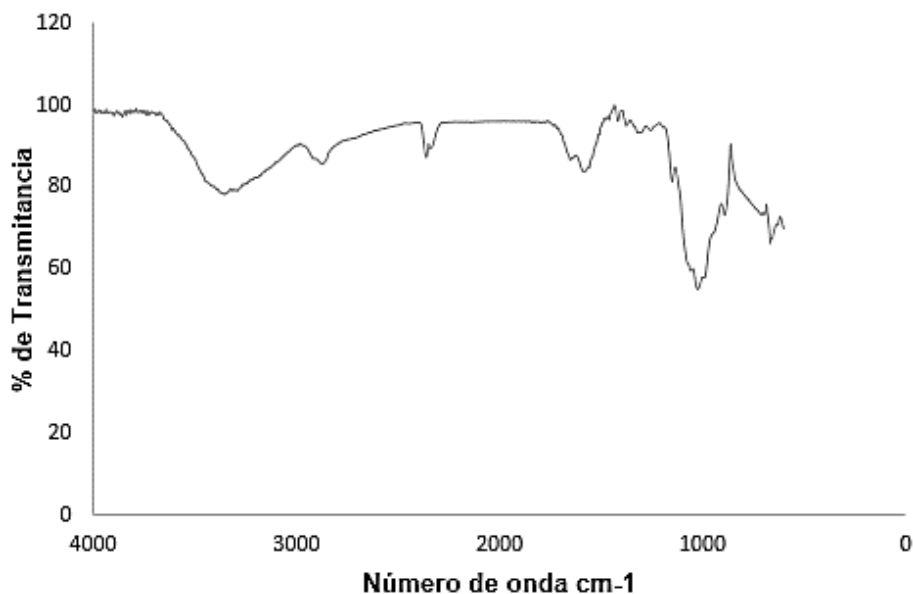


Figura 12. Espectro IR de quitosano grado industrial obtenido bajo las mismas condiciones que los espectros de las muestras de quitosano experimental

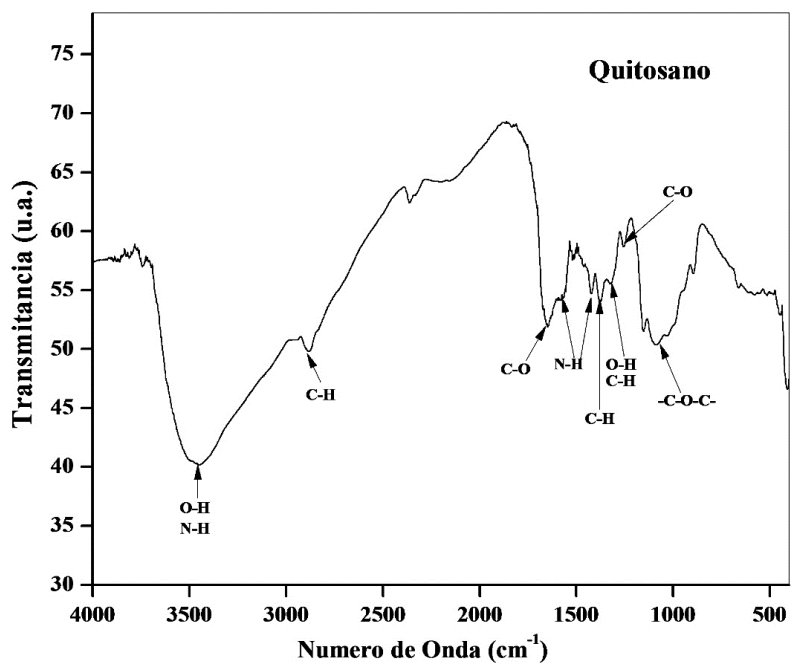


Figura 13. Espectro IR de quitosano reportado en bibliografía (Macea et al., 2015)

En las Figuras 12 y 13, se pueden observar los picos característicos del quitosano; de los 3700 a 3000 cm^{-1} tenemos el pico correspondiente a las vibraciones del grupo hidroxilo (OH), pero a su vez hay que considerar que en ese pico puede estar superpuesto el pico correspondiente a las vibraciones de enlace del grupo amino. También se observan los picos de 2900 a 2800 cm^{-1} que corresponden a los enlaces de CH_2 y CH_3 ; los picos de 1700 a 1500 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$); los picos presentes desde 1450 a 1200 cm^{-1} que comprenden a las vibraciones de los enlaces simples entre carbono-hidrógeno y carbono-carbono, pero a su vez de la vibración de estiramiento de los grupos $-\text{NH}$ libres. Entre la zona 1600 a 1000 cm^{-1} se encuentran las vibraciones de los enlaces C-O-C que corresponden al anillo sacárido que conforma el quitosano; y finalmente a 1060 cm^{-1} se tiene el pico que muestra a los enlaces de hidrógeno formados por los grupos activos del quitosano (Luna, 2012).

A su vez, como se supuso que las muestras de quitosano experimentales no alcanzaron una desacetilización total a partir de la quitina, para el análisis de los espectros de quitosano experimental obtenido y para analizar la presencia de quitina en los mismos, se tomó en cuenta el espectro de quitina reportado en bibliografía, debido a que no fue posible contar con una muestra de quitina experimental. El espectro de quitina se muestra en la Figura 14.



Figura 14. Espectro FTIR de muestra de quitina reportada en bibliografía (Pérez et al., 2014)

Con el quitosano obtenido a partir de la extracción en la que se empleó xileno se obtuvieron los espectros que se presentan en la Figura 15.

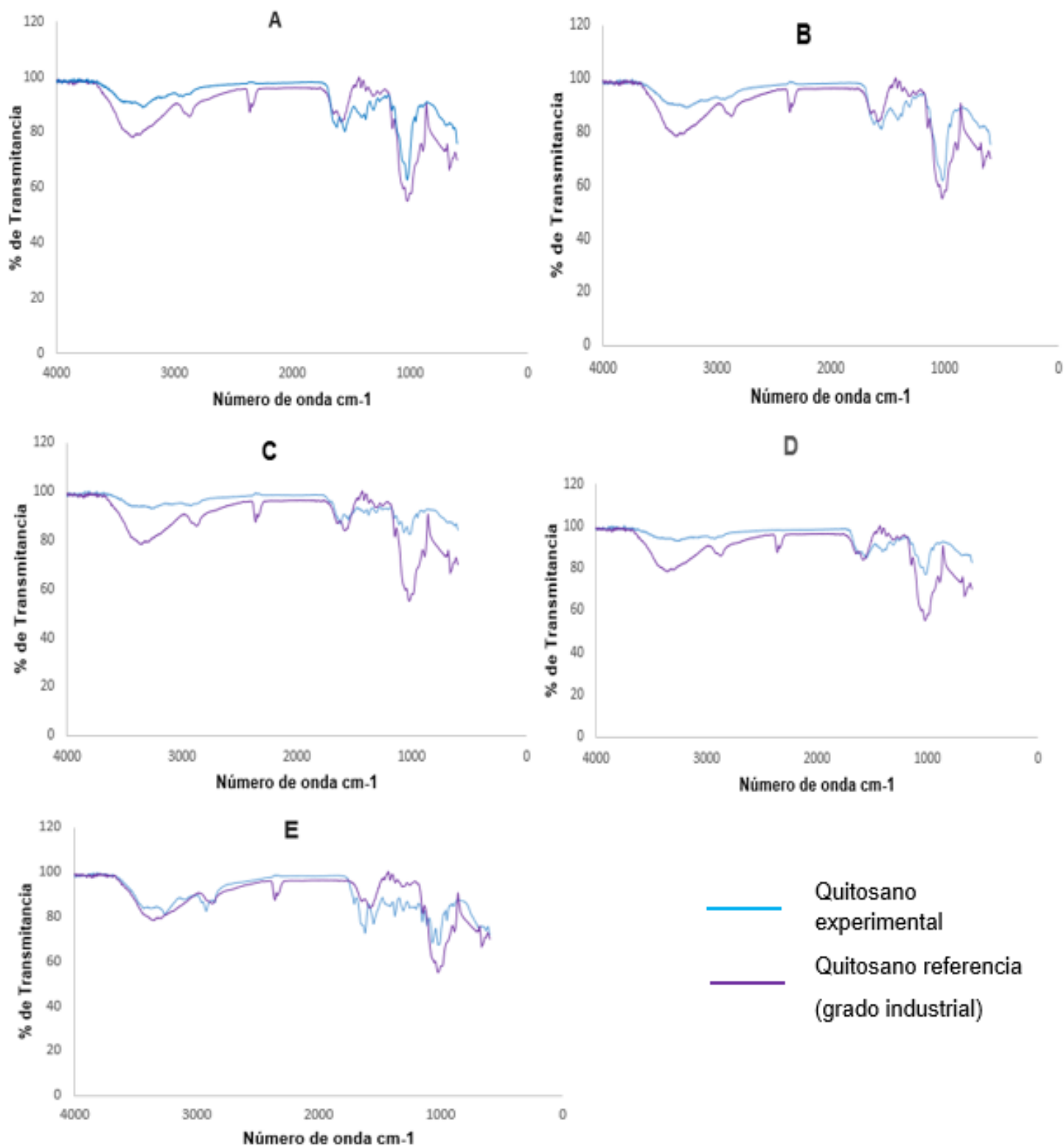


Figura 15. Espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (A: CA1b; B: CA2c; C: CA3a; D: CB1a; E: CC2b) y de quitosano grado industrial

En la Figura 15 se puede apreciar el espectro obtenido de quitosano experimental con la extracción del Método 1, comparado con el espectro obtenido de una muestra de quitosano grado industrial. Como se observa, los picos se encuentran similares, lo que quiere decir que finalmente si fue posible obtener quitosano. En cuanto se refiere al pico ubicado en 2900 y 2800 cm^{-1} , el cual comprende los enlaces de CH_2 y CH_3 , se puede concluir que las muestras no tuvieron una desacetilización total y por eso se presentan estas especies, por lo tanto las muestras comprenden una mezcla de quitina y quitosano. El pico ubicado entre 1261 cm^{-1} es aquel del grupo NH libre que refleja el resultado del proceso de desacetilación de la quitina; a su vez, en 1261 a 1060 cm^{-1} se obtienen los picos característicos más importantes del quitosano, debido a que los mismos corresponden a los grupos activos sueltos obtenidos por la desacetilación de la quitina y los puentes de hidrógeno que han logrado ser formados.

Tabla 10. Porcentaje de correlación obtenido de los espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (Método 1) comparados con un espectro de quitosano grado industrial.

Muestra	Porcentaje de Correlación
Ca1b	81,53%
Ca2c	85,20%
Ca3a	80,12%
CB1a	78,76%
CC2c	79,92%

Según la Tabla 10, se puede comprobar que efectivamente en todas las muestras, se obtuvo quitosano. Esto se debe gracias a que el coeficiente de correlación en todos esos casos fue mayor al 70 %.

En el caso de las muestras obtenidas en la extracción por el Método 2, no se obtuvo una similitud evidente con el espectro del quitosano grado industrial, como se puede ver en la Figura 16.

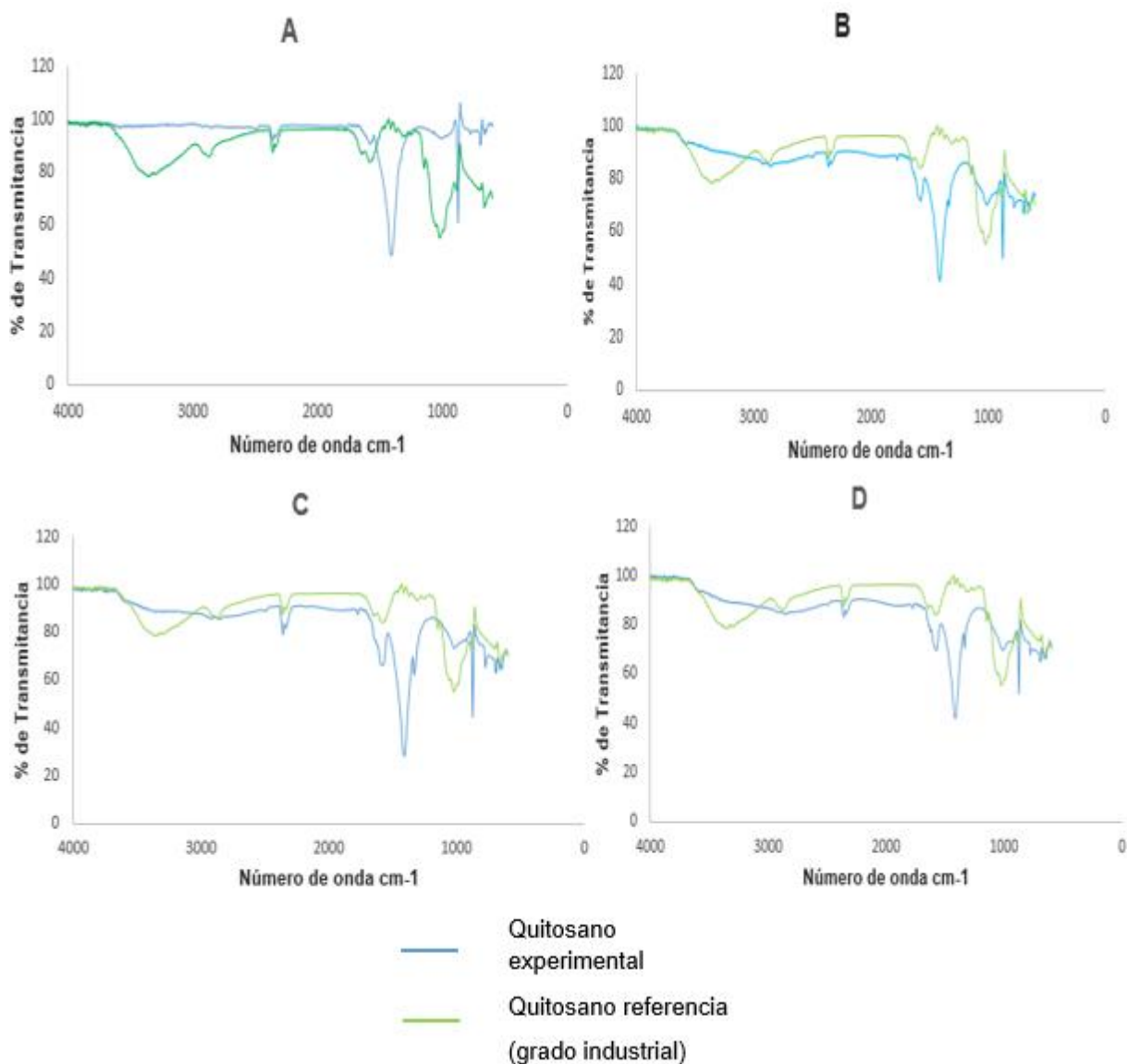


Figura 16. Espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (A: LA1a; B: LB1a; C: LB2a; D: LC2c) y de quitosano industrial

Como se puede apreciar en la Figura 16, el espectro experimental cuenta con picos ubicados en los lugares correspondientes a los picos característicos de la muestra industrial, sin embargo los mismos varían evidentemente en intensidad e incluso en forma, lo que evidencia que no se obtuvo quitosano o que el mismo es de baja pureza.

De manera general, los espectros experimentales cuentan con picos pronunciados en la zona 1500 cm^{-1} en donde corresponde a las vibraciones del grupo carbonilo, en la zona $1000\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ se encuentran dos picos pronunciados no correspondientes a quitosano; y finalmente en el caso de los picos ubicados de $4000\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$, no se puede apreciar con claridad la presencia de un pico e incluso llega a ser confundido con ruido del background, en esta zona debería apreciarse el pico del grupo amino.

Tabla 11. Porcentaje de correlación obtenido de los espectros infrarrojo de muestras de quitosano experimental (Método 2) comparados con un espectro de quitosano grado industrial.

Muestra	Porcentaje de Correlación
LA1a	6,96%
LB1a	41,93%
LB2a	33,34%
LC2c	46,79%

Debido a los resultados de los espectros, y a la Tabla 11 no se podría asegurar que lo obtenido es un quitosano de calidad, por lo que los espectros resultaron con picos correspondientes a otras especies presentes, las cuales

impiden una lectura clara de los mismos para confirmar si lo obtenido es quitosano. De igual manera, los porcentajes de correlación son menores del 50 %, lo que quiere decir que los espectros experimentales no tuvieron similitud con el espectro de una muestra de quitosano grado industrial que fue tomado como referencia.

