

ESTUDIO DE QUITOSANOS CUBANOS DERIVADOS DE LA QUITINA DE LA LANGOSTA

**Claudia Hidalgo¹, Mirna Fernández^{1*}, Olga M. Nieto¹, Armando A. Paneque²,
Gustavo Fernández³, Julio C. LLópiz⁴**

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

2) Centro de Química Farmacéutica (CQF). 200 y 21, Atabey, Playa, C. Habana, Cuba. Correo electrónico: armandopaneque@infomed.sld.cu

3) Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas (CIIQ). Calle F No.115 e/5^a y Calzada, Vedado, C. Habana. Cuba. Correo electrónico: gustavo@inor.ciiq.minbas.cu

4) Facultad de Química, Universidad de La Habana

Recibido: Julio 2008; Aceptado: Noviembre 2008

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron muestras de quitosano de alta masa molecular, derivadas de la quitina de langosta, obtenidas por desacetilación termoalcalina heterogénea bajo diferentes condiciones de temperatura, concentración de sosa y tiempo de tratamiento, las cuales fueron comparadas con dos muestras comerciales de referencia. El contenido de nitrógeno, residuos de ignición, grado de desacetilación, absorción de humedad, comportamiento térmico y cristalinidad de los quitosanos nacionales fue similar al de las muestras comerciales. El contenido de iones metálicos estuvo en los intervalos aceptados para uso farmacéutico. El calcio fue el elemento en mayor proporción en las muestras nacionales. La calidad microbiológica de las muestras de quitosano no mostró dependencia con el método termoalcalino de obtención. La comparación estadística de las variables estudiadas de las muestras nacionales no mostró diferencias significativas con las calculadas a través de la prueba de χ^2 .

Palabras claves: quitina, langosta, quitosano, propiedades físico-químicas

ABSTRACT

In this paper, different high molecular weight chitosans, derived from lobster chitin were obtained under alkaline N-deacetylation processes varying temperature, concentration of aqueous sodium hydroxide solutions and time of treatment. Properties of samples were analyzed and compare with two commercial chitosan materials. Nitrogen content, ashes, degree of deacetylation, moisture content, thermal behaviour and crystallinity of the present chitosans were comparable with those commercial materials. Required values of heavy metals were obtained according to pharmaceutical applications. Calcium was the higher metallic component in chitosan samples. The alkaline N-deacetylation processes did not influence on the microbiological quality of national chitosans samples. Not significant differences of the studied properties of chitosans are supported by the results of the χ^2 test.

Keywords: chitin, lobster, chitosan, physico-chemical properties

1. INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polímero más abundante tanto en el reino animal como en el vegetal. La principal fuente de obtención a nivel mundial son los desechos de la industria pesquera, fundamentalmente de los residuos de cangrejos y camarones [1]. El quitosano, principal derivado N-desacetilado de la quitina, no se presenta como una molécula única. Muestra variabilidad no solamente en el tamaño de las cadenas, sino también, en el grado de acetilación de las mismas [2].

A diferencia de los polímeros sintéticos, la quitina y el quitosano, no presentan limitaciones en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad, además de ser naturalmente abundantes y renovables [3, 4].

A pesar de la bondad de las propiedades del quitosano, su abundancia en la naturaleza y factibilidad económica de obtención, no ha sido adoptada como excipiente o componente en formulaciones por la industria farmacéutica. Las variaciones en la composición química del quitosano se deben esencialmente a las fuentes de quitina y a los procesamientos relativamente incontrolados, como la desacetilación y la depolimerización de la misma [5, 6]. El hecho de que los quitosanos comercialmente disponibles no siempre estén adecuadamente caracterizadas ha limitado su uso [7].

Una gran variedad de procedimientos han sido desarrollados y propuestos para la caracterización físico-química del quitosano. Sin embargo, no existe uniformidad en los ensayos de caracterización de estas a nivel mundial, como resultado de la dependencia con el material de partida y la rigurosidad del método de obtención. Así mismo, dicha variabilidad determina la diversidad de criterios en cuanto a los límites para los métodos seleccionados. Características tales como el grado de desacetilación, la masa molecular y su polidispersión, el contenido de humedad, la solubilidad, el porcentaje de cenizas, el contenido de metales pesados, endotoxinas y proteínas son fundamentales en el campo médico-farmacéutico y la industria alimentaria [2, 8].

Teniendo en cuenta que en Cuba, la quitina se obtiene comercialmente a partir del exoesqueleto de la langosta (*Panulirus Argus*) [9], la producción de quitosano resulta importante por lo que el objetivo del trabajo es evaluar muestras de quitosanos y compararlas con las comerciales.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales. Muestras de quitosano de alta masa molecular obtenidas por

desacetilación termoalcalina (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5 y Q6) suministradas por la Empresa Laboratorio “*Mario Muñoz*” (Cuba):

Disolución de NaOH 45%, 130°C/15 min dobles (Q1)

Disolución de NaOH 50%, 130°C/15 min dobles (Q2)

Disolución de NaOH 45%, 130°C/40 min (Q3)

Disolución de NaOH 50%, 130°C/40 min (Q4)

Disolución de NaOH 45%, 100°C/15 min dobles (Q5)

Disolución de NaOH 50%, 100°C/15 min dobles (Q6)

Muestras comerciales de quitosano de alta (HMW, 79,0% GD) y media masa molecular (MMW, 81,4% GD) (*Aldrich*, USA) derivadas de carapachos de camarón, como materiales de referencia para las muestras de quitosanos cubanos. El resto de los reactivos y disoluciones fueron de calidad analítica.

2.2. Ensayos.

2.2.1. Ensayo de pérdida por desecación y sólidos totales. Pesar de 1 a 2 g de la muestra en balanza analítica (*Sartorius TE 214S, Alemania*), y mantenerla en una estufa (*Memmet, Alemania*) a 105°C hasta peso constante (USP 27 [10]). El cálculo se realizó sobre la base de tres ensayos.

