



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TEMA:

“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*), UTILIZANDO UN AGENTE REDUCTOR QUÍMICO”

Trabajo de Investigación (Graduación). Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

AUTOR: Liliana Paulina Lalaleo Córdova

Tutor: Dr. Roman Rodríguez.

Ambato – Ecuador

2010

Dr. Román Rodríguez

TUTOR SUGERIDO

CERTIFICA:

Que el presente trabajo investigativo: “DESARROLLO DE UN METODO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARON (*Penaeus vannamei*), UTILIZANDO UN AGENTE REDUCTOR QUIMICO”, desarrollado por la egresada Liliana Paulina Lalaleo Córdova; contempla las orientaciones metodológicas de la Investigación Científica

Que ha sido dirigida en todas sus partes, cumpliendo con las disposiciones por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Por lo expuesto:

Autorizo su presentación ante los organismos competentes para la sustentación del mismo.

Ambato, Abril del 2010.

.....
Dr. Román Rodríguez.

APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Dr. Roman Rodríguez.

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación realizado bajo el tema: “DESARROLLO DE UN METODO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARON (*Penaeus vannamei*), UTILIZANDO UN AGENTE REDUCTOR QUIMICO”, de la egresada Liliana Paulina Lalaleo Córdova; considero que dicho trabajo investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Abril de 2010

.....
Dr. Roman Rodríguez.
TUTOR DE TESIS

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido del Proyecto de Investigación, corresponde exclusivamente a Liliana Paulina Lalaleo Córdova; Dr. Roman Rodríguez, Tutor del Proyecto de Investigación “DESARROLLO DE UN METODO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARON (*Penaeus vannamei*), UTILIZANDO UN AGENTE REDUCTOR QUIMICO”, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Técnica de Ambato.

Liliana Lalaleo

Autor

Dr. Roman Rodríguez

Tutor Proyecto

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Abril de 2010

Para constancia firman:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

A mis padres por su gran amor, comprensión y apoyo a largo de todos estos años y porque sin su ejemplo nunca hubiera llegado hasta aquí.

A mis hermanas Andrea y Diana por darme su apoyo constante.

A mis amigos que siempre estuvieron apoyándome a la distancia.

Agradecimiento

Agradecer es siempre difícil, más aún cuando se tiene tanto que agradecer y tantas personas a quienes decirles Gracias.

A mis padres por su gran amor, comprensión y apoyo a largo de todos estos años.

A mis hermanas Andrea y Diana por hacerme la vida más alegre

Al Dr. Roman Rodríguez por su amistad incondicional y enseñarme lo hermoso de esta carrera. Quien además ha sido el verdadero creador de este trabajo que ahora se consuma.

A Mirari por su invaluable amistad y su apoyo desde el día en el comenzamos este largo trayecto.

A David, por ser mi apoyo sentimental y mi fortaleza todo este tiempo. Y por darme fuerzas para salir hacia adelante en todo momento.

A mis amigas Yoly, Aracelly, Lily, Alejandra, por demostrarme todo este tiempo la verdadera amistad.

Al Ing. Juan De Dios Alvarado, por confiar en mí y hacerme partícipe de este gran reto.

ÍNDICE

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Tema de investigación	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.2.1. Contextualización macro, meso y micro	2
1.2.2. Análisis crítico	4
1.2.3. Prognosis	5
1.2.4. Formulación del problema	6
1.2.5. Preguntas directrices	6
1.2.6. Delimitación	6
1.3. Justificación	7
1.4. Objetivos	8
1.4.1. General	8
1.4.2. Específicos	8

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes investigativos	10
2.2. Fundamentación Filosófica	12
2.3. Fundamentación Legal	13
2.4. Categorías fundamentales	14
Marco conceptual	15
Quitina y Quitosano	15
Métodos de obtención	17
Métodos alternativos	19
Calidad	20
Aplicaciones del Quitosano	28
Proyecciones futuras	29
2.3. Hipótesis	30
2.3.1. Hipótesis de la Investigación	30
2.3.1. Hipótesis Estadística	30
2.3.2.1. Hipótesis Nula	30
2.3.2.2. Hipótesis Alternativa	30

2.4. Señalamiento de variables de la hipótesis	30
--	----

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Enfoque	31
3.2 Modalidad básica de la investigación	31
3.3. Nivel o tipo de investigación	32
3.4. Método y técnicas de investigación	33
3.4.1. Obtención de la Materia Prima	33
3.4.1.1.1. Recepción de la Materia Prima	33
3.4.1.1.2. Secado	33
3.4.1.1.3 Cocción 1	34
3.4.1.1.4. Lavado	34
3.4.1.1.5. Cocción 2	34
3.4.1.1.6. Lavado 2	34
3.4.1.1.7. Desmineralización	34
3.4.1.1.8. Secado	35
3.4.1.1.9. Desacetilación.	35
3.4.1.1.10. Lavado	35
3.4.1.2. Obtención de Quitosano (Método Directo)	37
3.4.1.2.1. Recepción de la Materia Prima	37
3.4.1.2.2. Secado	37
3.4.1.2.3. Desmineralización.	37
3.4.1.2.4. Lavado	37
3.4.1.2.5. Desproteínización	37
3.4.1.2.6. Lavado	38
3.4.1.2.7. Secado	38
3.4.2. Método para Determinar Propiedades Físico Químicas del Quitosano.	40
3.4.2.1. Método para determinar humedad	40
3.4.2.2. Método para determinar cenizas	40
3.4.2.3. Método para determinar el porcentaje de nitrógeno	41
3.4.2.4. Método para determinar peso molecular viscosimétrico	42
3.4.2.5. Método para determinar el índice de blancura	44
3.4.2.6. Método para la determinación del grado de desacetilación	45
3.4.2.6.1. Método por Espectroscopía Infrarrojo	45

3.4.2.6.2. Método por determinación de Nitrógeno	46
3.4.2.6.3. Método por análisis titrimétrico con bromuro de hidrógeno.	46
3.5. Población y muestra	49
3.5.1. Diseño experimental	49
3.5.1.1. Factores y niveles en estudio para el desarrollo de un método para la obtención de quitosano.	49
3.5.1.2. Tratamientos	49
3.6. Operacionalización de variables	50
3.7. Recolección de información	52
3.8. Procesamiento y análisis	52

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados	53
4.1.1. Peso Molecular	53
4.1.2. Humedad	54
4.1.3. Cenizas	55
4.1.4. Color.	56
4.1.5. Nitrógeno	57
4.1.6. Grado de Desacetilación	58
4.1.6.1 Método por determinación del porcentaje de nitrógeno.	59
4.1.6.2. Método por Espectroscopia Infrarrojo	60
4.1.6.2. Método por análisis titrimétrico con bromuro de hidrógeno	61

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	63
5.2. Recomendaciones	65

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos	67
6.2. Antecedentes de la propuesta	70
6.3. Justificación	69
6.4. Objetivos	69
6.5. Análisis de Factibilidad	70
6.6. Fundamentación	71
6.7. Metodología. Modelo Operativo	72
6.8. Administración	75
6.9. Previsión de la Evaluación	76
Bibliografía	77

ANEXOS

ANEXO	A	TABLAS DE RESULTADOS
ANEXO	B	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
ANEXO	C	GRÁFICAS
ANEXO	D	DIAGRAMA

ANEXO A

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla A-1. Peso viscosimétrico molecular promedio del quitosano

Tabla A-2. Porcentaje de humedad en el quitosano

Tabla A-3. Porcentaje de cenizas en el quitosano

Tabla A-4. Índice de blancura (Sistema CIELAB)

Tabla A-5. Espectros de color (Adobe Photoshop)

Tabla A-6. Porcentaje de nitrógeno en el quitosano.

Tabla A-7. Grado de desacetilación del quitosano, en base al contenido de nitrógeno.

Tabla A-8. Grado de desacetilación del quitosano, en base al análisis por espectroscopía infrarroja.

Tabla A-9. Grado de Desacetilación del Quitosano, en base al análisis por titulación volumétrica.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tablas del análisis estadístico

Tabla B-1. Análisis de varianza para el peso molecular viscosimétrico promedio en quitosano.

Tabla B-2. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el peso molecular viscosimétrico en quitosano.

Tabla B-3. Análisis de varianza para el porcentaje de humedad en quitosano.

Tabla B-4. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el porcentaje de humedad en quitosano.

Tabla B-5. Análisis de varianza para porcentaje de ceniza en quitosano.

Tabla B-6. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el porcentaje de cenizas en quitosano.

Tabla B-7. Análisis de varianza para índice de blancura en quitosano.

Tabla B-8. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el índice de blancura en quitosano.

Tabla B-9. Análisis de varianza para porcentaje nitrógeno en quitosano.

Tabla B-10. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el porcentaje de nitrógeno en quitosano.

Tabla B-11. Análisis de varianza para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

Tabla B-12. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

Tabla B-13. Análisis de varianza para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

Tabla B-14. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

Gráficos del Análisis Estadístico

Gráfico B-1. Factores principales para el peso molecular viscosimétrico en quitosano.

Gráfico B-2. Interacción de factores para el peso molecular viscosimétrico en quitosano.

Gráfico B-3. Factores principales para el porcentaje de humedad en quitosano.

Gráfico B-4. Interacción de factores para el porcentaje de humedad en quitosano.

Gráfico B-5. Factores principales para el porcentaje de cenizas en quitosano.

Gráfico B-6. Interacción de factores para el porcentaje de cenizas en quitosano.

Gráfico B-7. Factores principales para el índice de blancura en quitosano.

Gráfico B-8. Interacción de factores para el índice de blancura en quitosano.

Gráfico B-9. Factores principales para el porcentaje de nitrógeno en quitosano.

Gráfico B-10. Interacción de factores para el porcentaje de nitrógeno en quitosano.

Gráfico B-11. Factores principales para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

Gráfico B-12. Interacción de factores para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

Gráfico B-13. Factores principales para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

Gráfico B-14. Interacción de factores para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

ANEXO C

GRÁFICAS

Gráfico C-1. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-2. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-3. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-5. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-4. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-6. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-7. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Gráfico C-8. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

ANEXO D

DIAGRAMAS

Diagrama D-1. Obtención de Quitosano

RESUMEN

La obtención de quitosano se la realizó a partir de caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*) procedentes de marisquerías y centros de acopio de la ciudad de Ambato. El presente trabajo de investigación planteó tres factores de estudio: método de obtención, uso de agente reductor y tiempo de desacetilación, a fin de evaluar si estas variables generan un producto con características diferentes a las reportadas bibliográficamente.

Se utilizaron dos métodos de obtención: uno indirecto y uno directo, y para cada uno de ellos se determinó la influencia de dos variables: presencia o usencia del agente reductor (tetrahidruro de boro y sodio, NaBH_4) y tiempo de desacetilación de 2 y 4 horas.

La investigación buscó desarrollar un método alternativo para la obtención de quitosano, el cual emplea un agente reductor, cuya principal función es evitar la oxidación de los grupos funcionales del polímero.

Las características físico - químicas del quitosano fueron analizadas en base a los siguientes parámetros: peso molecular, porcentaje de humedad, contenido de cenizas, índice de blancura, contenido de nitrógeno y grado de desacetilación.

En base a los análisis estadísticos, los mejores resultados indican un peso molecular de 8.31×10^5 g/mol, 10.39 % de humedad, 0.12 % de contenido de cenizas, 81.69/100 de índice de blancura, 8.44 % de nitrógeno, un grado de desacetilación del 85.91 % calculado en base al contenido de nitrógeno y un grado de desacetilación del 74.24 % en base al análisis por espectroscopia infrarroja, donde todos los parámetros reportados corresponden a tratamientos con el uso del agente reductor. En contraste, sin agente reductor, se obtuvo como mejor resultado un peso molecular de 6.91×10^5 g/mol, 10.72 % de humedad, 0.11 % de contenido de cenizas, 90.55/100 de índice de blancura, 8.44 % de nitrógeno, un grado de desacetilación del 85.05 % calculado en base

a contenido de nitrógeno y un grado de desacetilación del 73.72 % en base al análisis por espectroscopia infrarroja.

Los resultados globales indican que el método directo con un tiempo de desacetilación de 4 horas, independiente de la presencia de agente reductor, permite obtener un quitosano de mejores características físico- químicas, por lo que no se justifica el empleo de Tetrahidruro de Boro y Sodio como agente reductor en el proceso de obtención de quitosano.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Tema de investigación

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*), UTILIZANDO UN AGENTE REDUCTOR QUIMICO.

1.2. Planteamiento del problema

El quitosano es un polímero natural modificado que se obtiene a través de la desacetilación de la quitina, el componente principal de los caparazones de crustáceos tales como langosta, camarón y cangrejo [1]. Este polímero presenta la propiedad de formar películas, es biocompatible, no antigénico, no tóxico y biofuncional. La seguridad biológica del quitosano ha sido demostrada en experimentos nutricionales con animales domésticos, lo que genera especial interés por sus aplicaciones comerciales en varios sectores industriales [2].

En la industria agrícola es empleado en el recubrimiento de semillas para incrementar el tiempo de germinación y proveer resistencia contra patógenos de plantas. Por otro lado el quitosano es usado en la industria química en el tratamiento de aguas residuales, ya que tiene la capacidad de atrapar metales pesados y proteínas. También es utilizado en medicina para la preparación de implantes de piel [3]. El quitosano tiene importancia relevante en la industria alimenticia debido a sus propiedades funcionales y

actividad antimicrobiana frente a hongos, levaduras y bacterias, lo que permite su uso como conservante alimenticio [4].

En la actualidad, existe la necesidad de establecer métodos analíticos fiables y económicos en lo relacionado a la determinación del peso molecular y grado de desacetilación, como parámetros de control de calidad adecuado en la producción de quitosano. La obtención de este polímero involucra varios procesos químicos como desproteización, desmineralización, decoloración y desacetilación, y por tanto, las características físico-químicas del quitosano pueden ser enormemente afectadas por el método de obtención y por la materia prima empleada para este efecto.

Bajo este criterio, el estudio de nuevos métodos de obtención de quitosano y su posterior caracterización físico-química es de gran importancia para conocer la mejora en las características del producto, las mismas que se puedan traducir en un alto rendimiento a nivel industrial.

1.2.1. Contextualización macro, meso y micro

Los países en vías de desarrollo proveen el 90 % del camarón consumido en los países desarrollados. Esto genera cerca de 8 mil millones de dólares al año y esta industria se considera una importante fuente de empleo, elemento básico para el desarrollo económico. En Ecuador, la industria camaronera se inicia en la década de los años sesenta, cuando un grupo de capitalistas empezaron a explotar las pampas salinas o salitrales [5].

La ubicación geográfica del Ecuador le permite contar con climas amables y grandes extensiones territoriales apropiadas para el desarrollo de estos cultivos. Actualmente, este sector ha crecido a expensas de los bosques de manglar, apoyada por todo tipo de subsidios y créditos. Ecuador ha sido la principal fuente de abastecimiento de camarón para países como

Estados Unidos y la Unión Europea, ubicándose entre uno de los negocios más rentables del mundo [6].

La principal característica de los efluentes de la industria camaronera es su alto contenido de materia orgánica, debida a la presencia de desechos tales como camarones enteros que caen al piso, cabezas y sobre todo, caparazones resultantes de las prácticas operativas de producción en las procesadoras. Normalmente contienen una gran carga orgánica que incluye pequeños restos de carne de camarón, proteínas solubles y carbohidratos. Cuando estas sustancias entran al drenaje se convierten en contaminantes y tienen que ser removidos antes de que el agua se pueda descargar. Los niveles de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) pueden llegar a alcanzar los 100 mg/l o incluso más y los niveles de sólidos suspendidos totales (SST) alcanzan los 100 ppm o más [7].

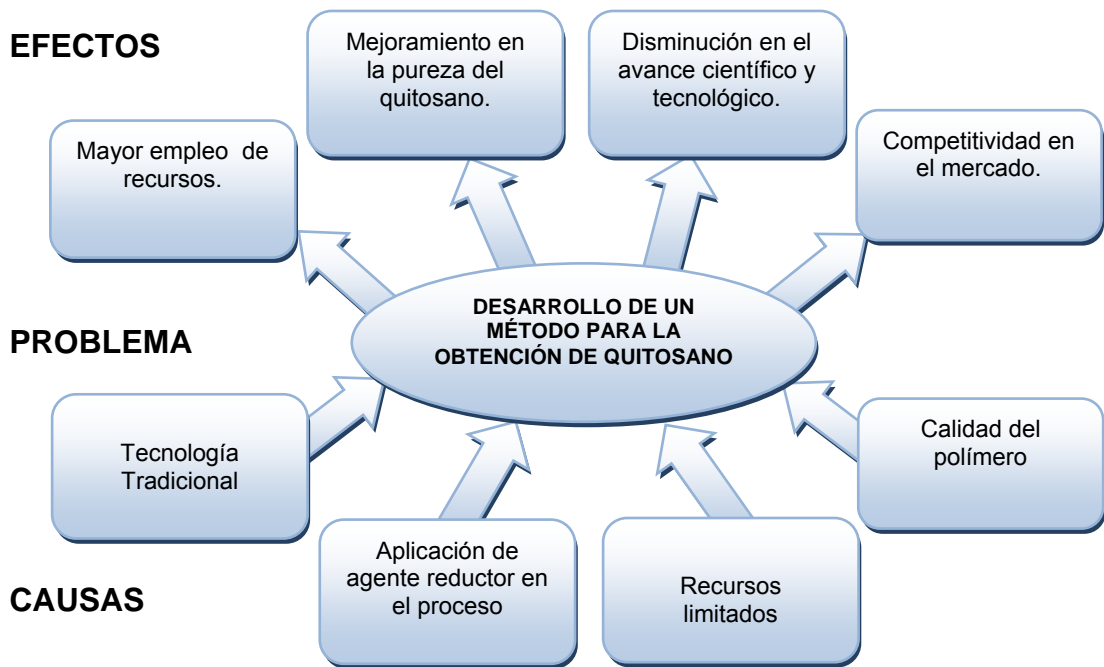
La mayoría de las empresas procesadoras de camarón envían los desechos de camarón al relleno sanitario, obviando la posibilidad de la implementación de producción más limpia en este sector industrial. Actualmente, la industria camaronera no debería hacer caso omiso de las tendencias mundiales en cuanto a la incorporación de la normativa ISO 14000, la cual promueve objetivos ambientales de alto valor para la sociedad tales como "mantener la prevención de la contaminación y la protección del ambiente en equilibrio con las necesidades socioeconómicas".

Aprovechar cuidadosamente nuestros inapreciables recursos naturales y prevenir la contaminación, minimizando los impactos ambientales negativos, es el principal objetivo de la norma ISO 14000. Sin embargo, conviene tener presente que la prevención de la contaminación en las organizaciones incluye el uso de procedimientos, productos y materiales que eviten o reduzcan la polución, sean susceptibles al reciclado, constituyéndose en un eficiente manejo de los recursos. Atendiendo a la Norma ISO 14001, se entiende por organización a toda compañía, firma, empresa, autoridad o institución, pública o privada, que tiene sus propias funciones y administración [8].

Actualmente se ha impulsado la posibilidad de utilización de los desechos generados por el sector camaronero, lo que ha evidenciado que se pueden desarrollar diversos productos con valor agregado y con mercados potenciales a escala comercial. Tal es el caso del quitosano, cuyas características han hecho de este polímero uno de los materiales más versátiles en estudio, especialmente por la variedad de modificaciones a las que puede ser sometido: reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, preparación de películas entrecruzadas, etc., las que permiten obtener materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc. [9,10].

Sin embargo, los métodos de obtención para este polímero, ya sean por vía química o microbiológica, influyen sobre las características del polímero, en especial sobre la solubilidad y la actividad antimicrobiana, por lo que se deberá tener en cuenta el método de obtención empleado [11].

1.2.2. Análisis crítico



Árbol de Problemas
Elaborado por: Liliana Lalaleo.

Relación causa – efecto

Causa:

Aplicación de agente reductor en el proceso.

Efecto:

Mejoramiento en la pureza del quitosano.

La quitina y el quitosano son polímeros producidos comercialmente en India, Japón, Polonia, Noruega y Australia. El precio del quitosano en pequeñas cantidades es de 7,5 USD por 10 g [12]. Actualmente en el Ecuador se debería potencializar la producción de quitosano para diversos fines en el sector industrial, pero será necesario determinar las características con las que cuenta el producto, ya que la materia prima y sobre todo el proceso de obtención, pueden ser determinantes en las características físico-químicas del quitosano.

Esta investigación trata de desarrollar un método alternativo para la obtención de quitosano, empleando un agente reductor, cuya función será la de evitar la oxidación de grupos funcionales del polímero y desplazar la reacción química hacia la formación de productos, es decir, favorecer el proceso de desacetilación de la quitina. La adición de un agente reductor influirá en las características físico- químicas del quitosano, lo cual constituirá un gran avance si se comprueba que la adición de dicho agente proporciona cambios positivos en el producto final, mejorando la calidad de este.

1.2.3. Prognosis

El presente estudio constituiría una variante de investigación aplicada para el desarrollo de un método alternativo en la obtención de quitosano, ya que una falta de atención en la mejora de las metodologías empleadas

actualmente provocaría un estancamiento en la innovación tecnológica para la obtención de quitosano. Además, la evaluación de la calidad del biopolímero a través de la valoración de sus características físico-químicas permitirá evitar pérdida de recursos a nivel industrial y optimizar sus aplicaciones.

1.2.4. Formulación del problema

¿La aplicación de un agente reductor mejorará las características físico-químicas del quitosano, permitiendo el desarrollo de un método alternativo en el proceso de obtención?

1.2.5. Preguntas directrices

- ∫ ¿Cómo afecta el proceso de obtención en la calidad del quitosano?
- ∫ ¿Que técnicas y métodos analíticos son fiables y económicos para la caracterización del quitosano?
- ∫ ¿Está directamente relacionado el grado de desacetilación con la calidad del quitosano?.
- ∫ ¿Las características físico-químicas del quitosano permitirán establecer la calidad del polímero obtenido en el proceso?

1.2.6. Delimitación

Área:	Investigación Aplicada
Sub-área:	Marina
Sector:	Camarón
Sub-sector:	Quitosano
Situación geográfica:	Ambato
Espacial:	Julio del 2009 – Febrero 2010

1.3. Justificación

La gran cantidad de desechos generados en el sector industrial ha despertado el interés por lograr atenuar la contaminación, específicamente mediante el tratamiento de residuos que permitan la obtención de nuevos productos con bajo costo de inversión. Una de las principales actividades comerciales en Ecuador es la industria camaronesa, que produce una gran cantidad de desechos que corresponden principalmente al caparazón, el mismo que al momento tiene escasa utilidad.

En la actualidad se investigan métodos más eficientes para producir quitosano a partir de la quitina, con variaciones en la metodologías desarrolladas para la obtención, tales como la aplicación de agentes reductores, con el fin de obtener diversos grados de desacetilación y diferente distribución de los grupos acetilo, lo que influye directamente en la solubilidad, actividad antimicrobiana y otras propiedades físico-químicas del quitosano.

La importancia del presente estudio radica en el desarrollo de un método alternativo para la obtención de quitosano a partir del caparazón del camarón, a fin de obtener un producto con mejores características físico-químicas, dando paso al uso potencial de este polímero al generar un valor agregado sobre una materia prima que normalmente es desechada.

Adicionalmente, su uso como material de consumo en diferentes fines del sector industrial permitiría reducir costos, lo que se refleja en ahorro de tiempo y dinero, además un aspecto que es muy importante de considerar es que también contribuirá a reducir la contaminación ambiental, ya que un biopolímero como el quitosano tiene características de biodegradabilidad importantes para el medio ambiente.

La simplificación en la producción de quitosano, ya sea por medio de la eliminación de la etapa de desproteínización o desmineralización, así

como el empleo de agentes reductores que aseguren una mejor calidad del polímero, reduciría considerablemente los costos de producción, debido al uso de menor cantidad de reactivos químicos, menor tiempo de procesamiento y menor descarga de residuos [13].

Finalmente, la obtención de quitosano por esta vía generará un gran aporte a la conservación ambiental, debido a la reducción de desechos que comúnmente son cargados a los efluentes y por consiguiente la carga orgánica del mismo. Esto constituye al quitosano en una excelente alternativa de producción debido a su gama extensa de aplicaciones, por lo que se podrá pensar en la producción de este polímero a nivel industrial a partir de métodos alternativos que aseguren una buena calidad y línea de proceso, generando mercados potenciales.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Desarrollar un método alternativo para la obtención de quitosano a partir de caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*).

1.4.2. Específicos

- Obtener quitosano a partir de caparazones de camarón utilizando tetrahidruro de boro y sodio como agente químico reductor.
- Establecer el porcentaje de humedad del quitosano
- Determinar el grado de desmineralización del quitosano a través del contenido de cenizas.
- Determinar el grado de desacetilación del quitosano por medio de espectroscopia molecular infrarroja, contenido de nitrógeno y titulación volumétrica.

- Establecer el peso molecular del quitosano por medio de viscosimetría capilar.
- Determinar el índice de blancura del quitosano a partir del sistema colorimétrico CIELAB.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes investigativos

En los últimos años, el uso masivo de materiales no degradables es causa de preocupación creciente en lo que se refiere a su depósito en el planeta, si bien es cierto que estos materiales en su gran mayoría no son tóxicos por si mismos, pueden convertirse en una problemática para el medio ambiente por efectos de acumulación.

En este sentido, la balanza se ha ido inclinando cada vez más por el uso de materiales ya existentes en la naturaleza, o por la modificación físico-química de estos, con el propósito de lograr su reconocimiento por los principales agentes degradantes naturales. Entre los materiales naturales más usados en la actualidad, una pareja de polisacáridos que ha tomado mucho auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado encontrárseles, y especialmente por su poco impacto ambiental, han sido la quitina y el quitosano [14].

La quitina es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza después de la celulosa. Fue descubierta por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos. Posteriormente Odier, en un estudio sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola “quitina” (del griego *tunic*, envoltura).

Rouget en 1859, al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio determinó que se podía obtener un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó “quitosano”. Payen, en 1943, inició una controversia que duró años sobre las diferencias entre la quitina y la celulosa, en parte porque se pensaba que la presencia de nitrógeno reportada en algunas investigaciones se debía a residuos de proteínas que no podían ser completamente eliminados de las muestras. [15]

Los estudios anteriores han establecido los fundamentos básicos para el desarrollo de nuevas investigaciones referentes a este biopolímero. Así se ha llegado a determinar que el quitosano es un derivado desacetilado de la quitina, usualmente obtenido por la reacción con hidróxido de sodio, el cual remueve el radical acetilo, dejando el grupo amino libre. Además, debido a la capacidad de adsorción de especies químicas en su estructura molecular lo hace un polímero soluble en solventes orgánicos, constituyendo el principal factor limitante para ciertas aplicaciones a nivel industrial, mientras que en otras le confiere ciertas ventajas frente a otros polímeros.

Durante los últimos años, la búsqueda de nuevos métodos de obtención de quitosano y su producción a escala industrial con exitosos resultados ha sido uno de los principales objetivos para varios investigadores. Así por ejemplo, se reporta un método directo para la producción de quitosano, eliminando la obtención previa de quitina, el cual consta de una desmineralización directa del caparazón de camarón en un medio ácido y posteriormente se somete al residuo remante a una desacetilación con álcali sin pasar por una etapa de desproteínización [13].

Así también, otro estudio indica que la aplicación de un agente reductor en el proceso de obtención de quitosano actúa como agente protector en contra de la oxidación y la degradación de la cadena polimérica,

reduciendo el aldehído polisacárido en un grupo aditol, el cual mejora considerablemente la pureza del quitosano [16].