4.2.1 ELABORACIÓN DE MEMBRANAS DE POLÍMERO CON QUITOSANO MEDIANTE ELECTROSPINNING

Basándose en las condiciones de la Tabla 1, y a su vez en la comparación de las lecturas de los espectros obtenidos de cada ensayo con los espectros del quitosano industrial, se eligieron 9 muestras de cada método con los porcentajes de extracción más altos y con mayor similitud entre el espectro experimental con el industrial utilizado como teórico.

Las muestras de los ensayos que fueron seleccionadas para la elaboración de las membranas por electrospinning se las puede observar en la Tabla 12.

Tabla 12. Muestras seleccionadas para la elaboración de membranas por electrospinning

Extracción Método 1	% experimental	Extracción Método 2	% experimental
CA1b	80,02	LA1a	62,69
CA2c	87,83	LA2a	92,00
CA3a	74,48	LA3c	62,74
CB1a	72,17	LB1a	77,72
CB2b	68,46	LB2a	80,64
CB3b	62,49	LB3b	64,59
CC1c	67,87	LC1a	49,86

CC2b	76,15	LC2c	65,79
CC3b	80,71	LC3b	82,40

Primeramente, con la finalidad de disolver el quitosano en polvo que se extrajo de las cáscaras de camarón, se utilizó una solución de ácido acético, que se evapora en el proceso al momento de la inyección en el equipo de electrospinning y no se presenta en la estructura de la membrana cuando es elaborada. Con el quitosano disuelto, se preparó una solución polimérica que contenía PVA y quitosano.

Una vez preparada la solución polimérica, se procedió a la inyección con la bomba de jeringa y el generador de alta tensión. En el electrospinning se genera un campo eléctrico que es el encargado de la formación de los hilos nanométricos que forman las membranas a medida que se van depositando en la placa recolectora, por lo tanto se cuenta con un polo positivo y uno negativo.

La distancia entre la aguja y el colector es de suma importancia, debido a que el ácido acético debe evaporarse en el trayecto de la deposición de las fibras, puesto que si no se presenta dicha evaporación, las fibras se depositan húmedas y varían su forma de manera significativa, lo cual no es deseado al momento de la elaboración de las membranas.

Una vez que se aplica el campo eléctrico, la superficie de la solución polimérica se carga. La formación de la gota en la punta de la aguja y la transformación de la misma a la fibra recolectada en la placa con papel aluminio se da gracias a la auto-repulsión que se forma espontáneamente por las cargas generadas en el campo eléctrico.

La principal característica que determina la eficiencia de la formación del electrohilado es la tensión superficial (si las demás variables se mantienen

constantes). La formación de las gotas y fibras son impulsados principalmente por la tensión superficial de la solución del quitosano, a menor tensión superficial, es necesario menor campo eléctrico para la formación de las membranas (Geng, Kwon y Jang, 2005).

La tensión superficial es a su vez la encargada de la formación del cono de Taylor, puesto que al romperse la misma, se descompone en una tangencial y una normal formando dicho cono, el mismo que es indispensable para la formación de las fibras, debido a que medida de que la gota toma una aceleración definida al momento de transportarse de la jeringa a la placa colectora, su diámetro se reduce en magnitud y por ello la tangencial y la normal logran balancearse, lo que da como resultado la solidificación de la gota, creando la fibra deseada de medidas nanométricas (Gamboa, Mantilla y Castillo, 2018). La formación del cono de Taylor se puede ver en la Figura 17.

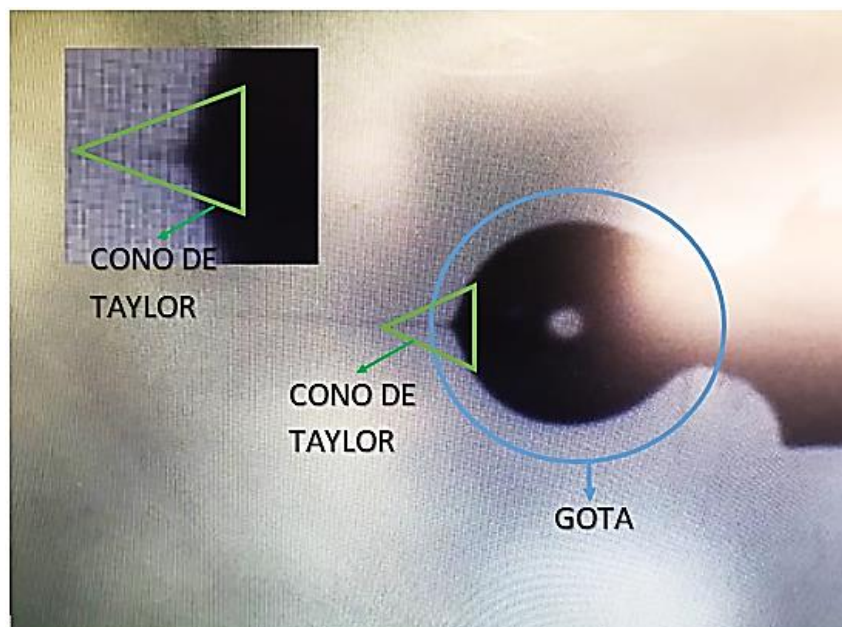


Figura 17. Formación del cono de Taylor en la gota de la solución polimérica quitosano (extraído experimentalmente)/PVA disuelto en ácido acético.

La concentración del ácido acético en agua influye fuertemente en la tensión superficial de las soluciones de quitosano, por esta razón, se trabajó con una solución de ácido acético al 70 %, para que el mismo permita que la solución de quitosano que se inyecte para la formación de las membranas sea la más adecuada.

En el caso del quitosano extraído experimentalmente por el Método 1, como se pudo observar en la caracterización por medio de FTIR, las muestras obtenidas no eran quitosano puro, sino que tenían quitina que no pudo ser desacetilizada, y a su vez por la variación de la temperatura es posible que tampoco se desmineralizó totalmente, por lo que minerales y otras interferencias pueden estar presentes. Esto de igual manera pudo confirmarse al momento de disolver las muestras de quitosano en ácido acético, debido a que éstas no fueron totalmente solubles, en este caso, se conoce que la quitina no es soluble en ácido acético y por ello se puede concluir que estaba presente en las muestras, sin embargo, a pesar de que todas las muestras en esta metodología fueron parcialmente solubles, hubieron muestras que fueron más solubles que otras.

La solubilidad de las muestras correspondientes a los ensayos con la metodología de extracción 2, es mayor que las muestras en el anterior método, sin embargo, como se pudo observar en los resultados obtenidos al caracterizar las muestras por FTIR, no se puede asegurar con certeza el principal factor de la solubilidad en este caso, porque a pesar de que hay quitina presente, puede que el exceso de hidróxido de sodio haya sido el que permitió la solubilidad de las muestras.

Según Koski, Yim y Shivkumar (2005), las propiedades reológicas y eléctricas (viscosidad, conductividad, tensión superficial y fuerza dieléctrica) se encuentran influenciadas por el peso molecular en la formación de las membranas, por ello cuando el peso molecular es demasiado bajo, las fibras tienden a perlar, mientras que cuando el peso molecular es alto, las fibras

aumentan su diámetro. Tomando en cuenta lo mencionado, para conseguir el peso molecular apto para las membranas, se utilizó la mezcla de dos polímeros; en primer lugar el quitosano extraído experimentalmente –con peso molecular alto– y el polivinil alcohol (PVA) con peso molecular bajo.

En la Tabla 13 se exponen las condiciones de trabajo para la elaboración de las membranas con el quitosano extraído experimentalmente bajo los diferentes tratamientos, en las dos metodologías empleadas.

Tabla 13. Condiciones experimentales para la elaboración de las membranas de quitosano/PVA por electrospinning.

Extracción por el Método 1			Extracción por el Método 2		
Muestra	Condición de trabajo		Muestra	Condición de trabajo	
	Caudal (mL/h)	Voltaje (kV)		Caudal (mL/h)	Voltaje (kV)
CA1b	0,35	10,40	LA1a	0,35	9,30
CA2c	0,40	16,10	LA2a	0,35	12,30
CA3a	0,40	9,40	LA3c	0,30	10,70
CB1a	0,30	6,90	LB1a	0,35	9,50
CB2b	0,25	13,00	LB2a	0,30	10,30
CB3b	0,25	7,40	LB3b	0,35	10,80
CC1c	0,40	16,10	LC1a	0,30	11,20
CC2b	0,25	13,60	LC2c	0,25	9,20
CC3b	0,25	10,70	LC3c	0,35	9,80

Las membranas obtenidas en las dos metodologías resultaron similares (de color blanco y bastante finas), como se puede observar en la Figura 18. A simple vista es difícil observar la estructura de las membranas, sin embargo, se puede suponer su calidad mediante la estabilidad del cono de Taylor que se presente en el proceso de inyección.



Figura 18. Ejemplo de una membrana elaborada con la solución polimérica que contenía el quitosano extraído experimentalmente por el Método 1.

Al mantenerse estable el cono de Taylor formado en la gota, durante el proceso de inyección, se puede asegurar que se están formando hilos finos de manera constante, mediante el campo magnético generado en el electrospinning. Estos hilos, al llegar a la placa colectora, se disponen de manera ordenada para formar las membranas. En el caso de no contar con estabilidad en la formación del cono, no es posible la formación constante de dichos hilos, por lo tanto en la placa colectora se dispondrían hilos incompletos, mal formados y sin orden, obteniendo membranas con baja calidad.

En el caso de las membranas elaboradas con la solución que contenía quitosano correspondiente al Método 1, se pudo apreciar que la formación del cono de Taylor resultó sencilla una vez que se adecuaron las condiciones óptimas para cada inyección. Dicho cono se mantuvo estable y no hubo mayor problema al inyectar la solución. Por otro lado, las membranas elaboradas con el quitosano correspondiente al Método 2, no contaron con estabilidad en el cono de Taylor y su formación resultó más difícil.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS POR MICROSCOPIA SEM

Para verificar que se obtuvieron fibras nanométricas capaces de formar membranas con el quitosano extraído en las metodologías empleadas, las muestras obtenidas por electrospinning fueron sometidas a un análisis morfológico utilizando un microscopio electrónico de barrido.

En las Figuras 19 y 20 se puede observar la morfología de las membranas de nanofibras elaboradas con el quitosano extraído bajo los diferentes tratamientos, en las dos metodologías empleadas.

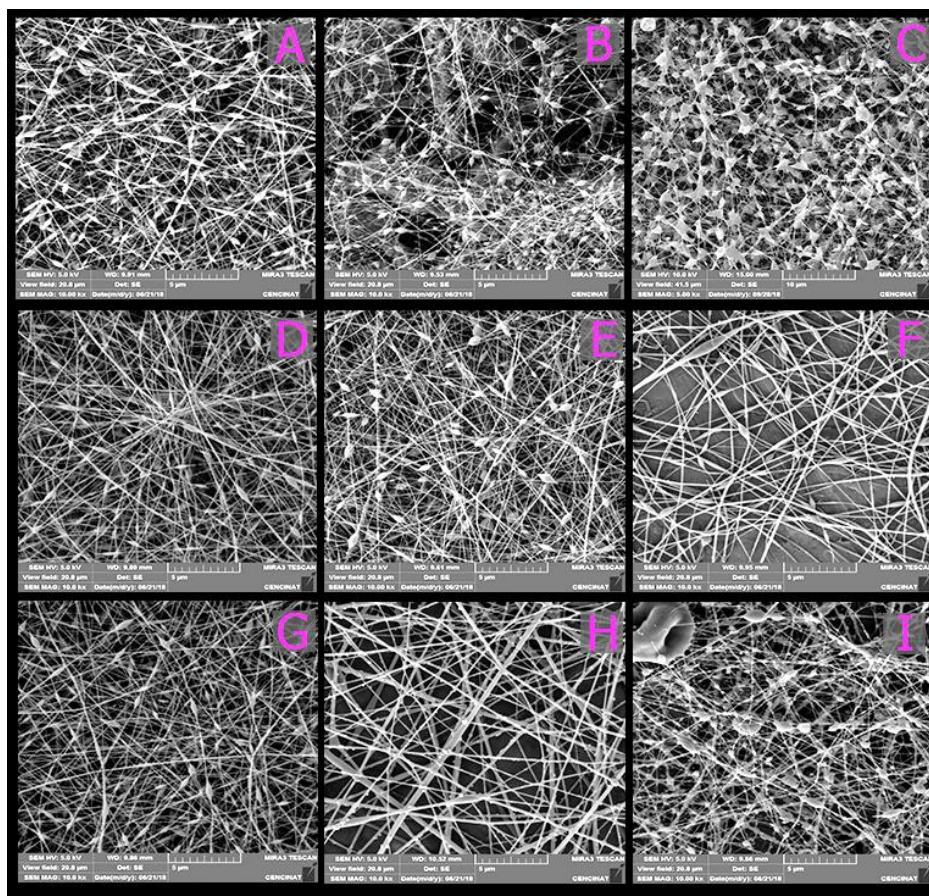


Figura 19. Micrografía SEM de electrohilado de quitosano extraído experimentalmente mediante el Método 1 (quitosano/PVA) disueltos en ácido

acético, a una concentración 1:1; A (CA1b), B (CA2c), C (CA3a), D (CB1a), E (CB2b), F (CB3b), G (CC1c), H (CC2b), I (CC3b).

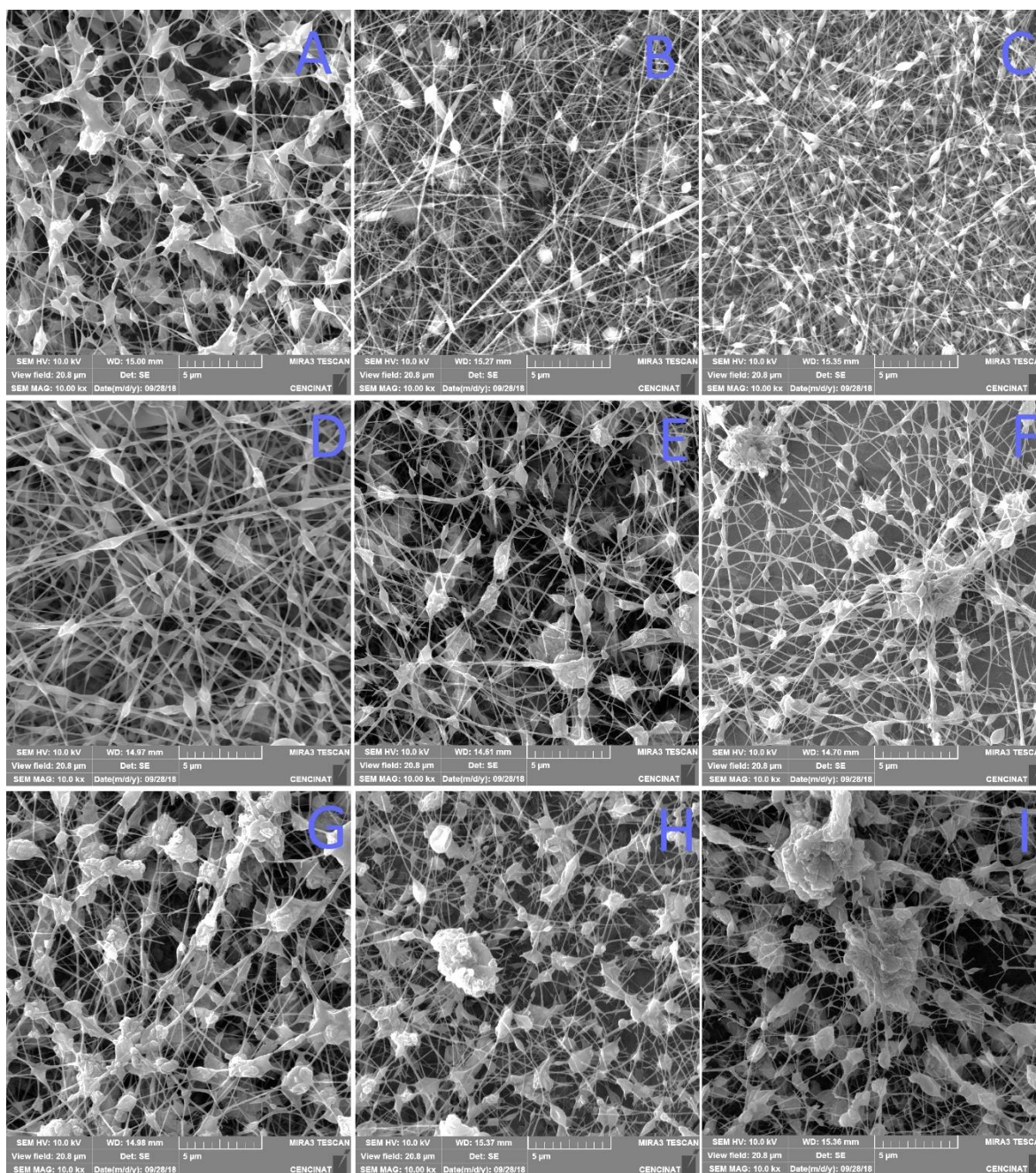


Figura 20. Micrografía SEM de electrohilado de quitosano extraído experimentalmente mediante el Método 2 (quitosano/PVA) disueltos en ácido acético, a una concentración 1:1 A (LA1a), B (LA2a), C (LA3c), D (LB1a), E (LB2a), F (LB3b), G (LC1a), H (LC2c), I (LC3c).