2.2.2. Ensayo de residuos de ignición. La porción de ensayo (2 g) fue incinerada a la llama hasta total carbonización y desaparición de humos blancos. Posteriormente se incineró en mufla (*Carbolite, Inglaterra*) a 750–800°C, durante 6 horas, hasta total desaparición del carbón de la materia orgánica. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó, repitiéndose sucesivamente esta operación hasta peso constante (USP 27 [10]). Los resultados se expresaron sobre la base de tres réplicas.

2.2.3. Ensayo de metales pesados. El ensayo fue realizado empleando un equipo de absorción atómica (*UNICAM SOLAR, Inglaterra*). En el análisis se determinó el contenido de los siguientes elementos: calcio, magnesio, hierro, cobre, plomo, cinc, níquel, sodio, potasio y manganeso (USP 27 [10]).

2.2.4. Determinación de material insoluble. La disolución de cada muestra de quitosano al 1% en ácido acético al 1% se filtró a través de papel de filtro. El papel con el residuo fue secado a 105°C, hasta peso constante. Los cálculos se realizaron sobre la base de tres réplicas [8].

2.2.5 Ensayo de contenido de nitrógeno. La determinación se realizó por el método de *Kjeldahl* (USP 27 [10]). Se valoró con disolución de ácido sulfúrico 0,01 N hasta cambio

de coloración de verde a azul. El ensayo se realizó por triplicado.

2.2.6. Ensayo del porcentaje de grupos aminos libres y grado de desacétilación (GD). El porcentaje de grupos aminos libres se determinó empleando la técnica potenciométrica reportada por *Broussignac* [11] y *Xuan* et al. [12]. En la misma se analizaron por triplicado cada una de las muestras de quitosano estudiadas.

2.2.7. Espectroscopia Infrarroja (IR). Se empleó la técnica de KBr para el registro de los espectros. El espectro infrarrojo fue obtenido en un espectrofotómetro (EQUINOX, *Bruker*, Alemania) en un intervalo de frecuencia de $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$. Las absorbancias a 1.655 cm^{-1} (banda amida I), como medida del contenido del grupo N-acetilo, y 3.450 cm^{-1} (banda hidroxilo) fueron determinadas empleando el método propuesto por *Baxter* et al. [13] y las modificaciones reportadas por *Domszy* y *Roberts* [14].

2.2.8. Difracción de Rayos-X. Los difractogramas de los polvos de quitosano, se obtuvieron con radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($1,54 \text{ \AA}$) empleando un difractómetro de rayos-X D8 Advance *Brucker*, Alemania. El intervalo angular fue desde 5 a 60° con incrementos de $0,1^\circ$ y el tiempo de medición fue de 15 segundos/incremento, calculándose el porcentaje de cristalinidad de las muestras según el método propuesto por *Fernández* et al. [15].

2.2.9. Estudio de absorción de humedad. El estudio se llevó a cabo por un período de 10 días, colocando las muestras de quitosano por triplicado, en desecadoras a diferentes porcentajes de humedad relativa (HR) empleando disoluciones de sales saturadas. Para el desarrollo del método se utilizaron diferentes sales, calidad analítica, que se corresponden con los porcentajes de humedad siguientes: 0 (sílica gel), 43 (carbonato de potasio), 84 (bromuro de potasio) y 98% (nitrato de plomo) [15]. El comportamiento de la absorción de humedad fue calculado a partir del incremento del peso promedio de las muestras en el tiempo de almacenamiento.

2.2.10. Ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para la obtención de las curvas calorimétricas, se pesaron aproximadamente $3,5 \text{ mg}$ de muestra las que se colocaron en un depósito de aluminio. Una corriente de nitrógeno a razón de 200 mL/min fue empleada como gas de purga. Todo el procedimiento se realizó con un calorímetro (*Piris*, *Perkin Elmer*, EUA) a una velocidad de corrida de 10 grados/minuto según las condiciones descritas por *Fernández* et al. [15].

2.2.11. Microscopía electrónica de barrido (SEM). El ensayo se llevó a cabo empleando un microscopio electrónico de barrido acoplado a un detector de rayos-X (TESCAN TS 5130 SB acoplado al analizador de rayos-X OXFORD instruments, INCA 350,

EUA), recubriendo las muestras con oro.

2.2.12. Ensayo de pureza microbiológica. Se realizó el conteo microbiológico y diferencial para la evaluación de la pureza microbiológica de cada una de las muestras de quitosano obtenidas según lo descrito en la USP 27 [10] para medicamentos no estériles.

2.2.13 Influencia del proceso de obtención en las propiedades físico-químicas de los quitosanos. En la evaluación y comparación de los resultados obtenidos se empleó la prueba de homogeneidad basada en χ^2 [16]. A través de la técnica multivariada de mínimos cuadrados (PSL) del programa SIMCA-P V11.0.0.0, se determinaron las relaciones entre las variables independientes (condiciones de obtención) y dependientes (propiedades físico-químicas), entre las muestras de quitosano derivadas de la quitina de langosta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de las propiedades físico-químicas de los quitosanos. La evaluación de las condiciones del proceso de obtención de los quitosanos, y sus efectos sobre las propiedades físico-químicas, mostró los resultados que aparecen en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1: Resultados en la determinación de sólidos totales, pérdida por desecación, residuos de ignición y material insoluble.

Muestras	Pérdida por desecación (%)	Sólidos Totales (%)	Residuos de Ignición (%)	Material Insoluble (%)
Q1	14,51 ± 0,05	85,48 ± 0,05	0,71 ± 0,04	2,51 ± 0,20
Q2	14,12 ± 0,11	85,87 ± 0,11	0,86 ± 0,05	2,75 ± 0,34
Q3	12,88 ± 0,01	87,11 ± 0,01	0,62 ± 0,03	2,76 ± 0,39
Q4	12,34 ± 0,01	87,65 ± 0,01	0,85 ± 0,02	2,50 ± 0,23
Q5	15,19 ± 0,06	84,80 ± 0,06	0,88 ± 0,04	2,96 ± 0,54
Q6	15,02 ± 0,08	84,97 ± 0,08	0,87 ± 0,07	2,53 ± 0,11
MMW	11,69 ± 0,01	88,30 ± 0,01	0,48*	0,34*
HMW	13,67 ± 0,02	86,32 ± 0,02	0,61*	0,94*

*Datos del proveedor.