El empleo de un agente reductor en el proceso genera grandes expectativas en cuanto a la innovación de métodos alternativos para la obtención de quitosano que mejoren las características fisicoquímicas del biopolímero. Sin embargo se tendrá que tomar en cuenta que los factores como la calidad de la materia prima empleada y el método de obtención establecido son determinantes en la calidad del polímero.

2.2. Fundamentación Filosófica

El enfoque que orienta a la presente investigación se basa en un paradigma Positivista.

El paradigma Positivista lo emplearon por primera vez Abbagnano y Saint Simon alrededor del año 1830, aunque es a Comté a quien pertenece el mérito de haberlo popularizado al conceptualizar el positivismo como un fundamento que debería construir un modelo que incluyera todas las ramas de la ciencia [37].

En 1998, Dobles, Zúñiga y García desarrollaron la teoría que sostiene que el positivismo se fundamenta en afirmar que el conocimiento verdadero es aquel que es producido por la ciencia, mediante un método establecido [37].

Por tanto, las tesis fundamentales asociadas a dicho término son:

- a) la ciencia es el único conocimiento válido
- b) proporciona un conocimiento puramente descriptivo
- e) debe extenderse a todos los campos del saber, incluyendo al hombre.

La ciencia positivista se establece entonces como la posibilidad absoluta de conocer la realidad mediante un procedimiento específico es decir, el único conocimiento auténtico es el conocimiento científico, y tal conocimiento solamente puede surgir de la afirmación positiva de las teorías a través del método científico [38].

2.3. Fundamentación Legal

La presente investigación no se ampara bajo ninguna norma ecuatoriana ni internacional específica para quitosano. Sin embargo, al ser este un biopolímero obtenido a partir de material de desecho de industria camaronera y procesado a escala industrial mediante el empleo de métodos químicos, es importante señalar normativas que aseguren la biodegradabilidad del polímero con el fin de establecer un producto más amigable para el medio ambiente.

Existen normas internacionales que regulan los procesos de degradación y de biodegradación tanto en Estados Unidos como en Europa. Las más conocidas son:

- Estados Unidos:

ASTM D6400-99 “Especificación Standard para los plásticos compostables” que es una norma que establece los requisitos y la norma ASTM D5338-98 “Método de ensayo estándar para la determinación de la degradación aeróbica de los materiales plásticos o biopolímeros en condiciones controladas de compostaje” que es una norma de procedimiento para medir la degradación aeróbica [39].

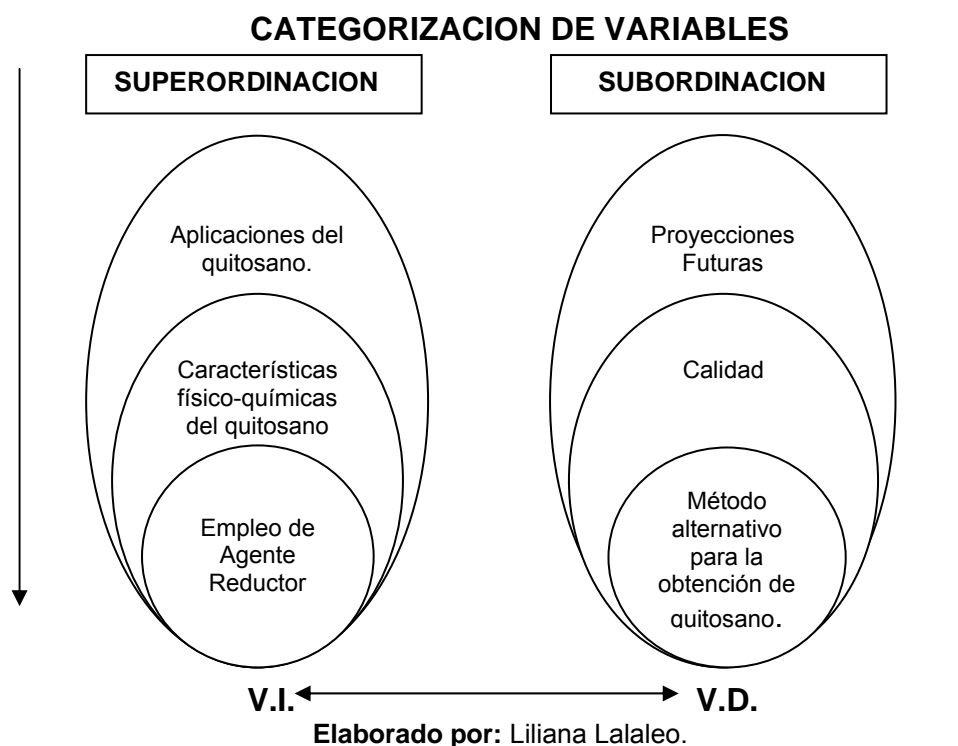
- Europa:

Norma EN 14855 “Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final y desintegración de materiales plásticos en condiciones de compostaje controladas” que es la norma que describe el procedimiento del análisis [39].

Para el caso puntual de Argentina, el IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) conformó la comisión “Materiales Plásticos Biodegradables/Compostables”. Dicha comisión elaboró el Esquema N° 2 de Norma IRAM 29420 cuyo título es: Materiales Plásticos Biodegradables y/o Compostables – Terminología, que actualmente se encuentra en discusión pública. Así mismo se inició la redacción del Esquema N° 1 de la norma IRAM 29421 titulada: Materiales Plásticos Biodegradables y/o Compostables. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación [39].

El objetivo que persiguen estas normas es especificar la biodegradabilidad de los plásticos y los productos fabricados con plásticos o polímeros.

2.4. Categorías fundamentales



MARCO CONCEPTUAL

QUITINA Y QUITOSANO

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido. Este polímero posee las características de ser blanco, duro, inelástico y es la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas cercanas al mar [14]. La quitina al ser tratada mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50% de sus grupos acetilo se convierte en quitosano $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, el cual posee propiedades de tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, entre otras. [16]. Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100%, el polímero se conoce como quitano [15]. Las estructuras químicas de la quitina, quitosano y quitano se muestran en la Figura 1.

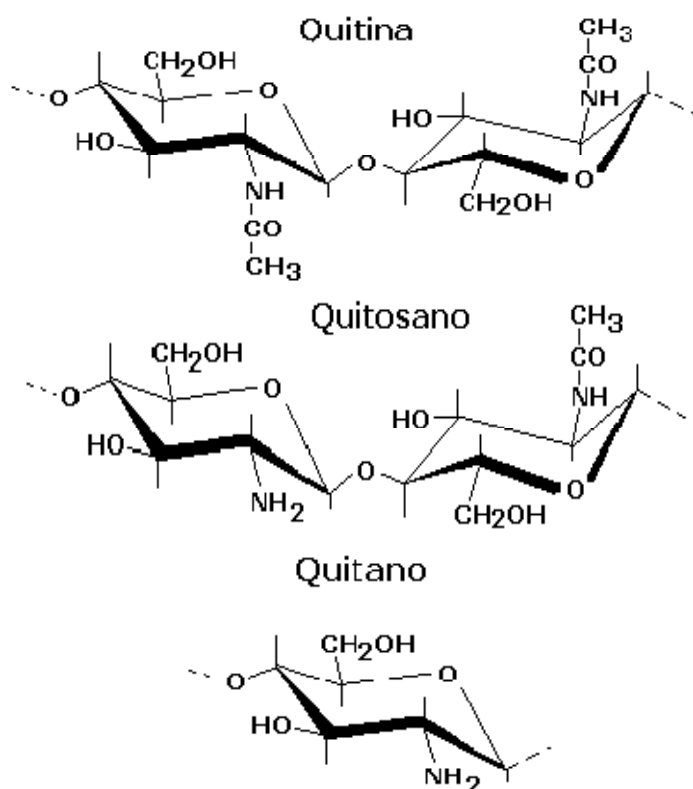


Fig 1. Estructuras químicas de la unidad repetitiva de la quitina, quitosano y quitano.
Fuente: Lárez V. Algunos usos del Quitosano en Sistemas Acuicos. 2007. Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 4(2),91.

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, sus fuentes principales son el exoesqueleto o caparazón de crustáceos, alas de insectos como escarabajos y cucarachas, paredes celulares de algunos hongos, y algas [1]. La producción industrial de este biomaterial se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos tales como camarones, langostas, cangrejos y krill, debido a la facilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras de estas especies. El quitosano se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos, llegando a representar hasta un tercio de su peso [18].

Actualmente la fuente principal de quitosano a nivel industrial lo constituye la quitina, la cual mediante un proceso de desacetilación química o enzimática ha permitido producirlo a gran escala. Desde el punto de vista químico los procesos para obtener quitina y quitosano son relativamente sencillos a los enzimáticos [14]. En la Tabla 1 se presentan algunas fuentes de materia prima para la obtención de quitina y quitosano.

Tabla 1. Principales fuentes de materia prima para la obtención de quitina/quitosano

Origen	Composición Química (%)				
	Humedad	Proteínas	Cenizas	Lípidos	Quitina
Caparazones de jaiba y cangrejo					
• <i>Callinectes sapidus</i>	46.8	7	38.5	0,4	7.3
• <i>Paralithodes camschaticus</i>	50	11	23	0.5	15.5
• <i>Chionectes opilio</i>	---	10.3	57.9	1.35	26.65
Camarón (langostino)					
• <i>Penaeus spp.</i>					
Cabeza	77.04	12.9	5.2	2.06	2.8
Cáscara	65	22.1	9.2	0.5	6.2
Krill					
• <i>Euphasia superba</i>	---	41	23	11.6	24
Langosta					
• <i>Linuparus trigonus</i>	13.5	17	54.7	---	---
• <i>Panulirus argus</i>	11.8	11.0-14.0	55.0	---	10.6
Pluma de Calamar					
• <i>Dosidicus gigans</i> (calamar gigante).	60	24.16	0.4	0.26	18.9
• <i>Loligo spp.</i> (calamar común)	50	32.75	0.25	---	17

Fuente: Peniche C.A. Estudio sobre la quitina y quitosana. 2006.3-15.

MÉTODOS DE OBTENCIÓN

Obtención de quitina

La mayor parte de las técnicas desarrolladas descansan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. Algunos incluyen un paso de decoloración de la quitina extraída, mediante una extracción con solvente o la oxidación de los pigmentos remanentes. Estos métodos utilizan generalmente grandes cantidades de agua y energía, y con frecuencia dan lugar a desechos corrosivos.

En la actualidad se investigan tratamientos enzimáticos como una alternativa promisoriosa. A tal efecto se han reportado procesos que utilizan extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas, pero aún sin la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico. Se menciona la remoción de grupos acetilo a partir de una enzima llamada N-deacetilasa glucosaminoglicano obtenido a partir del microorganismo *Mucor rouxii*, pero tan solo presenta una actividad del 30% [18].

En general, los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos: acondicionamiento de la materia prima, extracción de la proteína (desproteínización), eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización), y decoloración de la quitina obtenida [19].

- **Acondicionamiento de la materia prima**

Consiste en el lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismos. Posteriormente se procede a su molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros.

- **Desproteínización**

El procedimiento más comúnmente utilizado para desproteínizar consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura más bien alta (65-100 °C), con el fin de separar la proteína. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0.5 y 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero.

Los procesos de desproteínización usando extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas se han probado con relativo éxito, pero la alternativa del tratamiento enzimático/microbiológico, además de consumir largo tiempo, suele dejar de 1-7% de proteína residual.

- **Desmineralización**

El principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el CaCO_3 , el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta 10%) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos (HNO_3 , HCOOH , H_2SO_4 , y CH_3COOH). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas altas, que provocan la degradación del polímero. Un tratamiento alternativo para disminuir la degradación consiste en el empleo del agente complejante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

- **Decoloración**

La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como la

astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β -caroteno. Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes [9].

También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H_2O_2 (0.5-3%) y el NaClO (0.32%), aunque debe tenerse presente que éstos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero [17].

Obtención de quitosano

La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (40-50%) a temperaturas superiores a 100°C, preferiblemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras como el $NaBH_4$ o el Tiofenol para evitar la despolimerización [14].

Las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de partida, el tratamiento previo y el grado de desacetilación deseado. No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo grado de desacetilación alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85%. Tratamientos prolongados suelen provocar la degradación del polímero sin traducirse en un aumento sensible del grado de desacetilación [20].

MÉTODOS ALTERNATIVOS

En la actualidad se exploran otros métodos más novedosos para desacetilar la quitina que hacen uso de la radiación con microondas o de

tratamientos termo-mecánicos, entre otros. Sin embargo, la adición de un agente reductor es uno de los métodos más sencillos para este efecto y con alentadores resultados, ya que evita la despolimerización del polímero. [21]. Entre los más empleados están el Tetrahidruro de Boro y Sodio (NaBH_4) y Tiofenol [20].

CALIDAD

La calidad se refiere al muestreo, especificaciones y ensayos, así como a la organización, documentación y procedimientos de aprobación que garanticen la realización de los ensayos pertinentes y necesarios. Los materiales empleados, el proceso de producción en sí y los productos finales para su venta o distribución serán aprobados una vez que su calidad haya sido considerada satisfactoria.

La calidad del quitosano obtenido a partir de cualquier procedimiento empleado está basado en la pureza que presenta el polímero mediante la valoración de las características físico-químicas; por ello, es de suma importancia emplear métodos fiables de análisis para este efecto. Los métodos analíticos deberán estar validados, ya que las operaciones de control descritas en la autorización de comercialización deberán realizarse con arreglo a los métodos aprobados y los resultados obtenidos se registrarán y comprobarán para asegurar que son coherentes entre sí [22]. Esto determinará si la metodología establecida es la adecuada.

Las casas comerciales presentan las siguientes especificaciones para el quitosano comercial:

Tabla N.2. Especificaciones comerciales del quitosano.

CARACTERÍSTICA	Peakchem	Dalwoo	Wellable	Guinama [40]
Color	Blanco amarillento	Blanco amarillento	Blanco opaco	Amarillento o blanco
Humedad	4.52 %	7.5 %	-	-
Ceniza	0.91%	0.1%	-	7.52%

pH				-
Grado de desacetilación	70-100%	90-100%	85-98%	87%
Peso Molecular	-	-	161 n	1.41x10 ⁵ Da.

Fuente: Arancibia y Almeida. Desarrollo de tecnología para la obtención de quitina y quitosano a partir de caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*).2005; www.guinama.com/documentos/quitosano_caracterizado.

Caracterización fisicoquímica del quitosano.

Tanto la composición de las cadenas de este polímero como sus dimensiones suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención, por lo que la determinación del grado de desacetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de estos polisacáridos, ya que ambas tienen una gran incidencia en sus propiedades [19]. Otras características, tales como la polidispersidad de su masa molecular, el contenido de humedad, su solubilidad y el porcentaje de cenizas contribuyen también en la caracterización del polímero [18].

- **Determinación del grado de desacetilación**

Normalmente los estudios de caracterización del quitosano se centran en la determinación de su grado de desacetilación (GDA). Se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación de estos polímeros basados en diversas técnicas, entre las que se pueden mencionar la espectroscopia IR, espectroscopia RMN de protón, la potenciometría y la espectroscopia UV de primera derivada [23]. Otras técnicas alternativas incluyen el análisis elemental, el análisis térmico, la cromatografía de permeación de gel y el dicroísmo circular. Sin embargo uno de los métodos más utilizados es la valoración titulométrica de los grupos aminos, para lo cual se pueden utilizar distintas formas de determinación del punto final [15].

- **Espectroscopia IR**

Por su simplicidad, el método más empleado en la actualidad es el que hace uso de la espectroscopía infrarroja. Las muestras se pueden preparar para su análisis en forma de películas, que se obtienen esparciendo una solución de quitosano al 1-2% en peso en ácido acético, ácido láctico o ácido cítrico, que son los ácidos que han demostrado ser los mejores solventes de este polímero [13]. La suspensión es colocada sobre una placa de vidrio y se deja secar por un periodo de 12 horas. Luego es sumergida en NaOH o amoníaco para convertirlas de sal ácida a la forma amina, se lavan profusamente con agua y se secan a vacío [20].

El método IR consiste en correlacionar las absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas con el tanto por ciento de acetilación del quitosano [17].

Las siguientes son algunas de las líneas base propuestas para la determinación del grado de desacetilación del quitosano:

Domszy y Roberts (1985) [35].

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1.33]$$

Sabnis and Block (1997) [35].

$$DD = 97.67 - [26.486 \times (A_{1655} / A_{3450})]$$

Rout (2001) [35].

$$DD = 118.883 - [40.1647 \times (A_{1655} / A_{3450})]$$

Sin embargo el método de Baxter ha sido usado con frecuencia en la literatura [33]. En éste, el grado de N-acetilación se calcula por la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = [(A_{1655}/A_{3450}) \times 115] \quad (\text{Ec.1})$$

Donde A1655 y A3450 son las absorbancias del pico correspondiente al banda amida I y de la banda tomada como referencia, respectivamente.

- **Análisis Titrimétrico con Bromuro de Hidrógeno**

Se basa en el empleo de ácido hidrobromídrico en la determinación del grado de desacetilación, convirtiendo al quitosano en sal de quitosano soluble en sustancias polares. Las moles de álcali neutralizadas corresponde a las moles de ácido hidrobromídrico presente, y esta a su vez corresponde a la mol de unidades de quitosano inicialmente presente en la solución. Esto facilita el cálculo del grado de desacetilación de muestras de quitosano [23]

- **Peso molecular viscosimétrico promedio**

El quitosano es un biopolímero de alto peso molecular, su composición varia con la materia prima empleada en el proceso y el método de obtención.[34]

El peso molecular del quitosano ha sido estimado a partir de la viscosidad intrínseca, es así como se puede determinar el peso molecular viscosimétrico (M_v) de un polímero a partir de la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (\text{Ec.2})$$

Donde K (dLg^{-1}) y α son constantes tabuladas que dependen de la naturaleza del polímero, del disolvente y de la temperatura.

Los valores de las constantes K y α son constantes específicas para el solvente y el polímero utilizado, siendo para el caso de quitina de K =

$1.79 \cdot 10^{-3}$ y $\alpha = 0.59$ en ácido fórmico 0.2 M; para quitosano de $K = 0.074$ y $\alpha = 0.76$ en acetato de sodio 0.2 M y ácido acético 0.3 M [8].

El peso molecular promedio viscoso de la quitina está alrededor de $1.03 \cdot 10^6$ g/mol, $2.03 \cdot 10^6$ g/mol y $2.5 \cdot 10^6$ g/mol, para el quitosano los valores reportados son $1 \cdot 10^5$ g/mol, $1.25 \cdot 10^6$ g/mol, $1.61 \cdot 10^6$ g/mol, $5 \cdot 10^5$ g/mol y $6.22 \cdot 10^6$ g/mol [17,19].

- **Colorimetría**

El objeto de la colorimetría es expresar los colores y sus atributos perceptuales mediante números. Para conseguirlo, es necesario establecer una correlación entre los distintos atributos perceptuales del color y las magnitudes de la radiación visible [30].

En este sentido, la colorimetría es una parte de la psicofísica, la cual estudia las relaciones entre las magnitudes físicas y las respectivas magnitudes percibidas.

En 1924, la CIE estandarizó internacionalmente la función de eficiencia luminosa espectral (*spectral luminous efficiency function*) para la visión fotópica [41]

En 1976 define el modelo L^*a^*b para crear un sistema de codificación independiente del dispositivo. En este modelo los parámetros son luminosidad (**L**) y la componente **a** (posición en un eje entre verde a rojo) y la componente **b** (posición en un eje entre azul y amarillo). En CIE L^*a^*b la distancia entre colores dentro del modelo corresponde a la percepción humana del color [42].

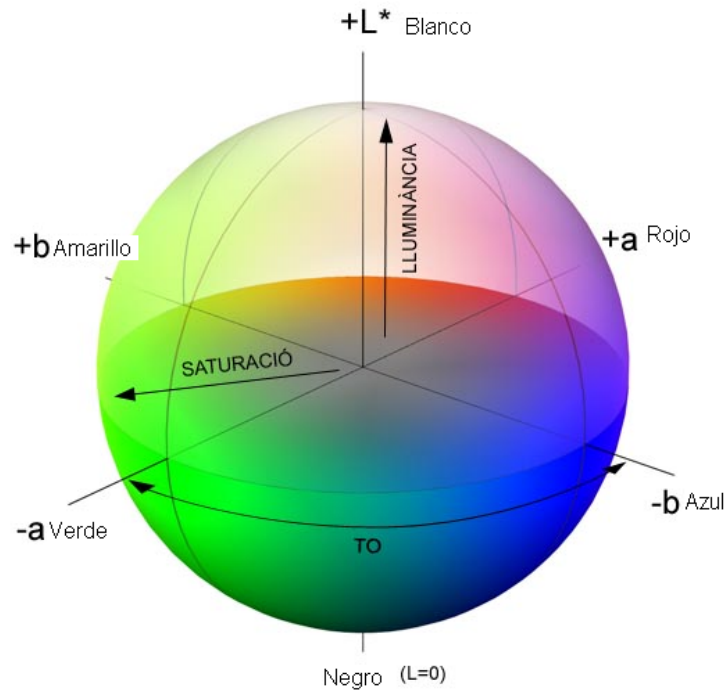


Fig 2. Espectro de Colores. (CIELab)
Fuente: www.colormodels.com/imatges/cielab_cat.jpg

Reacciones del quitosano

- **Formación de policomplejos.**

Los policomplejos son formados por la atracción electrostática de dos polielectrolitos con cargas opuestas como fuerza conductora del proceso. Por su naturaleza policatiónica [24], el quitosano ha sido usado para la complejación de proteínas ácidas en una variedad de fluidos biológicos, los cuales pueden ser manipulados con relativa facilidad [25]. En su proceso de hinchamiento, normalmente los hidrogeles preparados por el entrecruzamiento de una sola especie de polielectrolito, un policatión o un polianión, son altamente sensibles al pH del medio [14].

Por lo general, los hidrogeles preparados con quitosano logran un grado de hinchamiento máximo a valores de pH ácidos bien

determinados, debido a que el máximo grado de hinchamiento de estos materiales surge de un compromiso entre la máxima repulsión que pueden experimentar los grupos cargados y el mínimo apantallamiento que genera la adición de un exceso del ácido [26].

En el caso de los complejos polielectrolitos, entrecruzados químicamente en reacciones posteriores, es posible obtener materiales que se hinchen tanto a pH ácido como a pH básico. La generación de un hidrogel, formado inicialmente mediante la formación de un complejo polielectrolito entre el poliácido acrílico y el quitosano, mediante una reacción de polimerización a templado del ácido acrílico vía radicales libres en medio acuoso, es un ejemplo de este tipo de materiales [14].

- **Reacciones de entrecruzamiento**

Los hidrogeles químicos son redes tridimensionales formadas por la unión covalente de todas las cadenas de polímeros existentes en un sistema determinado, hasta formar, teóricamente, una sola macromolécula. Una de las principales propiedades del quitosano es su capacidad de formar hidrogeles inteligentes, que son matrices poliméricas que cambian su conformación de acuerdo a las condiciones del medio como temperatura, pH, polaridad, etc [27].

Obtener hidrogeles de quitosano es posible mediante una serie de modificaciones químicas sumamente interesantes en un polímero sintético como el polivinil alcohol (PVA). Este último fue inteligentemente modificado aprovechando que normalmente en su cadena pueden encontrarse, distribuidas al azar, uniones cola-cola que generan grupos OH vecinales; estos grupos vecinales pueden ser oxidados a grupos aldehídos, los que a su vez pueden formar bases de Schiff con el quitosano.

La base de Schiff son especies generadas a partir de reacciones reversibles; sin embargo, estas especies pueden ser convertidas en materiales más estables mediante una reacción de hidrogenación con reactivos comunes como el cianoborohidruro de sodio [14].

- **Cuaternización, alquilación exhaustiva del grupo amino.**

Debido a que el quitosano posee un valor de $pK_a \sim 5,6$, es soluble solo en soluciones ácidas con valores de $pH < 6$, se ha venido buscando extender el intervalo de pH donde se pueda utilizar dicho biopolímero en solución, para darle una mayor aplicabilidad. En ese sentido, un material con una mayor densidad de carga generaría seguramente una mayor solubilidad; por ello, una de las rutas propuestas para lograr este objetivo es lograr una alta eficiencia en la cuaternización de los grupos amino en las cadenas del polímero.

Existen diversos métodos de cuaternización de grupos amino primarios y secundarios, algunos de los cuales ya se han aplicado con éxito al quitosano, obteniéndose diferentes derivados alquilados [27]. Normalmente los productos obtenidos mejoran sustancialmente su solubilidad en agua con relación al quitosano virgen. Estos materiales han mostrado actividad antibacterial sobre *S. aureus*, habiéndose notado un incremento de dicha actividad conforme aumenta el tamaño de la cadena alquilante [14].

Una aplicación sumamente interesante de los derivados cuaternizados del quitosano es la prominente propiedad de transporte de compuestos hidrofílicos a través de monocapas de células intestinales de Caco-2, que ha exhibido el trimetil-quitosano (TMC), se espera a corto plazo que este material refuerce la permeación de drogas macromoleculares hidrófilas como, por ejemplo, los péptidos y las proteínas.

Además, también puede ser empleado como agente floculante en el tratamiento de aguas de desecho que contienen glutamato de sodio mostrando alta eficiencia en la remoción de la turbidez en un intervalo amplio de pH, aparentemente el poder floculante incrementa con el tamaño de la cadena alquílica [20].

- **Preparación y modificación de electrodos.**

El uso de electrodos para la determinación selectiva de iones metálicos es ampliamente conocido. Como un ejemplo de la aplicación de este tipo de electrodos basados en membranas preparadas con quitosano, éste se ha estudiado en mezclas con distintos polímeros, habiéndose obtenido algunas membranas que resultaron selectivas al Cr (III) [28].

APLICACIONES DEL QUITOSANO

El quitosano ha manifestado una extensa gama de aplicabilidad: en el área medio ambiental se ha demostrado su capacidad de secuestrar iones metálicos de transición y post-transición, además su carácter policatiónico le confiere acción floculante, lo que se resume en un elemento de gran utilidad en la contaminación de aguas residuales industriales [28]; en biotecnología este polímero ha tenido destacadas aplicaciones ya que sirve como soporte para la inmovilización de enzimas lo que representa de gran aplicación en la elaboración de biosensores [20].

En cuanto a la industria alimentaria, el quitosano es aplicado como agente gelificador y estabilizador de formulaciones [29], además actúa como conservante alimenticio debido a sus propiedades antimicrobianas frente a hongos, levaduras y bacterias [4], esto ha representado una consideración importante del quitosano en el sector agrícola, actuando principalmente como nematocida, en el tratamiento de semillas [3].

Actualmente el quitosano también es empleado para tratamientos dérmicos [8]; es un excelente formador de fibras, películas y membranas, además de poderse preparar en forma de microesferas y microcápsulas [20], lo que unido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad admiten su empleo en diversas aplicaciones en las industrias biomédica y farmacéutica, y la reactividad que le confieren sus grupos $-NH_2$ y $-OH$ permiten la preparación de derivados que amplían grandemente su campo de acción, como control del colesterol, liberación de drogas, suturas, biomateriales, entre otras.[14].

En la Figura 2 se presenta un esquema de las principales aplicaciones del quitosano en varios sectores.