En la Figura 19, se puede observar las membranas elaboradas con el quitosano obtenido al realizar la extracción por el Método 1, dichas membranas no presentan una tendencia en formación de fibras que sea evidente entre cada una, sin embargo, se puede apreciar en las fotografías de los ensayos iniciales y finales (A, B, C, H, I) que no se lograron formar fibras muy marcadas, si no que se formaron *beads* (Figura 21), debido a que las fibras fueron depositadas con menor humedad en comparación con las demás fibras, a pesar de que la distancia entre aguja y colector fue constante en la elaboración de todas las membranas, esto pudo deberse al voltaje que fue necesario para alcanzar el cono de Taylor en cada ensayo en el equipo de electrospinning, como se puede observar en la Tabla 13. Las fibras D, F y H son las que tienen mejor apariencia en comparación con las demás fibras.

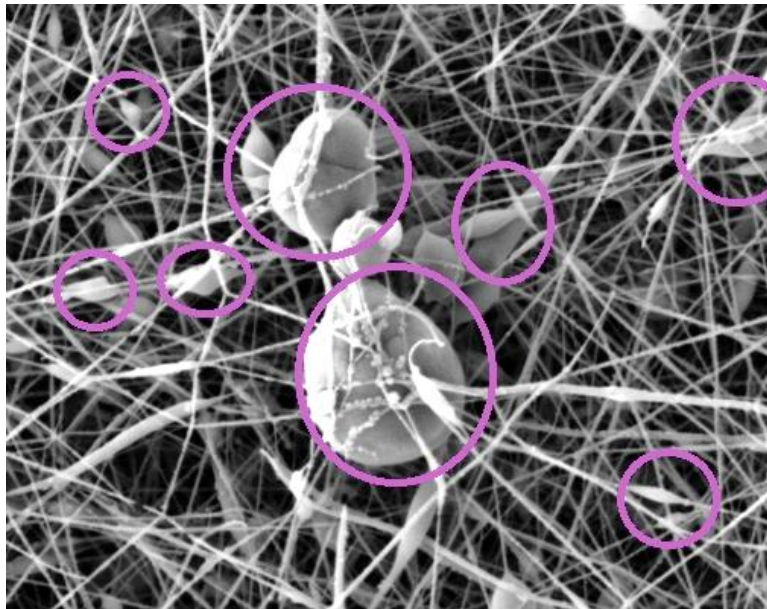


Figura 21. Primer ejemplo de formación de *beads* en las micrografías obtenidas por SEM.

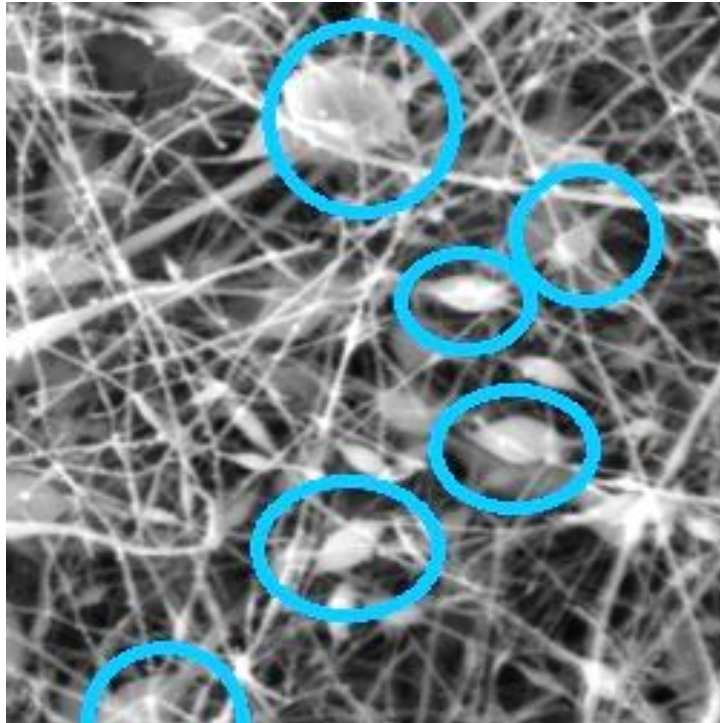


Figura 22. Segundo ejemplo de formación de *beads* en las micrografías obtenidas por SEM.

Según Li y Wang (2013), al aumentar el voltaje hay más probabilidad de presenciar *beads*, sin embargo, dicha formación puede deberse a un peso molecular, concentración o viscosidad bajos y una alta tensión superficial. Por otro lado, cabe resaltar que la concentración de quitosano en las membranas también afecta en la formación de *beads*, o incluso en la formación de partículas y no de fibras, esto radica en la pureza de quitosano con la que se trabaje, y como se ha mencionado anteriormente, las muestras de quitosano tienen presente quitina, y en ciertos casos, minerales e interferencias que no pudieron ser retirados por la modificación de la temperatura y concentración de soluciones en los distintos ensayos de extracción de quitosano utilizados.

En el caso de la Figura 20 se pueden apreciar las membranas obtenidas que contienen en su estructura quitosano extraído utilizando el Método 2, las cuales indican una alta formación de *beads* y muy poca formación de fibras; a su

vez se observa que tiene mayor tendencia a la formación de partículas que a la formación de membranas definidas, lo que quiere decir que el caso de que lo obtenido fue quitosano, este no es óptimo para la formación de las membranas, debido a que en comparación con las membranas obtenidas de quitosano obtenido por el Método 1, la pureza y la estructura del quitosano es evidentemente diferente y no de suficiente calidad para que en la inyección por electrospinning resulten fibras.

Se revisaron las micrografías obtenidas de las muestras por SEM y se seleccionaron aquellas que tenían características morfológicas similares a las obtenidas de membranas elaboradas con quitosano grado industrial, como se puede ver en la Figura 23.

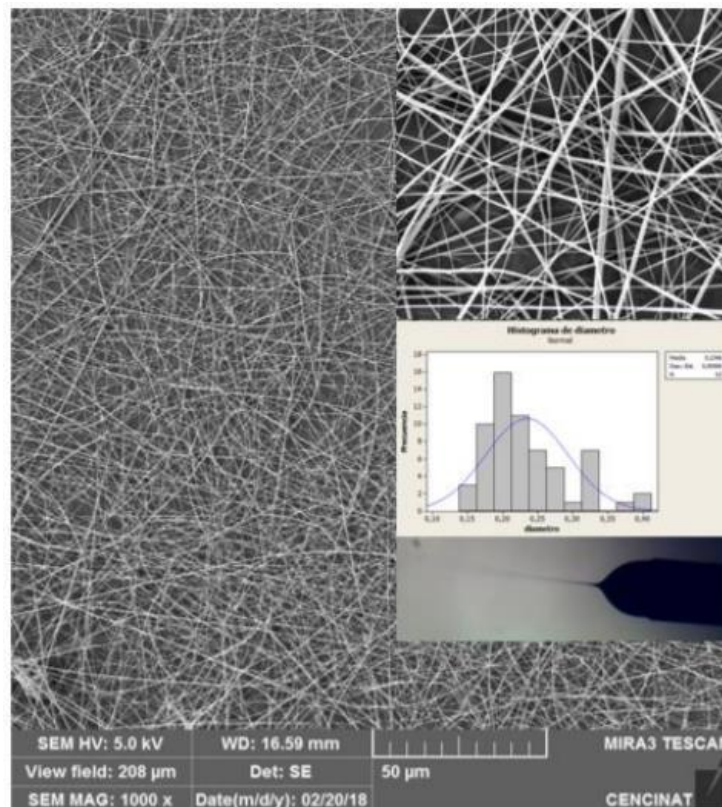


Figura 23. Membrana elaborada con quitosano industrial 2% con ácido acético 70% + PVA 10% disuelto en agua (Granja, Herrera, 2018).

Las membranas elaboradas con las muestras de quitosano del Método 1 que se seleccionaron fueron la CB1a, CB3b y CC2b. En el caso de las muestras de quitosano del Método 2 se seleccionó la muestra LB1a. Una vez seleccionadas las membranas, se procedió a tomar 60 medidas de longitudes de diferentes fibras en las fotografías de cada membrana en el programa ImageJ y se realizó un histograma, para evaluar la variabilidad de las fibras que presentaban dichas membranas y de esta forma seleccionar cuál de ellas fue la más uniforme en cada método, como se presenta en las Figuras 24 y 25.

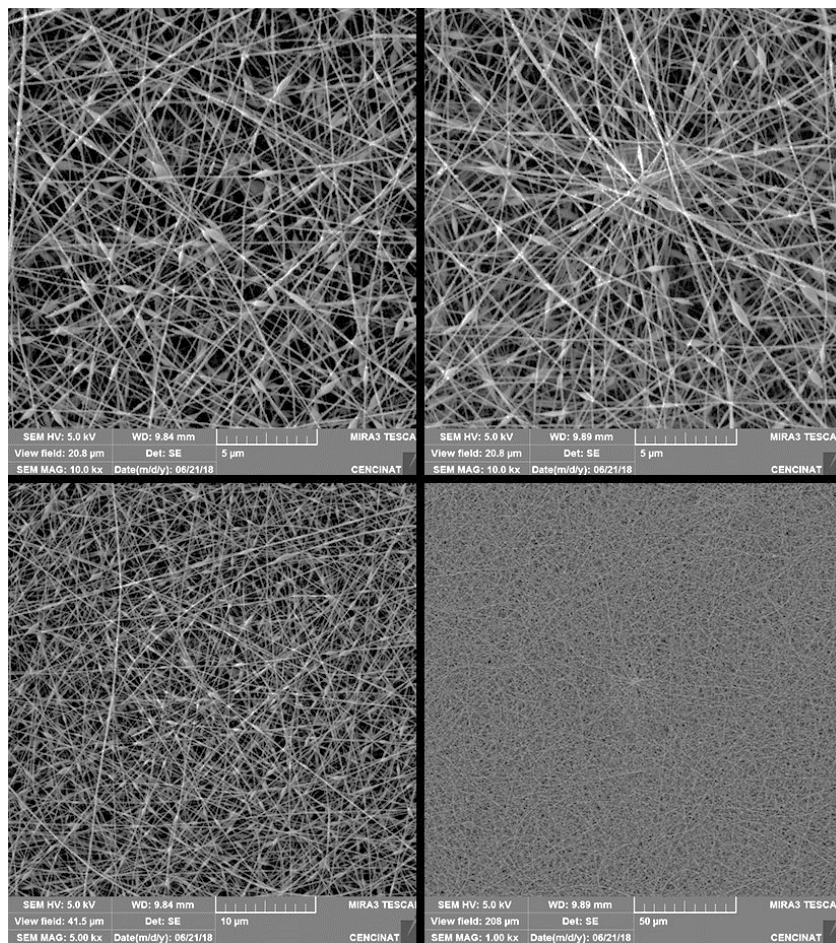


Figura 24. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra CB1a correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones.

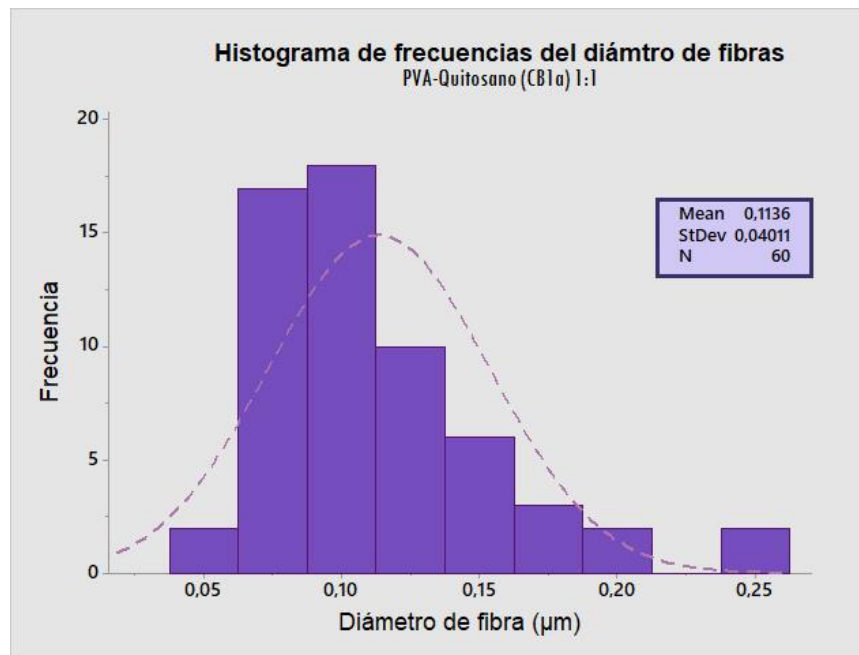


Figura 25. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra CB1a

Como se puede observar en la Figura 24, la muestra CB1a presenta *beads* pero si se logra la formación de fibras. Dichas fibras, en la Figura 25, tienen una tendencia asimétrica hacia la izquierda y un valor atípico a la derecha, lo que demuestra que varían entre sí significativamente en cuanto se refiere al diámetro, esto quiere decir que la formación de las fibras no es uniforme y existe un tiempo de falla en su formación, lo cual puede afectar a la calidad de la membrana que es obtenida. De los diámetros de las fibras se obtuvo una desviación estándar de 0,04011 μm.

Al comparar el histograma de la Figura 25, con el de la Figura 23, se puede observar que los dos comprenden una distribución bastante similar (no normal con tendencia a la izquierda), por lo que se puede decir que la variación de los diámetros de la muestra CB1a es similar a los diámetros obtenidos con las membranas elaboradas con el quitosano grado industrial, sin embargo no se

pueden apreciar fibras de formación estable en la micrografía. Dicha membrana no resultó de buena calidad.

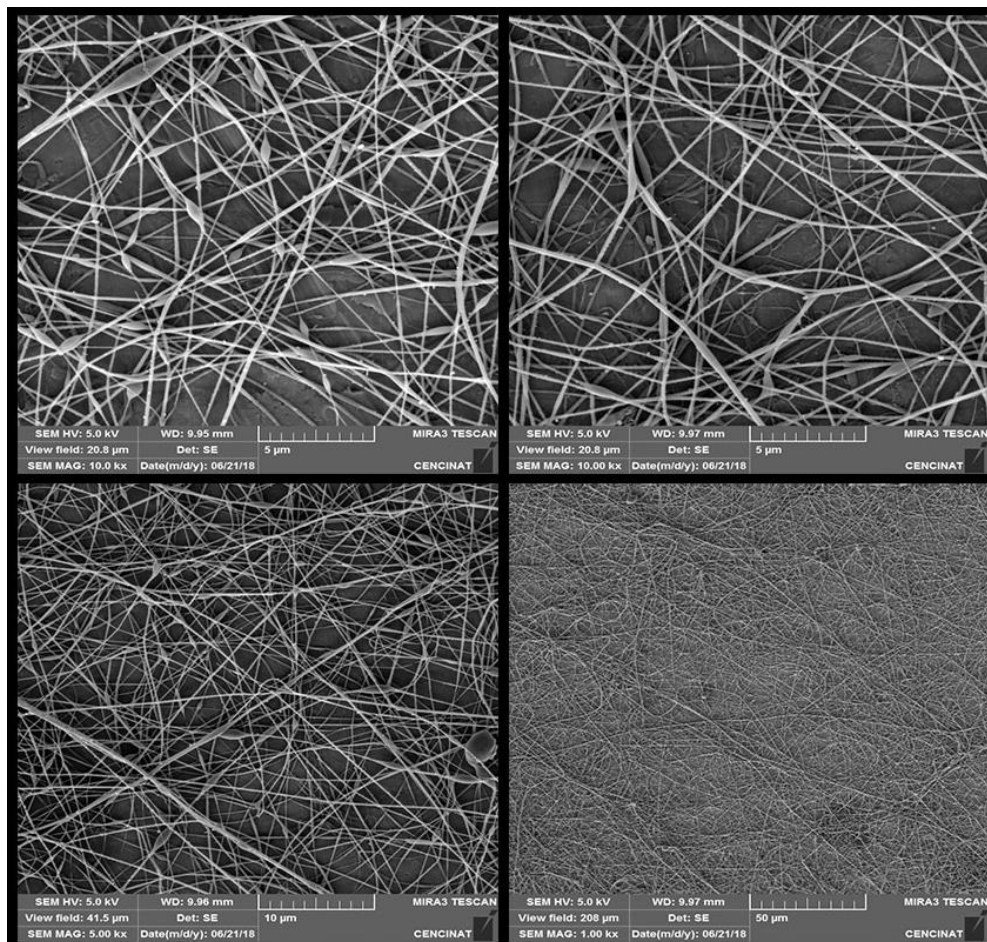


Figura 26. Fotografías obtenidas por SEM de la muestra CB3b correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones.