Al analizar el contenido de humedad de las muestras comerciales y nacionales se evidencian valores superiores al 10%, en todos los casos. Tomando en cuenta que como resultado de la desacetilación termoalcalina la cantidad de grupos amino libres en la cadena polimérica aumentan, es de esperar una mayor capacidad de absorción de agua en el

quitosano, respecto a la quitina. Se distinguen tres sitios de humedad predominantes en la quitosano como son: los grupos hidroxilos libres de las cadenas, grupos aminos y el final de la cadena polimérica, compuesta por un grupo hidroxilo ó un grupo aldehído [17]. Tanto la quitina como el quitosano poseen una estructura porosa con regiones cristalinas y amorfas, lo que facilita la absorción del agua en su superficie. El contenido de sólidos totales se comportó de manera similar, tanto en las muestras nacionales como en las de referencia, oscilando los valores entre 84 y 88%, los que están en correspondencia con los obtenidos en la pérdida por desecación.

Los resultados correspondientes a la determinación de cenizas totales ó residuos de ignición muestran valores, en todos los casos, menores del 1%, límite establecido para este parámetro en las especificaciones de calidad de las muestras comerciales, HMW y MMW, tomadas como referencia. Las muestras correspondientes a las disoluciones de NaOH 50% (m/m) mostraron mayores valores de residuos respecto a los obtenidos para 45% (m/m) de NaOH. Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta que al aumentar la concentración de las disoluciones de NaOH, aumenta también su viscosidad, lo que unido a las características estructurales del biopolímero facilita su retención en el mismo. Teniendo en cuenta las futuras aplicaciones en el campo médico-farmacéutico del biopolímero, los resultados alcanzados indican el bajo contenido de materiales inorgánicos en todas las muestras de quitosano, y por tanto su calidad. Estos resultados están en correspondencia con el estudio del contenido de impurezas metálicas realizado por espectroscopia de absorción atómica. Las cantidades de los iones metálicos estuvieron en los rangos aceptados para uso farmacéutico. El calcio fue el elemento mayoritario en las muestras nacionales. Los mismos están en concordancia con el alto contenido calcáreo característico del carapacho de la langosta en comparación con otros crustáceos [18] y los obtenidos por García [19] en el análisis de la quitina cubana. Por lo tanto, impurezas como los elementos minerales (calcio) pueden estar influyendo en los resultados del parámetro residuos de ignición.

El contenido de material insoluble en las muestras nacionales, independientemente de las condiciones para su obtención, es superior al de las muestras comerciales. Tomando en consideración la presencia de materiales inorgánicos y la composición metálica de las muestras de quitosanos, con respecto a las de referencia, además de otros contaminantes, pueden justificar estos resultados. Al mismo tiempo es necesario tener presente la variación en las condiciones de obtención de los quitosanos cubanos y la diferencia en cuanto al origen del material de partida, la quitina, y sus propiedades.

Con la técnica potenciométrica para la cuantificación del grado de desacetilación del quitosano, se realizó la determinación a las muestras nacionales y de referencia (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del contenido de nitrógeno, grupos aminos libres y grado de desacetilación de las muestras de quitosanos.

Muestras	Contenido de Nitrógeno (%)	Porcentaje de grupos aminos	GD (%)
Q1	bh $7,01 \pm 0,29$	$7,80 \pm 0,00$	$78,84 \pm 0,01$
	bs $8,20 \pm 0,34$	$9,13 \pm 0,00$	$92,24 \pm 0,02$
Q2	bh $6,89 \pm 0,14$	$6,94 \pm 1,50$	$70,18 \pm 1,51$
	bs $8,03 \pm 0,17$	$8,09 \pm 1,75$	$81,73 \pm 1,77$
Q3	bh $7,04 \pm 0,01$	$7,81 \pm 0,01$	$78,95 \pm 0,00$
	bs $8,08 \pm 0,01$	$8,97 \pm 0,01$	$90,63 \pm 0,00$
Q4	bh $7,30 \pm 0,26$	$6,94 \pm 1,50$	$70,18 \pm 1,51$
	bs $8,33 \pm 0,31$	$7,92 \pm 1,72$	$80,06 \pm 1,73$
Q5	bh $6,82 \pm 0,02$	$7,81 \pm 0,00$	$78,94 \pm 0,03$
	bs $8,05 \pm 0,02$	$9,21 \pm 0,00$	$93,09 \pm 0,03$
Q6	bh $6,75 \pm 0,06$	$7,82 \pm 0,01$	$79,00 \pm 0,06$
	bs $7,94 \pm 0,07$	$9,20 \pm 0,01$	$92,97 \pm 0,07$
MMW	bh ---	$6,94 \pm 1,50$	$70,16 \pm 1,52$
	bs ---	$7,86 \pm 1,70$	$79,46 \pm 1,72$
HMW	bh ---	$6,94 \pm 1,50$	$70,15 \pm 1,52$
	bs ---	$8,04 \pm 1,74$	$81,26 \pm 1,76$

bh: base húmeda; bs: base seca; ---: no determinada

Según se aprecia, el contenido de nitrógeno total en las muestras cumple con el límite establecido para este parámetro (7–8 %), siendo en base seca ligeramente superior al límite máximo. Por otra parte, se observan adecuados resultados en el grado de desacetilación, correlacionados con los porcentajes de grupos aminos libres determinados potenciométricamente. Según las condiciones de obtención de las muestras nacionales, existe la tendencia al incremento en el porcentaje de grupos aminos libres y grado de desacetilación en las muestras obtenidas con disoluciones de álcali más diluidas, con independencia del tiempo de tratamiento. Los procedimientos usuales de desacetilación termoalcalina de la quitina permiten lograr productos desacetilados en un 75–85 %. La obtención de quitosanos,

solubles en ácidos diluidos (generalmente con más del 70% de grado de desacetilación) constituye por lo tanto un criterio de la calidad del proceso de obtención de los quitosanos cubanas. Variaciones lógicas se aprecian entre los resultados expresados en base húmeda (bh) y base seca (bs), de ahí la importancia del contenido de humedad ya comentado.