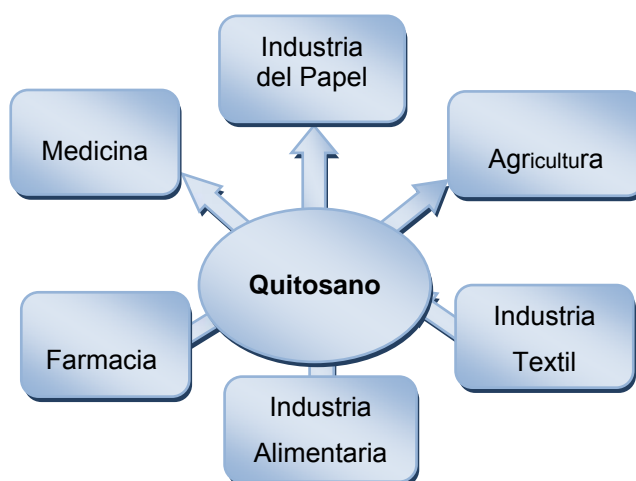


Fig. N 3. Esquema de algunas aplicaciones del quitosano en diversos campos.
Fuente: Peniche C.A. Estudio sobre la quitina y quitosana. 2006.3-15.

PROYECCIONES FUTURAS

El deseo de avanzar en la búsqueda de nuevos conocimientos ha permitido desarrollar varias investigaciones dirigidas al quitosano para encontrar aplicaciones aun no descubiertas, esto generará beneficios especialmente para los países en vías de desarrollo como Ecuador.

Actualmente se trata de impulsar la aplicabilidad del quitosano en terapia genética no viral, lo que representaría la utilización de una vía alterna a la introducción física del material genético dentro de las células. Esta vía,

ya probada con resultados alentadores en otros países, utiliza la formación de complejos polielectrolitos que se producen entre el polímero, ADN, sales orgánicas, lípidos, entre otros, esto puede constituir una gran ventaja en estudios de transfección in vitro e in vivo [14].

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis de la Investigación

El empleo de un agente reductor permitirá desarrollar un método alternativo para la obtención de quitosano de mayor grado de pureza a partir de caparazones de camarón.

2.3.1. Hipótesis Estadística

2.3.2.1. Hipótesis Nula

Los tratamientos resultantes producto de la correlación de los factores de estudio presentan las mismas características físico-químicas en las respuestas experimentales.

2.3.2.2. Hipótesis Alternativa

Los tratamientos resultantes producto de la correlación de los factores de estudio presentan diferentes características físico-químicas en las respuestas experimentales.

2.4. Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable Independiente: Empleo de un agente Reductor.

Variable Dependiente: Desarrollo de un método alternativo para la obtención de quitosano.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Enfoque

El presente estudio recoge información de carácter predominantemente cuantitativo, debido a las metodologías analíticas planteadas para la determinación de las características físico-químicas de los tratamientos en estudio. La aplicación del agente reductor, el proceso de obtención, los parámetros de análisis como: peso molecular, contenido de humedad, contenido de cenizas, contenido de nitrógeno, color, grado de desacetilación del quitosano se correlacionan directamente permitiendo emitir criterios de calidad del producto.

3.2 Modalidad básica de la investigación

Las modalidades de investigación en las que se enmarca la presente investigación serán Experimental y Bibliográfica.

Experimental

La investigación permitirá el desarrollo de un método alternativo para la obtención de quitosano, mediante la recopilación de información obtenida de los análisis de la caracterización físico-química con las que cuenta el quitosano de cada uno de los tratamientos.

Bibliográfica

Se aportará con información relevante que complementará a la reportada bibliográficamente respecto a los métodos para obtención de quitosano.

3.3. Nivel o tipo de investigación

Exploratorio

Se estudiarán nuevas alternativas para la obtención de quitosano a partir de un lote de caparazones de camarón, mediante la determinación de las características físico-químicas, que se traduce en la pureza del polímero, en base a la aplicación de diferentes métodos analíticos.

Descriptivo

Se caracterizará al quitosano mediante el empleo de diversas técnicas de análisis, tanto químicas como físicas, lo que permitirán obtener datos confiables para la determinación de la pureza del quitosano, y de esta manera emitir criterios de aceptabilidad mediante comparaciones según casas comerciales.

Asociación de variables

Los parámetros a evaluarse permitirán conocer las características con las cuenta el quitosano, y con ello evaluar la calidad del polímero obtenido a partir de un determinado lote de materia prima y el proceso de obtención.

3.4. Método y Técnicas de Investigación

3.4.1. Obtención de la Materia Prima

El presente trabajo se realizó con caparazones de camarón de la variedad (*Penaeus vannamei*) cultivado en Ecuador y fueron recopilados de distribuidores y diversas marisquerías de la ciudad de Ambato.

3.4.1.1. Obtención de Quitosano (Método Indirecto)

La tecnología empleada para la obtención de quitosano fue desarrollada en base a los métodos reportados por Alvarado J. [13], Parada et al [12] y Peniche C. [20], de los cuales se realizó una adaptación según las condiciones del lugar de desarrollo. El proceso de obtención es esquematizado gráficamente en el Diagrama D-1.

Obtención de Quitina

3.4.1.1.1. Recepción de la Materia Prima

Los caparazones de camarón se lavaron y se retiraron patas, cola y residuos de carne, con el fin de eliminar la mayor cantidad de proteína que puede interferir en el proceso.

3.4.1.1.2. Secado

Se secaron los caparazones en una estufa a 90°C por 5 horas, luego se procedió a moler para facilitar el proceso.

3.4.1.1.3 Cocción 1

Los caparazones de camarón triturados se sometieron a cocción en una solución de NaOH al 0.5%, en una relación 2:3 (w/w) durante 30 minutos a 80°C y agitación constante, para eliminar colorantes característicos del camarón y desproteinizar.

3.4.1.1.4. Lavado

Se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar el precipitado con abundante agua con la ayuda de un lienzo.

3.4.1.1.5. Cocción 2

El precipitado obtenido de la etapa anterior se sometió a una segunda cocción con una solución de NaOH al 3% por 10 minutos a 80°C y agitación constante. Seguido se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar la misma operación anterior. El proceso se lo realizó 3 veces para reafirmar la eliminación de la mayor cantidad de proteína presente en el caparazón.

3.4.1.1.6. Lavado 2

Al final de la etapa de cocción se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con abundante agua con la ayuda de un lienzo, hasta tener un pH cercano a 7.

3.4.1.1.7. Desmineralización

El sólido remante se desmineralizó con una solución de HCl 2N a temperatura ambiente por 60 minutos, con el propósito de eliminar la mayor cantidad de minerales que se encuentran en el caparazón de camarón. Seguido se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con abundante agua hasta obtener un pH cercano a 7.

3.4.1.1.8. Secado

El sólido obtenido, quitina, se colocó en bandejas de aluminio y se secó en estufa a 50°C por 6 horas.

Obtención de Quitosano a partir de Quitina

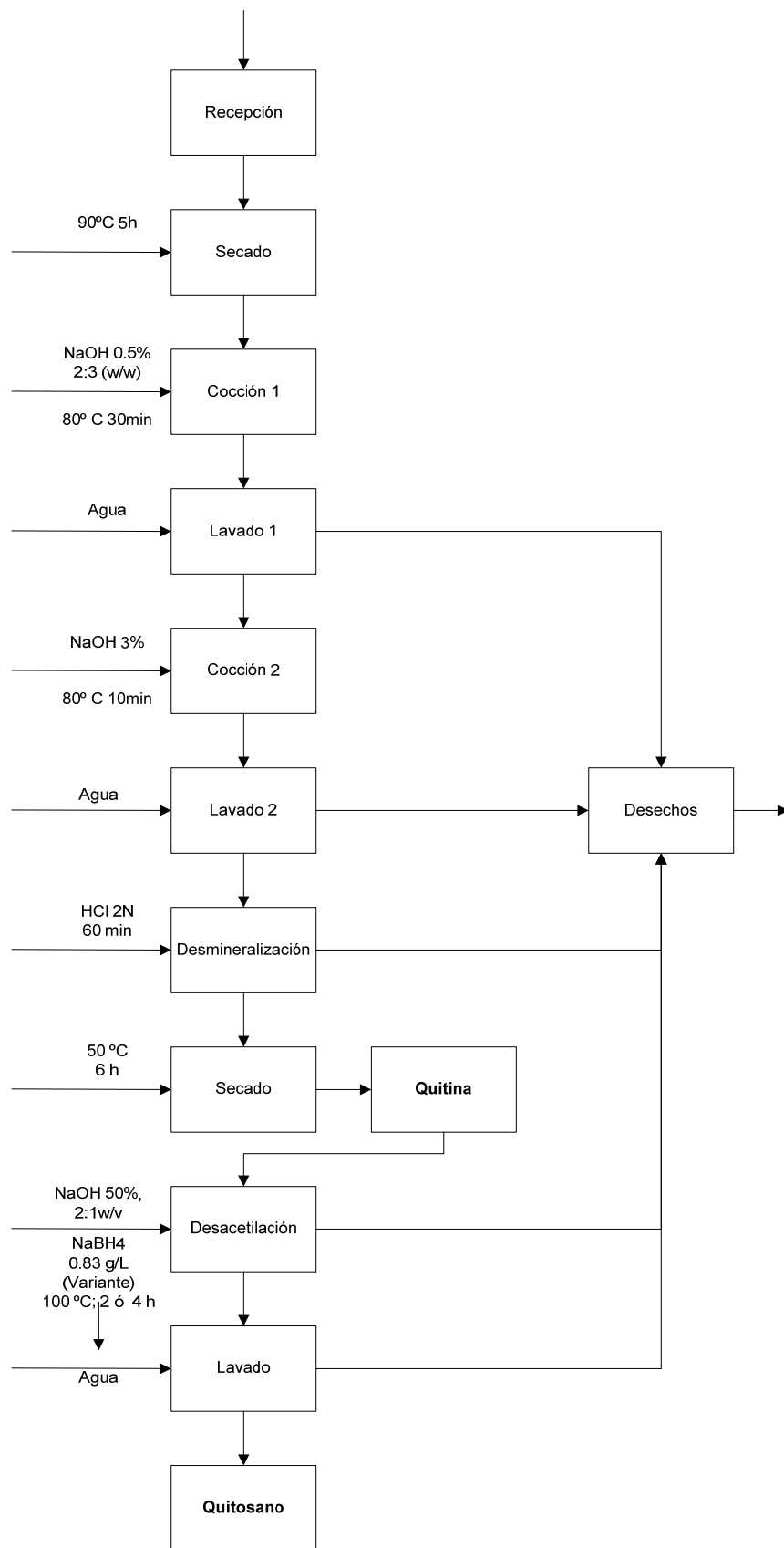
3.4.1.1.9. Desacetilación.

La quitina fue tratada con una solución de NaOH al 50% a 100°C, en una relación (w/v) 1:2 durante 2 y 4 horas y con la adición del agente reductor (NaBH_4) a una concentración de 0.83 g/L de acuerdo al diseño experimental en los tratamientos que lo requiera.

3.4.1.1.10. Lavado

Se descartó el sobrenadante y se lavó profusamente el sólido remanente obtenido hasta obtener un pH cercano a 7.

DIAGRAMA 1. Diagrama de flujo de la obtención de quitosano a partir de caparazones de camarón empleando el método indirecto.



3.4.1.2. Obtención de Quitosano (Método Directo)

La tecnología empleada para la obtención de quitosano fue en base al método reportado por Alvarado J. [13], en el cual se obtiene directamente quitosano sin pasar por etapas iniciales para la obtención de quitina.

3.4.1.2.1. Recepción de la Materia Prima

Se siguió el mismo procedimiento que el reportado en el literal 3.4.1.1.1

3.4.1.2.2. Secado

Se siguió el mismo procedimiento que el reportado en el literal 3.4.1.1.2

3.4.1.2.3. Desmineralización.

Los caparazones de camarón triturados fueron colocados en una solución de HCl 2 N en una relación 1:2 (w/w) a temperatura ambiente por 72 horas, con el propósito de eliminar la mayor cantidad de minerales que se encuentran en el caparazón de camarón.

3.4.1.2.4. Lavado

Seguido se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con abundante agua hasta obtener un pH cercano a 7.

3.4.1.2.5. Desproteínización

El precipitado obtenido de la etapa anterior fue llevado a una solución de NaOH al 50% a 100°C , con una relación (w/v) 1:2 durante 2 y 4 horas y con la adición del agente reductor (NaBH₄) a una concentración

de 0.83 g/L, de acuerdo al diseño experimental en los tratamientos que lo requiera.

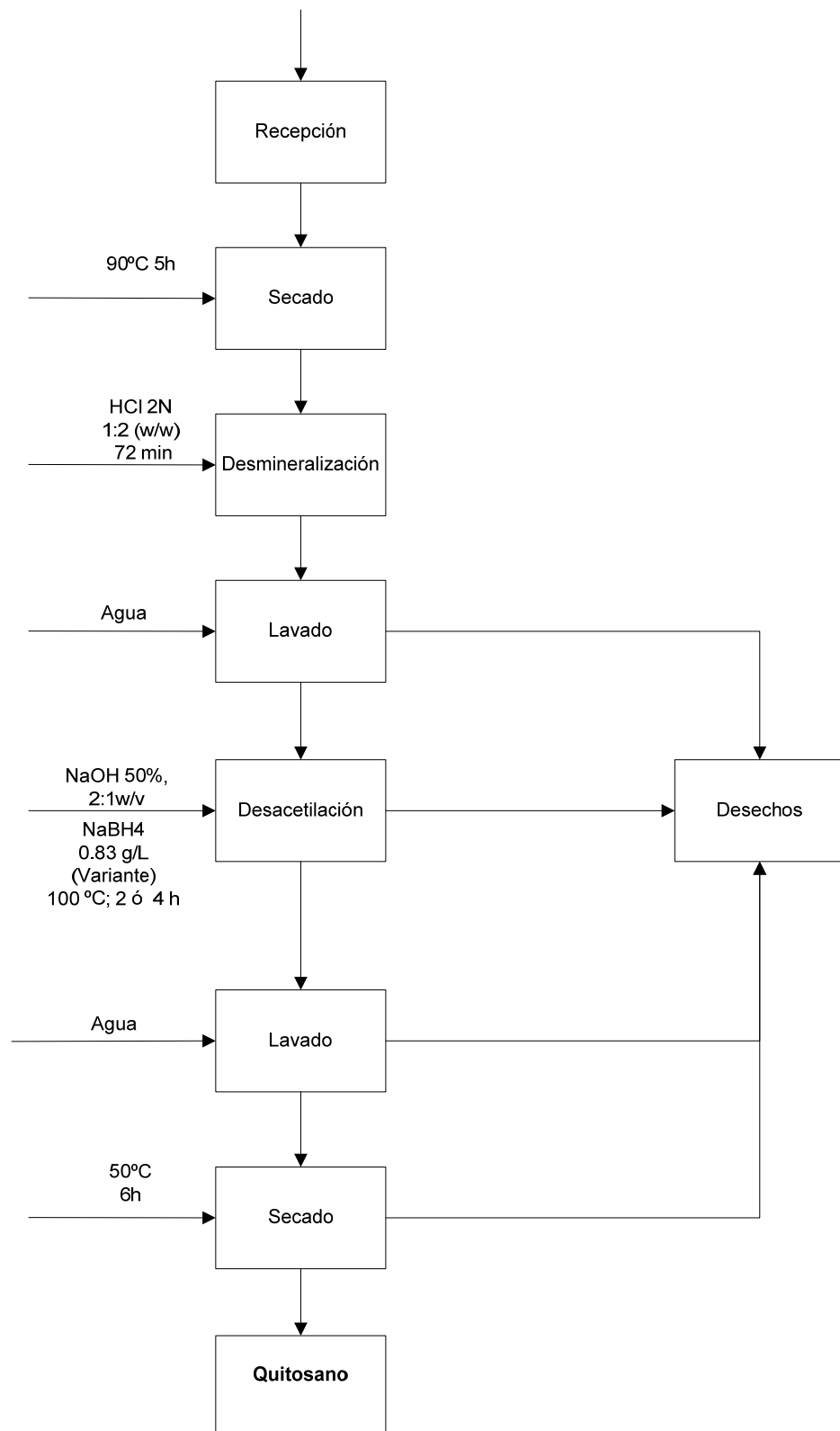
3.4.1.2.6. Lavado

Se descartó el sobrenadante y se lavó profusamente el sólido remanente obtenido hasta obtener un pH cercano a 7.

3.4.1.2.7. Secado

El sólido obtenido, quitosano, se colocó en bandejas de aluminio y se secó en estufa a 50°C por 6 horas.

DIAGRAMA 2. Diagrama de flujo de la obtención de quitosano a partir de caparazones de camarón empleando el método directo.



3.4.2. Método para Determinar Propiedades Físico Químicas del Quitosano.

3.4.2.1. Método para determinar humedad

En la determinación de la humedad se utilizó el método de desecación por infrarrojo con el equipo Gibertini Eurotherm. La balanza fue ajustada a 160°C por 10 minutos.

La ecuación para la determinación del contenido de humedad es descrita a continuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_{mh} - P_{ms}}{P_{mh}} * 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde

% humedad: Humedad

P_{mh} : Peso de la muestra húmeda

P_{ms} : Peso muestra seca

3.4.2.2. Método para determinar cenizas

La determinación de cenizas se realizó mediante análisis gravimétrico proximal, por calcinación de las muestras en mufla a 550°C por 5 horas, por el método PE-01-5.4FQ AOAC 923.03, en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos, Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos (LACONAL), Universidad Técnica de Ambato.

La ecuación para la determinación del contenido de cenizas es descrita a continuación:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{P_{cz} - P_c}{P_{cm} - P_c} * 100 \quad (\text{Ec.4})$$

Donde

% cenizas : cenizas

P_{cz} : Peso del crisol mas cenizas

P_{ms} : Peso del crisol mas muestra
 P_c : Peso del crisol

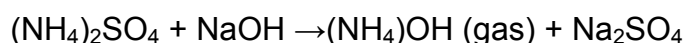
3.4.2.3. Método para determinar el porcentaje de nitrógeno

Se peso alrededor de 0.20g de muestra, en un balón, luego se añadió 1.0 g de hidróxido de potasio, 0.1 g de sulfato de cobre y 0.001 g de dióxido de selenio. A la mezcla se añadió 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. El balón se colocó en el equipo digestor a una temperatura aproximada de 500°C por 13 a 15 minutos hasta que se efectuó una combustión total de la mezcla.



Se procedió con la destilación una vez enfriada la muestra y se añadió NaOH al 50% hasta que se torne un viraje en la coloración a negro. Seguido se colocó en un erlenmeyer 10 ml de ácido sulfúrico a 0.1 N y se adicionó tres gotas de indicador rojo de metilo.

La reacción efectuada en el digestor fue:



Se recogió 20 ml de condensado y se tituló con una base de hidróxido de sodio 0.1 N, el mismo que neutralizó el ácido no neutralizado. Para determinar la cantidad de N_2 (se encontraba como NH_4OH presente en la muestra) se restó de la cantidad total de ácido el número de ml empleados en la titulación.

El análisis se realizó bajo el método estandarizado PE-03-5.4.FQ AOAC 2001.11 por la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (LACONAL), Universidad Técnica de Ambato.

La ecuación para la determinación del contenido de nitrógeno es descrita a continuación:

$$\% N = \frac{[(V_{H_2SO_4} * N_1 * f_1) - (V_{NaOH} * N_2 * f_2)] * 0.014 * 100}{P_m} \quad (\text{Ec.5})$$

Donde

%N : Porcentaje de nitrógeno

$V_{H_2SO_4}$: Volumen de ácido sulfúrico (ml)

V_{NaOH} : Volumen de hidróxido de sodio de la titulación $\zeta\zeta$ (ml)

N_1 : Normalidad del ácido sulfúrico

N_2 : Normalidad del hidróxido de sodio

f_1 : Factor obtenido en la valoración del ácido

f_2 : Factor obtenido en la valoración del hidróxido

P_m : Peso de la muestra en gramos.

0.014 : gramos de nitrógeno correspondiente a 1 ml de H_2SO_4

3.4.2.4. Método para determinar peso molecular viscosimétrico

En la determinación de peso molecular se empleó un viscosímetro de CANNON 100-282B N° 52L donde se dejó caer el líquido desde la marca superior hasta la inferior y se registró el tiempo de caída del menisco a 25°C, esta operación se repitió 3 veces en cada factor de dilución para cada tratamiento, con el objetivo de reducir el error experimental.

En la determinación de la densidad de las muestras en estudio, se empleó un picnómetro de botella.

Para calcular el peso molecular se utilizó la ecuación de Mark-Houwink cuyas constantes dependen de la naturaleza del polímero y del solvente. Las muestras de quitosano fueron diluidas en una solución de NaCl 0.2M y ácido acético 0.1N, a una relación 1:1 (v/v).

A continuación se reportan las ecuaciones empleadas para la determinación de peso molecular:

- Densidad relativa experimental

$$\bar{\sigma} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \quad (\text{Ec.6})$$

Donde:

- σ : Densidad relativa
- m_1 : Masa del picnómetro vacío (g).
- m_2 : Masa del picnómetro con agua (g).
- m_3 : Masa del picnómetro con la muestra (g).

- Viscosidad Relativa

$$\mu = \frac{\bar{\sigma}_2 * t_2}{\bar{\sigma}_1 * t_1} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde:

- μ : Viscosidad relativa.
- δ_1 : Densidad relativa del solvente (A. acético 0.1 M.+ NaCl 0.2 M).
- t_1 : Tiempo de escurrido del solvente (A. acético 0.1M.+NaCl 0.2 M).
- δ_2 : Densidad relativa de la muestra.
- t_2 : tiempo de escurrido de la muestra.

Se realizó un gráfico de viscosidad reducida $(\mu-1)/C$ en función de la concentración C (Anexo C), dando como resultado un recta, cuyo corte en

eje de las ordenadas corresponde a la viscosidad intrínseca η , la cual permitió el cálculo del peso molecular viscosimétrico.

- Peso Molecular - Ecuación de Mark Houwink.

$$M = e^{\frac{\ln \eta - \ln K}{\alpha}} \quad (\text{Ec.8})$$

Donde:

M : Peso molecular

K : 1,81E-03 (constante)

α : 0,93 (constante)

3.4.2.5. Método para determinar el índice de blancura

Los espectros de color se obtuvieron con la ayuda de un escáner Canon N656U donde se colocó la muestra de quitosano previamente molida, posteriormente los espectros fueron procesados en el programa Adobe Photoshop y transformados al Sistema CIELab.

El índice de blancura de los tratamientos tiene una tendencia cercana a 100, debido a que en las coordenadas del sistema CIELab, cuando L alcanza el valor de 100 representa el color blanco y cuando L sea una valor igual a 0 representa el color negro, los coordenadas a y b representa la cromaticidad de los colores rojo a verde y azul a amarillo respectivamente.

La ecuación para la determinación del índice de blancura es descrita a continuación:

$$(WI) = [100 - \{(L - 100)^2 + a^2 + b^2\}^{0.5}] \quad (\text{Ec.9})$$

Donde:

(WI): Índice de Blancura

L : Luminosidad en el rango de 0 (negro) a 100 (blanco).

- a :Cromaticidad +a/-a para rojo/verde.
- b :Cromaticidad +b/-b para azul/amarillo

3.4.2.6. Método para la determinación del grado de desacetilación

3.4.2.6.1. Método por Espectroscopia Infrarrojo

Las muestras de quitosano fueron preparadas en forma de disco de bromuro de potasio (KBr), de acuerdo al método propuesto por Khan et al [23]. Se tomaron 40-60 mg. de polvo de quitosano y 120 mg. de KBr , y fueron mezclados y triturados en un mortero por 10 minutos. Aproximadamente 40 mg. de la mezcla fue compactada en forma de disco mediante una prensa hidráulica de Infrarrojo a una presión de 8 toneladas por 6 segundos. Los discos fueron colocados en un horno a 80°C por 16 horas antes del análisis.

Los espectros de las muestras de quitosano fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro Infrarrojo con transformada de Fourier, Perkin Elmer. El grado de desacetilación (DD) de las muestras de quitosano fueron calculadas utilizando dos líneas base, las cuales fueron propuestas por Khan et al. [23]. El cálculo del grado de desacetilación según las dos líneas es descrito a continuación:

$$DD=100-[(A_{1655} /A_{3450}) *100/1.33] \text{ Línea base (a)}$$

$$DD=100-[(A_{1655} /A_{3450}) *115] \text{ Línea base (b) (Ec.10)}$$

Los análisis por IR se realizaron en el Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros (CIAP) de la Escuela Politécnica Nacional, Quito. Las gráficas de los espectros de cada muestra de quitosano se encuentran en el anexo C.

3.4.2.6.2. Método por determinación de Nitrógeno

El grado de desacetilación (DD) de las muestras de quitosano fue calculado mediante análisis elemental, utilizando la ecuación reportada por Taboada et al. [30].

$$DD (\%) = 100 - [(8.695 - \%N)/1.799] * 100 \quad (\text{Ec.11})$$

Donde:

%N : Porcentaje de Nitrógeno

8.695 : Porcentaje de nitrógeno (100% desacetilado)

1.799 : Diferencia entre 8.695 y 6.896 (porcentaje de nitrógeno (N) en la quitina totalmente desacetilada).

4.2.6.3. Método por análisis titrimétrico con bromuro de hidrógeno.

Para la determinación del grado de desacetilación (DD) se pesó 0.25 g. de quitosano y fue disuelto en 50 ml de solución 0.2 M de ácido bromhídrico recién preparado. Seguido se adicionó 25 ml de ácido bromhídrico 9 M. (concentrado) con una vigorosa agitación para precipitar la sal de quitosano. La mezcla fue centrifugada en una centrífuga a 2000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue descartado y el sólido remanente fue lavado varias veces con una mezcla de metanol y éter absoluto en una relación (1:1, v/v) hasta que el filtrado estuviera con un pH cercano a la neutralidad. La sal de quitosano obtenida fue removida con éter absoluto y colocada en un desecador con sílica gel por 24 horas, hasta que el éter se evapore completamente de la muestra y se obtenga únicamente la sal de quitosano.

Se pesó aproximadamente 0.1 g. de sal de quitosano y se disolvió en 50 ml de agua destilada, de la solución resultante se tomó 10 ml de alícuota y se tituló con una solución de NaOH 0.01 M previamente estandarizada y fenoftaleína como indicador.

Las moles del álcali neutralizadas corresponden a las moles de ácido bromhídrico presente y este a su vez corresponde a la mol de unidades de glucosamina presente en la solución.

A continuación se reportan las ecuaciones empleadas para la determinación del grado de desacetilación en base al análisis trimétrico con bromuro de hidrógeno:

- Determinación de m moles de sal de quitosano

$$m \text{ moles} = V_{\text{titulación}} * [\text{NaOH}_{\text{estandarizado}}]$$

Donde

m moles : mili moles de sal de quitosano.

$V_{\text{titulación}}$: Volumen de la titulación con NaOH.

- Cálculo del porcentaje de nitrógeno

$$\% \text{ N} = \frac{(m \text{ moles de quitosano} * \text{PM}_{\text{nitrógeno}})}{W \text{ muestra} * 1000}$$

Donde :

m moles de quitosano: mili moles de quitosano

$\text{PM}_{\text{nitrógeno}}$: peso molecular del nitrógeno

W_{muestra} : peso del sal de quitosano.

1000 : conversión de milimoles a moles.