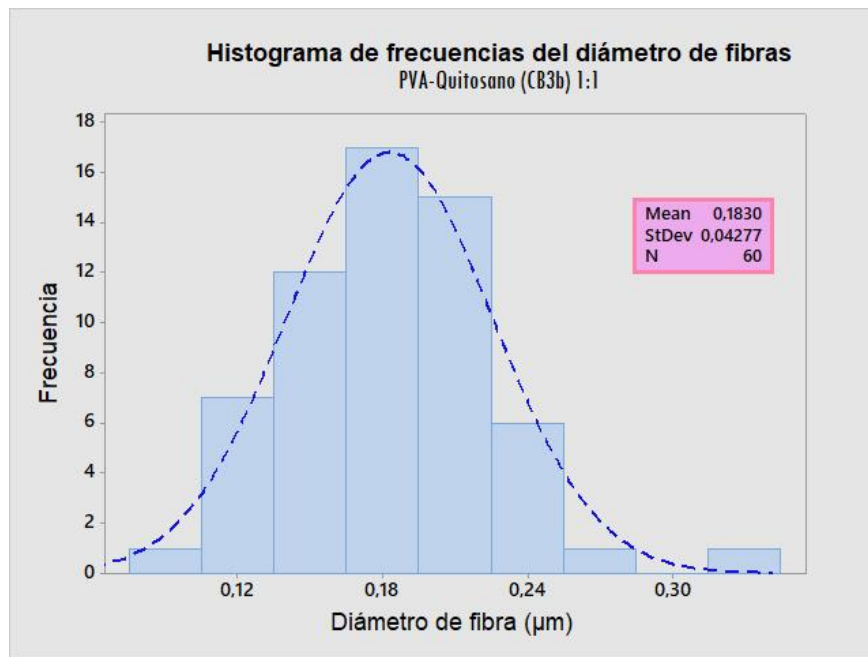


Figura 27. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra CB3b.

Como se observa en la Figura 26, la muestra CB3b presenta una mínima cantidad de *beads*, sin embargo los espacios entre cada fibra son más amplios. En la Figura 27 se aprecia que los datos correspondientes al diámetro de las fibras tiene una tendencia normal, lo que quiere decir que los diámetros no tienen una alta variación entre sí, sin embargo es importante resaltar que se cuenta con un dato atípico hacia la derecha. La calidad de las membranas en este caso está reflejado en el espacio entre las fibras. De los diámetros de las fibras se obtuvo una desviación estándar de 0,04277 μm .

Al comparar el histograma de la Figura 27, con el de la Figura 23, se puede observar que la distribución de los datos no es similar, por lo que se puede decir que las membranas obtenidas tienen una diferencia evidente en cuanto a diámetros de fibra comparando con las membranas elaboradas con el quitosano grado industrial, por otra parte, como se puede observar en la micrografía (Figura 26), la membrana tiene una morfología similar a la que se aprecia en la Figura 23.

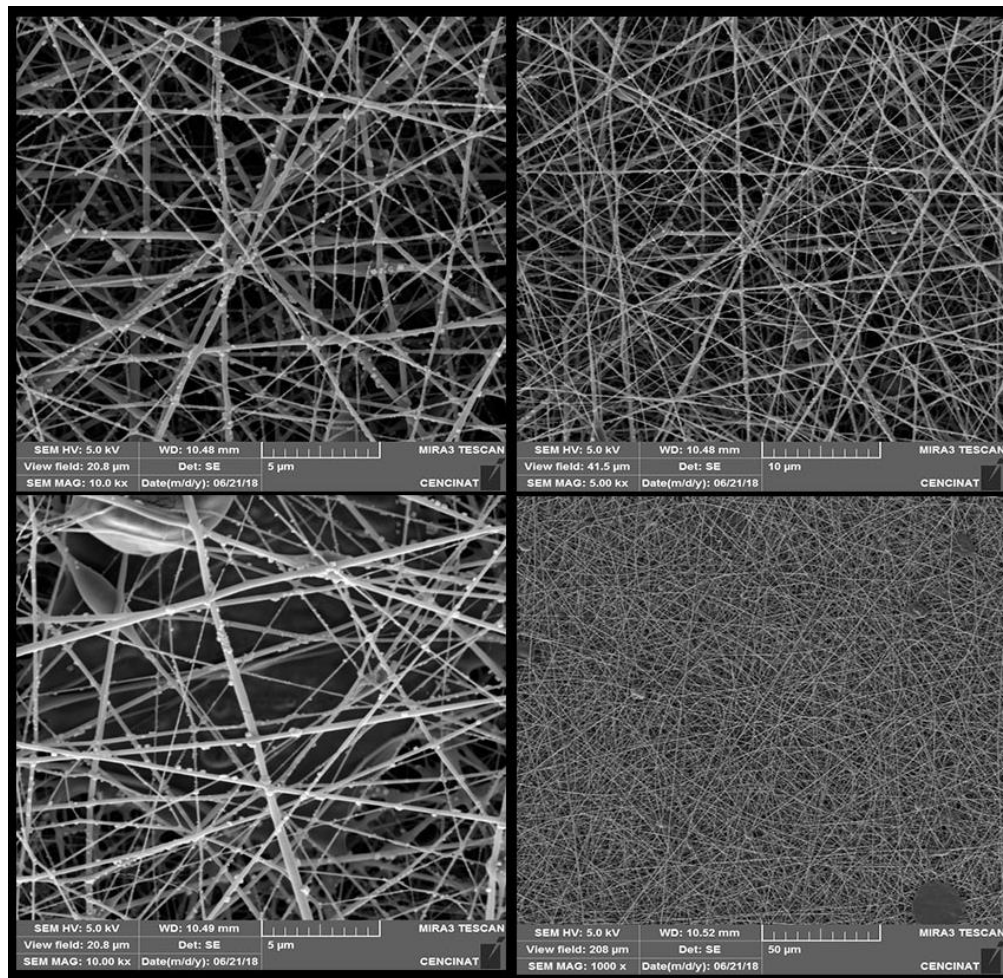


Figura 28. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra CC2b correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones

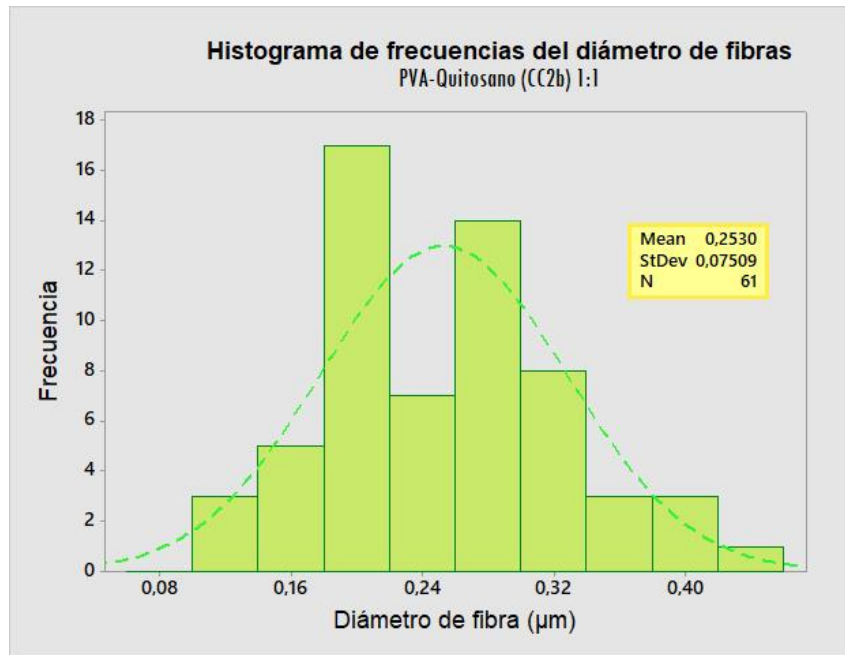


Figura 29. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra CC2b

En la Figura 28, se observan fibras con menos espacio entre ellas y no es notoria la presencia de *beads*, sin embargo se presenta una cantidad de partículas adheridas en las fibras. Con respecto a la Figura 29, se puede apreciar una distribución normal entre los datos de diámetros tomados de las fibras, sin embargo se puede apreciar que no hay uniformidad en los diámetros de las fibras. La calidad de las membranas en este caso es mejor que en los dos casos anteriores. De los diámetros de las fibras se obtuvo una desviación estándar de 0,07509 μm.

Al comparar el histograma de la Figura 29, con el de la Figura 23, se puede observar que la distribución de los datos tampoco es similar (como en el caso anterior), lo que quiere decir que las membranas obtenidas difieren en los diámetros de fibra comparando con las membranas elaboradas con el quitosano grado industrial. Al observar en la micrografía de la Figura 28, se puede

determinar que la membrana obtenida es la más cercana a la membrana correspondiente al quitosano grado industrial.

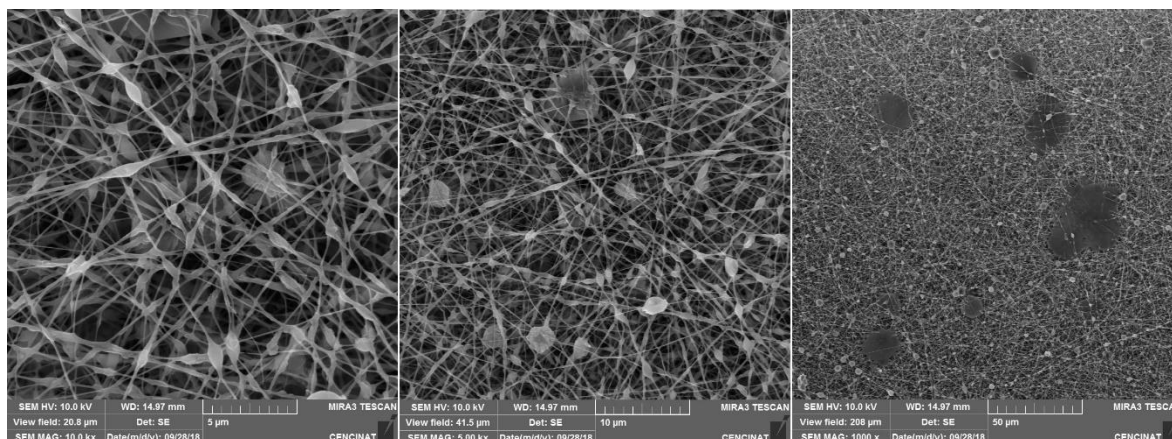


Figura 30. Micrografías obtenidas por SEM de la muestra LB1a correspondiente a una membrana quitosano/PVA en diferentes resoluciones

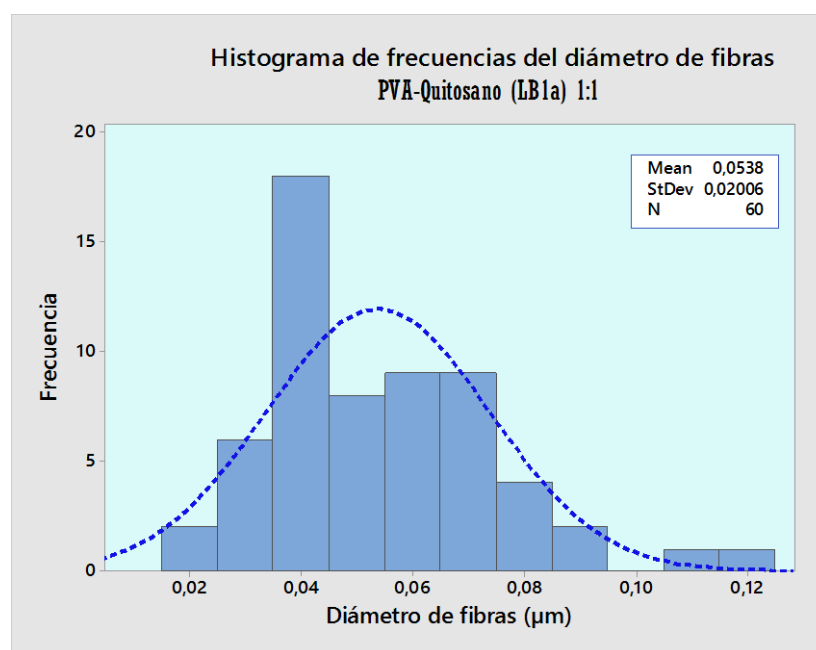


Figura 31. Histograma del diámetro de las fibras correspondiente a la membrana de la muestra LB1a.

En la Figura 30 se puede apreciar una membrana formada por fibras muy delgadas que coexisten con una alta cantidad de *beads*, lo cual refleja una calidad muy baja de la misma. En cuanto se refiere a la Figura 31, las fibras cuentan con diámetros bastante diferentes entre sí, lo que quiere decir que la formación de la misma no fue uniforme y que por ello la membrana no cuenta con una estructura pareja. La desviación estándar resultante de la medición de los diámetros de las fibras fue de 0.02006 μm .

Comparando los resultados obtenidos con la membrana de la muestra LB1a con los resultados que se obtuvieron según Granja y Herrera (2018), no fue posible obtener una membrana similar y el resultado obtenido en este caso fue de muy mala calidad.

De acuerdo a las membranas seleccionadas, se puede apreciar que aquellas que contaron con una morfología similar a una membrana elaborada con quitosano industrial fueron las pertenecientes al método 2 de extracción de quitosano, de las cuales la que presentó mejores características fue la membrana de la muestra CC2b. Las membranas elaboradas con el quitosano proveniente del otro método son notablemente de baja calidad y no tienen similitud con la membrana tomada como referencia.

5. CONCLUSIONES

Fue posible la obtención de quitina y quitosano proveniente de cáscaras de camarón mediante el Método 1, sin embargo no se pudo asegurar si con el Método 2 se obtuvo quitina ni quitosano, o que lo obtenido resultó de mala calidad.

El porcentaje de rendimiento de extracción de quitosano con el Método 1 fue de un promedio total de 71 %; no se reportó el porcentaje de rendimiento a partir de la quitina extraída, sin embargo se utilizó el porcentaje teórico de quitina presente y se obtuvieron porcentajes de rendimiento mayores al 100 % con desviaciones estándar mayores a 3 y diferencias significativas entre el resultado teórico y los resultados experimentales. Al realizar las lecturas de las muestras de quitosano en el FTIR, se reflejaron resultados positivos puesto que los picos de los espectros experimentales coincidieron en un promedio de porcentaje de correlación del 81,11 % con los picos de un espectro de quitosano tomado como referencia. Se concluye que se obtuvo quitosano con interferencias que se encontraban presentes al pesar las muestras obtenidas.

El porcentaje de rendimiento de extracción de quitosano con el Método 2 fue de un promedio total de 73 %; utilizando el porcentaje teórico de quitina presente, se obtuvieron porcentajes de rendimiento mayores al 100 % con desviaciones estándar mayores a 3 y diferencias significativas entre el resultado teórico y los resultados experimentales. Se determinó que el Método 2 fue más preciso que el Método 1, debido a que las desviaciones estándar fueron menores. Al realizar las lecturas en el FTIR, a simple vista parecen coincidir en ciertos picos, pero los espectros experimentales eran diferentes en comparación con espectro de quitosano grado industrial tomado como referencia puesto que el porcentaje de correlación promedio fue de 34,00 %. Se concluye que con el Método 2 no se obtuvo quitosano o si se obtuvo, fue de baja pureza.