Espectroscopia IR. Los espectros (Figura 1) exhiben las bandas características de este biopolímero, lo que permite corroborar la identidad química del quitosano. Se aprecian las bandas correspondientes al ν_{OH} y ν_{NH} ($3.600 - 3.400 \text{ cm}^{-1}$), característicos de alcoholes, aminas y amidas presentes en la estructura del quitosano desacetilado. También aparecen las bandas del $\nu_{C=O}$ y ν_{NH} , características de amidas, fundamentalmente $1.700 - 1.600 \text{ cm}^{-1}$. Aproximadamente entre $1.660 - 1.555 \text{ cm}^{-1}$ aparecen las bandas características de las amidas I (1655 cm^{-1}) y amida III (1313 cm^{-1}), respectivamente. Este comportamiento se corresponde con lo planteado por *Nieto* [22] y *Fernández* et al. [15].

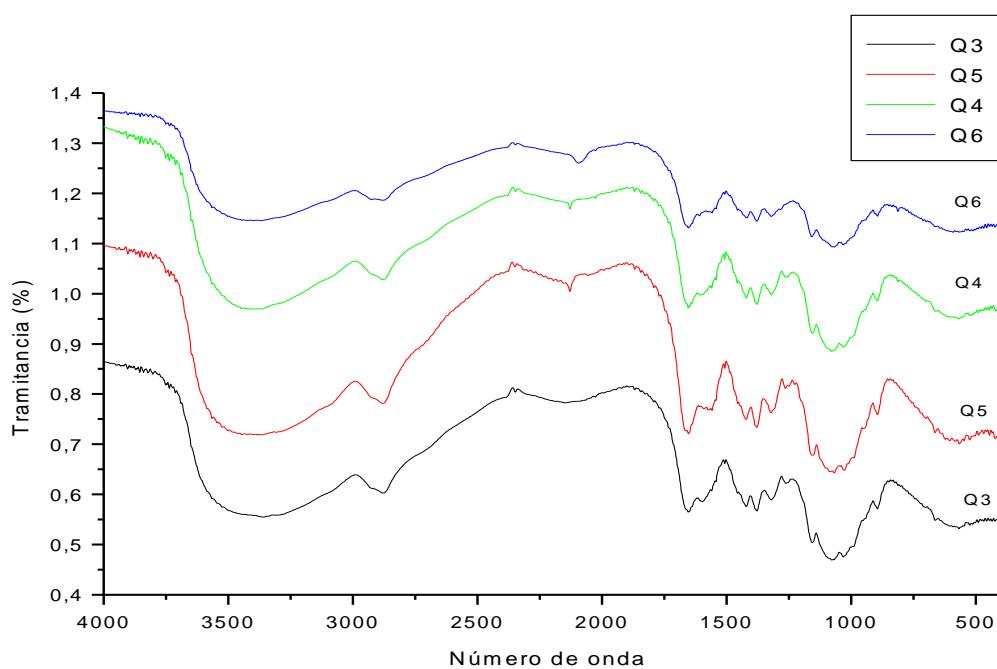


Figura 1. Espectros IR de las muestras Q3, Q4, Q5 y Q6.

Debido a la simplicidad de la espectroscopia IR, es uno de los métodos más empleados no solo en la identificación sino también en la determinación del grado de N-acetilación del quitosano. No obstante, a las ventajas en cuanto a rapidez, y que no precisa de la disolución de la muestra en un disolvente para su empleo, la preparación del material de estudio, tipo de instrumento empleado y condiciones experimentales de trabajo influyen notablemente en los resultados [20]. De acuerdo a las condiciones establecidas para la determinación del grado de

desacetilación por espectroscopia IR los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del grado de desacetilación (%) obtenidos por IR y potenciometría.

Muestras	Espectroscopia infrarroja	Potenciometría (bs)
Q1	86 - 89%	92,24 ± 0,02
Q2	86 - 89%	81,73 ± 1,77
Q3	88%	90,63 ± 0,00
Q4	88%	80,06 ± 1,73
Q5	88%	93,09 ± 0,03
Q6	87%	92,97 ± 0,07
MMW Método colorimétrico* GD: 81,4%		79,46 ± 1,72
HMW Método colorimétrico* GD: 79,0%		81,26 ± 1,76

*suministrado por el proveedor

Como se puede ver, existe una dependencia entre los valores de grado de desacetilación y el método analítico empleado en su determinación, por lo que se recomienda especificar, método y condiciones, si se desean realizar comparaciones. Es muy importante la selección adecuada de las condiciones al analizar los espectros IR para alcanzar buenos resultados. Brugnerotto et al. [21] realizaron una extensa investigación acerca de la diversidad de líneas de base que pueden ser empleadas. La potenciometría tiene la ventaja de que cuantifica los grupos aminos protonados directamente, por lo que no existe el problema de la no accesibilidad de los grupos aminos durante la etapa de protonación, como resultado de la formación de la sal, siempre que se emplee un ácido apropiado [14, 20]. Sin embargo, teniendo presente que el fundamento químico del método se basa precisamente en la reacción con los grupos aminos, es de suponer que la presencia de contaminantes (estructura nitrogenada) remanentes en las muestras puede afectar ó interferir en los resultados. Debido a ello, la comparación de los resultados se hace difícil, aún más cuando se trabajan diferentes fuentes de quitina para producir quitosano, y diversos procedimientos para su caracterización.