- Cálculo del grado de desacetilación

Se realizó un grafico del grado de desacetilación en función del porcentaje de nitrógeno. La quitina tiene un porcentaje de nitrógeno del 6.896% lo cual indica que está totalmente acetilada y al llegar al 8.6956% que es el valor máximo de desacetilación indica que la quitina ha pasado a quitano. Estos valores dieron como resultado una recta lineal.

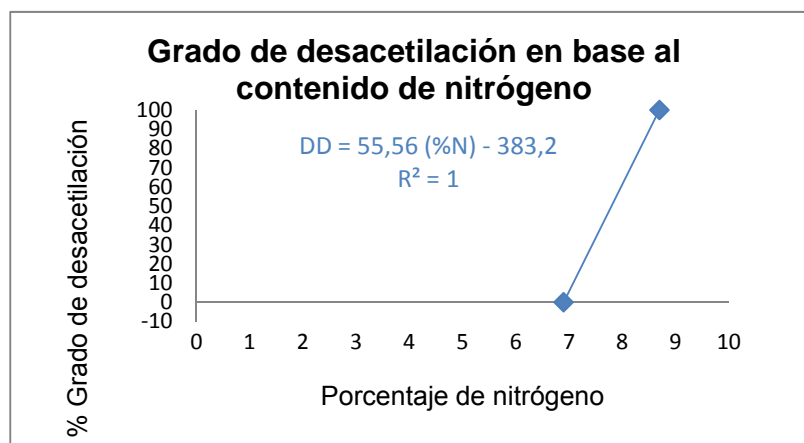


Fig. N 4. Representación gráfica de grado de desacetilación en función del porcentaje de nitrógeno.

Donde:

6.896 : quitina (0% desacetilada)

8.6956: quitano (100% desacetilado)

- Interpolación

La ecuación de la recta obtenida en la Figura 4 permitió determinar el grado de desacetilación mediante interpolación, donde el porcentaje de nitrógeno calculado representa el eje de las abscisas, por consiguiente se pudo efectuar el cálculo del grado de desacetilación.

$$DD = 55.56 (\% \text{ nitrógeno}) - 383.2 \quad (\text{Ec.12})$$

3.5. Población y muestra

3.5.1. Diseño experimental

3.5.1.1. Factores o niveles en estudio para el desarrollo de un método para la obtención de quitosano.

Tabla N.3. Factores de Estudio

Factores	Niveles
A. Método de obtención	a ₀ : método indirecto a ₁ : método directo
B. Uso de agente reductor	b ₀ : sin agente reductor b ₁ : con agente reductor (NaBH ₄)
C. Tiempo de desacetilación	c ₀ : 2 h. c ₁ : 4 h.

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

3.5.1.2. Tratamientos

Los tratamientos resultantes de la correlación de los factores de estudio en el desarrollo de un método alternativo para la obtención de quitosano son:

Tabla N.4. Tratamientos de estudio

Tratamientos		Factores de estudio		
Nº	Codificación	Método de obtención	Agente reductor	Tiempo de desacetilación
1	a ₀ b ₀ c ₀	método indirecto	sin agente reductor	2 horas
2	a ₀ b ₀ c ₁	método indirecto	sin agente reductor	4 horas
3	a ₀ b ₁ c ₀	método indirecto	con agente reductor	2 horas
4	a ₀ b ₁ c ₁	método indirecto	con agente reductor	4 horas
5	a ₁ b ₀ c ₀	método directo	sin agente reductor	2 horas

6	$a_1b_0c_1$	método directo	sin agente reductor	4 horas
7	$a_1b_1c_0$	método directo	con agente reductor	2 horas
8	$a_1b_1c_1$	método directo	con agente reductor	4 horas

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

3.6. Operacionalización de variables

Variable Independiente : Empleo de agente reductor

Tabla N.5. Operacionalización de la variable Independiente

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICAS E INSTRUMENTOS
El agente reductor actúa como protector en contra de la oxidación y la degradación de la cadena polimérica en el proceso de obtención del quitosano, permitiendo una efectiva desacetilación y por ende se constituye en un excelente elemento para mejorar la pureza del polímero.	<ul style="list-style-type: none"> -Protector de oxidación y degradación. -Efectiva desacetilación -Pureza. - Proceso de obtención. 	<ul style="list-style-type: none"> -Grado de desacetilación -Peso molecular 	<ul style="list-style-type: none"> ¿Mejorará las características físico-químicas del quitosano el empleo de un agente reductor? ¿Cuál serían las ventajas que presenta la adición de un agente reductor en el proceso de obtención? ¿Existen cambios notables en la obtención de quitosano con agente reductor frente a los métodos convencionales? 	<ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopi a infrarrojo. - Contenido de nitrógeno. - Valoración Titrimétrica - Ecuación de Mark-Houwink.

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

Variable Dependiente: Desarrollo de un método alternativo para la obtención de quitosano.

Tabla N.6. Operacionalización de la variable Dependiente

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICAS E INSTRUMENTOS
El estudio de nuevas tecnologías para la obtención de quitosano, con la ayuda de la investigación aplicada generará grandes aportes para el desarrollo de nuevas metodologías en el proceso de obtención, mejorando la calidad del polímero.	-Nuevas Tecnologías.	-Proceso	¿Cuál será la mejor metodología para la obtención de quitosano con una buena pureza?	Diseño Experimental
	-Calidad	-Características comerciales.	¿El estudio de una nueva metodología con un agente reductor permitirá el desarrollo de un método alternativo del proceso ? ¿El proceso de obtención del quitosano afecta en las características de este?	

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

3.7. Recolección de información

El diseño experimental planteado tuvo como finalidad obtener datos experimentales reales de las características físico-químicas con las que cuenta el quitosano en cada uno de los tratamientos, por lo cual se estableció un diseño 2^3 , con una réplica y 5 respuestas experimentales, dando como resultado 16 tratamientos de análisis.

En base al diseño experimental propuesto, se estudiaron a los diferentes tratamientos producto de la correlación de variables entre la aplicación de agente reductor químico, método de obtención y tiempo de desacetilación, a partir de la recopilación de datos de las respuestas experimentales establecidas, tales como grado de desacetilación por método químico y físico, y peso molecular. Estos parámetros fundamentarán la respuesta que se dé a la hipótesis planteada.

El proceso de análisis se lo realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.8. Procesamiento y análisis

El procesamiento de la información obtenida en la fase experimental de la investigación, se lo realizó en base a un estudio estadístico con la ayuda del programa STATGRAPHICS PLUS.

El análisis de la información se basó en la interpretación de los resultados obtenidos del estudio estadístico y fue sustentado con revisión bibliográfica, lo cual permitirá la comprobación de la hipótesis para establecer conclusiones y recomendaciones sobre la investigación desarrollada.

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados

4.1.1. Peso Molecular

Los datos de peso molecular obtenidos experimentalmente se reportan en la Tabla A-1. Bibliográficamente los datos fluctúan entre: $1.41 \cdot 10^5 \pm 0.01$ Da [40], $1 \cdot 10^5$ g/mol, $1.25 \cdot 10^6$ g/mol, $5 \cdot 10^5$ g/mol [12].

El análisis de varianza reportado en la Tabla B-1, indica en la interacción triple la presencia de diferencia significativa, es decir si hay interacción entre los factores de estudio. Por otro lado, al analizar los factores principales de manera individual se encuentra diferencia estadística significativa en todos los casos, lo cual denota que al modificar los niveles de cada factor, varía notablemente el peso molecular del quitosano.

Se menciona que la variación en la composición de las cadenas de estos polímeros como sus dimensiones en función de la materia prima y rigurosidad del método de obtención por factores como: la temperatura, la concentración y la duración del proceso [16, 34]. Por esto se busca la interacción de tres factores seleccionados en este estudio, para definir un método óptimo que genere un quitosano de peso molecular cercano a los reportados bibliográficamente.

La determinación del grado de acetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra

de quitosano, ya que ambas tienen una gran incidencia en sus propiedades [20]. Al analizar los datos obtenidos se establece la necesidad de buscar un quitosano de bajo peso molecular, esto indica la remoción eficaz de los grupos acetilo y por consiguiente la disminución de peso en el polímero.

El Gráfico B-1, señala que los niveles óptimos para obtener quitosano de bajo peso molecular serán con método directo, sin la presencia de agente reductor y 4 horas de desacetilación. Esto es comparable con la Tabla B-2, donde se determina que el mejor tratamiento es $a_1b_0c_1$.

4.1.2. Humedad

Los valores de porcentaje de humedad de cada tratamiento se reportan en la Tabla N. 2. Bibliográficamente los valores comerciales se encuentran entre: 10-13% [31], 4.5%, 7.5% [13] y menor al 10% [32] dependiendo de la casa fabricante.

En el análisis de varianza (Tabla B-3), se observa que en la interacción triple de factores, no existe diferencia estadística significativa con un α : 0.05 de confianza. Sin embargo, los factores de estudio de manera individual: método de obtención, agente reductor y tiempo de desacetilación si presentan diferencia estadística significativa, cuando se modifiquen los niveles de dichos factores.

Las interacciones AB, AC, presentan diferencia estadística significativa, lo cual señala que existe interacción entre los factores y la variación de sus correspondientes niveles influenciará en la respuesta experimental, esto es comprable en el análisis estadístico de medias (Tabla B-4).

El quitosano al ser extremadamente higroscópico resulta difícil eliminar completamente el efecto de humedad en las muestras. Se concluye entonces que la humedad es un parámetro importante a considerar al efectuar otros análisis de caracterización [23,36].

En base a lo anteriormente mencionado, conviene identificar el tratamiento que presente el porcentaje de humedad más bajo. Al realizar el análisis de medias para cada tratamiento sobresale la media 1 y 3 que corresponde al tratamiento $a_0b_0c_0$ y $a_0b_1c_0$ respectivamente, en el que se combina el método indirecto, con o sin agente reductor y 2 horas de desacetilación, siendo estos los mejores tratamientos por su baja humedad, estos datos son comparables con el Gráfico B-3.

De las especificaciones del quitosano, el tratamiento $a_0b_0c_0$ es el único que presenta el porcentaje de humedad más bajo en comparación a los otros tratamientos y se encuentra cerca de los valores reportados bibliográficamente, por lo que se constituye el mejor tratamiento para esta prueba.

4.1.3. Cenizas

En la Tabla A-3 se reportan los valores experimentales obtenidos para cada tratamiento de este estudio. Bibliográficamente los valores reportados del contenido de cenizas en quitosano de varias casas comerciales se encuentran entre: 0.1%, 0.91%, <2% [32] y 2.4%, <1.5% [13].

El análisis de varianza indica en la interacción de los tres factores de estudio: método de obtención, agente reductor y grado de desacetilación, presencia de diferencia estadística significativa con el 95% de confianza, por tanto, se concluye que existe interacción de los tres factores sobre la respuesta experimental. Al analizar los efectos por separado se encuentra solo para los factores A y B diferencia significativa, mostrando así la incidencia de la modificación de los niveles establecidos para cada factor sobre el contenido de cenizas, sin embargo el factor C no tiene una incidencia relevante en este parámetro.

Las interacciones AC y BC presentan diferencia estadística significativa, señalando entonces la existencia de interacción entre los factores involucrados. Caso contrario a lo que se observa en la interacción AB, en donde, el análisis de varianza no señala interacción entre estos factores debido a que la probabilidad es superior al $\alpha = 0.05$.

En base a que el contenido de cenizas es un indicador de la efectividad del proceso de desmineralización debido a la eliminación del carbonato cálcico y además, ya que las cenizas residuales pueden afectar la solubilidad, contribuyendo a disminuir la viscosidad y afectando la calidad del producto final, el contenido de cenizas es un parámetro importante a considerar [43]. Se buscará entonces el mejor tratamiento en base al menor contenido de ceniza.

Al analizar el Gráfico B-5, se determina trabajar con un método indirecto de obtención, presencia de agente reductor y de preferencia con 4 horas de desacetilación aunque la diferencia de este último es mínima, para obtener un menor porcentaje de cenizas en el quitosano. Esto es comprable con los datos reportados en el análisis de medias para este parámetro, constituyéndose entonces como mejor tratamiento a $a_0b_1c_1$.

Por lo tanto, el tratamiento seleccionado como el mejor, tiene un contenido de 0.10% de cenizas, el cual está dentro del rango aceptado para este tipo de productos (<2%) e incluso dentro del rango que se supone para un quitosano de alta calidad, el cual debe tener un contenido de cenizas menor al 1% especificado por varias casas fabricantes. Esto nos indica una extracción óptima en el proceso.

4.1.4. Color.

En la Tabla A-4 se encuentran reportados los valores de luminosidad (L), cromaticidad (a y b) e índice de blancura (WI) de cada uno de los tratamientos propuestos para el estudio. Bibliográficamente se caracteriza al quitosano de color blanquecino amarillento [13].

El análisis de varianza (Tabla B-7), indica diferencia estadística significativa al 95% de confianza, para los factores B y C es decir, agente reductor y grado de desacetilación, lo que significa que existe influencia de estos factores sobre el índice de blancura del quitosano.

Al analizar cada efecto por separado en el Gráfico B-7, se determina trabajar con método directo o indirecto de obtención, ya que este factor no tiene un efecto marcante sobre el índice de blancura, sin la presencia de agente reductor y con 4 horas de tiempo de desacetilación,

Las interacciones dobles: AB, AC y BC e interacción triple ABC presentan diferencia significativa en el análisis de varianza, lo cual indica que existe influencia entre factores al modificarse los niveles de los mismos.

Aplicando la prueba de diferencia de medias entre interacciones (Tabla B-8), se obtiene que el tratamiento que se ajusta mejor con las especificaciones de color de las casas fabricantes es el $a_0b_0c_1$, es decir método indirecto, sin agente reductor y 4 horas de desacetilación, cuyo índice de blancura es cercano a 100.

4.1.5. Nitrógeno

En la Tabla A-6 se reporta el porcentaje de nitrógeno para cada tratamiento de quitosano.

El análisis de varianza (Tabla B-9) indica que no presenta diferencia estadística significativa la interacción triple de los factores en estudio. Sin embargo al analizar cada efecto por separado se encuentra diferencia para los factores B y C, lo cual denota que al modificar los niveles de estos factores el porcentaje de nitrógeno se verá influenciado notablemente.

Las interacciones: AB, AC y BC presentan diferencia estadística significativa, esto indica que cada factor (método de obtención, presencia de agente reductor y tiempo de desacetilación) se ve influenciado por el otro al variar sus niveles.

Bibliográficamente se reporta que el nitrógeno queda en el quitosano contenido en el grupo amino (-NH₂) [43] y al alcanzar un porcentaje de 8.44%, indica una buena remoción de grupos acetilo, mediante el proceso de desacetilación. Esto señala que el polímero que llega a estar totalmente desacetilado presenta un valor del 8.695% y se denomina quitano [21,33].

Por tanto, en este caso interesa obtener un alto porcentaje de nitrógeno cercano al 8.695%. Analizando el Gráfico B-9, se establece como niveles óptimos para obtener un alto porcentaje de nitrógeno, la presencia de agente reductor y a 4 horas de desacetilación, en el caso del Factor A, al no presentar diferencia significativa se podrá trabajar con cualquiera de los niveles planteados en el estudio, por lo tanto los mejores tratamientos serán a₀b₁c₁, a₁b₁c₁ esto es comprable con los datos reportados en la Tabla B-10.

Entonces, se puede decir que, los mejores tratamientos determinados para esta prueba cumplen con las características de quitosano.

4.1.6. Grado de Desacetilación

La desacetilación es el proceso en el que la quitina se convierte en quitosano tras la extracción de los grupos acetilos, dejando únicamente grupos amino libres (-NH₂). La aplicación del quitosano a nivel industrial depende principalmente del alto grado de reactividad de estos grupos [43].

Se reporta que los valores para el grado de desacetilación, pueden variar conforme el método empleado y limitar el rango del grado de desacetilación en el cual son aplicables, por lo cual es necesario mencionar los métodos utilizados para el estudio [23].

En este trabajo se estudió el grado de desacetilación (DD) por tres métodos: en base al contenido de nitrógeno en el quitosano, aplicando la Ec (10) reportada en Arancibia y Almeida [19], en base al análisis por espectroscopia

infrarroja con la Ec (11) reportada en Khan et al [23] y en base al análisis por valoración titrimétrica con bromuro de hidrógeno. Además se involucró tres factores de estudio con la finalidad encontrar la tecnológica óptima que genere un producto de alto grado de desacetilación.

Bibliográficamente se reporta al quitosano con grado de desacetilación de 70-100%, 85-98% [13]; 87-98% [40].

4.1.6.1 Método por determinación del porcentaje de nitrógeno.

Los resultados de la determinación del grado de desacetilación (DD), se reportan en la Tabla A- 7.

El análisis de varianza, reportado en la Tabla B-11, señala que no existe diferencia significativa entre la interacción de los factores. Sin embargo, al analizar cada efecto por separado, se puede decir que únicamente el factor A (método de obtención) no presenta diferencia estadística significativa, mientras que los Factores B y C (agente reductor y tiempo de desacetilación) respectivamente si presenta diferencia trabajando con un $\alpha=0.05$. Esto indica que se puede trabajar con cualquier nivel del factor A, no así para el caso de los Factores B y C donde la variación de los niveles de cada factor influenciará notablemente en el grado de desacetilación.

Las interacciones: AB, AC y BC presentan diferencia significativa entre factores, esto indica que cada factor se ve influenciado por el otro al variar sus niveles.

El proceso de desacetilación involucra la remoción de los grupos acetilo de la estructura molecular de la quitina hasta dejar únicamente grupos amino ($-NH_2$) [13], la versatilidad del quitosano depende principalmente del alto grado de reactividad de los grupos amino. Es por ello que se busca obtener un mayor grado de desacetilación [33].

Analizando el Diagrama B-11, se obtiene que los mejores niveles para obtener un alto grado de desacetilación será en presencia de agente reductor y 4 horas de desacetilación, en el caso del Factor A, al no presentar diferencia significativa se podrá trabajar con cualquiera de los niveles planteados en el estudio, por lo tanto los mejores tratamientos serán $a_0b_1c_1$ y $a_1b_1c_1$, esto es comprable con los datos reportados en la Tabla B-12.

Al tener los mejores tratamientos un grado de desacetilación del 80.90%, es un indicativo que el método desarrollado es efectivo para conferirle al quitosano mejores características y similares a las de grado comercial reportados bibliográficamente.

4.1.6.2. Método por Espectroscopia Infrarrojo

Los resultados de la determinación del grado de desacetilación (DD), se reportan en la Tabla A- 8.

En la Tabla B-13, indica que la interacción de los factores en estudio no presenta diferencia estadística significativa, por lo tanto no existe influencia entre sí para los tres factores. Sin embargo, al analizar los efectos de manera individual, se encuentra que los factores B y C actúan sobre el grado de desacetilación al variar sus niveles, no así para el factor A que no presenta diferencia significativa y se podrá trabajar con cualquier nivel propuesto en el estudio porque no influenciará la respuesta experimental.

Las interacciones: AC y BC presentan diferencia significativa entre factores, esto indica que existe interacción entre factores, mientras que el factor AB no presenta estadísticamente diferencia con un $\alpha=0.05$.

Se mencionó anteriormente que el proceso de desacetilación involucra la remoción de los grupos acetilo de la estructura molecular de la quitina hasta dejar únicamente grupos amino ($-NH_2$) [13], es por ello que, un alto grado de desacetilación es un indicativo que el proceso se ha efectuado eficazmente.

Analizando el Diagrama B-13, se obtiene que los mejores niveles para obtener un alto grado de desacetilación será con agente reductor y 4 horas de desacetilación, en el caso del Factor A al no presentar diferencia significativa se podrá trabajar con cualquiera de los niveles planteados en el estudio, por la tanto los mejores tratamientos serán $a_0b_1c_1$ y $a_1b_1c_1$, esto es comparable con los datos reportados en la Tabla B-14.

Al tener los mejores tratamientos un grado de desacetilación de 70.24% es un indicativo que el método desarrollado es efectivo para conferirle al quitosano características similares a las de grado comercial reportados bibliográficamente.

4.1.6.2. Método por análisis titrimétrico con bromuro de hidrógeno

En la Tabla A- 9 se reportan los datos del grado de desacetilación en base al análisis titrimétrico con bromuro de hidrógeno. Sin embargo los valores obtenidos son incoherentes y difieren altamente con los valores reportados bibliográficamente.

Existen reportes de las limitaciones que presenta el método por valoración titrimétrica debido a la influencia del contenido de humedad y cenizas, las cuales deben ser considerados al momento del análisis. Las muestras de quitosano no deben superar el 15% de humedad y el 1% en contenido de cenizas. Por tanto se deberán hacer correcciones en base a estos factores en la masa del polímero ya que los pre-tratamientos a las muestras no son factibles. [44]

Además algunas muestras pueden contener exceso de ácido como residuo del proceso de obtención de la sal de quitosano, lo que genera en la solución un carácter ácido que es neutralizado por el NaOH (titulante), por esto es aconsejable un constate monitoreo en el proceso de obtención de la sal de quitosano. Siendo este el caso, el proceso resulta en una curva de titración con dos puntos de inflexión: el primero corresponde al exceso de

ácido en la solución y el segundo a la protonación del quitosano. La diferencia entre estos dos puntos de inflexión difiere las moles de H^+ requeridas para la protonación de los grupos aminos libres y este a su vez en la determinación de las moles de glucosamina que contiene el polímero [44].

En el proceso de obtención de la sal de quitosano del análisis titrimétrico no se logró alcanzar un pH cercano a la neutralidad, por lo que las limitaciones del análisis reportadas por Baláz y Pál aplican para este caso. [44].

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- 5.1.1. La investigación estableció tres factores principales de estudio: método de obtención, adición de agente reductor y tiempo de desacetilación. La adición del agente reductor en la etapa de desacetilación del proceso, fue el factor de mayor interés en el estudio, con el cual se obtuvo un quitosano de características químicas y físicas cercanas a los rangos reportados bibliográficamente en cada parámetro. Los resultados globales sugieren trabajar con un método directo de obtención y un tiempo de 4 horas de desacetilación sin ser relevante la presencia de NaBH_4 como agente reductor.
- 5.1.2. En la determinación del contenido de cenizas, los resultados indican que el mejor tratamiento de este estudio es la combinación de método indirecto de obtención, presencia de NaBH_4 como agente reductor y 4 horas en el proceso de desacetilación. Se demuestra que el agente reductor disminuye el contenido de cenizas en el quitosano obtenido.
- 5.1.3. En la determinación del grado desacetilación, los resultados demuestran que este parámetro es altamente afectado por el método analítico empleado para su determinación. Sin embargo los

métodos en conjunto señalan que el grado de desacetilación es influenciado por la presencia de agente reductor y tiempo de desacetilación. Se puede decir entonces, la adición de agente reductor aumentó el grado de desacetilación de las muestras en estudio.

5.1.4. En la determinación del peso molecular viscosimétrico, los resultados indican que este parámetro es altamente afectado por el método de obtención y tiempo de desacetilación. El método directo se determinó como mejor método de obtención, con lo cual se comprueba lo reportado por Alvarado et al 2005, en el caso del agente reductor no se pudo ver un efecto marcante entre los tratamientos y se sugiere trabajar con 4 horas de desacetilación.

5.1.5. Los resultados de la determinación de humedad en los tratamientos en estudio revelan que este parámetro puede ser influenciado por el método de obtención y presencia de agente reductor, en cuanto al tiempo de desacetilación se comprueba que no afecta significativamente el porcentaje de humedad. Por tanto, el mejor tratamiento para este parámetro lo constituye un método indirecto, presencia de agente reductor y 4 horas de desacetilación.

5.1.6. En el índice de blancura los resultados demuestran que el agente reductor no tiene influencia relevante en esta respuesta experimental, siendo el método de obtención y el tiempo de desacetilación los factores que determinen el mayor índice de blancura. Los mejores niveles de cada factor son el método de obtención indirecto y 4 horas de tiempo de desacetilación.

5.1.7. La adición de Tetrahidruro de Boro y Sodio (NaBH_4) como agente reductor en el proceso de desacetilación, permitió obtener como producto final un quitosano de características similares a las reportadas por las casas comerciales, constituyéndose una variante en los métodos de obtención ya reportados. Sin embargo su baja actividad no justifica su empleo, ya que todos los

tratamientos propuestos presentan características similares en presencia o ausencia de agente reductor, por tanto se rechaza la hipótesis nula propuesta para la presente investigación.

5.1.8. En la investigación desarrollada, no se empleó un reactor cerrado para la obtención de quitosano en presencia de agente reductor, como lo sugiere la literatura, por tanto puede ser éste el factor principal al que se debe la escasa actividad que presentó el agente reductor en la mejora de las características físico-químicas del polímero.

5.2. Recomendaciones

5.2.1. La literatura en general, propone diversos métodos químicos para la obtención de quitosano, la cual se basa en una desproteización alcalina y una desmineralización ácida para obtener como producto final el polímero. Sin embargo, debería prestarse atención al desarrollo de nuevas tecnologías más amigables con el medio ambiente que involucre menos productos químicos en el proceso. Actualmente existen reportes alentadores de la obtención de quitosano a partir de enzimas encargadas de realizar el proceso de desacetilación en la obtención de quitosano, pero tan solo trabajan con el 30% de efectividad, por lo que convendría buscar nuevos catalizadores biológicos con mayor actividad a los ya reportados.

5.2.2. En el presente estudio se trabajó con Tetrahidruro de Boro y Sodio (NaBH_4) como agente reductor químico, el cual fue adicionado en el proceso de desacetilación de la obtención del quitosano. Sin embargo sería importante señalar, la utilización de otros agentes reductores químicos para probar los efectos que generaría en el quitosano, en base a la determinación de las características físico químicas.

- 5.2.3. Es importante señalar que en futuras investigaciones de obtención de quitosano en presencia de agente reductor se trabaje en un reactor cerrado, para evidenciar la actividad que podría generar en el quitosano.
- 5.2.4. La literatura reporta grandes limitaciones en el método de valoración titrimétrica empleada para determinar el grado de desacetilación de quitosano, por esto es recomendable seguir el método de análisis rigurosamente en las condiciones en las que se señalan, para obtener datos confiables que permitan la caracterización del quitosano.
- 5.2.5. En el proceso de obtención de quitosano, se generan una cantidad considerable de desperdicios como proteína, grasas y pigmentos como residuo en la etapa de desproteinización, donde se induce una hidrólisis alcalina en la estructura de la matriz y hace solubles dichos residuos, razón por la cual sería importante desarrollar una tecnología para la recuperación de estos, lo que representaría un aporte valioso en el fortalecimiento y enriquecimiento de la alimentación animal.
- 5.2.6. El mejor quitosano obtenido en la presente investigación podría ser objeto de futuras investigaciones para aportar en el desarrollo de nuevas tecnologías sostenibles como es el caso del tratamiento de aguas residuales, constituyendo una variante de sustitución total o parcial de los métodos actualmente desarrollados.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos

- **Título:** Análisis del grado de desacetilación por espectroscopia infrarroja.
- **Unidad Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- **Beneficiario:** Estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
- **Director del Proyecto:** Dr. Roman Rodríguez.
- **Personal Operativo:** Egda. Liliana Lalaleo.
- **Tiempo de Duración:** 6 meses.
- **Lugar de Ejecución:** Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- **Costo:** 41000 \$.

6.2. Antecedentes de la propuesta

El proceso de desacetilación involucra la remoción de los grupos acetil de la cadena polimérica, dejando solo los grupos amino (-NH₂). Tanto la composición de las cadenas de estos polímeros como sus dimensiones suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del

método de obtención, por lo que la determinación del grado de acetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de estos polisacáridos, ya que ambas tienen una gran incidencia en sus propiedades [20].