La membrana que tuvo los mejores resultados en morfología y apariencia visual fue la muestra CC2b (del Método 1). Se trabajó con 75 °C en el procedimiento de la desproteización y 65 °C para la desacetilación obteniendo un rendimiento basado desde el peso inicial de las cáscaras hasta el peso final del producto del 76 %. En la caracterización por FTIR, los picos resultantes del espectro correspondiente a la muestra se encontraban ubicados de manera similar a los picos de un espectro de un quitosano tomado como referencia. Para el electrohilado se elaboró una solución de quitosano al 3 % en ácido acético al 70 % y PVA al 10 %, como condiciones de trabajo se utilizaron 0,25 mL/h de caudal y 13.6 kV de voltaje. En las micrografías obtenidas por SEM de la muestra de la membrana se apreciaron fibras con superficies generalmente lisas y con diámetros no uniformes, sin embargo se apreció que la calidad de la membrana fue la mejor en comparación a los demás casos estudiados.

6. RECOMENDACIONES

- Establecer diferentes condiciones de trabajo con el ácido clorhídrico en el Método 2 para lograr obtener quitosano.
- Experimentar con otros métodos de purificación de quitosano para conseguir la eliminación de interferencias.
- Aumentar concentración de quitosano en la solución polimérica de inyección.
- Realizar la extracción de quitosano de las cáscaras de camarón con enzimas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegría, I., Simón, J. y Villarruel, L. (2014) Recubrimiento de Semillas de Soja y Maíz con Películas de Quitosano (Disertación de pregrado) Universidad Tecnológica Nacional, San Rafael, Mendoza.
- Arias, J. P. (2017). La quitina: un compuesto con mucho potencial. Recuperado el 6 de junio de 2018, de <http://papeldeperiodico.com/2017/06/la-quitina-compuesto-mucho-potencial/>
- Aules, E. y Quije, J. (2016). Caracterización de Microfibras de Fibroína de Seda Obtenidos a partir de la Técnica de Electrohilado. (Disertación de Pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Quito, Ecuador.
- Balanta, D., Grande, C. D. y Zuluaga, F. (2010). Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(5): 297–316.
- Beltrán, J. (2010). Extracción y caracterización de quitosano del camarón Titi y su aplicación en la liberación controlada de un fármaco (PhD Thesis). Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Berg, J. M., Stryer, L. y Tymoczko, J. L. (2007). Bioquímica. Sexta Edición. Barcelona, Reverté.
- Bolívar, G. (2018) Alcohol polivinílico: propiedades, usos, riesgos. Recuperado de: www.lifeder.com/alcohol-polivinilico/amp/
- Buitelaar, R. y Fuentes, J. A. (1991). La competitividad de las economías pequeñas de la región. *Revista de la CEPAL*. No.43: 83-97.
- Bhardwaj, N. y Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: una técnica fascinante para la fabricación de fibras. *Biotechnology advances*, 28(3): 325-347.
- Caicedo, A. (2015). Obtención de nanofibras a base de Quitosano y PVA mediante la técnica de electrospinning. *Revista Informador Técnico*, 79: 43-45. Recuperado de <https://biblat.unam.mx/es/revista/informador-tecnico/articulo/obtencion-de-nanofibras-a-base-de-quitosano-y-pva-mediante-la-tecnica-de-electrospinning>

- Cárdenas, E. (2015) Síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano para la determinación de bioacumulación en moscas *Drosophila Melanogaster* (Disertación de Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Chaussard, G. y Domard, A. (2004). New Aspects of the Extraction of Chitin from Squid Pens. *Biomacromolecules* 5: 559-564.
- Chew, S. Y., Wen, Y., Dzenis, Y. y Leong, K. W. (2006). The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Current pharmaceutical design*, 12(36): 4751–4770.
- Dersch, R., Steinhart, M., Boudriot, U., Greiner, A. y Wendorff, J. H. (2005). Nanoprocessing of polymers: applications in medicine, sensors, catalysis, photonics. *Polymers for Advanced Technologies*, 16(2-3), 276-282.
- Escobar-Sierra, D. M., Urrea-Llano, C. A., Gutiérrez-Guerra, M. y Zapata-Ocampo, P. A. (2014). Producción de matrices de quitosano extraído de crustáceos. *Revista Ingeniería Biomédica*. 5 (9): 20-25. Medellín.
- Fang, J., Zhang, L., Sutton, D., Wang, X. y Lin, T. (2012). Needleless Melt-Electrospinning de Nanofibras de Propileno. *Journal of Nanomaterials*, 2012: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/382639>
- Gamboa, W., Mantilla, O. y Castillo, V. (2018). Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica “electrospinning” para aplicaciones farmacológicas. *Sociedad Cubana de Bioingeniería*. 1(1): 1-10. Habana.
- García, T. y Roca, J. (2008) Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 11(2): 24- 32.
- Geng, X., Kwon, O.-H. y Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27): 5427–5432. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.066>
- Giraldo, J. D. (s/f). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. Universidad Pontificia Bolivariana. DOI: 10.13140/RG.2.1.3350.9287
- Granja, A. y Herrera, C., (2018). Obtención y caracterización de fibras submicrométricas de quitosano mediante la técnica de electrohilado.

- (Disertación de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Matriz Sangolquí. Quito, Ecuador.
- Hong, N.y Meyers S., (1989). Aislamiento y caracterización de la quitina proveniente de cáscaras de cangrejo de río. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 575-579.
- Instituto de Física de la Universidad Autónoma de México UNAM (s/f). Espectrofotometría Infrarroja. Recuperado de: http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas_equipos/ftir.html.
- Koski, A., Yim, K. y Shivkumar, S. (2004). Effect of Molecular Weight on Fibrous PVA Produced by Electrospinning. *Materials Letters*, 58: 493–497. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(03\)00532-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00532-9)
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D. y Farson, D. (2007). Electrospinning para ingeniería de tejidos. *Materials Science and Engineering: C*, 27(3): 504-509.
- Lárez-Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*, 1(2): 15–21.
- Li, Z. y Wang, C. (2013). Effects of Working Parameters on Electrospinning. En Z. Li & C. Wang, *OneDimensional nanostructures* (pp. 15–28). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado de http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-36427-3_2
- Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H. J. y Kaplan, D. L. (2006). Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(16): 3115–3124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.022>
- Lopez, N. (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación (PhD Thesis). Université Claude Bernard-Lyon I.
- Luna, Y. (2012). Obtención De Quitosano A Partir De Quitina Para Su Empleo En Conservación De Frutillas Y Moras. (Disertación de Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Organismo Evaluador de la Conformidad, Ecuador (2017). Importaciones, Exportaciones y Balanza Comercial del Ecuador. Recuperado de <https://atlas.media.mit.edu/es/profile/country/ecu/>
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A. y Yamamoto, H. (2004). Electrospinning del quitosano. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 25, 1600 -1605.
- Macea, R. B., Hoyos, D., Flórez, C., Montes, Y. G., Fuentes, E. M., Ruiz, J. I. R. y Ruiz, J. I. R. (2015). Synthesis and film properties of chitosan and whey. *Polímeros*, 25(1): 58–69. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1558>
- Melaj, M. y E Daraio, M. (2012). Matrices poliméricas sólidas basadas en quitosano y xantano para liberación controlada de fertilizantes. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(1): 3-6.
- Martin, G. P. (1995). Aplicaciones y aspectos de la quitina y el quitosano. *Journal de Ciencia Macromolecular*, Parte A: Química pura y aplicada, 32:4, 629-640.
- Mora-Molina, J., Starbird-Pérez, R., Chaves-Barquero, L. y Araya-Marchena, M. (2011). Desarrollo de membranas de quitosano y diseño de un equipo para la eliminación de metales pesados del agua. *Tecnología en Marcha*. 25(3): 3-18.
- Minitab Inc. (2000), Minitab Statistical Software, Versión 13.2, USA.
- Paredes, A., Ortega, O., González, A., Bustillos, L. y Velazco, G. (2014). Análisis comparativo de la regeneración ósea obtenida con quitosano y plasma rico en fibrina. *Acta Odontol Venez*, 52(2): 10-15.
- Percot, A., Voton C., Domard, A. 2003. Optimización de la extracción de quitina proveniente de cáscaras de camarón. *Biomacromolecules* 4: 12-18.
- Pérez, A., Sierra, J. R., Ruiz, J. R., Álvarez, I. A., Álvarez, Y. A. y Carrascal, A. R. (2014). Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1): 104–110.
- Ramirez, Q. (2013). Membranas compuestas base polimérica: preparación, caracterización y estudios para la separación de gases. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación de Química Aplicada, México D.F, México.
- Sánchez, E., Lozano, M. y Orts, R. (2016). Libro de artículos del XXI *Congreso Nacional de Ingeniería Mecánica*. Universita. Elche. España.

- Sánchez, L. M. D., Rodríguez, L. y López, M. (2013). Electrospinning: La era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 14(1): 10-27.
- Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga (s/f). Microscopía electrónica de barrido (SEM). Recuperado de: <http://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>
- Sill, T. J. y von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: aplicaciones en administración de fármacos e ingeniería de tejidos. *Biomaterials*, 29(13): 1989-2006.
- Srinivasan, G. y Reneker, D. H. (1995). Estructura y morfología de fibras de aramidas con diámetro pequeño, elaboradas por electrospinning. *Polymer international*, 36(2): 195-201.
- Tharanathan, R. N. y Kittur, F. S. (2003). Quitina: la biomolécula indiscutible de gran potencial. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(1): 61-87
- Teo, W. E. y Ramakrishna, S. (2006). Una revisión sobre el diseño de electrospinning y ensamblajes de nanofibras. *Nanotechnology*, 17(14): R89.
- Ugaz, O. (1997). Colorantes Naturales. *Fondo Editorial PUCP*. Lima, Perú.
- Valenzuela, C. y Arias, J. I. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en ciencias veterinarias*, 27(1): 8-12.
- Velásquez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 4(2): 91-93.
- Vernon, B. Biomateriales inyectables. *Woodhead Publishing* 4(1): 1-10. <https://doi.org/10.1533/9780857091376.frontmatter>.
- Verma, R. y Gupta, B. D. (2015). Detection of heavy metal ions in contaminated water by surface plasmon resonance based optical fibre sensor using conducting polymer and chitosan. *Food Chemistry*, 166: 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.045>
- Viloria, G. J. V., Gonzalez, A. y Ortiz, R. (2012). Apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético. *Avances en Biomedicina*, 1(1): 38–41.
- Wang, X., Kim, H. J., Wong, C., Vepari, C., Matsumoto, A. y Kaplan, D. L. (2006). Fibrous proteins and tissue engineering. *Materials today*, 9(12): 44-53.

- Ying Ch., Huey L., Yen M. y Song L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*. 88:179–184.
- Zhang, Z., Yao, X. y Zhu, H. (2010). Potential application of geopolymers as protection coatings for marine concrete: II. Microstructure and anticorrosion mechanism. *Applied clay science*, 49(1-2): 7-12.
- Zuwei Ma, Masaya Kotaki, Ryuji Inai, y Seeram Ramakrishna (2005) Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Ing.* 11(1-2):101-9.

8. ANEXOS

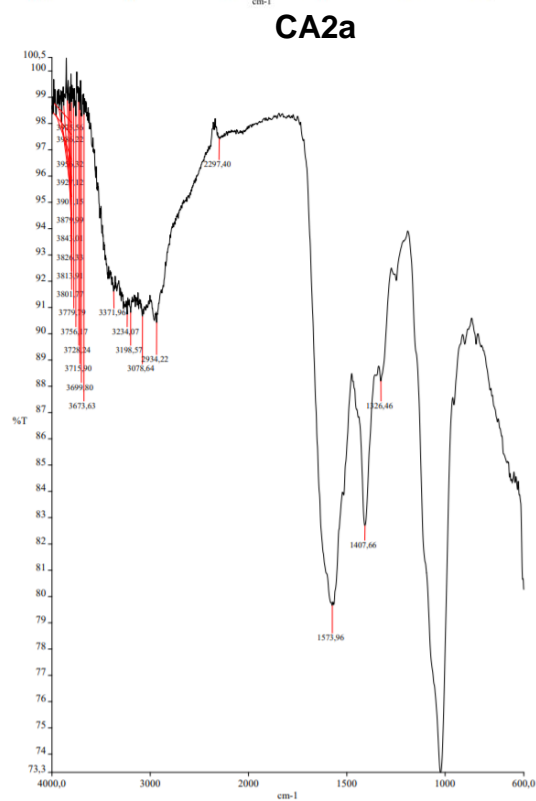
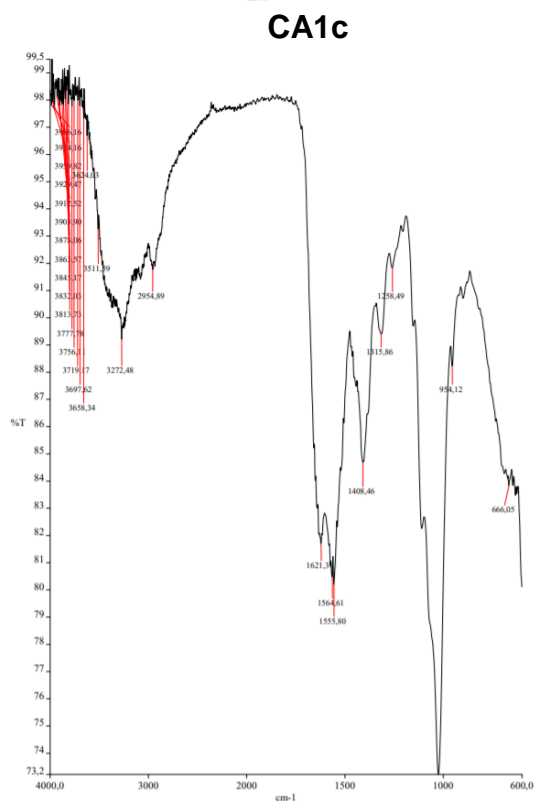
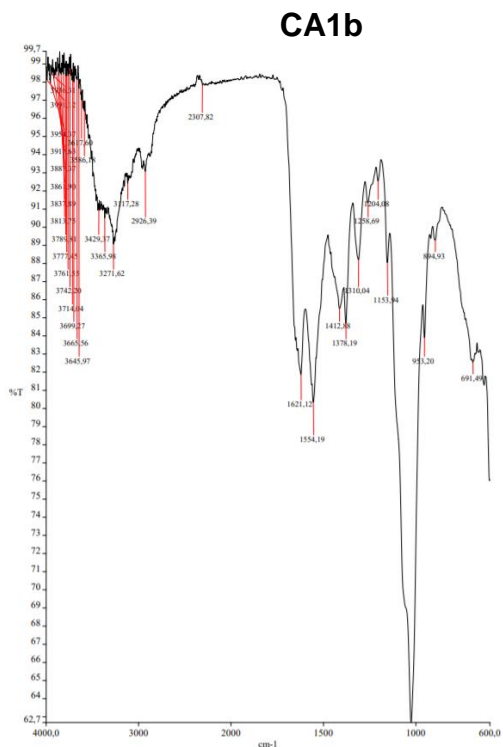
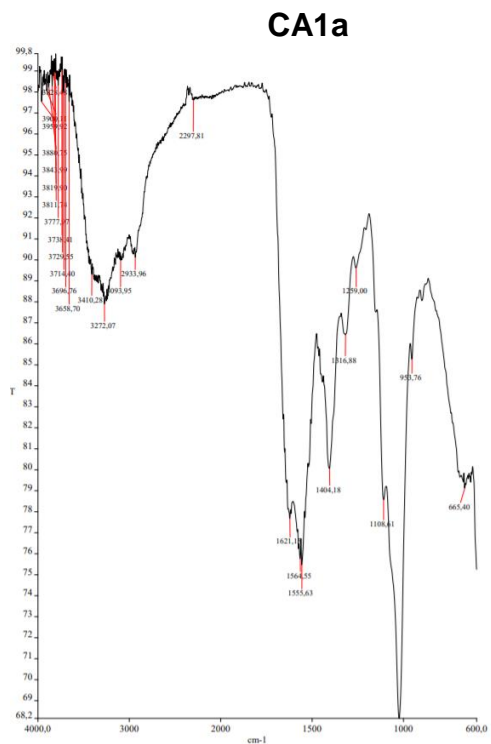
Anexo 1. Peso inicial de las cáscaras de camarón y peso final del quitosano obtenido en el Método 1.