Cristalinidad y comportamiento térmico. La Figura 2 muestra los difractogramas de las muestras de quitosano. Los patrones de difracción de rayos-X incluyen las mismas reflexiones para las diferentes muestras de quitosanos, indicando similar estructura cristalina y por lo tanto la estabilidad de dicha estructura, aun bajo condiciones de obtención diferentes.

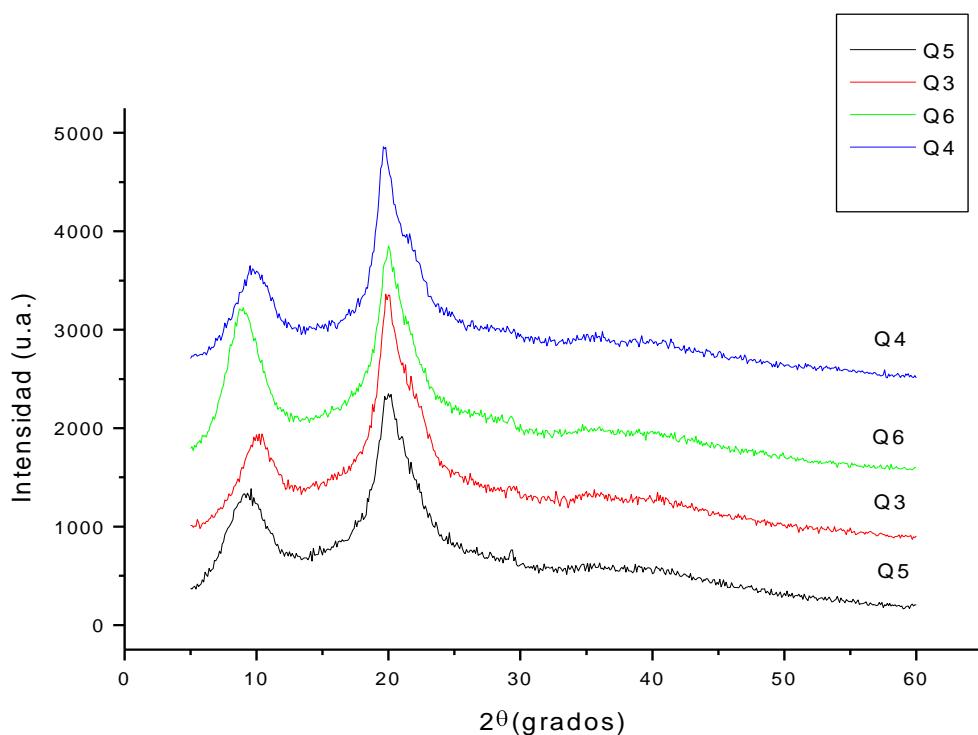


Figura 2. Difractogramas de rayos-X de las muestras Q3, Q4, Q5 y Q6.

Las reflexiones obtenidas coinciden con las reportadas por Fernández et al. [15] para las muestras Q1 y Q2, respectivamente y las comerciales. Los difractogramas muestran dos máximos de difracción aproximadamente a 10 y 20° (2θ), correspondientes a la forma hidratada del quitosano [2]. Todas las muestras presentan fases cristalinas y amorfas. Los resultados de la determinación de la cristalinidad se reflejan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cristalinidades de las muestras de quitosano.

Muestras	Porcentaje $\pm 10\%$
Q1	39,00*
Q2	45,00*
Q3	54,26
Q4	55,39
Q5	54,28
Q6	56,85

*Tomado de Fernández et al. [15]

Los patrones de difracción de las muestras Q3 y Q4, respectivamente, muestran que la reflexión de aproximadamente 10° (2θ) aparece a un ángulo de difracción ligeramente mayor. Las diferencias en la estructura molecular del quitosano tienen efecto sobre las difracciones de las moléculas cristalinas de quitosano en el pico de difracción a 10° (2θ) aproximadamente, lo que ha sido reportado anteriormente por *Nunthanid* et al. [23]. Al igual que en la quitina, las moléculas de quitosano en estado sólido están organizadas en regiones cristalinas, y coexisten con regiones amorfas. Tomando en consideración que la materia prima de partida tiene reportado valores de cristalinidad del 50% [19, 22], se demuestra la estabilidad de la estructura cristalina en los quitosanos estudiados, como resultado del tratamiento termoalcalino.

Por su parte, los eventos térmicos (endotérmicos y exotérmicos) concuerdan con los reportados por *Fernández* et al. [15] para las muestras Q1 y Q2, respectivamente, existiendo una relación entre el grado de desacetilación y la energía absorbida en el evento endotérmico, de manera que a mayor energía absorbida por la muestra, mayor es el grado de desacetilación que posee, comportándose de igual forma en el evento exotérmico (Tabla 5).

De acuerdo a estos resultados, las energías absorbidas durante el primer proceso se corresponden a la energía requerida para vaporizar toda el agua que se encuentra fuertemente asociada al quitosano. Por lo tanto, las variaciones en cuanto a la posición y forma del pico endotérmico reflejan diferencias en la capacidad de absorción de humedad y fortaleza de la interacción polímero – agua como han reportado *Sakurai* et al. [24]; *Kittur* et al. [25] y *Peniche* [2]. En cuanto al segundo evento, picos exotérmicos correspondientes a la descomposición del polímero, fueron registrados entre 280 - 300°C. Las diferencias en cuanto a cristalinidad, contenido de agua absorbida, grado de desacetilación, entre otros, pueden estar asociados con las variaciones en los resultados determinados para las muestras estudiadas.

Tabla 5. Eventos térmicos en las muestras de quitosano.

Muestras	Evento endotérmico		Evento exotérmico	
	ΔH (J/g)	Temperatura (°C)	ΔH (J/g)	Temperatura (°C)
Q1	92,00	133,00	-72,605	295,563
Q2	64,00	147,00	-69,056	297,231
Q3	887,034	165,713	-70,606	295,917
Q4	292,154	164,882	-41,351	296,491
Q5	1003,679	166,731	-75,124	294,731
Q6	221,718	168,878	-67,254	293,865

Absorción de humedad. Los resultados de la capacidad de absorción de humedad de las muestras de quitosano se aprecian en la Figura 3.