Se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación de estos polímeros basados en diversas técnicas, entre las que se pueden mencionar la espectroscopia infrarroja, espectroscopia RMN de protón, la potenciometría y la espectroscopia UV primera derivada [35].

Khan et al. reporta la variación en el grado de desacetilación según el método empleado para el análisis. Por esto es necesario especificar el método para la determinación de este parámetro en el producto final obtenido [23].

Entre estas metodologías, la ventaja que presenta la espectroscopia infrarroja es que es un método rápido, no requiere soluciones acuosas y es insensible a las impurezas orgánicas e inorgánicas. Sin embargo algunos errores sistemáticos que se comenten en este análisis es la arbitrariedad en la definición de la línea base [44].

Por esto se pretende buscar la línea base que se ajusta mejor en los espectros obtenidos. Las bandas características que se presentan en la mayor parte de espectros de muestra de quitosano son a 3450 cm^{-1} (tensión del grupo -OH), 3292 cm^{-1} (tensión del grupo N-H), 2919 y 2862 cm^{-1} (tensión del grupo C-H), 1655 cm^{-1} (Amida I), 1580 cm^{-1} (doblaje del grupo -NH₂), 1313 cm^{-1} (Amida III), 1154 cm^{-1} (tensión antisimétrica del puente C-O-C) [20].

6.3. Justificación

En los últimos años varias investigaciones realizadas reportan diversos métodos para el análisis del grado de desacetilación del quitosano. Sin embargo los resultados obtenidos varían entre método y método, por lo que se podrá pensar en la aplicación de un método confiable para la caracterización del quitosano a partir del grado de desacetilación que presenta.

La importancia de este estudio radica en la necesidad de establecer un método analítico confiable y económico en lo relacionado a la determinación del grado de desacetilación mediante el análisis por espectroscopia infrarroja, como parámetro de control de la calidad del polímero. La obtención de quitosano involucra varios procesos químicos como desproteización, desmineralización, decoloración y desacetilación, por tanto las características físico-químicas del quitosano pueden ser enormemente afectadas por el método de obtención, materia prima empleada y métodos de análisis.

Además, este estudio proporcionará importante información en el sector científico en la búsqueda de métodos eficaces de caracterización del polímero en cuando a la valoración del grado de desacetilación.

6.4. Objetivos

General

- Estudiar el grado de desacetilación del quitosano en base al análisis por espectroscopia infrarrojo.

Específicos

- Determinar la mejor línea base para la determinación del grado de desacetilación del quitosano.
- Comparar los resultados obtenidos del grado de desacetilación en base a al análisis por espectroscopia infrarrojo frente a los análisis por titulación volumétrica y determinación de nitrógeno.
- Establecer el método más efectivo en la determinación del grado de desacetilación en base a criterios como rentabilidad y confiabilidad de datos.

6.5. Análisis de Factibilidad

El estudio ha desarrollarse es de tipo investigativo y tecnológico, ya que con ello se puede implementar un método confiable para caracterizar al quitosano en base a la determinación del grado de desacetilación del polímero.

El análisis de factibilidad además es de carácter económico, ya que se podrá valorar el grado de desacetilación del quitosano mediante el análisis por espectroscopia infrarrojo, constituyendo un aporte valioso para la evaluación de la calidad del polímero y emitir criterios de rentabilidad con respecto a la materia prima y procesos de obtención los cuales son determinantes en la calidad del polímero obtenido.

Al conocer la calidad del quitosano, este se constituye en una excelente alternativa de futuras investigaciones y además se podrá pensar en la producción a nivel industrial apoyados de métodos eficaces, confiables

y económicos de caracterización que aseguren una buena calidad y línea de proceso, generando mercados potenciales.

Tabla Nº 7 . Valores Económicos de la Propuesta

RECURSOS HUMANOS	UTA	GRADUANDO
Tutor	1800	0
Graduando		
RECURSOS FÍSICOS		
Materia Prima	50	
Equipos	40000	
Reactivos	1000	
Material de Escritorio		25
RECURSOS ECONÓMICOS		
Transporte		50
Imprevistos		50
Publicaciones		100
Subtotal	42850	225
	TOTAL	43075

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

6.6. Fundamentación

Las propiedades del quitosano son en gran parte afectadas por el grado de desacetilación (D.D) que presenta, el cual es uno de los parámetros básicos estructurales del polímero. La propuesta de la presente investigación se fundamenta en emplear el mejor método de análisis para determinar el grado de desacetilación del quitosano, ya que al ser una variante de investigación aplicada, la falta de atención en el empleo de métodos eficaces que proporcionan resultados confiables provocaría un estancamiento del control de la calidad del polímero obtenido, impidiendo optimizar sus aplicaciones en diversas áreas.

Se reportan varias metodologías para la determinación del grado de desacetilación con quitosano, entre las cuales se encuentran: análisis titrimétrico con bromuro de hidrógeno, espectroscopia infrarroja, espectrofotometría UV entre otras [36]. Algunos autores señalan que el grado de desacetilación varía según el método de análisis empleado para la determinación [23].

Los instrumentos empleados para llevar a cabo algunos de estos análisis poseen grandes limitantes y son costosos. Sin embargo uno de los métodos más recomendados es el análisis por espectroscopia infrarroja, el cual es accesible, rápido y se puede usar muestras sólidas directamente [36].

El método IR consiste en correlacionar la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas con el tanto por ciento de acetilación del quitosano [20]. El método de Baxter y col.[33] ha sido usado con frecuencia en la literatura. En éste, el grado de N-acetilación se calcula por la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115$$

donde A_{1655} y A_{3450} son las absorbancias del pico correspondiente al banda amida I y de la banda tomada como referencia, respectivamente.

6.7. Metodología. Modelo Operativo

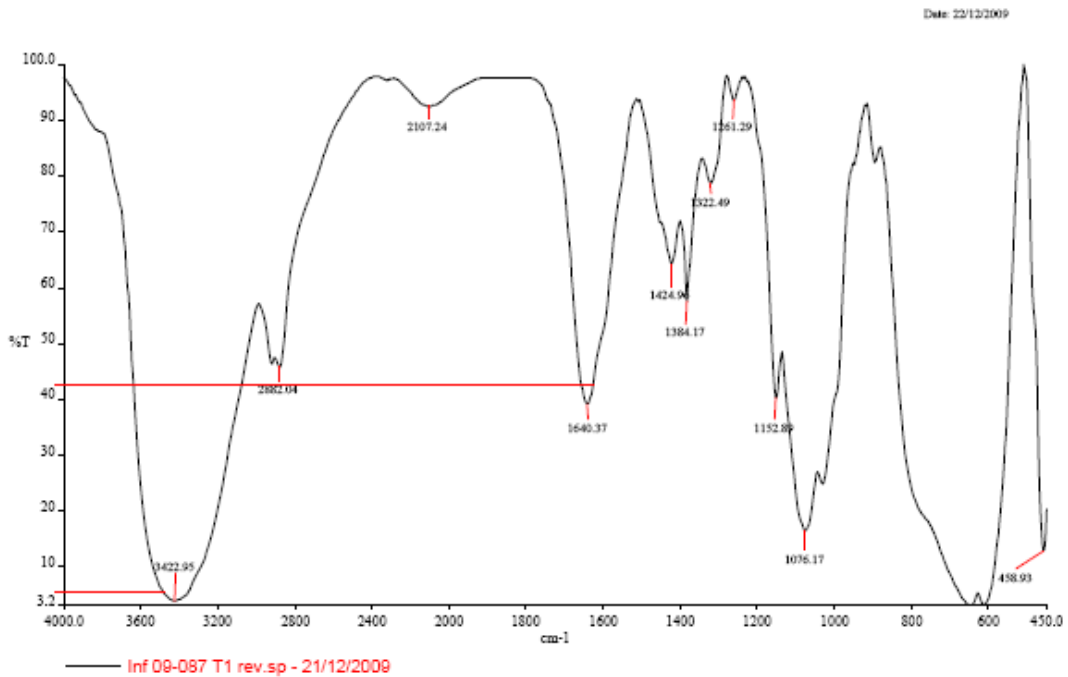
Para la aplicabilidad del quitosano en el tratamiento de aguas residuales se seguirá el siguiente modelo operativo:

Tabla Nº 8. Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Análisis del grado de desacetilación por espectroscopia infrarroja.	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 300	3 meses
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta.	Pruebas Preliminares de la determinación del grado de desacetilación del quitosano por espectroscopia infrarroja.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 500	1 mes
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Aplicación del método de espectroscopia infrarroja para determinar el grado de desacetilación	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 700	1 mes
4. Evaluación de la propuesta	Comprobación de la funcionalidad del quitosano.	Comprobación del grado de desacetilación con otros métodos propuestos.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 200	1 meses

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

El modelo de cálculo del grado de desacetilación en base al análisis por espectroscopia infrarroja, se presenta a continuación:



$$A = -\log T$$

Línea base (3450): 4.2 %T = 0.042 \rightarrow 0.9078 A

Línea base (1655): 39 %T = 0.390 \rightarrow 0.4073 A

- **Cálculo del grado de desacetilación**

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) * 100 / 1.33]$$

$$DD = 100 - [(0.9078 / 0.4073) * 100 / 1.33]$$

$$DD = 66.25\%$$

6.8. Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Dr. Roman Rodríguez y Egda. Liliana Lalaleo.

Tabla N°9. Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Análisis del grado de desacetilación por espectroscopia infrarroja	Aplicación de métodos costosos y con grandes limitantes, que proporcionan datos pocos confiables en la determinación del grado de desacetilación.	Datos confiables del grado de desacetilación del polímero. Optimización de las aplicaciones del quitosano en diversas áreas.	Determinar el grado de desacetilación del quitosano. Realizar análisis comparativos del grado de desacetilación del quitosano con otros métodos reportados. Establecer la mejor línea base para la determinación del grado de desacetilación por espectroscopia infrarroja.	Investigador: Dr. Roman Rodríguez, Liliana Lalaleo.

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

6.9. Previsión de la Evaluación

Tabla N° 10. Previsión de la Evaluación

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	- Sector Científico.
¿Por qué evaluar?	- Determinación de métodos confiables y económicos en la determinación del grado de desacetilación.
¿Para qué evaluar?	- Control de la calidad del polímero mediante un método confiable de análisis. - Optimización en las aplicaciones del quitosano.
¿Qué evaluar?	- Tecnología utilizada. - Materias primas. - Resultados obtenidos
¿Quién evalúa?	- Director del proyecto - Tutor - Calificadores
¿Cuándo evaluar?	- Todo el tiempo desde las pruebas preliminares, hasta los análisis finales de comparación de resultados.
¿Cómo evaluar?	- Mediante instrumentos de evaluación.
¿Con qué evaluar?	- Experimentación. - Normas establecidas

Elaborado por: Liliana Lalaleo.

Bibliografía

- [1]. **No HK, Meyers SP. 1995.**
Preparation and characterization of chitin and chitosan review.
J Aquat Food Prod Technol 4(2):27–52
- [2]. **Hirano S, Itakura C, Seino H, Akiyama Y, Nonaka I, Kanbara N, Kawakami T.1990.**
Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds.
J Agric Food Chem 38(5):1214–7.
- [3]. **Zivanovic S, CHI S, Draughon AF.2005.**
Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils.
J. Food Science .Vol. 70, Nr. 1. M45.
- [4]. **Sagoo S, Board R, Roller S. 2002.**
Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products.
FoodMicrobiol 19:175–82.
- [5]. **Shrimp: the Most Important Commodity of the Sector. 2007.**
*SeaFood Russia.*12-15.
- [6]. **Bravo E. 2003.**
La Industria camaronera en Ecuador.
Acción Ecológica 1-11.
Accedido el 15.05.2009. de:
<http://edualter.org/material/sobirania/enlace7.pdf>
- [7]. **Centro de Producción más limpia de Nicaragua y El Salvador, Park Environmental. 2008.**
Manual de buenas prácticas operativas de producción mas limpia para procesadoras de camarón.3-31.
Accedido el 20.05.09. de:
<http://p2pays.org/ref/40/39948.pdf>
- [8] **Schinitman Norberto. 2003**
Normas ISO 14000, , Ambiente y Sociedad
Accedido el 22.05.2009. de:
http://iso.org/iso/en/pdf.iso900014000/articles/pdf/viewpoint_2-01

- [9]. **Lemus J. F., Martínez L., Navarro M.A. y Posadas A. 2007.**
Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón.
Boletín Electrónico No. 07.1-13.
- [10]. **Lárez Velásquez C.2003.**
Algunos usos del quitosano en Sistemas Acuicos.
Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 4(2) 91-96.
- [11]. **Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C., Pan, C.L., 2002.**
Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation.
Fish. Sci. 68, 170–177.
- [12]. **Parada L.G., Crespín G. D., Miranda R. y Katime I. 2004.**
Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica.
Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 5(1) 2-7.
- [13]. **Alvarado J., Almeida A., Arancibia M., Aparecida de Carvalho R., Sobral P., Habitante M., Monterrey-Quintero E. y Sereno A. 2007.**
Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables.
Afinidad. 64 (531), 605-611.
- [14]. **Lárez, V. C. 2006.**
Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y futuro.
Avances en Química,1(2), 15-21.
- [15]. **Lárez V. C. 2007.**
Algunos usos del Quitosano en Sistemas Acuicos.
Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 4(2),91.
- [16]. **Hernandez O., Holmes S. 2008.**
Novel and modified materials for wastewater treatment applications,
Journal of Materials Chemistry.DOI: 10.1039/b716941h.
- [17]. **Lemus J.F., Martínez L., Navarro M.A. y Posadas A. 2007.**
Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón.
Boletín Electrónico No. 07.1-13.

- [18]. **Kafetzopoulos D., Martinou A. and Bouriotis V.1993.**
Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*.
Applied Biological Sciences Vol. 90, pp. 2564-2568.
- [19]. **Arancibia Mirari y Almeida Alba. 2005**
Desarrollo de Tecnología para la Obtención de quitina y quitosano a partir de caparazón de camarón (*Penaeus vannamei*)
Tesis de Grado. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
- [20]. **Peniche C.A. 2006.**
Estudio sobre la quitina y quitosana.
Universidad de La Habana. Trabajo de doctorado.3-15.
- [21]. **Luna J ., Di Bernardo M., García M., Yáñez R., Mejias R., Morales A., Rodríguez L., Ovalles F. 2003.**
Uso de glucosa como agente reductor en la determinación semicuantitativa de paraquat en orina.
Revista de toxicología. 1-30
- [22]. **Ministerio de Sanidad y Consumo. 2008.**
Control de Calidad.
Accedido el 01.06.09. de:
www.agemed.es/actividad/sglInspeccion/docs/09-capitulo6.pdf
- [23]. **Khan T. Peh k. Ch'ng H. 2002.**
Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods.
J Pharm Pharmaceut 5(3):205-212.
- [24]. **Peniche, C. and W. Argüelles-Monal,. 2001.**
Chitosan based polyelectrolyte complexes.
Macromol. Symposia, 168. 103-116.
- [25]. **Bernabé P., Peniche C., Argüelles-Monal W. 2005.**
Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking.
Polymer Bulletin. 55, 367–375.
- [26]. **Sun J, Chen J., Yang L., Wang S., Li Z. and Wu H. 2007.**
Synthesis and characterization of a pH-sensitive hidrogel made of pyruvic-acid-modified chitosan.
J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 18, No. 1, pp. 35–44.

- [27]. **Espinosa B., Argüelles W., Hernández J., Higuera I., Félix L., Campa A., Díaz E. y Goycoolea-F.**
Hidrogel de quitosano impreso molecularmente con capacidad de reconocimiento selectivo para bifenilos policlorinados (BPCs).
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD).
- [28] **Palanisamy K. 2005.**
Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal.
Electronic Journal of Biotechnology Vol.8 No.1. ISSN: 0717-3458.
- [29]. **Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, D.J., 2004.**
Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables.
Food Microbiology 21, 703–714.
- [30]. **Colorimetría. 2008.**
Accedido el 20/02/10 en:
www.gusgsm.com/book/export/html/428.
- [31]. **Cocoletzi Hernández, Águila O., Flores Agustin, E.L. Viveros Nava, E. Ramos Cassellis. 2009.**
Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón.
Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Superficies y Vacío 22(3) 57-60.
- [32]. **Soro Guevara Luis. 2007.**
Estudio de la Obtención de Quitosano a partir de caparazón de camarón y su estabilidad de una emulsión aceite-agua.
Tesis de Grado. Escuela Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica en Ciencias de la Producción.
- [33]. **Baxter Alasdair, Dillon Michael, Taylor K. D. 1991.**
Improved method for i.r. determination of the degree of Noacetylation of chitosan.
Int. J. Biol. Macromol., 1992, Vol. 14, June.
- [34]. **Roblejo P. Liuver A. 2009.**
Evaluación de la aplicación de coberturas de quitosana en la conservación de tomates.
Trabajo de Tesis. La Habana.

- [35] **Trang Si Trung, Wah Wah Thein-Han, Nguyen Thi Qui, Chuen-How Ng y Stevens Willem F. 2003.**
Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation.
Journal of Materials Chemistry.DOI: 10.1039/b716941h.
- [36]. **Dong Yanming , Congyi Xu, Wang Jianwei, Wang Mian, Wu Yusong y Ruan Yonghong. 2000.**
Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra.
Macromol. Symposia, 20. 103-116.
- [37]. **Positivismo y Neopositivismo**
Accedido el 01.02.10 de:
<http://revistas.ucm.es/fsl/15756866/articulos/ASEM9191110143A>.
- [38]. **La Corriente Positivista y su Influencia en la Ciencia**
Accedido el 01/02/10 de:
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/257/25700505>.
- [39]. **Lastivida. Centro de Información Técnica – CIT. 2009.**
Boletín Técnico Informativo N° 25.
Accedido el 20/02/10 en:
Plásticos Biodegradables, ¿qué son? y su relación con los RSU
- [40].**Guinama. Productos distribuidos por Guinama S.L.**
Quitosano caracterizado obtenido en el camarón.
Accedido el 20/02/10 en:
http://guinama.com/documentos/quitosano_caracterizado.
- [41]. **Colorimetría. 2008.**
Accedido en 08/01/10 en:
www-jrad/document/color/colorimetría
- [42]. **Espectro de Colores. Sistema CIELab**
Accedido en 03/12/09 en :
www.colormodels.com/imatges/cielab_cat.jpg
- [43]. **Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico, Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria, Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación , EuskoJaurlaritza - Gobierno Vasco. 2007.**

Desarrollo de materiales antimicrobianos de base biopolimérica para mejorar la conservación y seguridad de alimentos mínimamente procesados.

Accedido en 08/01/10 en:

<http://nasdap.ejgv.euskadi.net/r50-3813/es/.../POLNATII>.

- [44]. **Balázs Nándor and Pál Sipos. 2006.**
Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan
Carbohydrate Research 342 (2007) 124–130.
- [45]. **Qin Caiqin, Du Yumin, Zhang Zuqun, Liu Yi, Xiao Ling, Shi Xiaowen. 2003.**
Adsorption of Chromium (VI) on a Novel Quaternized Chitosan Resin.
College of Chemistry and Environmental Science, Wuhan University, 430072 Wuhan, China. Department of Chemistry, Xiaogan University, 432100.
- [46]. **Hernandez Oscar y Holmes Stuart M. 2007.**
Novel and modified materials for wastewater treatment applications.
First published as an Advance Article on the web 22nd February 2008
DOI: 10.1039/b716941h.
- [47]. **Benavente Martha, Sjöörn Anna, Westergren Robin, Moreno Luis y Martínez Joaquín. 2007.**
Biosorción de metales pesados con quitosano
Applied Biological Sciences Vol. 90, pp. 3264-70.

ANEXOS A

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla A-1. Peso viscosimétrico molecular promedio del quitosano

Tratamientos	Peso Molecular (g/mol)		
	R1	R2	Promedio
T1 (a0b0c0)	3,07E+06	2,97E+06	3,02E+06
T2 (a0b0c1)	1,62E+06	1,62E+06	1,62E+06
T3 (a0b1c0)	6,54E+06	4,76E+06	5,65E+06
T4 (a0b1c1)	1,55E+06	1,88E+06	1,71E+06
T5 (a1b0c0)	2,22E+06	2,00E+06	2,11E+06
T6 (a1b0c1)	6,46E+05	7,37E+05	6,91E+05
T7 (a1b1c0)	2,54E+06	1,82E+06	2,18E+06
T8 (a1b1c1)	8,49E+05	8,12E+05	8,31E+05

Factor A: Método de Obtención.
Nivel a₀: Método Indirecto
Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor
Nivel b₀: Sin Agente Reductor.
Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación
Nivel c₀: 2 horas
Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-2. Porcentaje de humedad en el quitosano

Tratamientos	Humedad (%)		
	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	10,58	10,87	10,72
a ₀ b ₀ c ₁	11,99	12,09	12,04
a ₀ b ₁ c ₀	10,61	10,16	10,39
a ₀ b ₁ c ₁	11,38	11,90	11,64
a ₁ b ₀ c ₀	11,63	11,98	11,81
a ₁ b ₀ c ₁	11,30	11,13	11,22
a ₁ b ₁ c ₀	13,81	14,24	14,03
a ₁ b ₁ c ₁	13,61	13,83	13,72

Factor A: Método de Obtención.
Nivel a₀: Método Indirecto
Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor
Nivel b₀: Sin Agente Reductor.
Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación
Nivel c₀: 2 horas
Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-3. Porcentaje de cenizas en el quitosano

Tratamientos	% Cenizas		
	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	0,11	0,11	0,11
a ₀ b ₀ c ₁	0,20	0,20	0,20
a ₀ b ₁ c ₀	0,14	0,15	0,15
a ₀ b ₁ c ₁	0,11	0,13	0,12
a ₁ b ₀ c ₀	0,19	0,20	0,20
a ₁ b ₀ c ₁	0,19	0,20	0,19
a ₁ b ₁ c ₀	0,16	0,18	0,17
a ₁ b ₁ c ₁	0,14	0,14	0,14

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-4. Índice de blancura (Sistema CIELAB)

Tratamientos	L			a			b			WI		
	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	74	75	74,5	5	5	5	10	10	10	71,70	72,61	72,16
a ₀ b ₀ c ₁	93	96	94,5	5	3	4	7	6	6,5	88,91	92,19	90,55
a ₀ b ₁ c ₀	83	80	81,5	3	3	3	4	4	4	82,28	79,38	80,83
a ₀ b ₁ c ₁	83	81	82	1	2	1,5	4	1	2,5	82,51	80,87	81,69
a ₁ b ₀ c ₀	89	86	87,5	4	3	3,5	2	11	6,5	88,13	81,94	85,04
a ₁ b ₀ c ₁	89	94	91,5	2	2	2	2	6	4	88,64	91,28	89,96
a ₁ b ₁ c ₀	82	81	81,5	7	5	6	5	10	7,5	80,05	77,95	79,00
a ₁ b ₁ c ₁	91	89	90	8	6	7	18	16	17	78,34	79,68	79,01

Factor A: Método de Obtención.
Nivel a₀: Método Indirecto
Nivel a₁: Método Directo

L 0 a 100 0(negro) / 100(blanco)
a -120 a +120 verde (-) / rojo (+)
b -120 a +120 azul (+) / amarillo (+)

Factor B: Agente Reductor
Nivel b₀: Sin Agente Reductor.
Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación
Nivel c₀: 2 horas
Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-5 .Espectros de color (Adobe Photoshop)

Tratamientos	R			G			B		
	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	198	198	198	179	180	179,5	134	166	150
a ₀ b ₀ c ₁	249	254	251,5	232	241	236,5	223	231	227
a ₀ b ₁ c ₀	210	208	209	206	197	201,5	200	192	196
a ₀ b ₁ c ₁	211	207	209	207	200	203,5	201	199	200
a ₁ b ₀ c ₀	243	226	234,5	221	212	216,5	186	194	190
a ₁ b ₀ c ₁	227	246	236,5	221	237	229	219	226	222,5
a ₁ b ₁ c ₀	219	215	217	199	197	198	194	182	188
a ₁ b ₁ c ₁	254	244	249	223	219	221	194	193	193,5

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

L 0 a 100

a -120 a +120

b -120 a +120

0(negro) / 100(blanco)

verde (-) / rojo (+)

azul (+) / amarillo (+)

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-6. Porcentaje de nitrógeno en el quitosano.

Tratamientos	% Nitrógeno		
	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	8,32	8,30	8,31
a ₀ b ₀ c ₁	8,39	8,39	8,39
a ₀ b ₁ c ₀	8,41	8,40	8,40
a ₀ b ₁ c ₁	8,44	8,44	8,44
a ₁ b ₀ c ₀	8,31	8,28	8,30
a ₁ b ₀ c ₁	8,44	8,45	8,44
a ₁ b ₁ c ₀	8,38	8,37	8,38
a ₁ b ₁ c ₁	8,44	8,44	8,44

Factor A: Método de Obtención.
Nivel a₀: Método Indirecto
Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor
Nivel b₀: Sin Agente Reductor.
Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación
Nivel c₀: 2 horas
Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-7. Grado de desacetilación del quitosano, en base al contenido de nitrógeno.

Tratamientos	% Desacetilación		
	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	79,35	77,89	78,62
a ₀ b ₀ c ₁	83,22	82,97	83,09
a ₀ b ₁ c ₀	83,86	83,51	83,69
a ₀ b ₁ c ₁	85,80	86,01	85,91
a ₁ b ₀ c ₀	78,70	77,1	77,90
a ₁ b ₀ c ₁	85,80	86,3	85,05
a ₁ b ₁ c ₀	82,57	82	82,29
a ₁ b ₁ c ₁	85,80	86	85,90

Factor A: Método de Obtención.
Nivel a₀: Método Indirecto
Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor
Nivel b₀: Sin Agente Reductor.
Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación
Nivel c₀: 2 horas
Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-8. Grado de desacetilación del quitosano, en base al análisis por espectroscopía infrarroja.

Tratamiento	% Desacetilación		
	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	66,25	65,98	66,115
a ₀ b ₀ c ₁	69,37	69,01	69,19
a ₀ b ₁ c ₀	71,41	73,22	72,315
a ₀ b ₁ c ₁	72,88	75,6	74,24
a ₁ b ₀ c ₀	64,42	62,43	63,425
a ₁ b ₀ c ₁	72,06	75,37	73,715
a ₁ b ₁ c ₀	70,06	73,28	71,67
a ₁ b ₁ c ₁	72,7	75,55	74,125

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

Tabla A-9. Grado de Desacetilación del Quitosano, en base al análisis por titulación volumétrica.

Tratamientos	% Desacetilación		
	R ₁	R ₂	Promedio
a ₀ b ₀ c ₀	66,13	103,06	84,59
a ₀ b ₀ c ₁	12,08	94,46	53,27
a ₀ b ₁ c ₀	32,14	73,43	52,78
a ₀ b ₁ c ₁	13,75	87,25	50,50
a ₁ b ₀ c ₀	40,56	98,64	69,60
a ₁ b ₀ c ₁	54,45	116,65	85,55
a ₁ b ₁ c ₀	27,26	95,04	61,15
a ₁ b ₁ c ₁	22,65	91,44	57,05

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

R₁ y R₂ Réplicas

ANEXOS B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla B-1. Análisis de varianza para el peso molecular viscosimétrico promedio en quitosano.