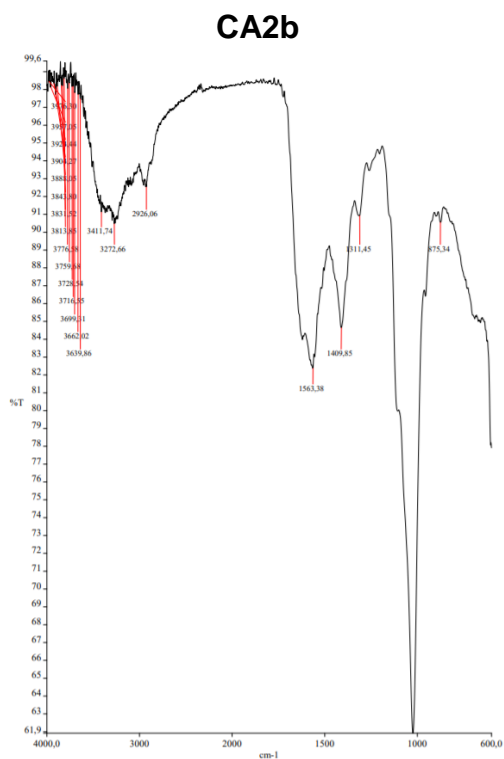
MUESTRA	Peso teórico quitina	Peso cáscaras (g)	Peso quitosano (g)	% desacetilación
CA1a	6,91	10,00	8,00	115,82
CA1b	6,91	10,01	8,61	124,57
CA1c	6,91	10,01	7,99	115,63
CA2a	6,91	10,00	8,80	127,35
CA2b	6,91	10,00	8,17	118,19
CA2c	6,91	10,01	8,79	127,25
CA3a	6,91	10,03	7,47	108,15
CA3b	6,91	10,05	6,75	97,61
CA3c	6,91	10,00	6,05	87,58
CB1a	6,91	10,02	7,23	104,61
CB1b	6,91	10,04	6,99	101,14
CB1c	6,91	10,06	7,22	104,54
CB2a	6,91	10,00	5,47	79,16
CB2b	6,91	10,01	6,85	99,19
CB2c	6,91	10,00	5,44	78,65
CB3a	6,91	10,08	6,02	87,17
CB3b	6,91	10,03	6,27	90,68
CB3c	6,91	10,02	5,98	86,59
CC1a	6,91	10,01	6,73	97,41
CC1b	6,91	10,07	6,42	92,86
CC1c	6,91	10,07	6,83	98,90
CC2a	6,91	10,06	7,49	108,38
CC2b	6,91	10,03	7,64	110,49
CC2c	6,91	10,02	7,60	110,03
CC3a	6,91	10,05	7,03	101,70
CC3b	6,91	10,02	8,08	116,99
CC3c	6,91	10,04	6,58	95,17

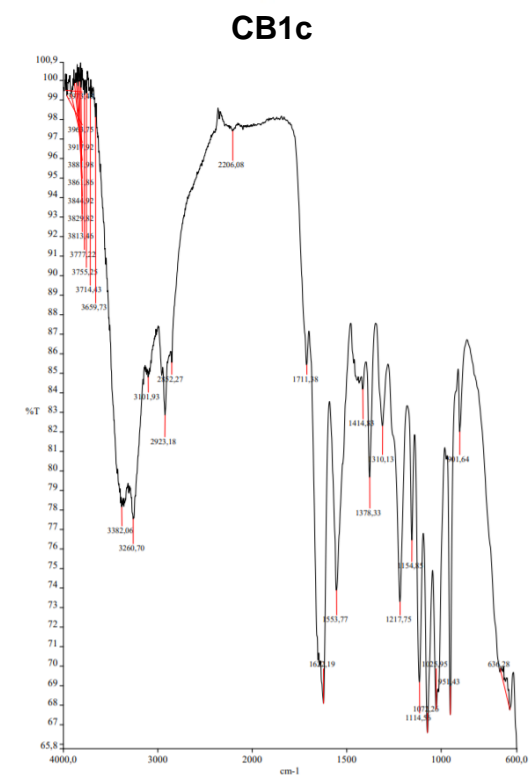
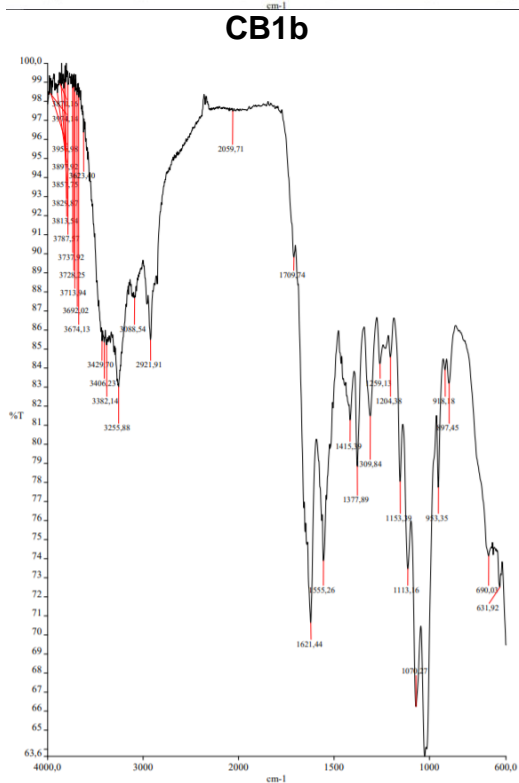
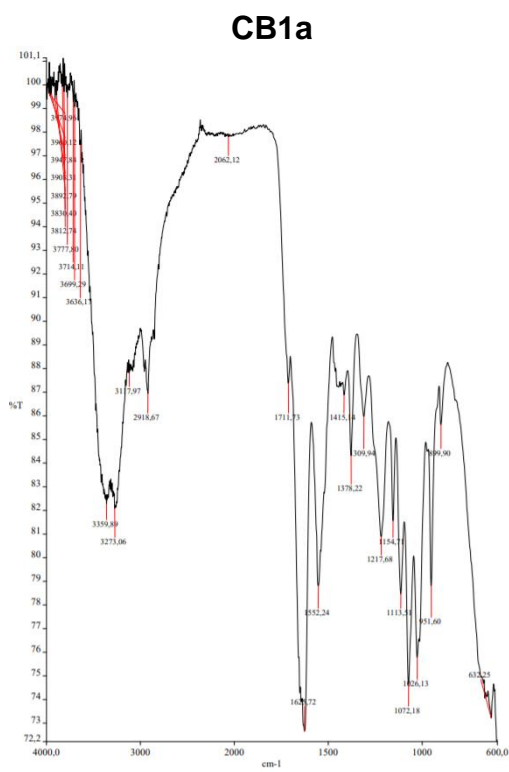
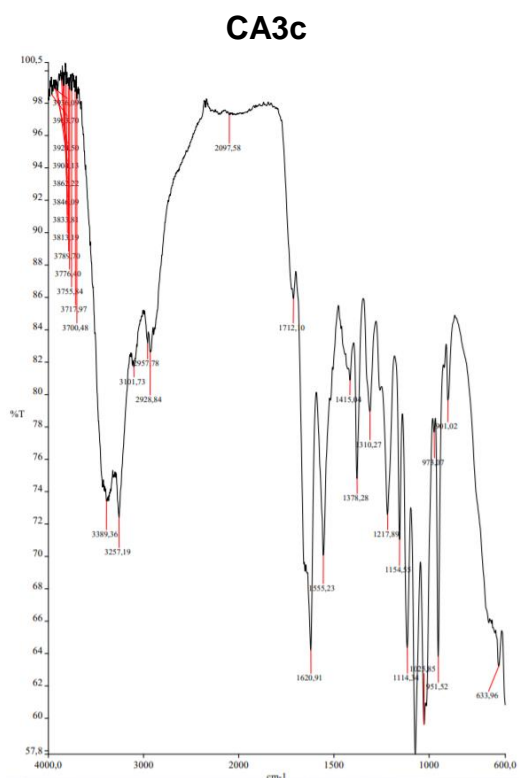
Anexo 2. Peso inicial de las cáscaras de camarón y peso final del quitosano obtenido en el Método 2.

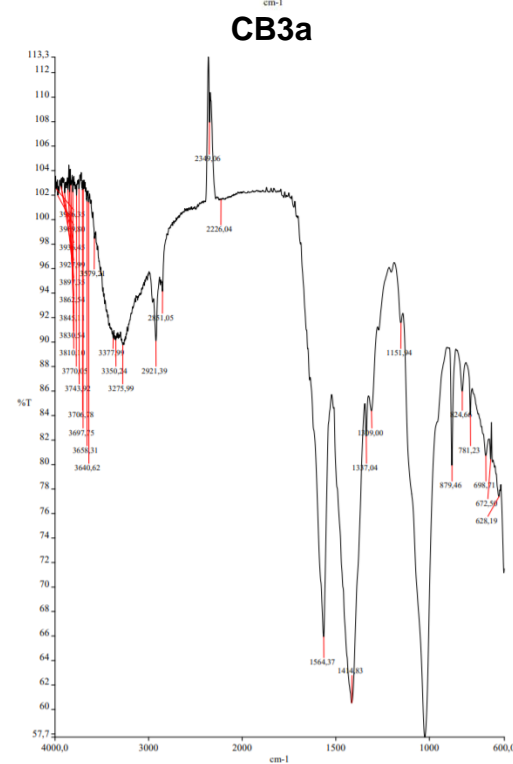
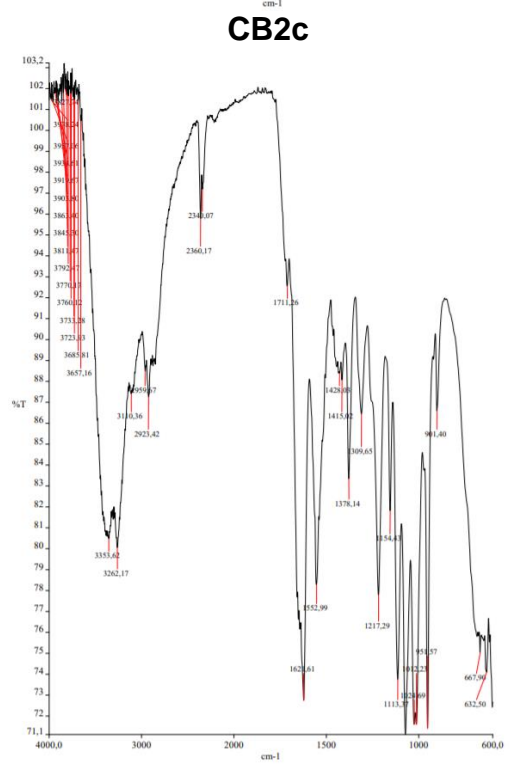
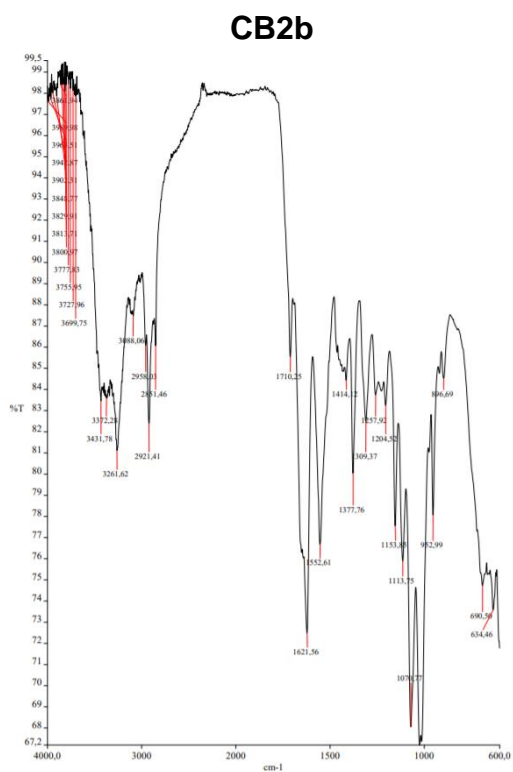
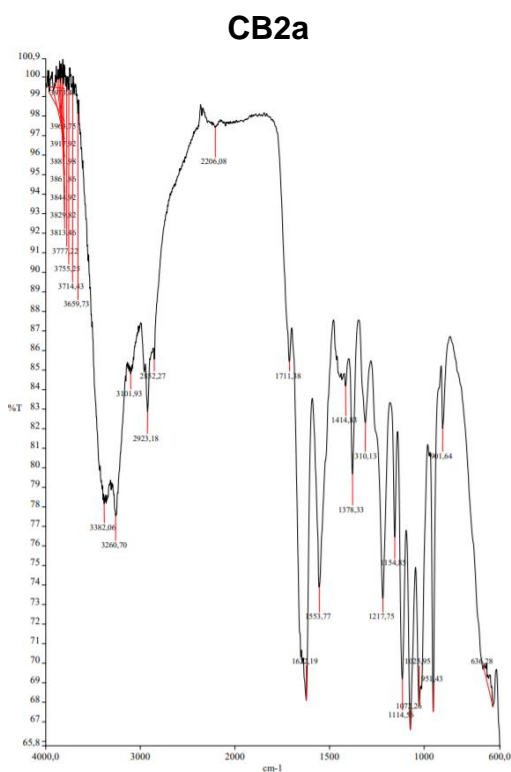
MUESTRA	Peso teórico quitina (g)	Peso cáscaras (g)	Peso quitosano (g)	% desacetilación
LA1a	6,91	10,06	6,31	91,28
LA1b	6,91	10,09	6,74	97,53
LA1c	6,91	10,07	9,78	141,54
LA2a	6,91	10,03	9,23	133,58
LA2b	6,91	10,01	8,48	122,70
LA2c	6,91	10,11	9,37	135,54
LA3a	6,91	10,03	12,50	180,85
LA3b	6,91	10,08	7,59	109,82
LA3c	6,91	10,06	6,31	91,33
LB1a	6,91	10,07	7,83	113,32
LB1b	6,91	10,02	7,73	111,90
LB1c	6,91	10,01	5,94	85,96
LB2a	6,91	10,08	8,13	117,68
LB2b	6,91	10,05	8,13	117,60
LB2c	6,91	10,01	8,68	125,61
LB3a	6,91	10,01	7,28	105,30
LB3b	6,91	10,00	6,46	93,50
LB3c	6,91	10,01	5,87	84,97
LC1a	6,91	10,07	5,02	72,66
LC1b	6,91	10,01	6,08	87,94
LC1c	6,91	10,01	5,30	76,65
LC2a	6,91	10,00	7,52	108,78
LC2b	6,91	10,00	6,35	91,96
LC2c	6,91	10,03	6,60	95,50
LC3a	6,91	10,01	9,16	132,59
LC3b	6,91	10,07	8,29	120,03
LC3c	6,91	10,03	10,00	144,73