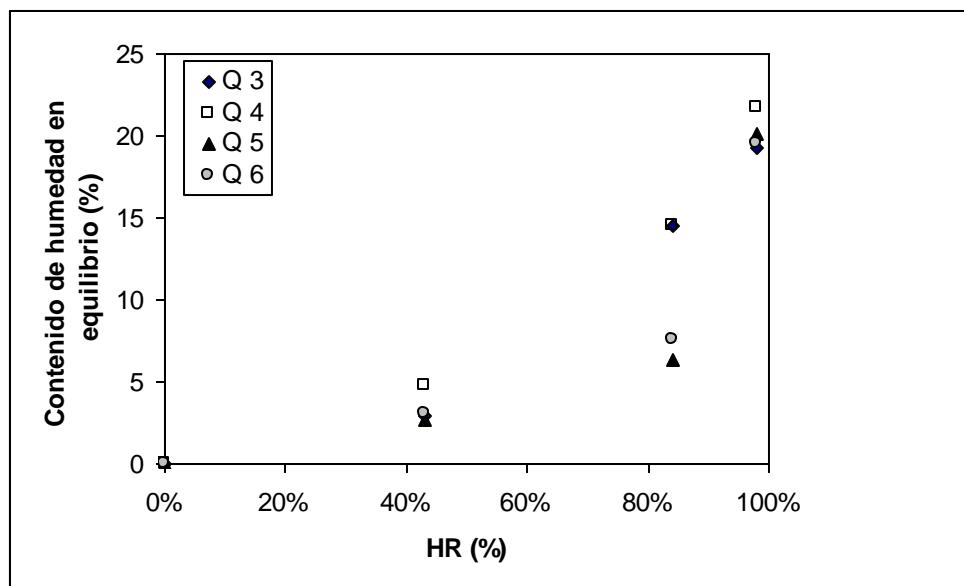


Figura 3. Resultados del estudio de absorción de humedad.

Las isotermas de absorción describen una forma en S, comportamiento reportado comúnmente para polímeros hidrófilos no solubles en agua [26]. La ganancia total de humedad en las muestras fue entre 19 y 20 % (m/m), independientemente de las condiciones para su obtención. Estos resultados sugieren similitud de afinidad por el agua, comportamiento que se hace más marcado a elevadas humedades, fundamentalmente superiores al 85%. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Fernández et al. [15] para muestras de quitosanos con diferentes masas moleculares y GD. La absorción de agua en poliamidas depende de la cristalinidad del polímero y la naturaleza química de los sitios de unión. El quitosano posee una estructura porosa con regiones amorfas y cristalinas, lo que facilita la absorción de agua en su superficie. Impurezas como elementos minerales (calcio), elemento mayoritario de las muestras en estudio, y proteínas pueden afectar la capacidad de absorción de agua en las quitinas y quitosanos, dependiendo de las fuentes y el proceso de obtención, lo que hace muy complejo el fenómeno.

Resultados de la microscopía electrónica de barrido: En la Figura 4 puede observarse la morfología de la superficie de las muestras de Q1 y Q3, respectivamente, y la forma asimétrica de las mismas. El resto de las muestras presentaron un comportamiento similar.