Fuente de varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Probabilidad
A:Metodo de obtención	9,57887E12	1	9,57887E12	43,00	0,0003*
B:Agente Reductor	2,14191E12	1	2,14191E12	9,62	0,0173*
C:Tiempo de desacetilación	1,63861E13	1	1,63861E13	73,56	0,0001*
AB	1,57873E12	1	1,57873E12	7,09	0,0324*
AC	1,64103E12	1	1,64103E12	7,37	0,0300*
BC	1,51407E12	1	1,51407E12	6,80	0,0351*
ABC	1,69657E12	1	1,69657E12	7,62	0,0281*
blocks	3,69694E11	1	3,69694E11	1,66	0,2386
Total error	1,55925E12	7	2,2275E11		
Total (corr.)	3,64662E13	15			

R-squared = 95,7241 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 91,9827 percent

- Diferencia Estadística Significativa

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-1. Factores principales para el peso molecular viscosimétrico en quitosano.

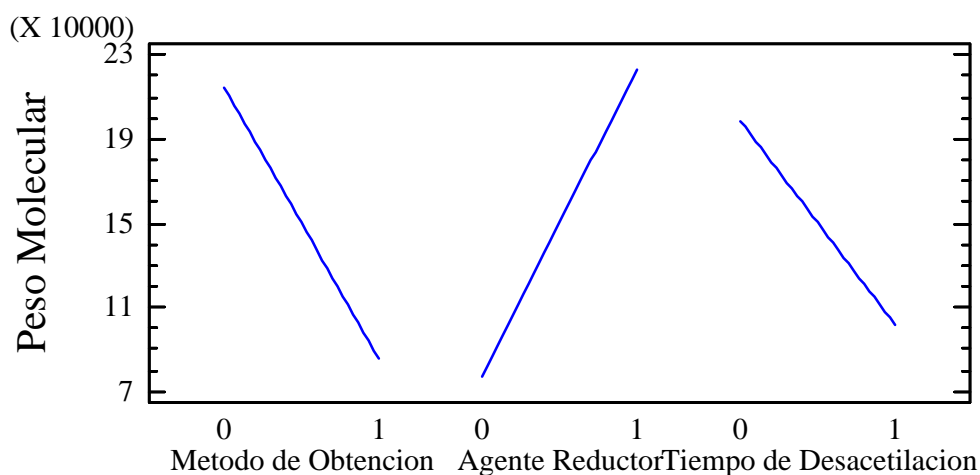


Gráfico B-2. Interacción de factores para el peso molecular viscosimétrico en quitosano.

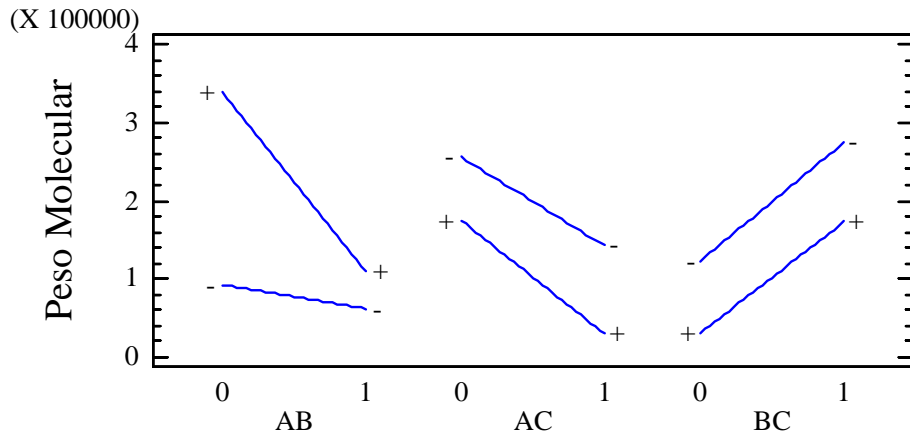


Tabla B-2. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el peso molecular viscosimétrico en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	3,00E+06
a ₁	1,45E+06
Factor B	
b ₀	1,86E+06
b ₁	2,59E+06
Factor C	
c ₀	3,24E+06
c ₁	1,21E+06
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	2,32E+06
a ₀ b ₁	3,68E+06
a ₁ b ₀	1,40E+06
a ₁ b ₁	1,50E+06
AC	
a ₀ c ₀	4,33E+06
a ₀ c ₁	1,67E+06
a ₁ c ₀	2,14E+06
a ₁ c ₁	7,61E+05
BC	
b ₀ c ₀	2,56E+06
b ₀ c ₁	1,16E+06
b ₁ c ₀	3,91E+06
b ₁ c ₁	1,27E+06
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	3,02E+06
a ₀ b ₀ c ₁	1,62E+06
a ₀ b ₁ c ₀	5,65E+06
a ₀ b ₁ c ₁	1,71E+06
a ₁ b ₀ c ₀	2,11E+06
a ₁ b ₀ c ₁	6,91E+05
a ₁ b ₁ c ₀	2,18E+06
a ₁ b ₁ c ₁	8,31E+05

Tabla B-3. Análisis de varianza para el porcentaje de humedad en quitosano.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Probabilidad
A:Método Obtención	8,92516	1	8,92516	168,02	0,0000*
B:Agente Reductor	3,97006	1	3,97006	74,74	0,0001*
C:Tiempo de Desacetilación	0,701406	1	0,701406	13,20	0,0084*
AB	7,46656	1	7,46656	140,56	0,0000*
AC	3,00156	1	3,00156	56,50	0,0001*
BC	0,0126562	1	0,0126562	0,24	0,6404
ABC	0,0297562	1	0,0297562	0,56	0,4786
Réplica	0,104006	1	0,104006	1,96	0,2045
Total error	0,371844	7	0,0531205		
Total (corr.)	24,583	15			

R-squared = 98,4874 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 97,1639 percent

*Diferencia Estadística Significativa

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-3. Factores principales para el porcentaje de humedad en quitosano.

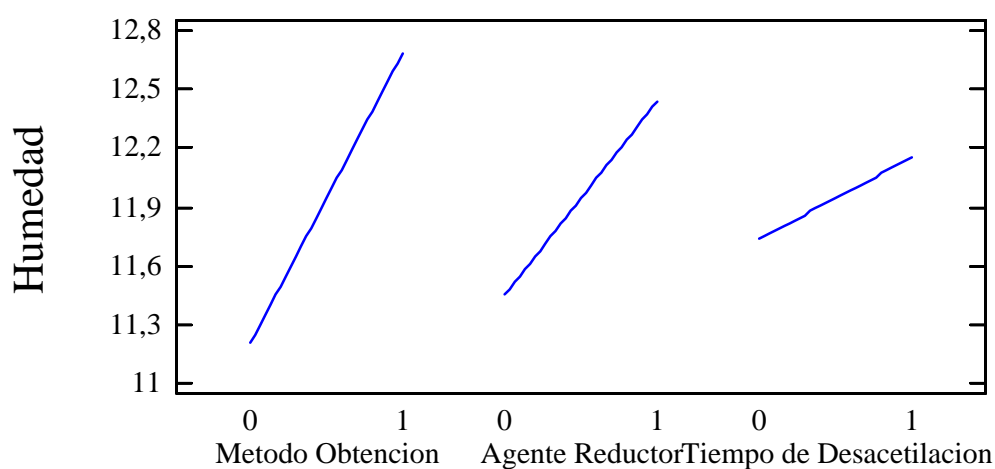


Gráfico B-4. Interacción de factores para el porcentaje de humedad en quitosano

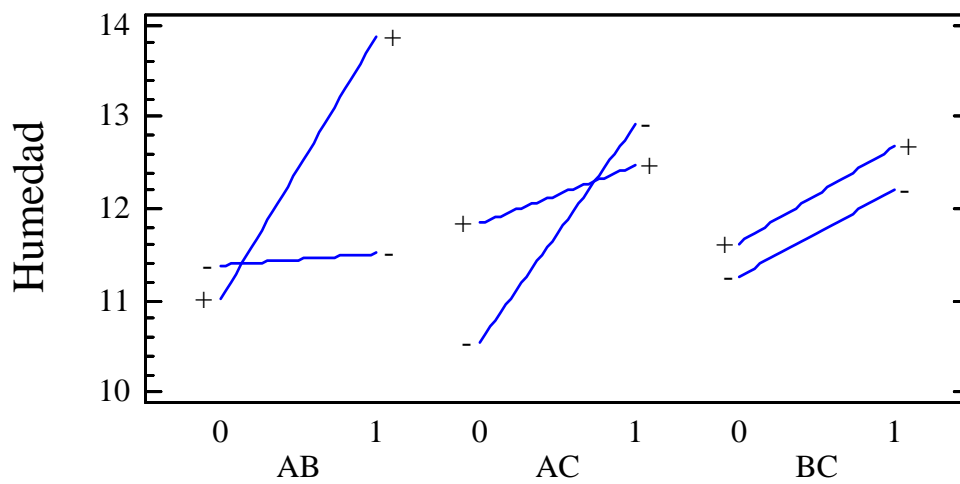


Tabla B-4. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el porcentaje de humedad en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	11,20
a ₁	12,69
Factor B	
b ₀	11,45
b ₁	12,44
Factor C	
c ₀	11,73
c ₁	12,15
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	11,38
a ₀ b ₁	11,01
a ₁ b ₀	11,51
a ₁ b ₁	13,87
AC	
a ₀ c ₀	10,55
a ₀ c ₁	11,84
a ₁ c ₀	12,92
a ₁ c ₁	12,47
BC	
b ₀ c ₀	11,26
b ₀ c ₁	11,63
b ₁ c ₀	12,21
b ₁ c ₁	12,68
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	10,72
a ₀ b ₀ c ₁	12,04
a ₀ b ₁ c ₀	10,39
a ₀ b ₁ c ₁	11,64
a ₁ b ₀ c ₀	11,81
a ₁ b ₀ c ₁	11,22
a ₁ b ₁ c ₀	14,03
a ₁ b ₁ c ₁	13,72

Tabla B-5. Análisis de varianza para porcentaje de ceniza en quitosano.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grado de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de varianza	Probabilidad
A:Método de Obtención	0,00950625	1	0,00950625	122,38	0,0000
B:Agente Reductor	0,00600625	1	0,00600625	77,32	0,0000
C:Tiempo de Desacetilación	0,00015625	1	0,00015625	2,01	0,1991
AB	0,00000625	1	0,00000625	0,08	0,7849
AC	0,00225625	1	0,00225625	29,05	0,0010
BC	0,00855625	1	0,00855625	110,15	0,0000
ABC	0,00075625	1	0,00075625	9,74	0,0168
blocks	0,00030625	1	0,00030625	3,94	0,0875
Total error	0,00054375	7	0,0000776786		
Total (corr.)	0,0280937	15			

R-squared = 98,0645 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 96,371 percent

• Diferencia Estadística Significativa

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-5. Factores principales para el porcentaje de cenizas en quitosano.

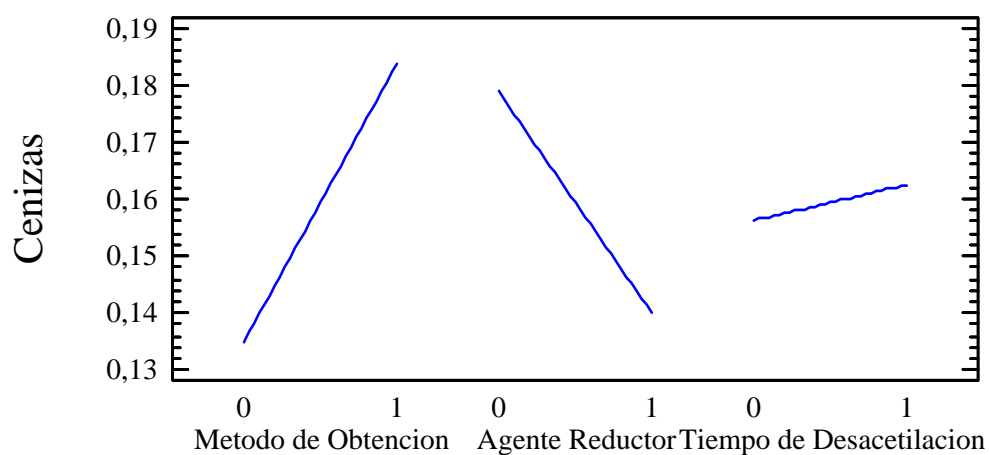


Gráfico B-6. Interacción de factores para el porcentaje de cenizas en quitosano.

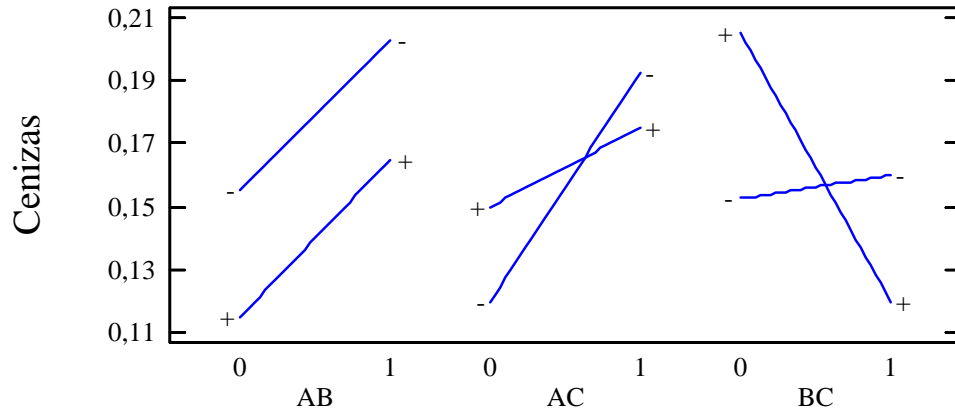


Tabla B-6. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el porcentaje de cenizas en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	0,14
a ₁	0,18
Factor B	
b ₀	0,18
b ₁	0,14
Factor C	
c ₀	0,16
c ₁	0,16
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	0,16
a ₀ b ₁	0,12
a ₁ b ₀	0,20
a ₁ b ₁	0,16
AC	
a ₀ c ₀	0,12
a ₀ c ₁	0,15
a ₁ c ₀	0,19
a ₁ c ₁	0,17
BC	
b ₀ c ₀	0,15
b ₀ c ₁	0,21
b ₁ c ₀	0,16
b ₁ c ₁	0,12
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	0,11
a ₀ b ₀ c ₁	0,20
a ₀ b ₁ c ₀	0,13
a ₀ b ₁ c ₁	0,10
a ₁ b ₀ c ₀	0,20
a ₁ b ₀ c ₁	0,21
a ₁ b ₁ c ₀	0,19
a ₁ b ₁ c ₁	0,14

Tabla B-7. Análisis de varianza para índice de blancura en quitosano.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Probabilidad
A:Método de Obtención	15,1321	1	15,1321	2,96	0,1288
B:Agente Reductor	73,7022	1	73,7022	14,44	0,0067*
C:Tiempo de Desacetilación	146,289	1	146,289	28,66	0,0011*
AB	70,56	1	70,56	13,82	0,0075*
AC	51,2656	1	51,2656	10,04	0,0157*
BC	126,001	1	126,001	24,68	0,0016*
ABC	39,8161	1	39,8161	7,80	0,0268*
blocks	1,35722	1	1,35722	0,27	0,6220
Total error	35,7315	7	5,1045		
Total (corr.)	559,854	15			

R-squared = 93,6177 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 88,0332 percent

• Diferencia Estadística Significativa

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-7. Factores principales para el índice de blancura en quitosano.

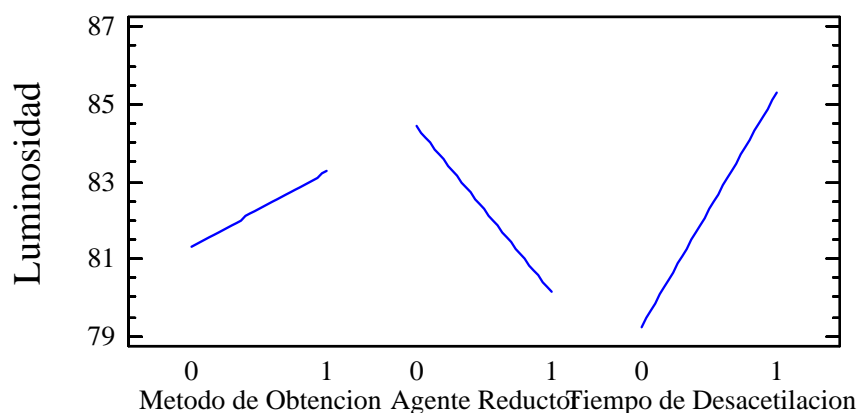


Gráfico B-8. Interacción de factores para el índice de blancura en quitosano.

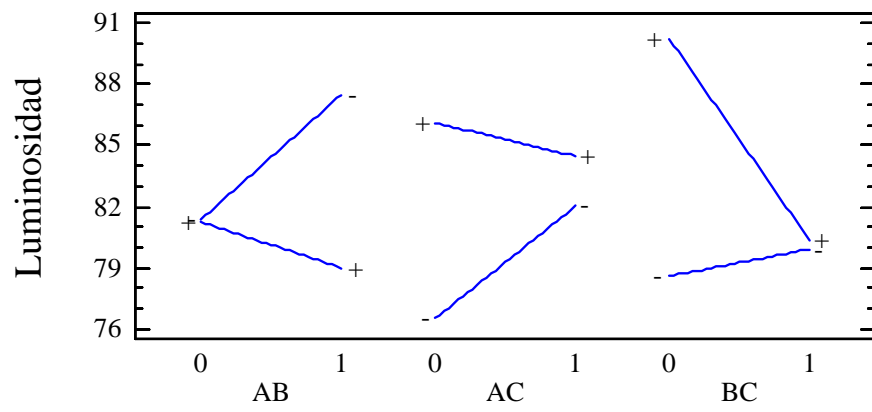


Tabla B-8. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el índice de blancura en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	81,31
a ₁	83,25
Factor B	
b ₀	84,43
b ₁	80,13
Factor C	
c ₀	79,26
c ₁	85,30
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	81,35
a ₀ b ₁	81,26
a ₁ b ₀	87,50
a ₁ b ₁	79,01
AC	
a ₀ c ₀	76,49
a ₀ c ₁	86,12
a ₁ c ₀	82,02
a ₁ c ₁	84,49
BC	
b ₀ c ₀	78,60
b ₀ c ₁	90,26
b ₁ c ₀	79,92
b ₁ c ₁	80,35
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	72,16
a ₀ b ₀ c ₁	90,55
a ₀ b ₁ c ₀	80,83
a ₀ b ₁ c ₁	81,69
a ₁ b ₀ c ₀	85,04
a ₁ b ₀ c ₁	89,96
a ₁ b ₁ c ₀	79,00
a ₁ b ₁ c ₁	79,01

Tabla B-9. Análisis de varianza para porcentaje nitrógeno en quitosano.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Probabilidad
A:Metodo de Obtención	0,000025	1	0,000025	0,30	0,5983
B:Agente Reductor	0,0121	1	0,0121	147,30	0,0000
C:Tiempo de Desacetilación	0,027225	1	0,027225	331,43	0,0000
AB	0,001225	1	0,001225	14,91	0,0062
AC	0,0025	1	0,0025	30,43	0,0009
BC	0,004225	1	0,004225	51,43	0,0002
ABC	0,0004	1	0,0004	4,87	0,0631
blocks	0,000225	1	0,000225	2,74	0,1419
Total error	0,000575	7	0,0000821429		
Total (corr.)	0,0485	15			

R-squared = 98,8144 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 97,7771 percent

*Diferencia Estadística Significativa

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-9. Factores principales para el porcentaje de nitrógeno en quitosano.

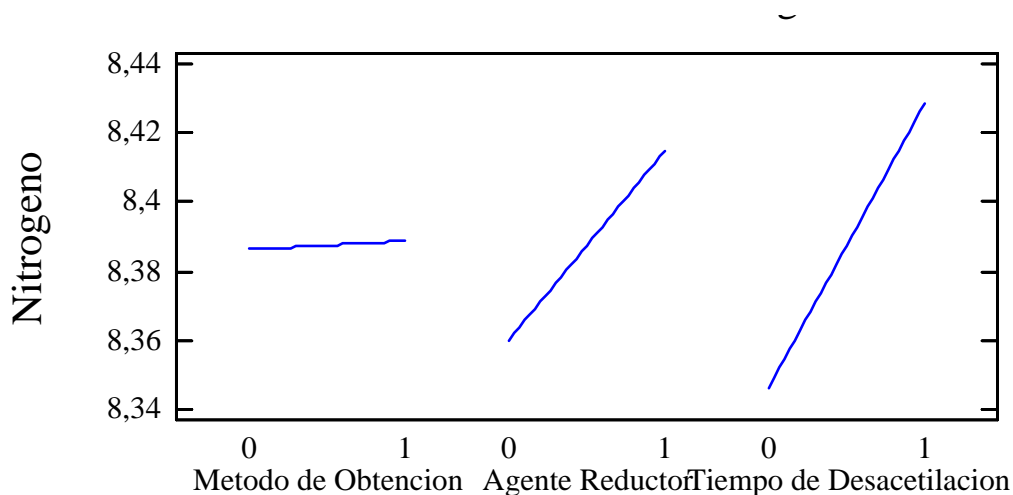


Gráfico B-10. Interacción de factores para el porcentaje de nitrógeno en quitosano.

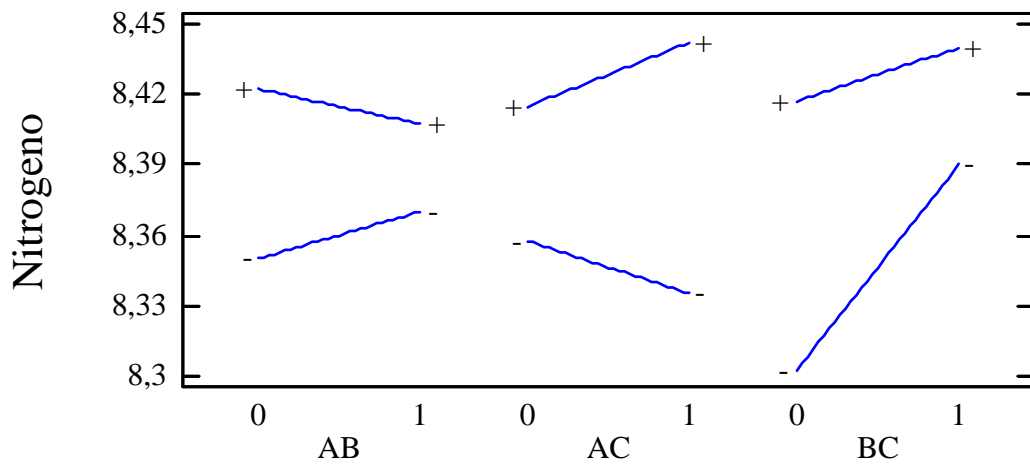


Tabla B-10. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el porcentaje de nitrógeno en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	8,39
a ₁	8,39
Factor B	
b ₀	8,36
b ₁	8,42
Factor C	
c ₀	8,35
c ₁	8,43
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	8,35
a ₀ b ₁	8,42
a ₁ b ₀	8,37
a ₁ b ₁	8,41
AC	
a ₀ c ₀	8,36
a ₀ c ₁	8,42
a ₁ c ₀	8,34
a ₁ c ₁	8,44
BC	
b ₀ c ₀	8,30
b ₀ c ₁	8,42
b ₁ c ₀	8,39
b ₁ c ₁	8,44
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	8,31
a ₀ b ₀ c ₁	8,39
a ₀ b ₁ c ₀	8,40
a ₀ b ₁ c ₁	8,44
a ₁ b ₀ c ₀	8,30
a ₁ b ₀ c ₁	8,44
a ₁ b ₁ c ₀	8,38
a ₁ b ₁ c ₁	8,44

Tabla B-11. Análisis de varianza para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Probabilidad
A:Método de Obtención	0,172225	1	0,172225	0,41	0,5409
B:Agente Reductor	36,663	1	36,663	86,81	0,0000*
C:Tiempo de Desacetilación	85,1929	1	85,1929	201,73	0,0000*
AB	3,3124	1	3,3124	7,84	0,0232*
AC	6,42623	1	6,42623	15,22	0,0045*
BC	11,526	1	11,526	27,29	0,0008*
blocks	0,6889	1	0,6889	1,63	0,2373
Total error	3,3785	8	0,422313		
Total (corr.)	147,36	15			

R-squared = 97,7073 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 96,1789 percent

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-11. Factores principales para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

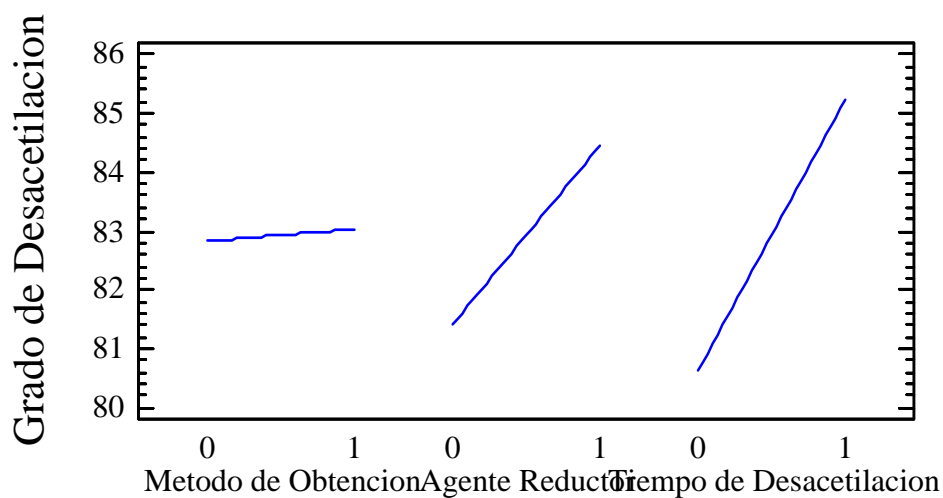


Gráfico B-12. Interacción de factores para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

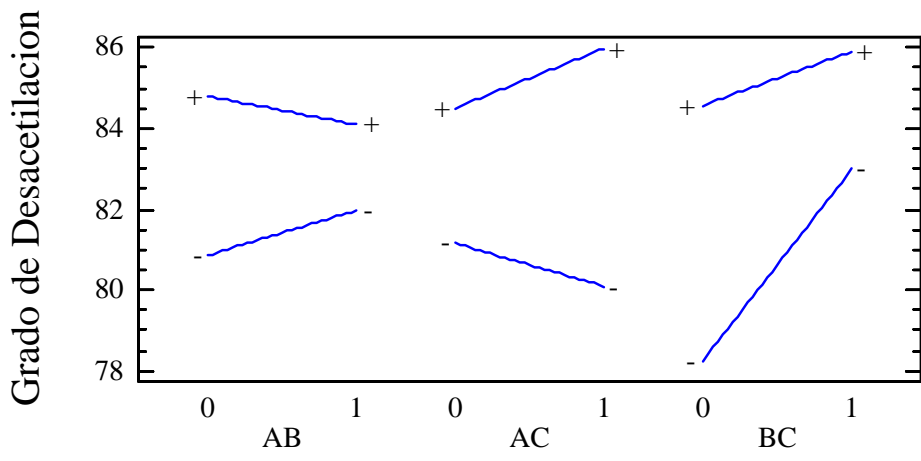


Tabla B-12. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el grado de desacetilación por determinación de nitrógeno en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	82,83
a ₁	83,03
Factor B	
b ₀	81,42
b ₁	84,44
Factor C	
c ₀	80,62
c ₁	85,24
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	80,86
a ₀ b ₁	84,80
a ₁ b ₀	81,98
a ₁ b ₁	84,09
AC	
a ₀ c ₀	81,15
a ₀ c ₁	84,50
a ₁ c ₀	80,09
a ₁ c ₁	85,98
BC	
b ₀ c ₀	78,26
b ₀ c ₁	84,57
b ₁ c ₀	82,99
b ₁ c ₁	85,90
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	78,62
a ₀ b ₀ c ₁	83,09
a ₀ b ₁ c ₀	83,69
a ₀ b ₁ c ₁	85,91
a ₁ b ₀ c ₀	77,90
a ₁ b ₀ c ₁	85,05
a ₁ b ₁ c ₀	82,29
a ₁ b ₁ c ₁	85,90

Tabla B-13. Análisis de varianza para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Probabilidad
A:Método de Obtención	0,288906	1	0,288906	0,14	0,7168
B:Agente Reductor	99,0523	1	99,0523	48,91	0,0002*
C:Tiempo de Desacetilación	78,7213	1	78,7213	38,87	0,0004*
AB	1,68351	1	1,68351	0,83	0,3922
AC	14,9963	1	14,9963	7,41	0,0297*
BC	20,1826	1	20,1826	9,97	0,0160*
ABC	11,1723	1	11,1723	5,52	0,0512*
blocks	7,96651	1	7,96651	3,93	0,0877*
Total error	14,1755	7	2,02508		
Total (corr.)	248,239	15			

R-squared = 94,2896 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 89,2929 percent

*Diferencia Estadística Significativa

Factor A: Método de Obtención.