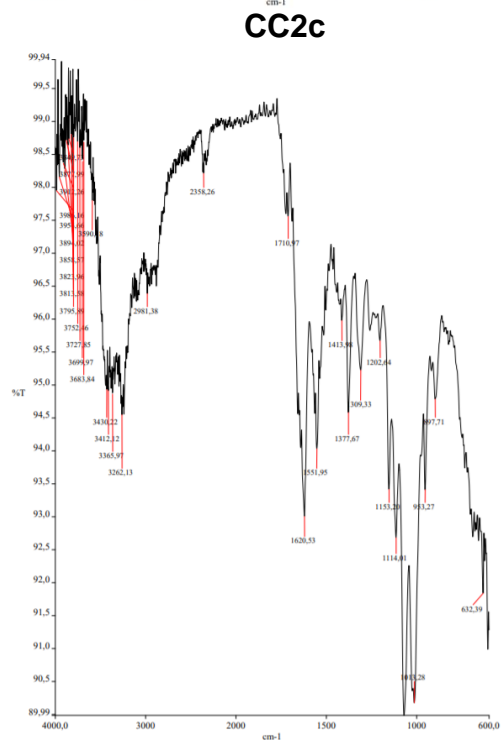
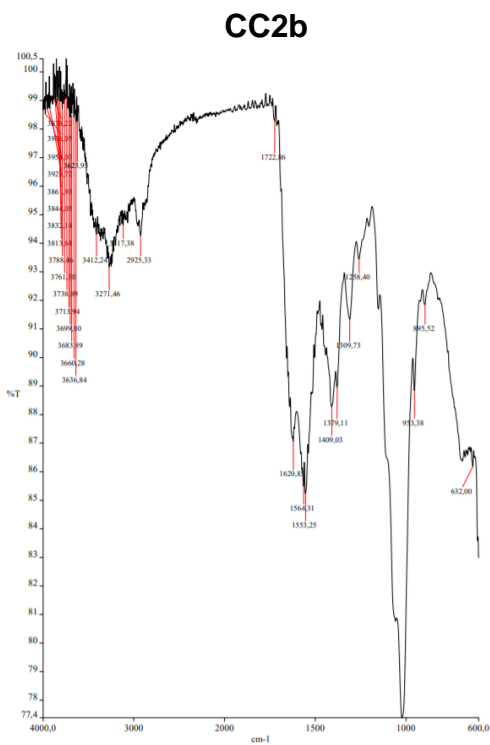
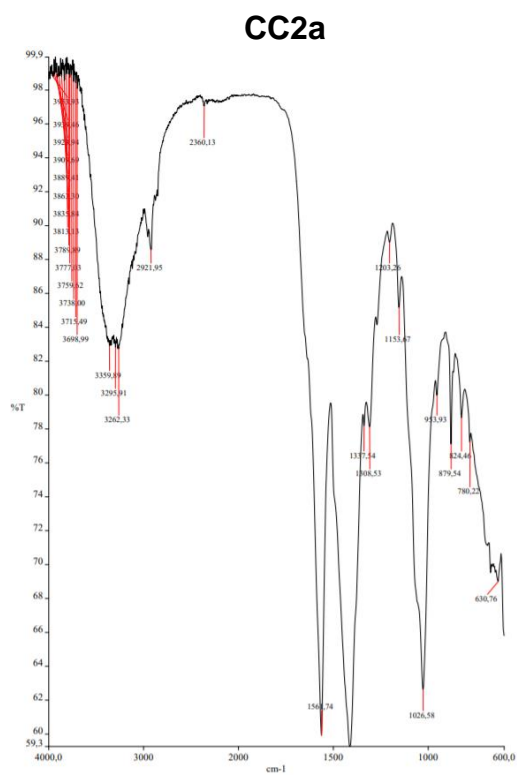
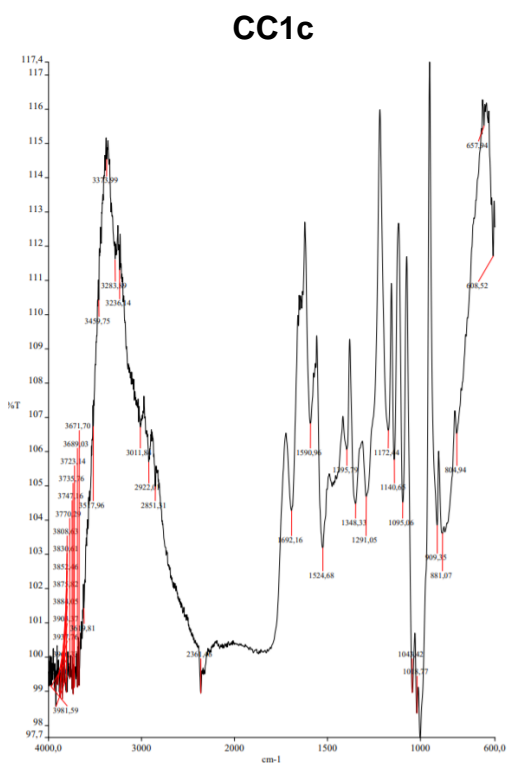
Anexo 3. Espectros infrarrojos de muestras de quitosano experimental extraído por el Método 1.

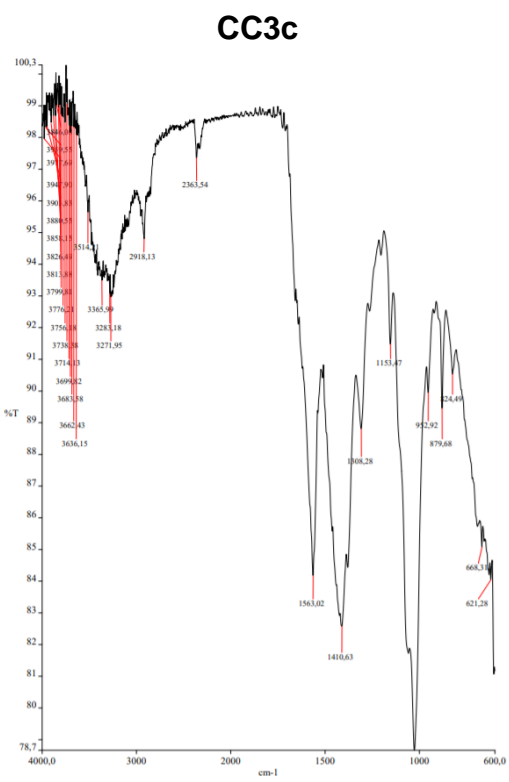
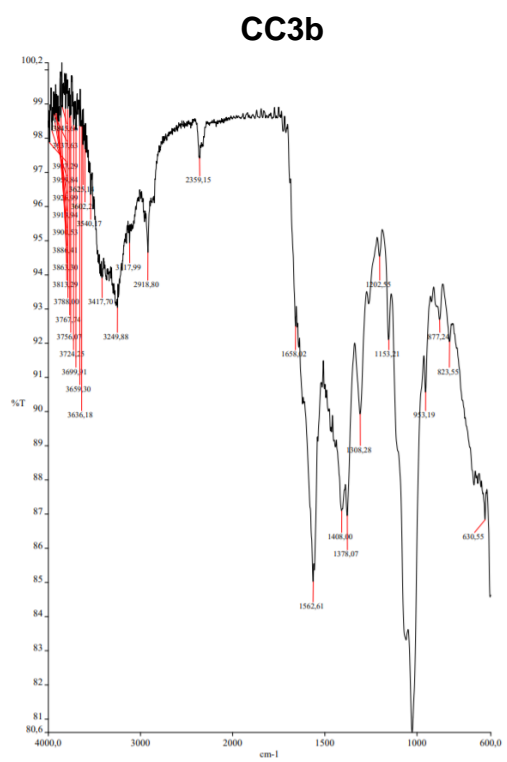
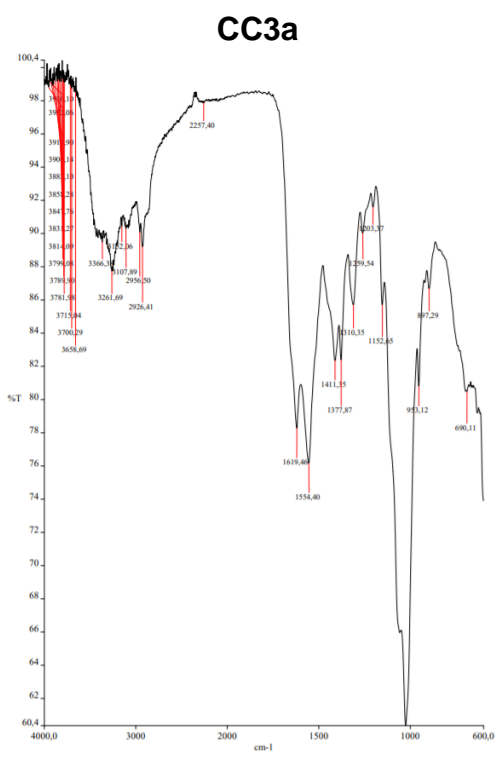




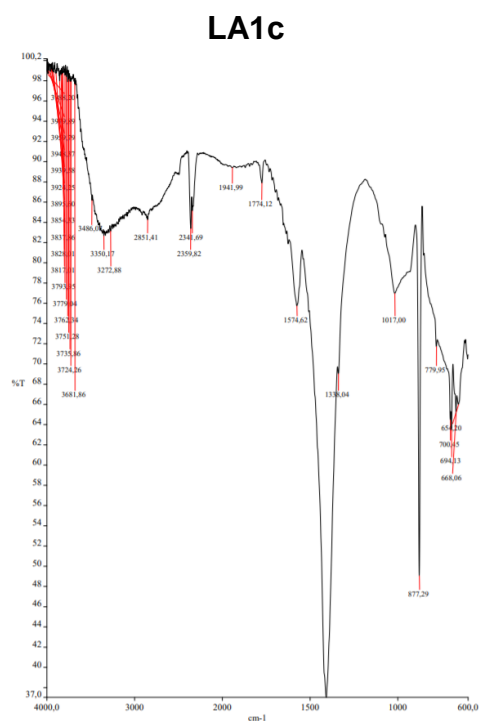
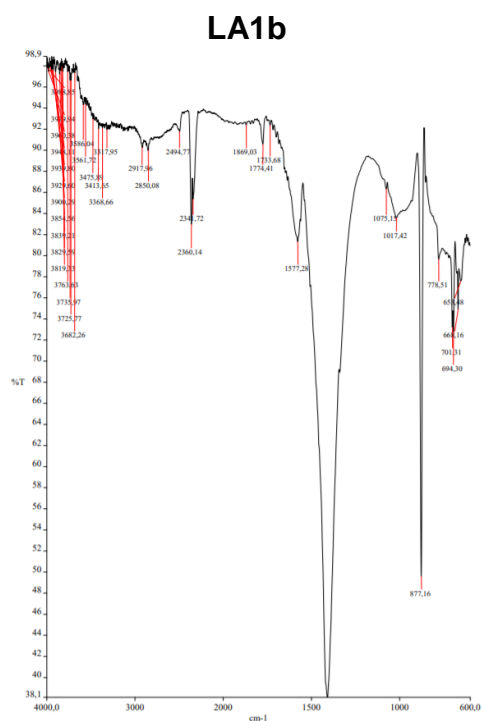
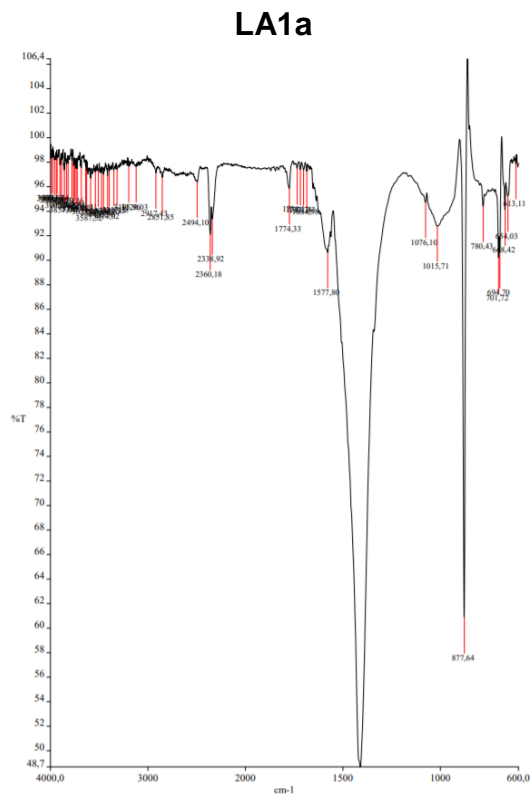


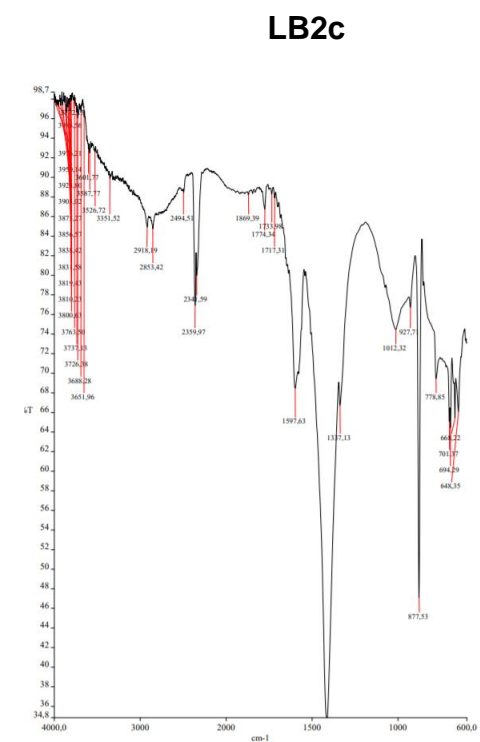
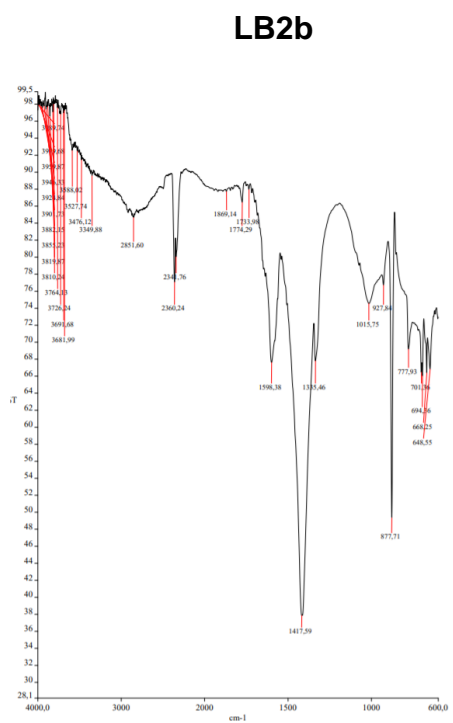
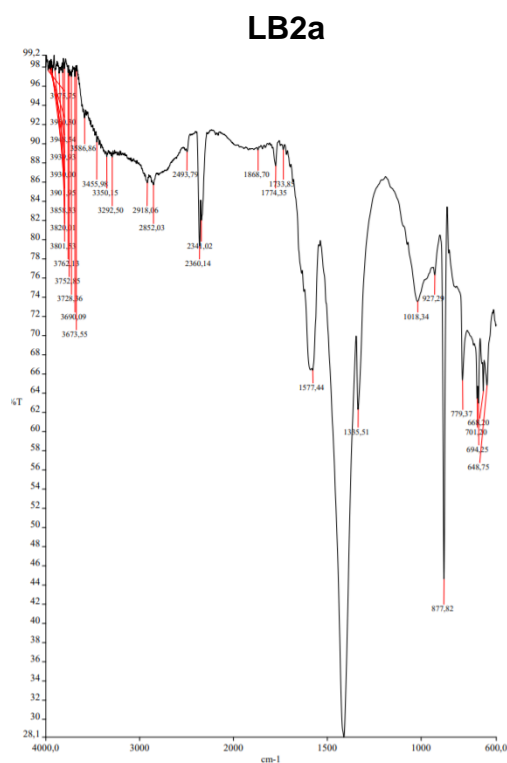
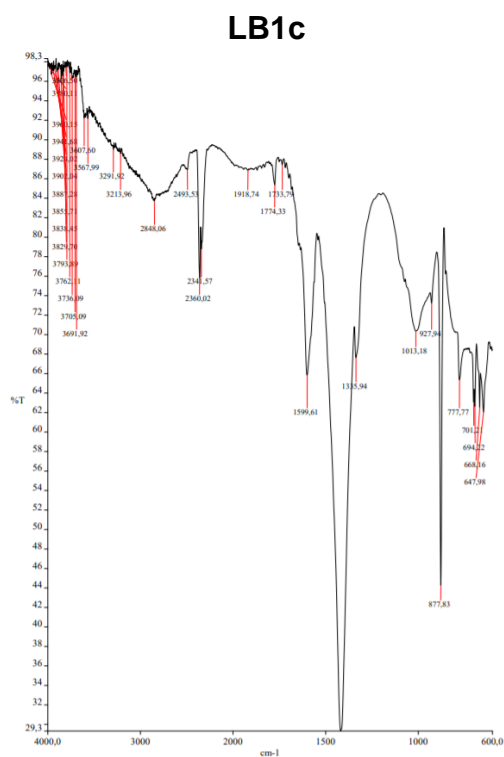