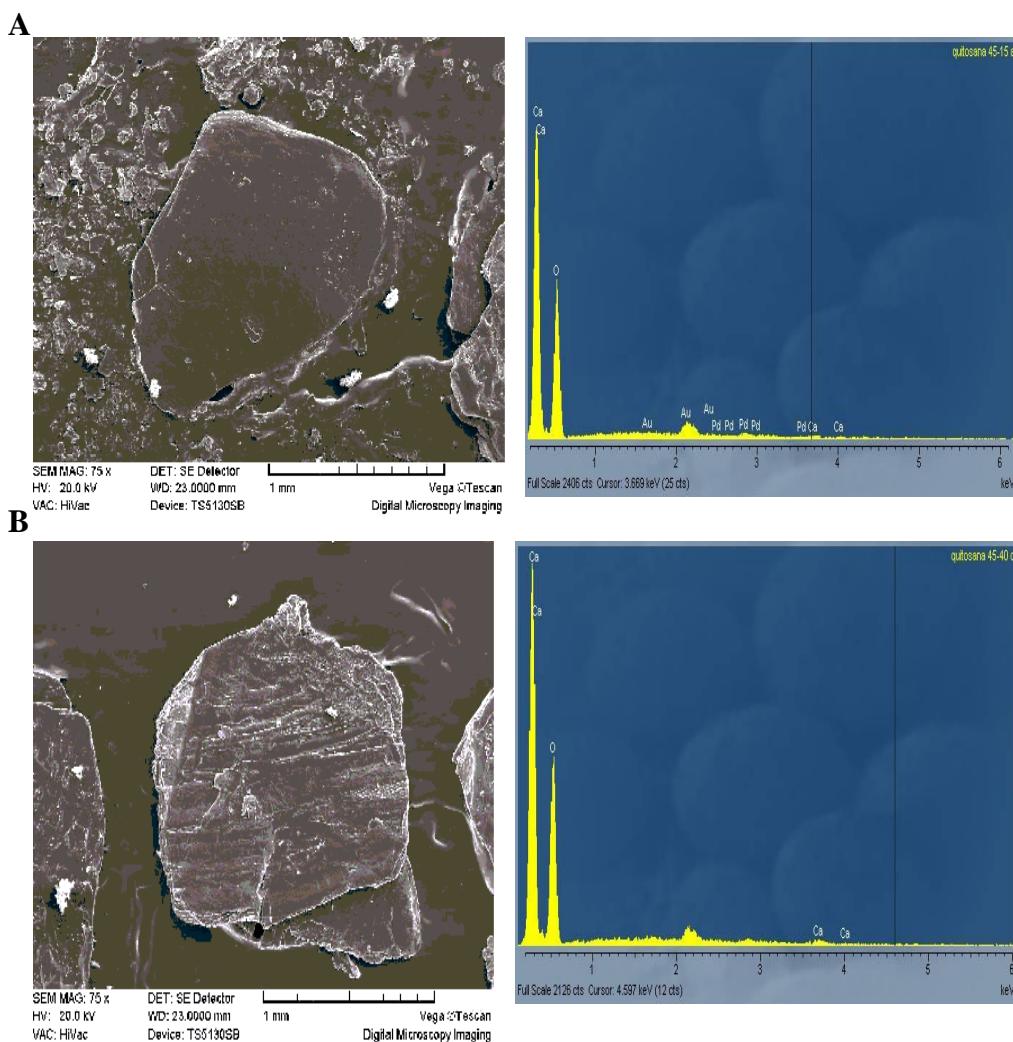


Figura 4. Imagen de SEM, acoplada al detector de rayos-X, para las muestras Q1 (A) y Q3 (B).

A través del análisis por absorción atómica se evidenció que el calcio era el elemento mayoritario en las muestras nacionales, estos resultados están acordes con los obtenidos a través del detector de rayos-X acoplado al microscopio electrónico.

Evaluación microbiológica. Todas las muestras satisfacen los límites establecidos por la USP 27 [10] para materias primas no estériles, por lo que desde el punto de vista microbiológico cumplen. Por lo tanto, las variaciones en el proceso de obtención de los quitosanos, no tienen influencia en los resultados microbiológicos, bajo las condiciones estudiadas.

Análisis estadístico. Con la finalidad de evaluar la influencia del proceso de obtención en las propiedades físico-químicas de las muestras de quitosano estudiadas, se aplicó la prueba de homogeneidad basada en χ^2 . Como se aprecia en la Tabla 6, los resultados obtenidos para las variables respuestas consideradas, independientemente de las condiciones

en el proceso de obtención, son similares a los esperados. Por lo tanto, no hay diferencias entre las condiciones y los resultados obtenidos para dichas variables (χ^2 observados < χ^2 tabulada).

Tabla 6. Valores observados y esperados al aplicar la prueba de homogeneidad χ^2 .

Muestra	Resultados observados						
	ST (%)	PD (%)	RI (%)	N (%)	NH₂ (%)	GD (%)	MI (%)
Q1	85,48	14,52	0,71	7,01	7,81	78,85	2,63
Q2	85,87	14,13	0,87	6,89	6,95	70,18	2,70
Q3	87,11	12,89	0,62	7,04	7,82	78,96	2,50
Q4	87,66	12,34	0,86	7,30	6,95	78,95	2,65
Q5	84,81	15,19	0,88	6,83	7,82	78,95	2,71
Q6	84,97	15,03	0,87	6,75	7,82	79,00	2,53
Resultados esperados							
Q1	86,69	14,13	0,81	7,03	7,59	78,12	2,64
Q2	82,55	13,46	0,77	6,69	7,23	74,38	2,52
Q3	86,66	14,13	0,81	7,02	7,59	78,09	2,64
Q4	86,56	14,11	0,81	7,02	7,58	78,00	2,64
Q5	86,77	14,14	0,81	7,03	7,60	78,19	2,64
Q6	86,67	14,13	0,81	7,03	7,59	78,10	2,64
χ^2 observados = 1,272419				χ^2 tabulada = 43,77 (GL = 30, 95% confianza)			
χ^2 observados < χ^2 tabulada							

ST: sólidos totales; PD: pérdida por desecación; RI: residuos de ignición; N: nitrógeno, NH₂: grupos aminos libres; GD: grado de desacetilación; MI: material insoluble

A pesar de no detectar diferencias a partir de los resultados de la prueba de homogeneidad χ^2 , se aplicó la técnica multivariada de mínimos cuadrados parciales (PSL) para detectar las relaciones existentes entre las variables independientes y dependientes. Al observar la Figura 5, se aprecia que tanto el tiempo de tratamiento como la temperatura están relacionados directamente con el contenido de nitrógeno y sólidos totales, e inversamente con las pérdidas por desecación y el material insoluble. Por su parte, el incremento de la concentración de la disolución de NaOH contribuye a obtener un menor porcentaje de grupos aminos libres y por lo tanto menor GD, y aumentan los residuos de ignición. Estos resultados están en correspondencia con lo explicado anteriormente.