Nivel a₀: Método Indirecto

Nivel a₁: Método Directo

Factor B: Agente Reductor

Nivel b₀: Sin Agente Reductor.

Nivel b₁: Con Agente Reductor.

Factor C: Tiempo de Desacetilación

Nivel c₀: 2 horas

Nivel c₁: 4 horas

Gráfico B-13. Factores principales para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

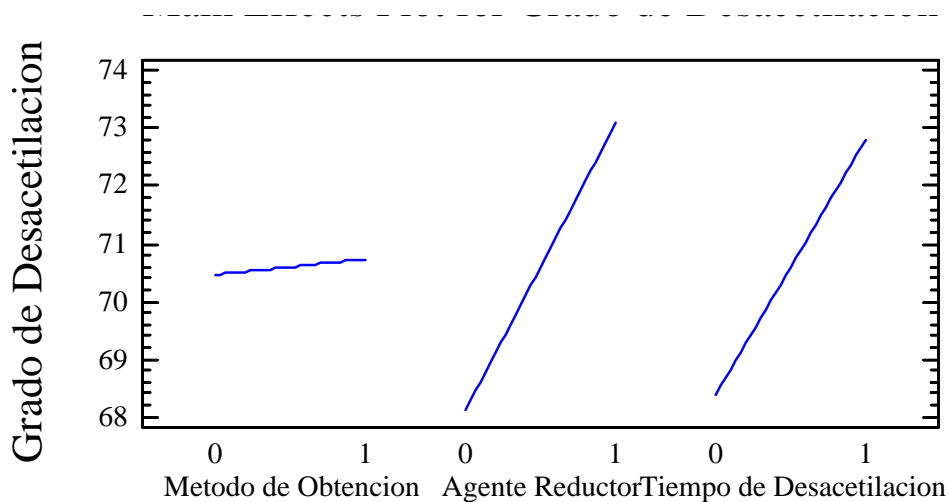


Gráfico B-14. Interacción de factores para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

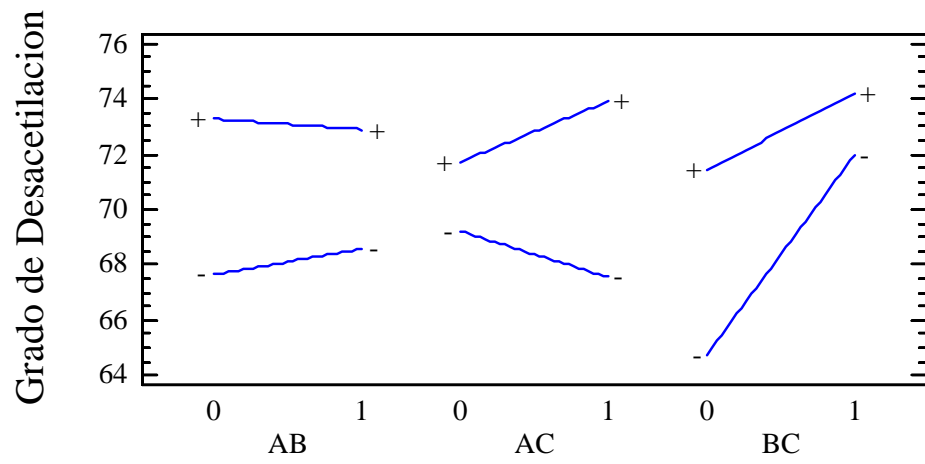


Tabla B-14. Diferencia de medias de los factores principales e interacciones para el grado de desacetilación por espectroscopia infrarrojo en quitosano.

Factores	Medias
Factor A	
a ₀	70,47
a ₁	70,73
Factor B	
b ₀	68,11
b ₁	73,09
Factor C	
c ₀	68,38
c ₁	72,82
Interacciones	
AB	
a ₀ b ₀	67,65
a ₀ b ₁	73,28
a ₁ b ₀	68,57
a ₁ b ₁	72,90
AC	
a ₀ c ₀	69,22
a ₀ c ₁	71,72
a ₁ c ₀	67,55
a ₁ c ₁	73,92
BC	
b ₀ c ₀	64,77
b ₀ c ₁	71,45
b ₁ c ₀	71,99
b ₁ c ₁	74,18
ABC	
a ₀ b ₀ c ₀	66,12
a ₀ b ₀ c ₁	69,19
a ₀ b ₁ c ₀	72,32
a ₀ b ₁ c ₁	74,24
a ₁ b ₀ c ₀	63,43
a ₁ b ₀ c ₁	73,72
a ₁ b ₁ c ₀	71,67
a ₁ b ₁ c ₁	74,13

ANEXOS C

Gráficas

Gráfico C-1. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método indirecto, sin agente reductor, 2 horas de desacetilación ($a_0b_0c_0$)

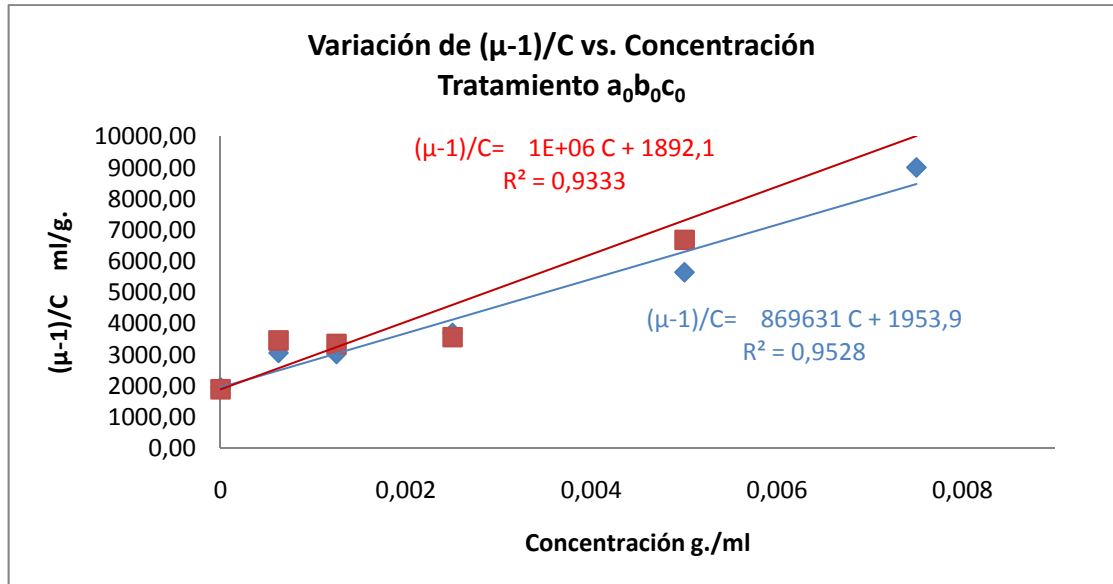


Gráfico C-2. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método indirecto, sin agente reductor, 4 horas de desacetilación ($a_0b_0c_1$)

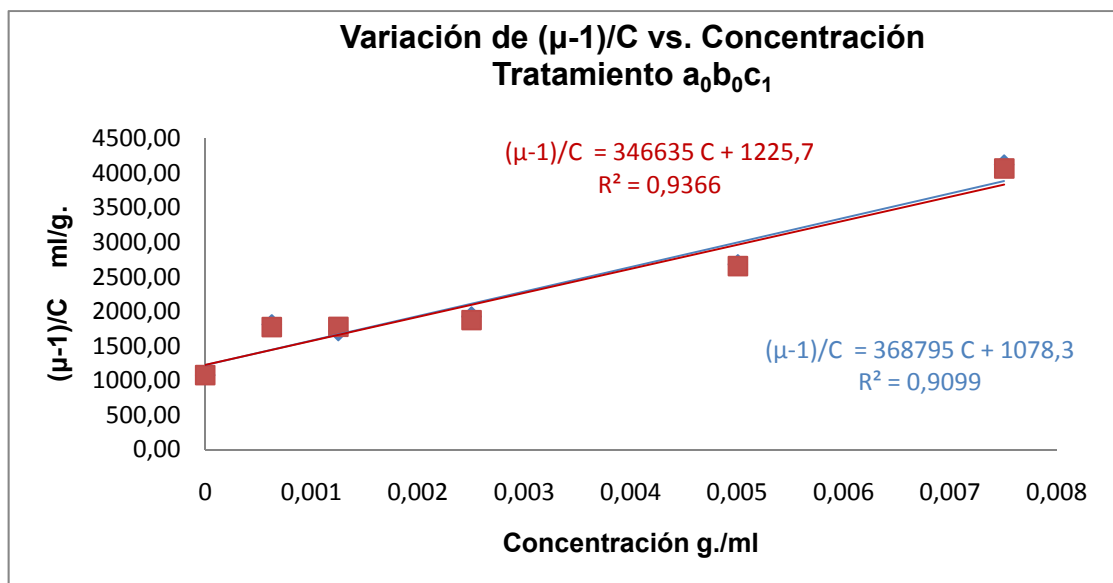


Gráfico C-3. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método indirecto, con agente reductor, 2 horas de desacetilación ($a_0b_1c_0$)

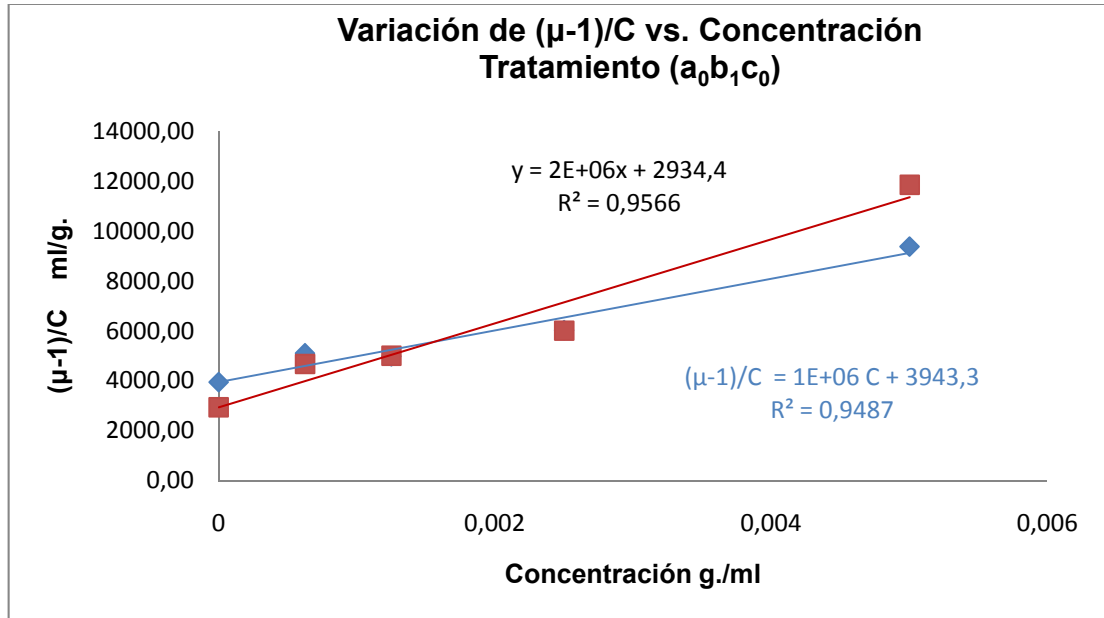


Gráfico C-4. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método indirecto, con agente reductor, 4 horas de desacetilación ($a_0b_1c_1$)

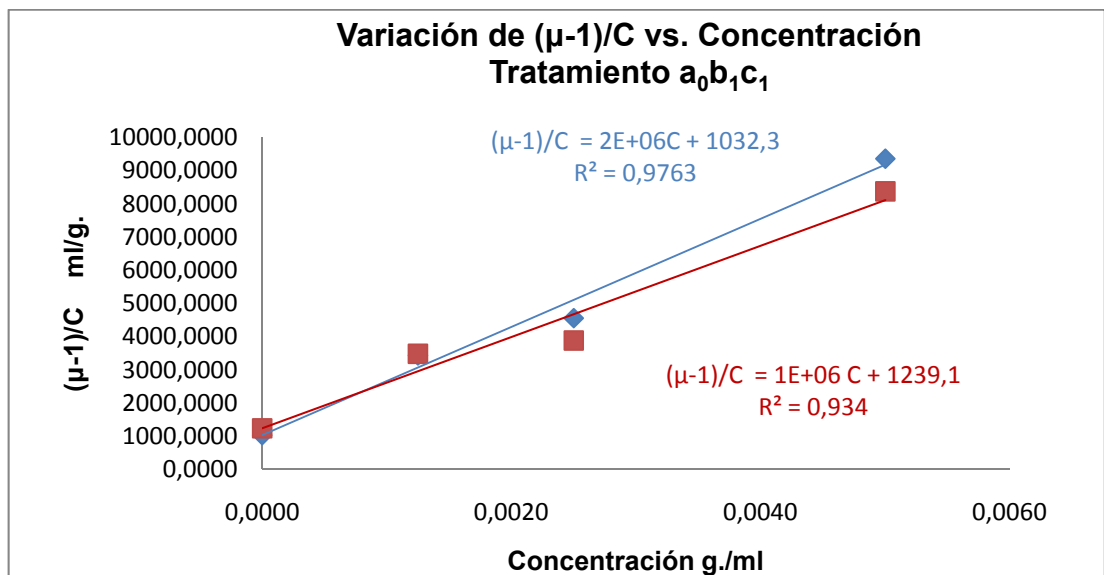


Gráfico C-5. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método directo, sin agente reductor, 2 horas de desacetilación ($a_1b_0c_0$)

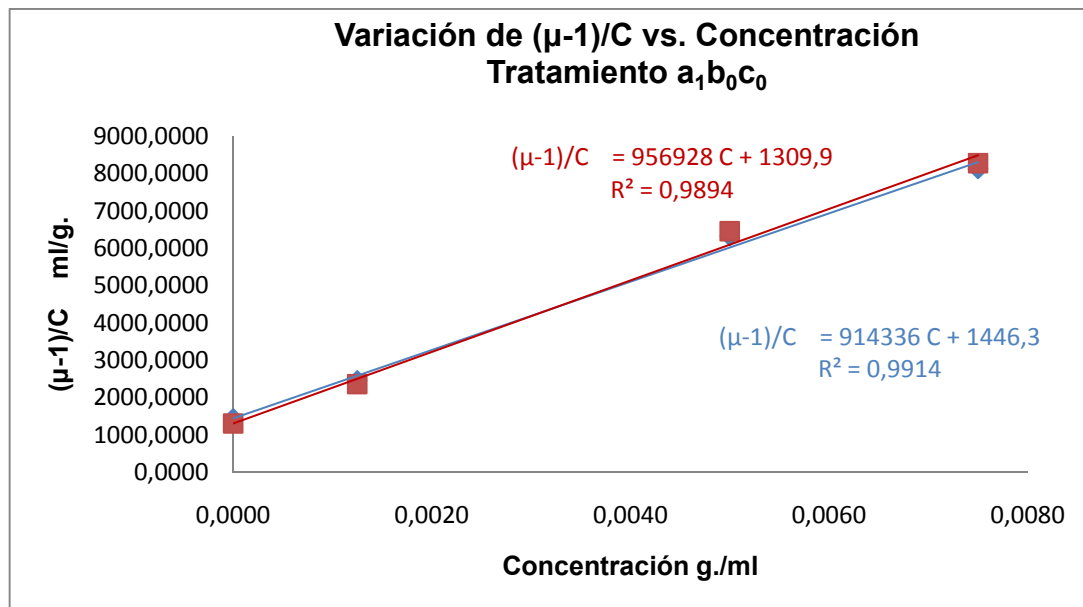


Gráfico C-6. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método directo, sin agente reductor, 4 horas de desacetilación ($a_1b_0c_1$)

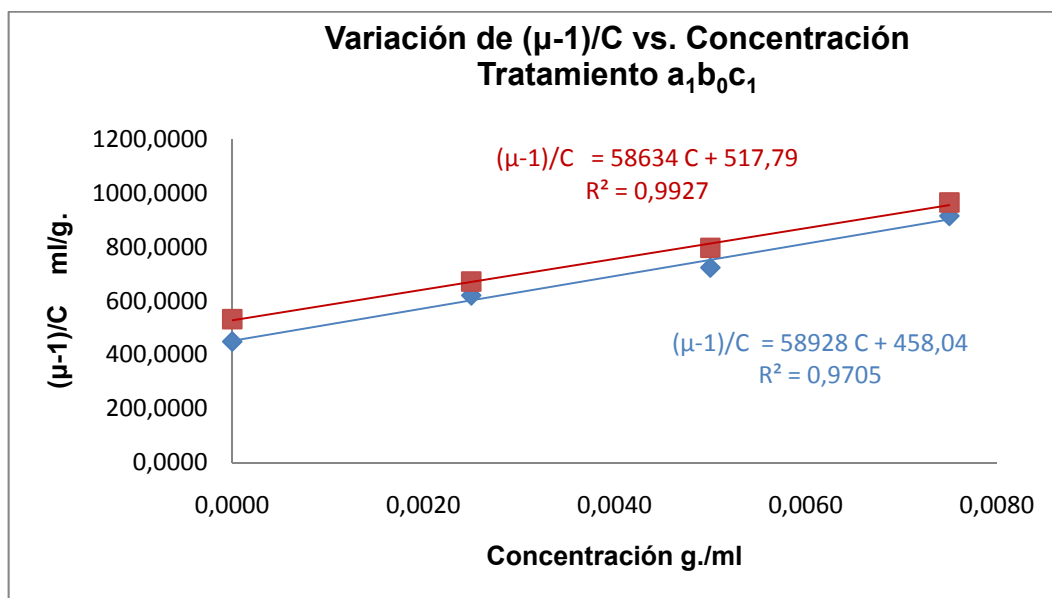


Gráfico C-7. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método directo, con agente reductor, 2 horas de desacetilación ($a_1b_1c_0$)

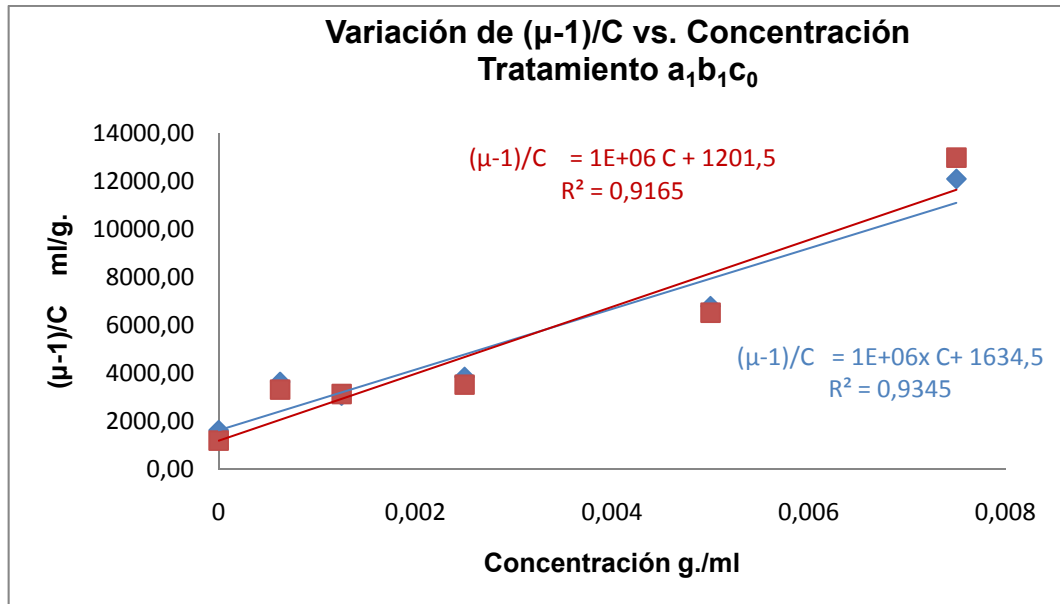


Gráfico C-8. Datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano en ácido acético 0.1 M. y NaCl 0.2 M.

Método directo, con agente reductor, 4 horas de desacetilación ($a_1b_1c_1$)

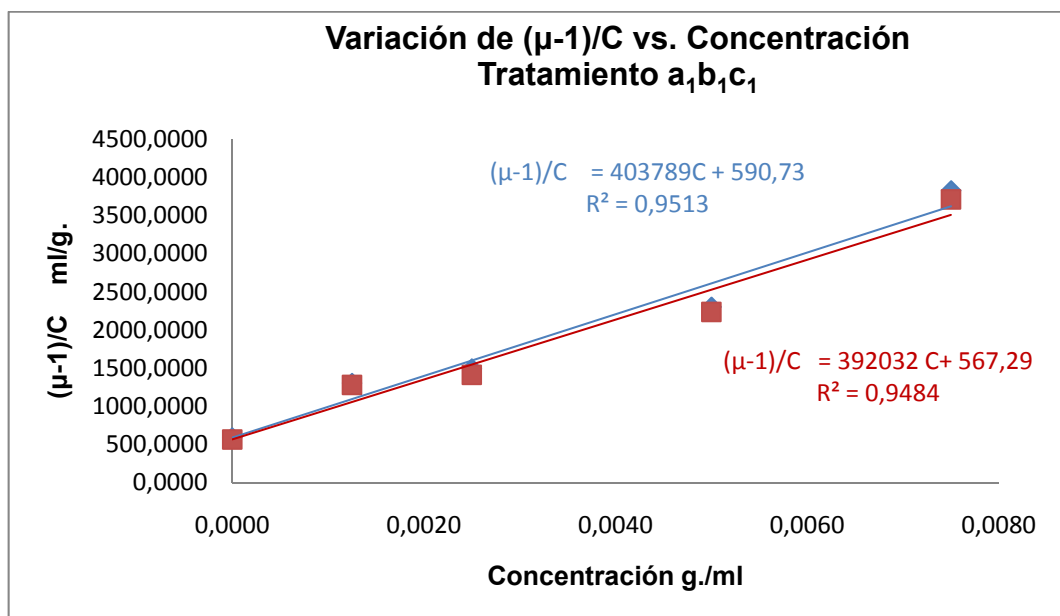


Grafico C-9. Espectro del Quitosano. Método indirecto, sin agente reductor, 2 horas de desacetilación (a₀b₀c₀)

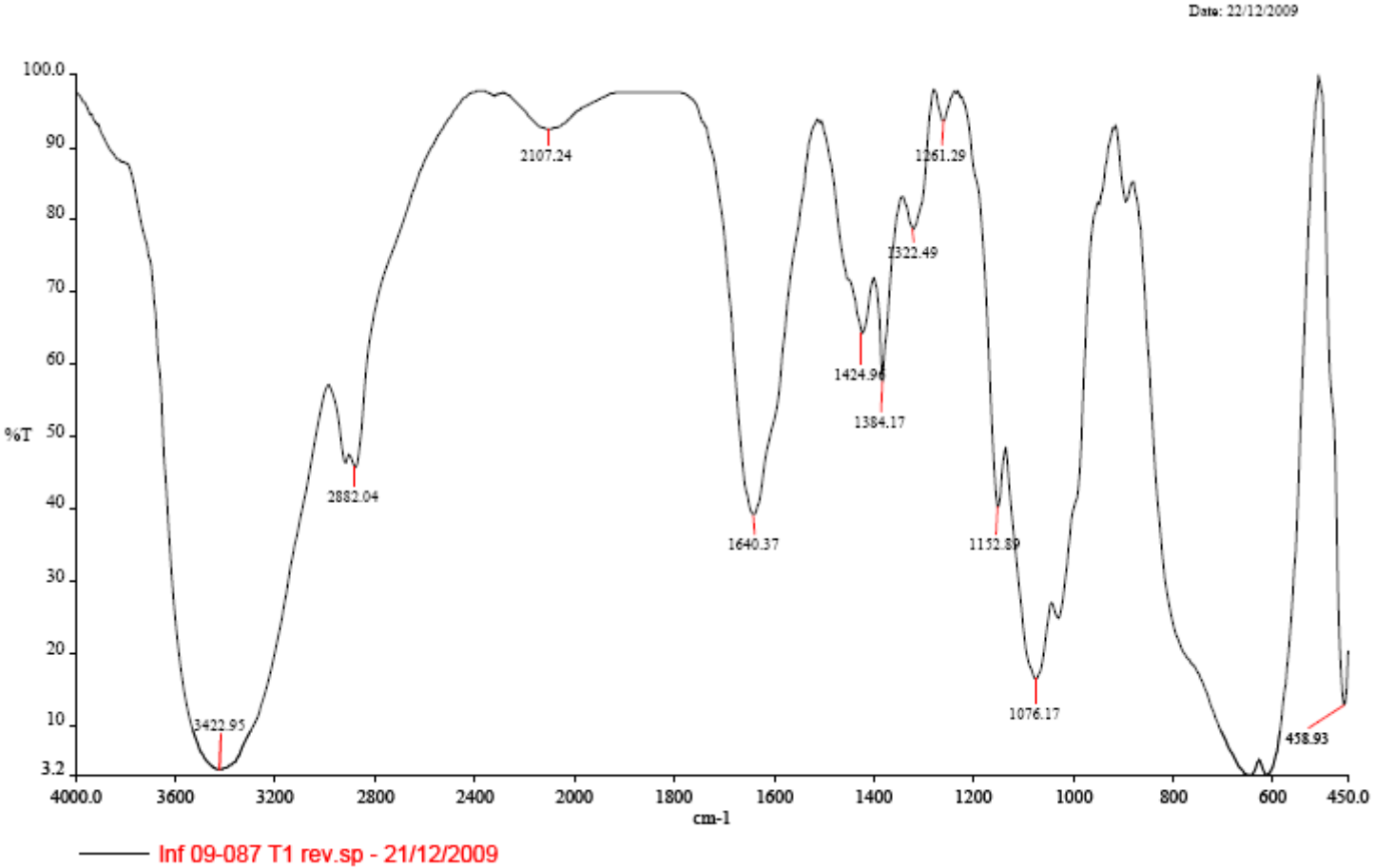


Grafico C-10. Espectro del Quitosano. Método indirecto, sin agente reductor, 4 horas de desacetilación (a₀b₀c₁)