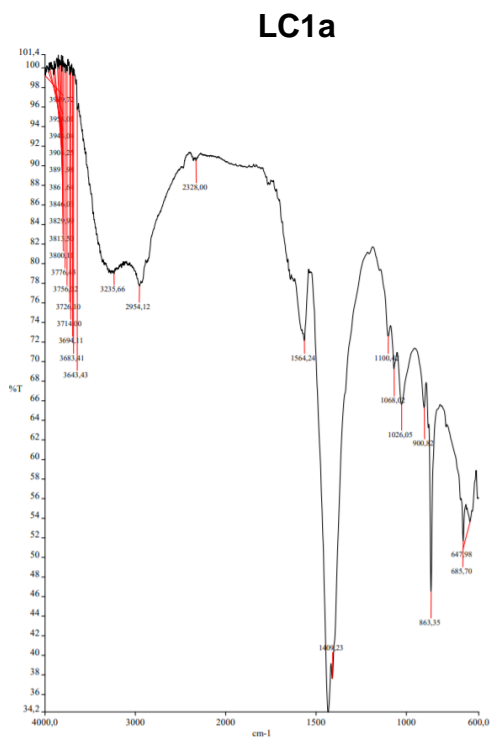
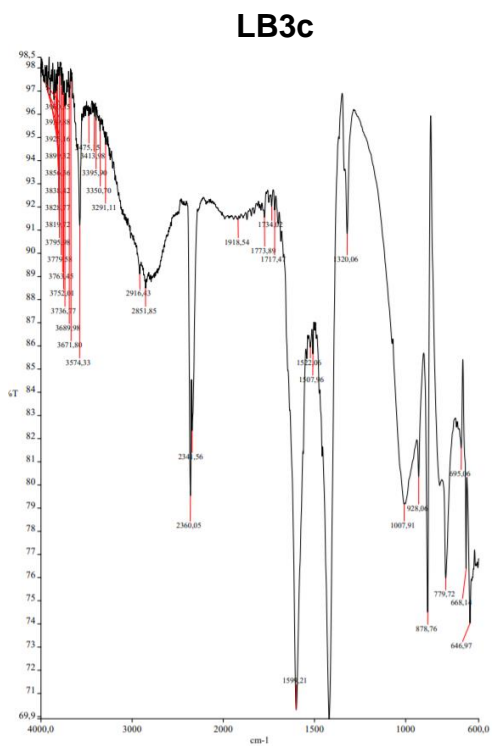
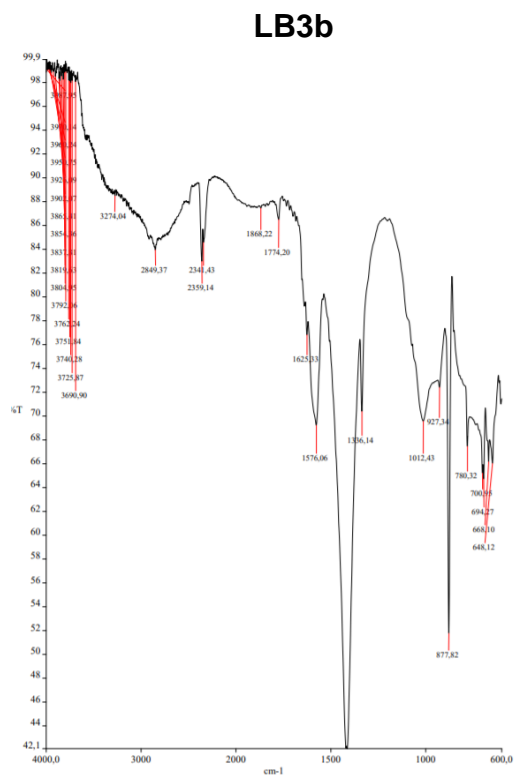
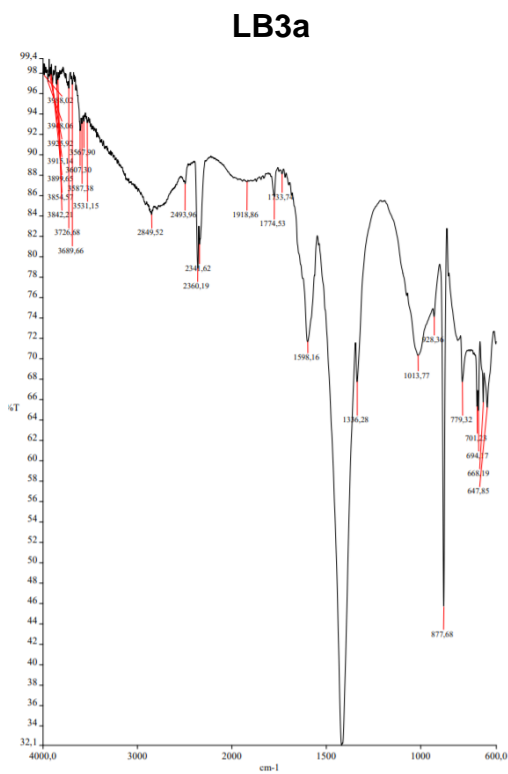


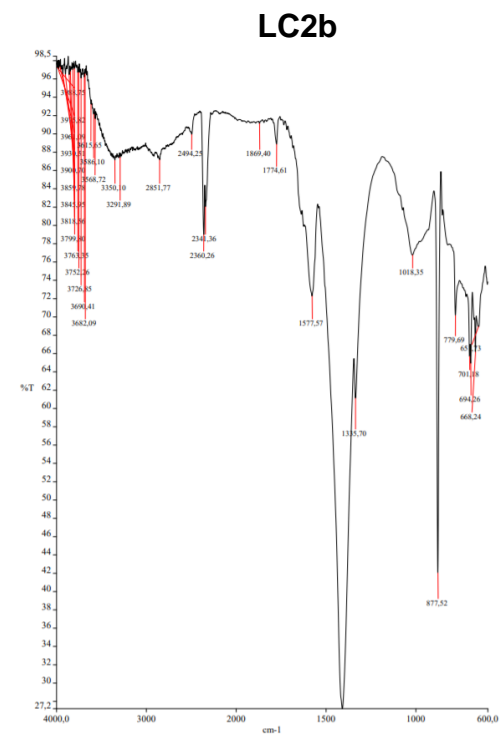
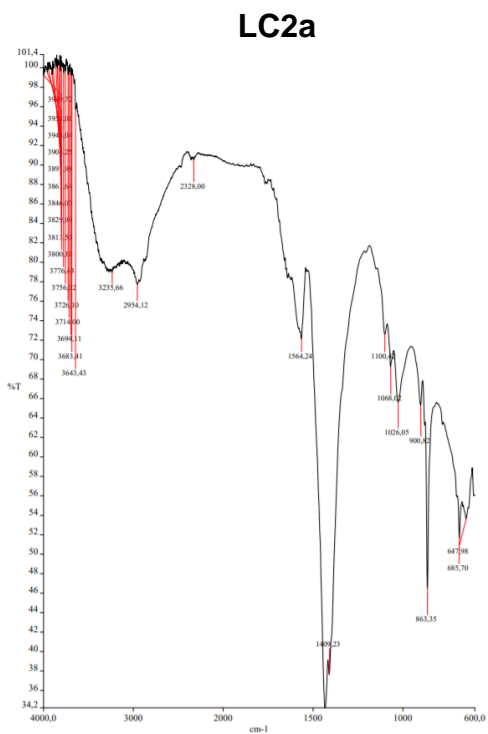
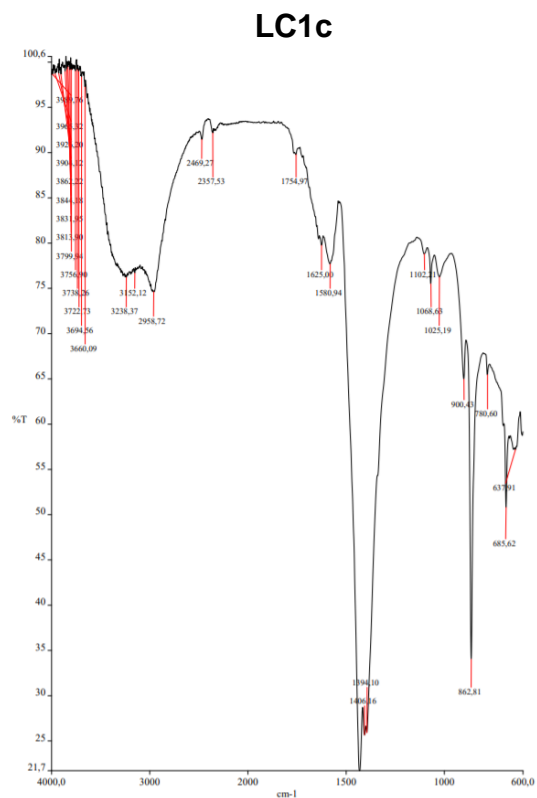
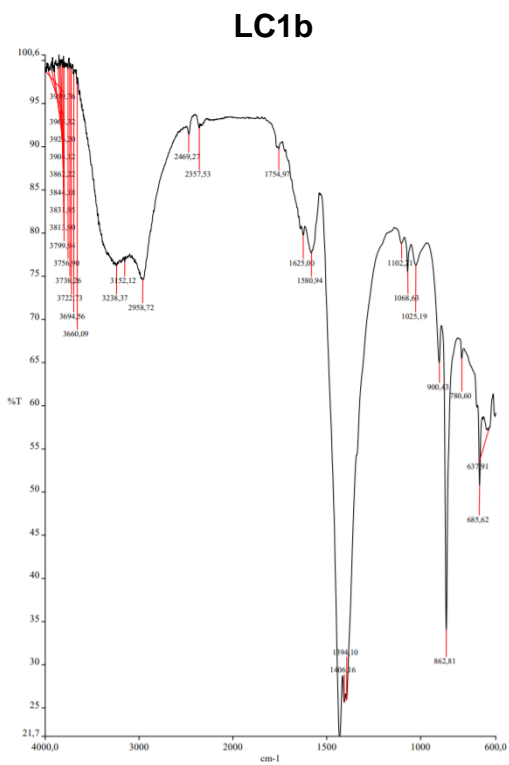


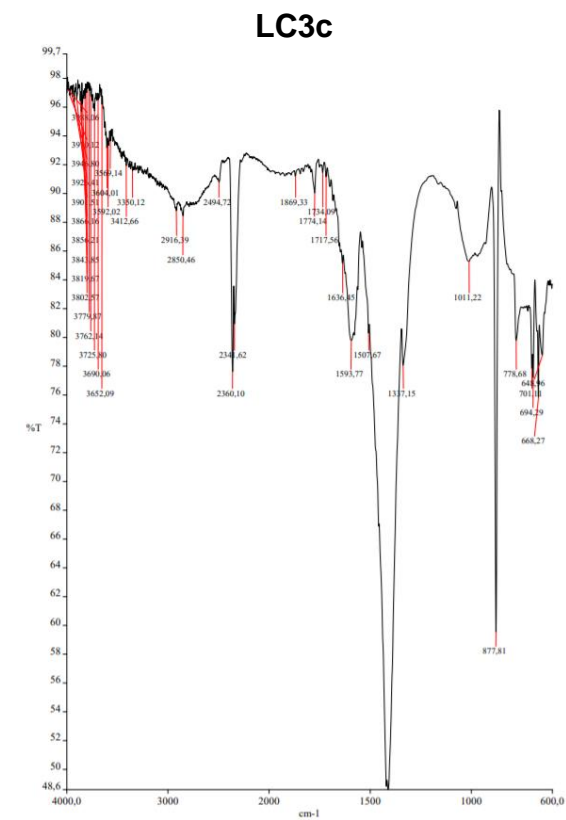
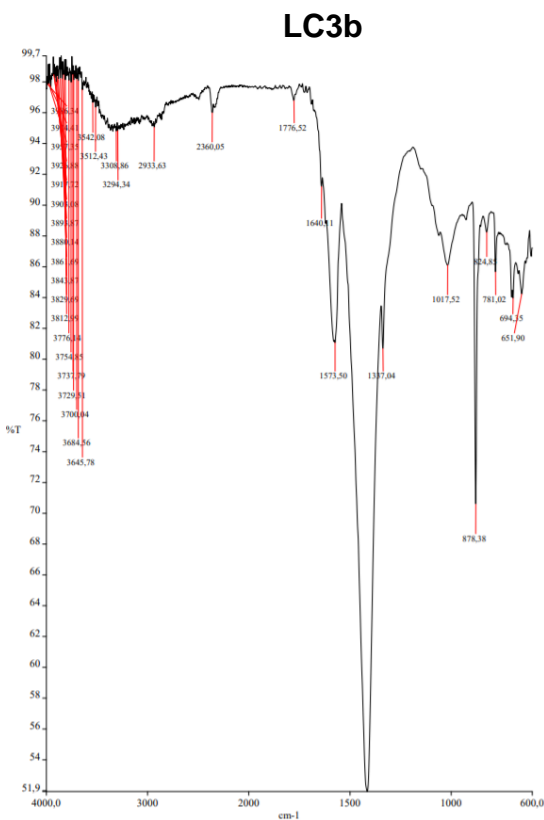
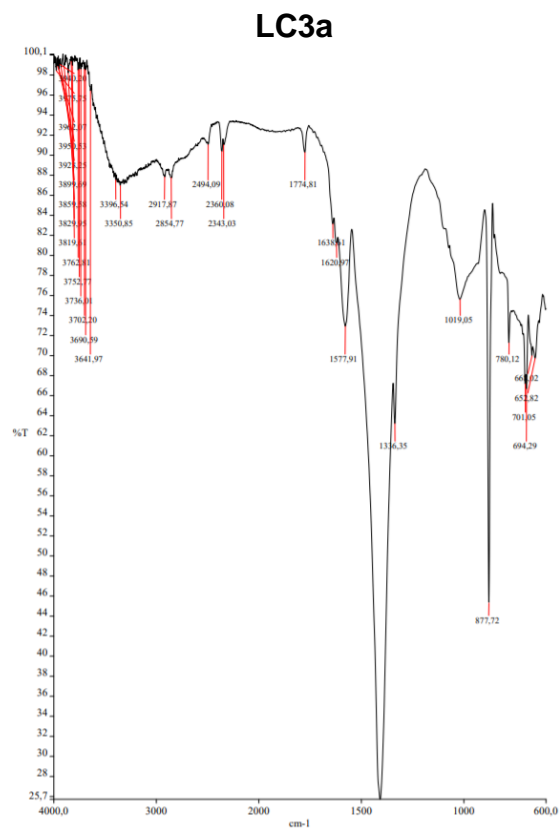
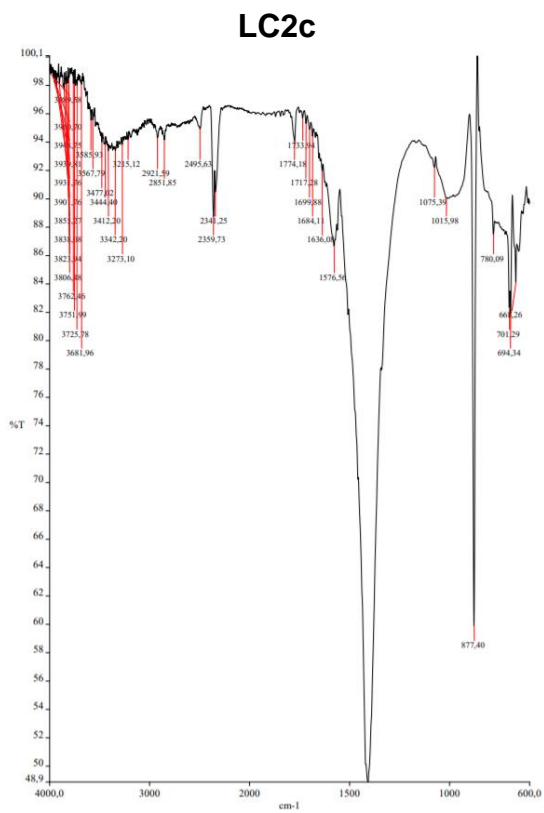
Anexo 4. Espectros infrarrojos de muestras de quitosano experimental extraído mediante el Método 2.











PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR DECLARACIÓN Y
AUTORIZACIÓN

Yo, Emily Josefa Arias De Prada, C.I. 1717526402, autora del trabajo de graduación titulado: "Optimización de la extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón para la elaboración de membranas empleando la técnica de electrospinning", previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 15 de enero de 2019

Emily Josefa Arias De Prada
C.I. 1717526402

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR DECLARACIÓN Y
AUTORIZACIÓN

Yo, Emily Josefa Arias De Prada, C.I. 1717526402, autora del trabajo de graduación titulado: "Optimización de la extracción de quitosano procedente de cáscaras de camarón para la elaboración de membranas empleando la técnica de electrospinning", previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 15 de enero de 2019



Emily Josefa Arias De Prada

C.I. 1717526402