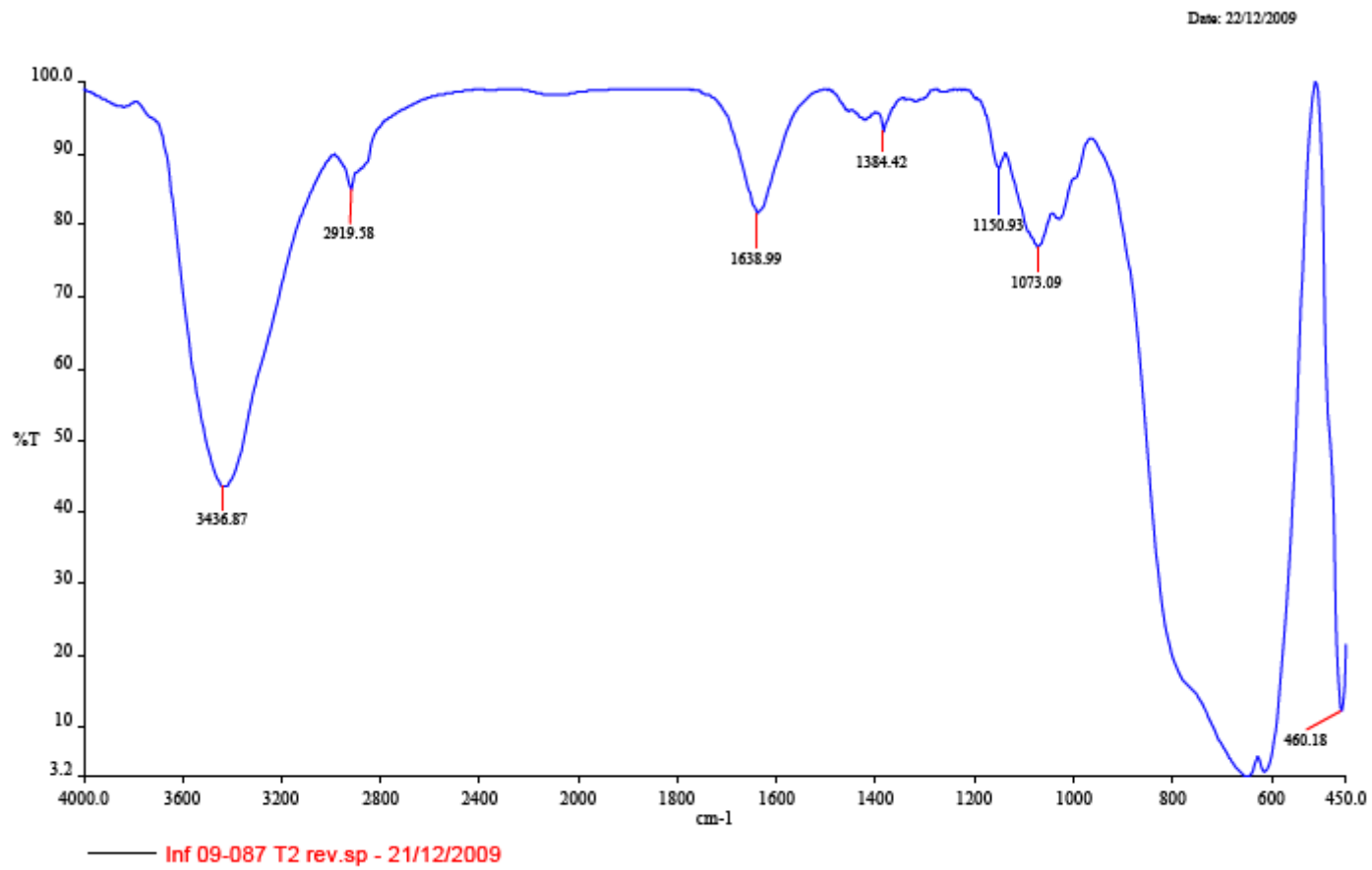


Grafico C-11. Espectro del Quitosano. Método indirecto, con agente reductor, 2 horas de desacetilación (a₀b₁c₀)

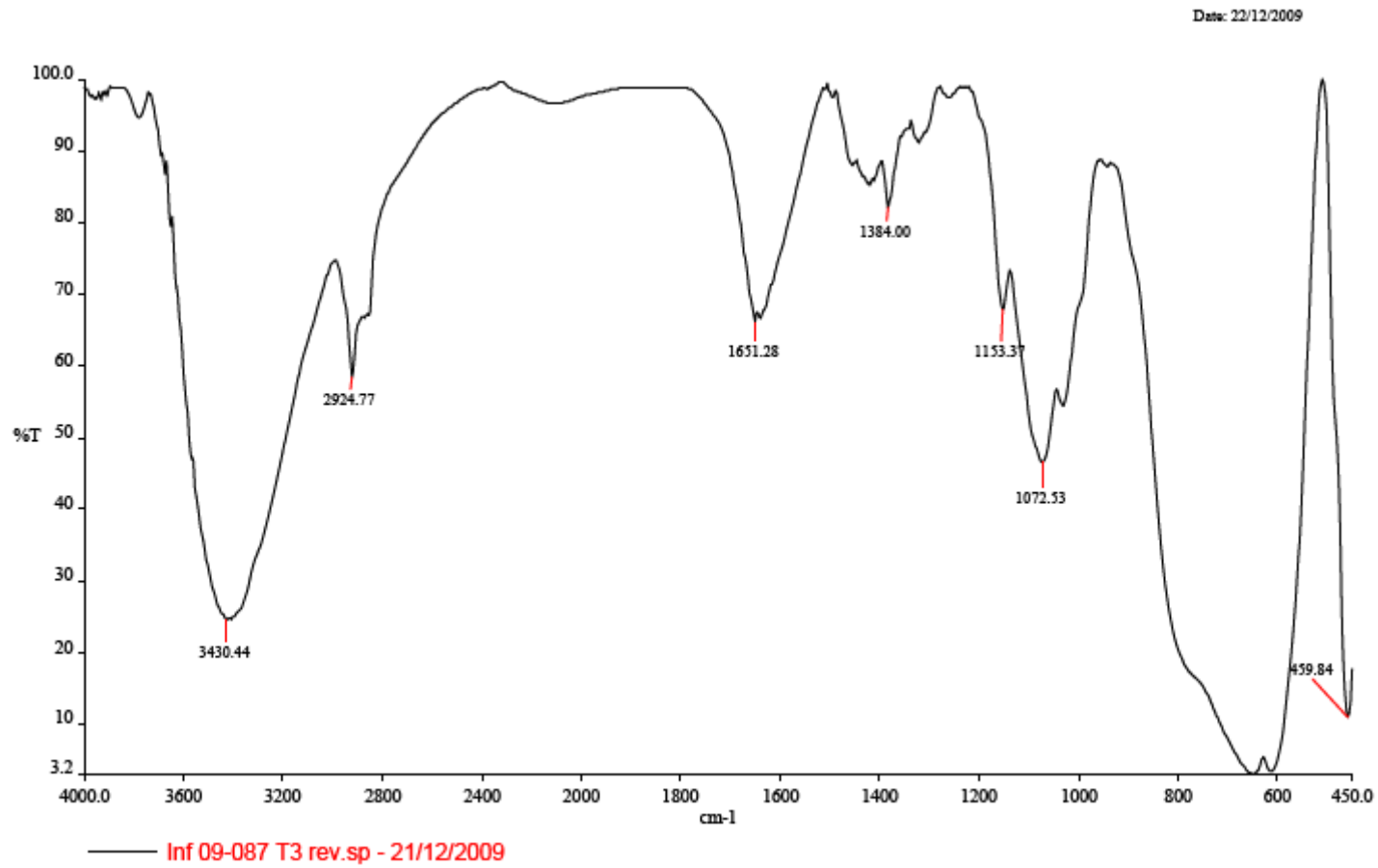


Grafico C-12. Espectro del Quitosano. Método indirecto, con agente reductor, 4 horas de desacetilación (a₀b₁c₁)

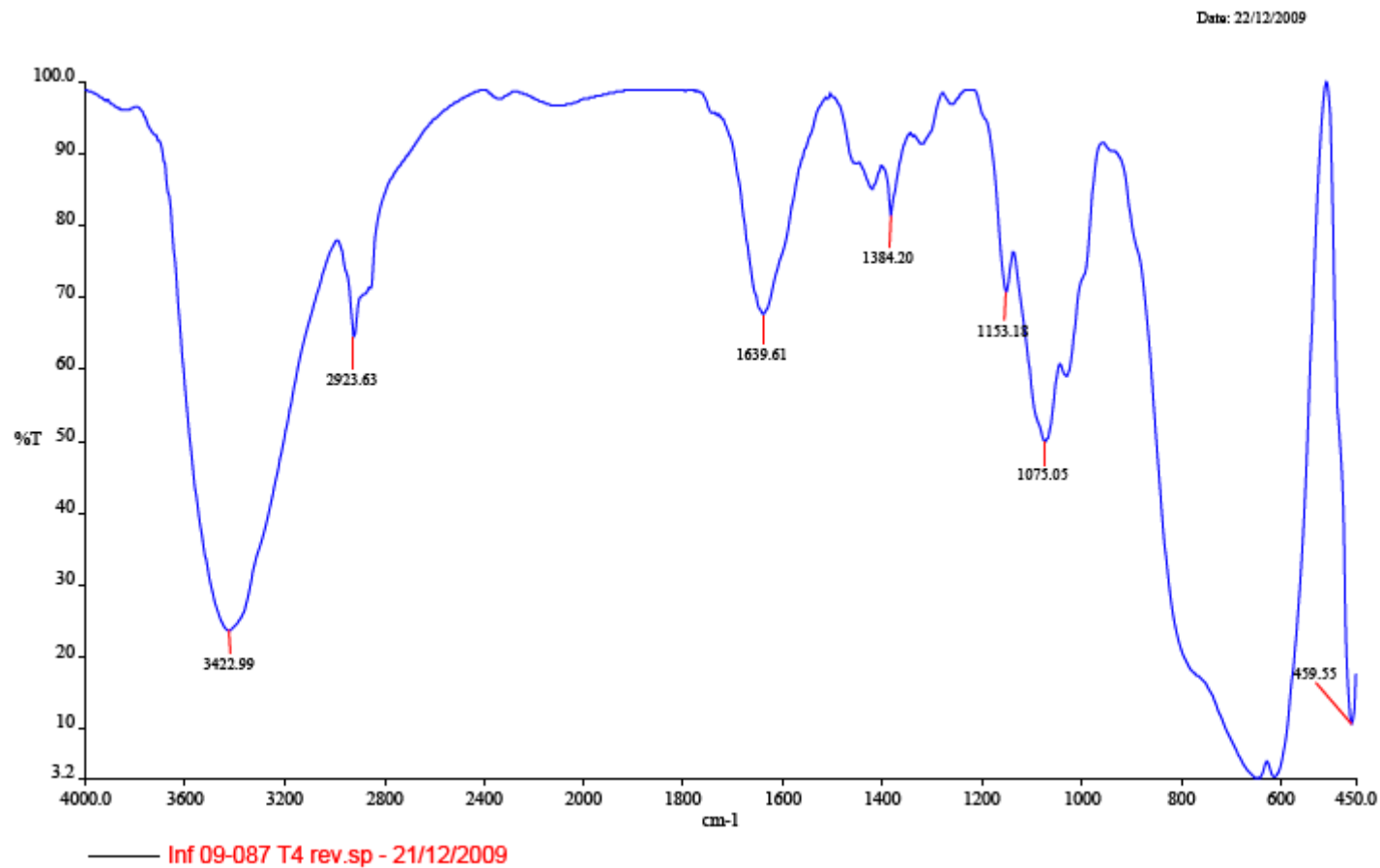


Grafico C-13. Espectro del Quitosano. Método directo, sin agente reductor, 2 horas de desacetilación (a₁b₀c₀)

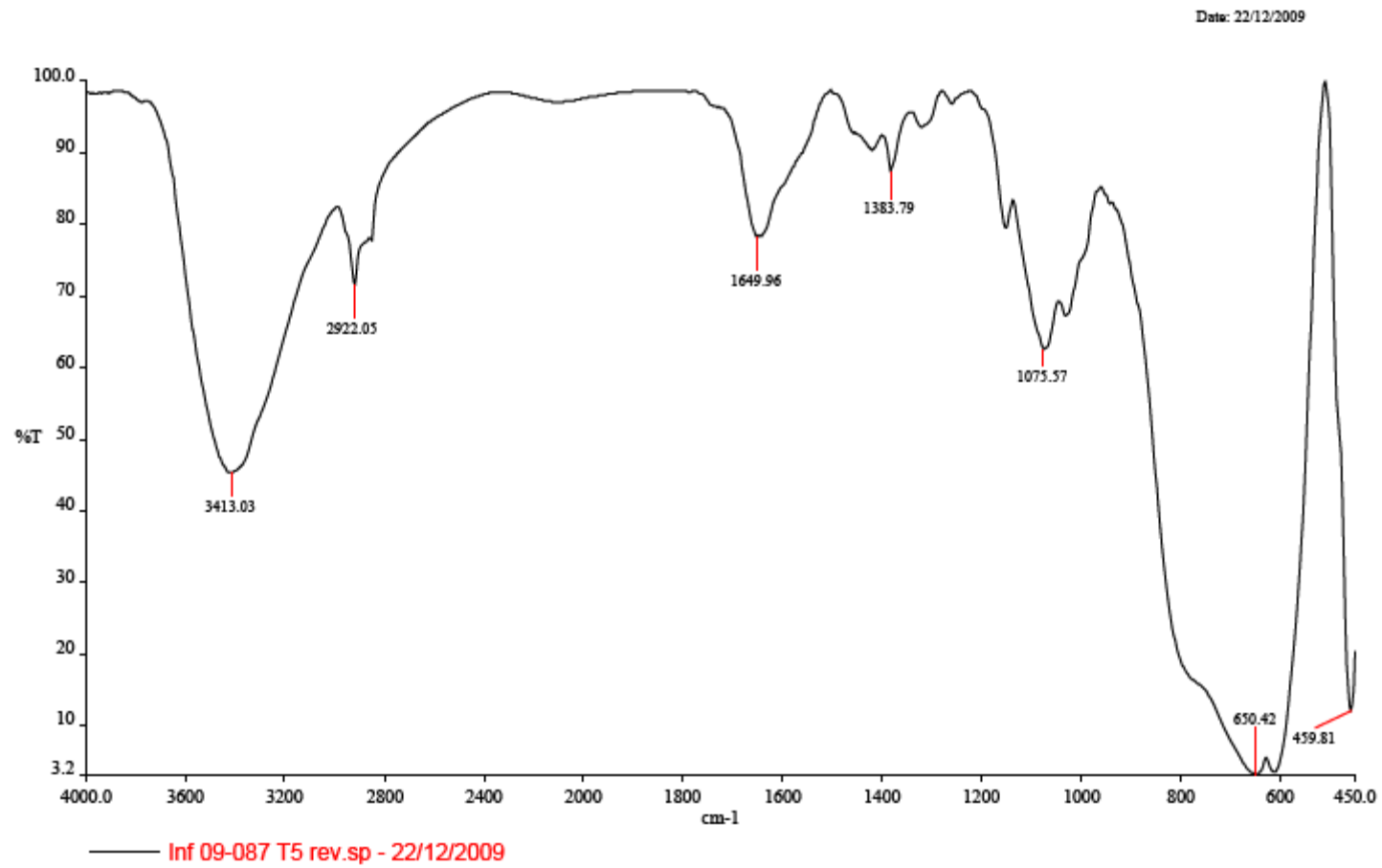


Grafico C-14. Espectro del Quitosano. Método directo, sin agente reductor, 4 horas de desacetilación (a₁b₀c₁)

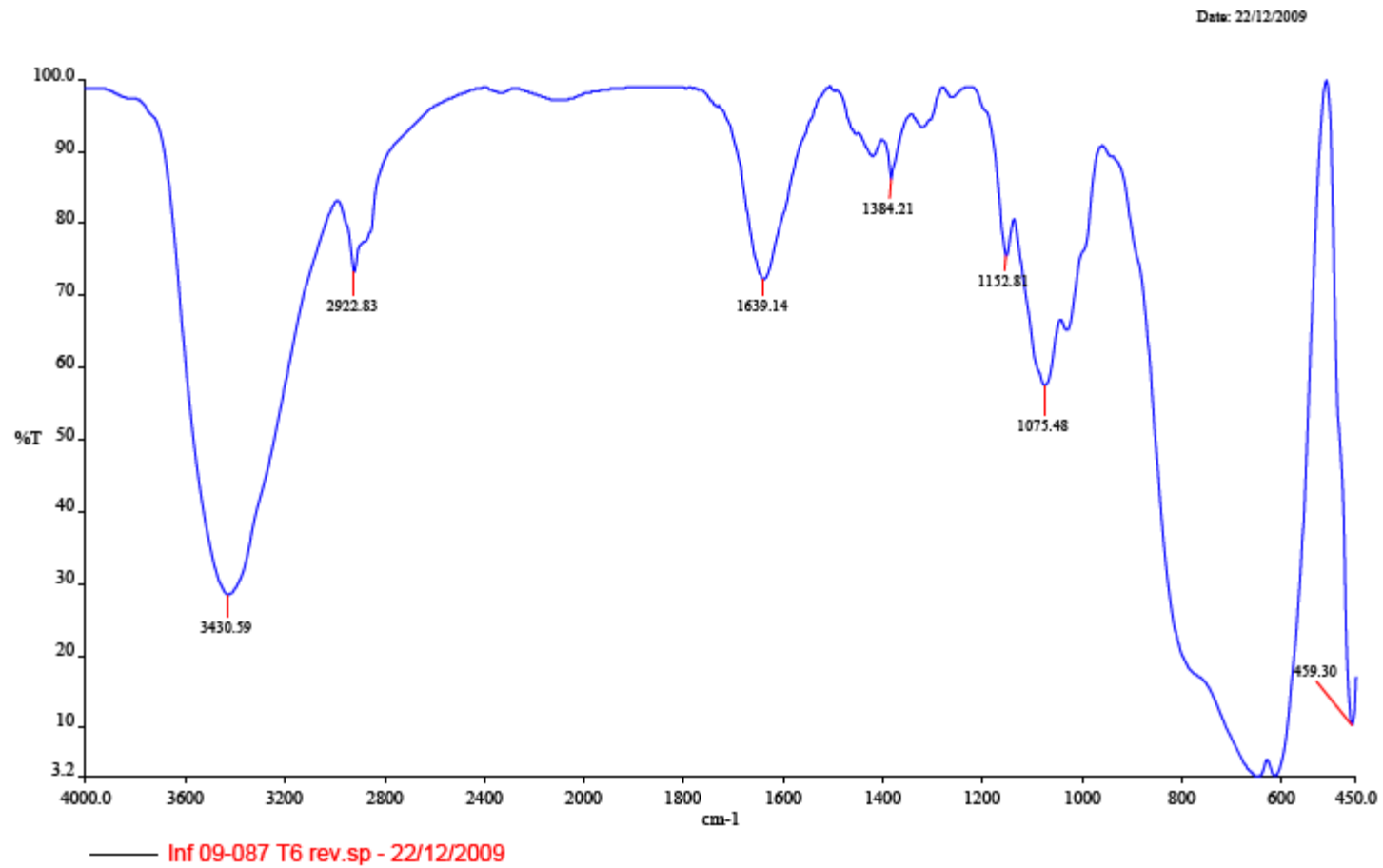


Grafico C-15. Espectro del Quitosano. Método directo, con agente reductor, 2 horas de desacetilación (a₁b₁c₀)

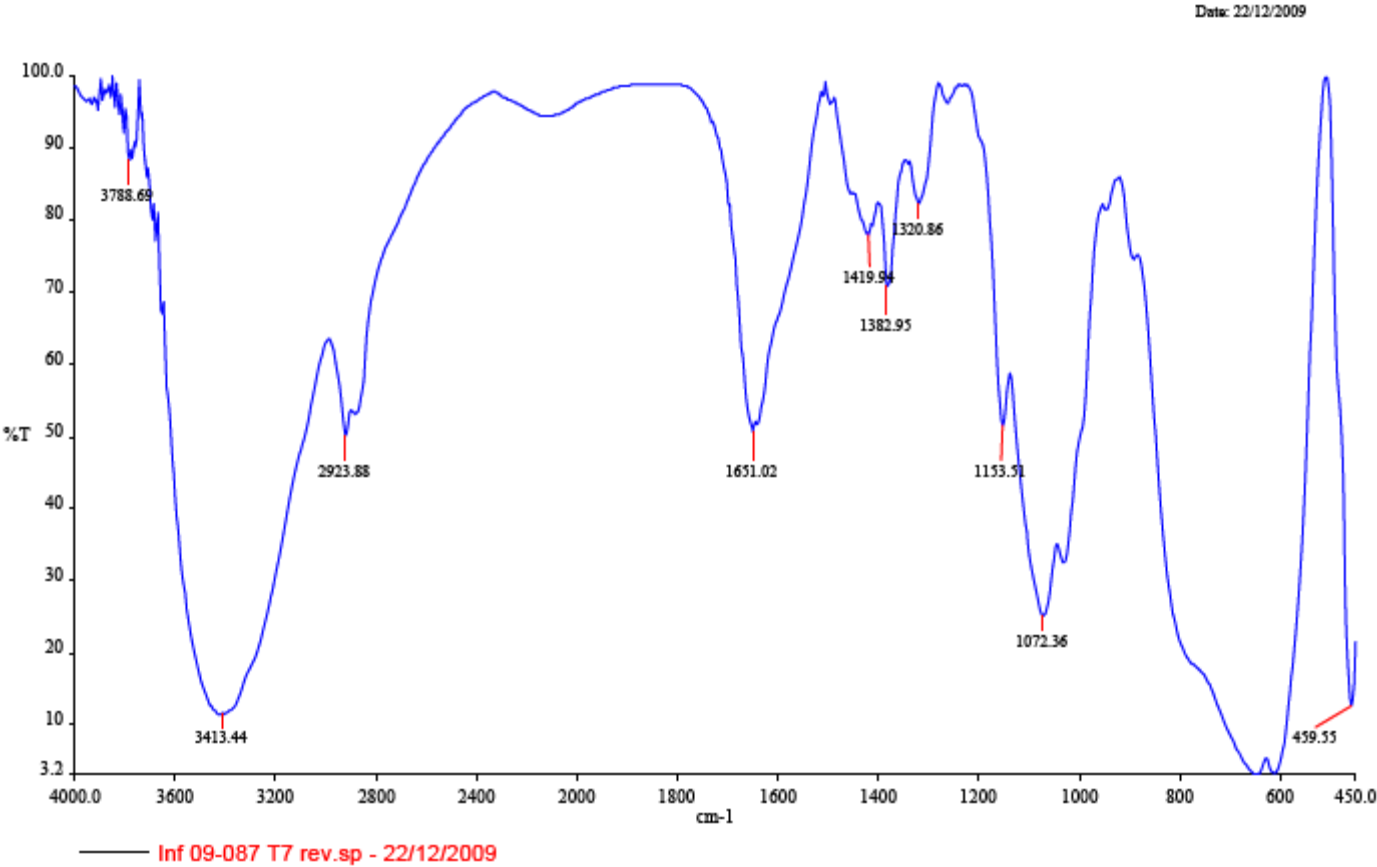
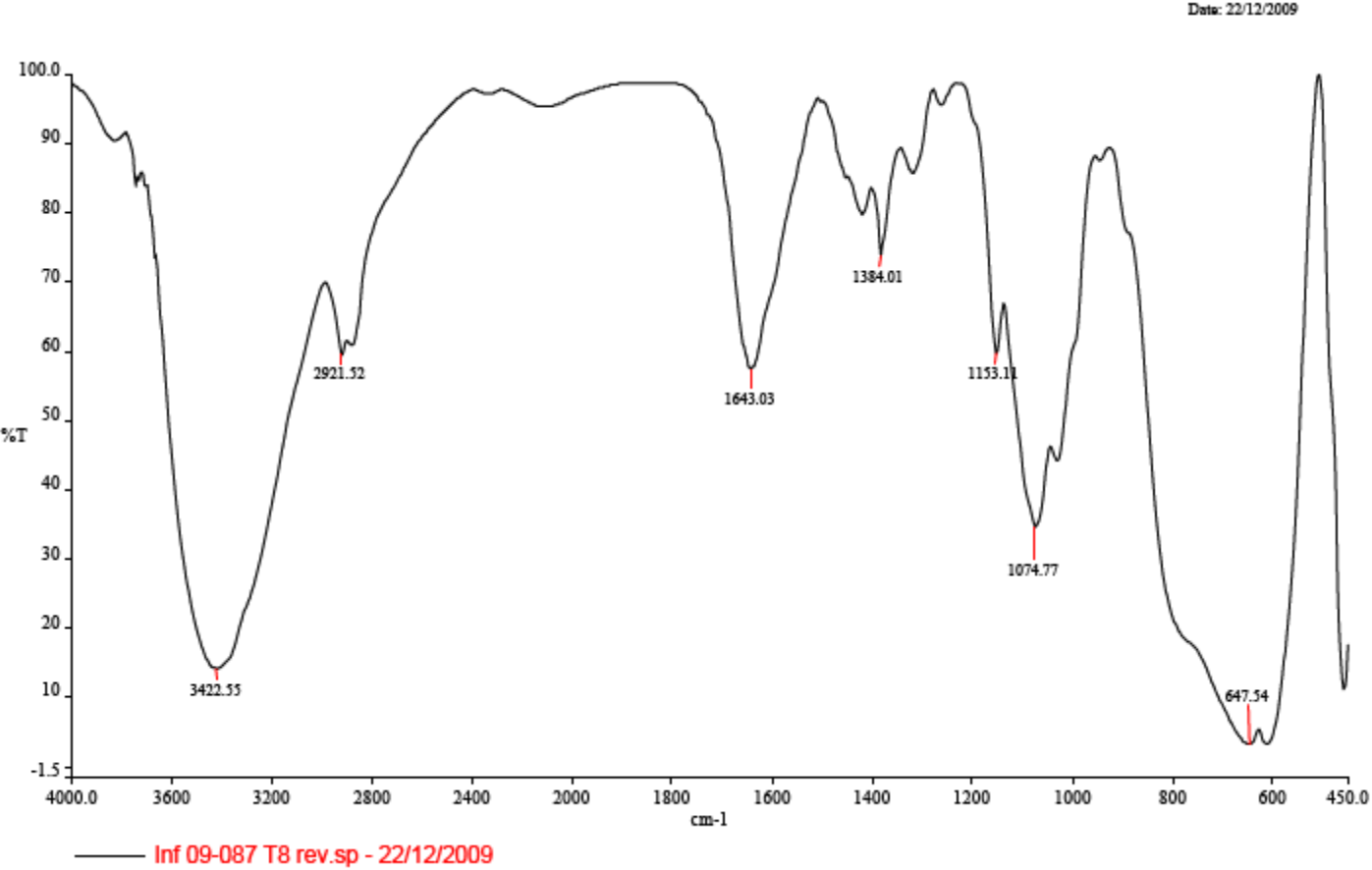


Grafico C-16. Espectro del Quitosano. Método directo, con agente reductor, 4 horas de desacetilación (a₁b₁c₁)



ANEXOS D

Diagramas

Diagrama D-1. Obtención de Quitosano



SELECCIÓN Y LAVADO



SECADO



MOLIDO



DESMINERALIZACIÓN



LAVADO



PRODUCTO FINAL



SECADO



LAVADO



COCCIÓN



DESPROTEINIZACIÓN