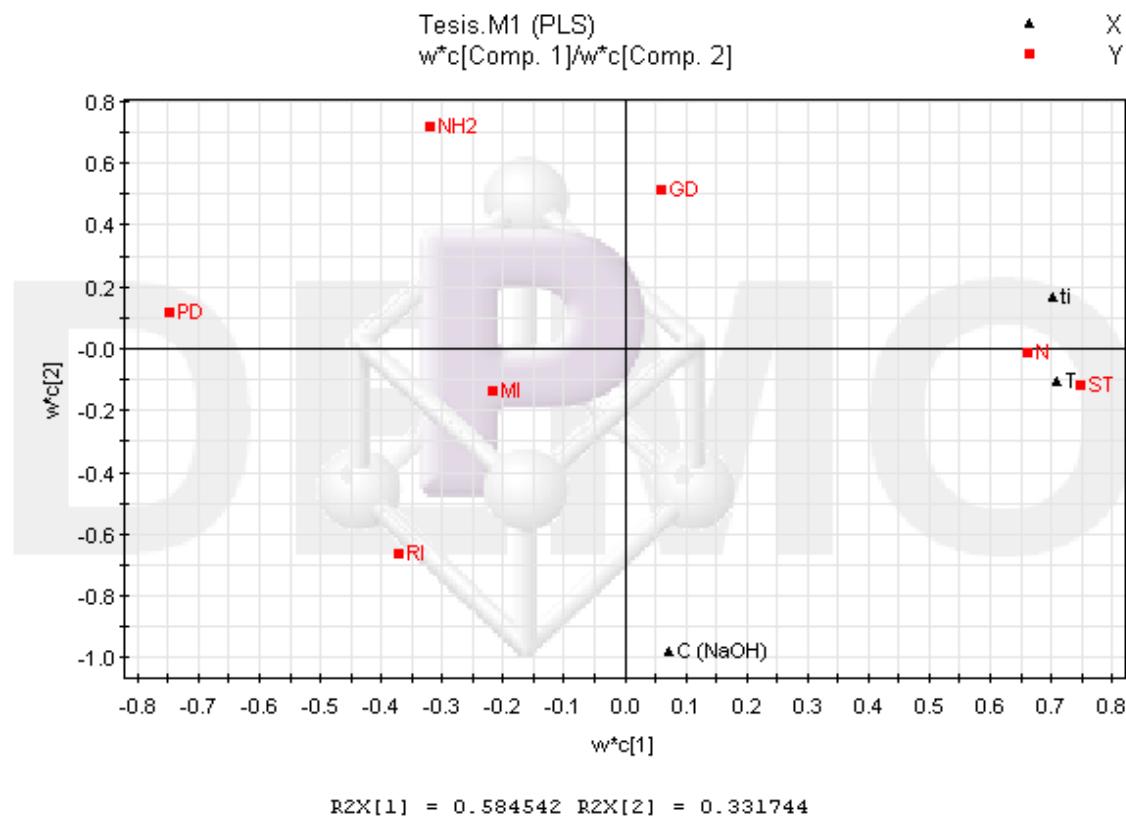


Figura 5. Marcas de la influencia de las condiciones de obtención sobre las propiedades físico-químicas de los quitosanos estudiados. ST: sólidos totales; PD: pérdida por desecación; RI: residuos de ignición; N: nitrógeno, NH₂: grupos aminos libres; GD: grado de desacetilación; MI: material insoluble; ti: tiempo; T: temperatura; C (NaOH): concentración de hidróxido de sodio.

4. CONCLUSIONES

Las propiedades de contenido de nitrógeno, residuos de ignición, grado de desacetilación, absorción de humedad, comportamiento térmico y cristalinidad de los quitosanos nacionales fueron similares a las muestras comerciales. El contenido de iones metálicos estuvo en los rangos aceptados para uso farmacéutico. La calidad microbiológica de las muestras de quitosanos no mostró dependencia con el método termoalcalino de obtención. La comparación estadística de las variables estudiadas de las muestras nacionales no mostró diferencias significativas con las calculadas a través de la prueba de χ^2 . Se demuestra que la calidad de los quitosanos, derivadas de quitina de langosta, es comparable a la de las muestras comerciales empleadas en el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Synowiecki J, Al-Khateeb NA, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **43**(2), 145 (2003)
- [2] Peniche Covas C “Estudios sobre quitina y quitosana”. Tesis Doctoral. Facultad de Química,

- Universidad de la Habana, Cuba (2006)
- [3] Singla AK, Chawla M, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1047 (2001)
- [4] Harish Prashanth KV, Kittur FS, Tharanathan RN, *Carbohydr. Polym.*, **50**, 27 (2002)
- [5] Rege PR, Block LH, *Carbohydr. Res.*, **321**, 235 (1999)
- [6] Rege PR, Garmise RJ, Block LH, *Int. J. Pharm.*, **252**, 41 (2003)
- [7] Felt O, Buri P, Gurny R, *Dug Dev. Ind.Pharm.*, **24**, 979 (1998)
- [8] Argüelles W, Heras Caballero A, Acosta N, Galed G, Gallardo A, Miralles B et al., “Caracterización de quitina y quitosano”. En “*Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*”. Pastor de Abram A. (editor) Programa CYTED, CIAD y Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú, Agosto 2004, p. 195-197
- [9] Henriques RD, Nieto OM “*Método para la obtención de quitina suficientemente pura*”. Patente Cubana No. 20760 (1980)
- [10] USP 27, 2004. United States Pharmacopoeia XXVII and National Formulary 22st: United States Pharmacopeial Convention. Versión Electrónica.
- [11] Broussignac P, *Chem. Ind. Genie Chim.*, **99**, 1241 (1968)
- [12] Xuan J, Lirong Ch, Wei Z, *Carbohydr. Polym.*, **54**, 457 (2003)
- [13] Baxter A, Dillon M, Taylor KDA, Roberts GAF, *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, 166 (1992)
- [14] Domszy JG, Roberts GA, *Makromolecules Chemistry*, **186**, 1671-1677 (1985)
- [15] Fernández M, Heinämäki J, Räsänen M, Maunu SL, Karjalainen M, Nieto OM, Iraizoz A, Yliruusi J, *Carbohydr. Polym.*, **58**, 401 (2004)
- [16] Sheskin DJ “*The Chi-Square test for r x c tables* (Test 16a: The Chi-Square test for homogeneity)”. En “*Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*”. Segunda Edición. Chapman & Hall/CRC, USA. 2000. Disponible en: www.crcpress.com
- [17] Gocho H, Shimizub H, Taniokac A, Chouc TJ, Nakajimal T, *Carbohydr. Polym.*, **41**, 87-90 (2001)
- [18] Nakamatsu J, Rodríguez N, “*Química de la quitina y el quitosano*”. En “*Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*”. Pastor de Abram A. (editor) Programa CYTED, CIAD y Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú, Agosto 2004, p. 75-104
- [19] García Mir V “*Potencialidades de la quitina cubana en la elaboración de tabletas*”. Tesis Doctoral. IFAL, Universidad de la Habana, Cuba (2006)
- [20] Khan TA, *J. Pharm. Pharmaceutic. Sci.*, **5(3)**, 205 (2002)
- [21] Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Argüelles-Monal W, Debrières J, Rinaudo M, *Polymer*, **42**, 3569 (2001)
- [22] Nieto OM. “*Quitina. Su estudio y utilización como fármaco acelerador de la cicatrización*”. Tesis Doctoral. IFAL, Universidad de la Habana, Cuba (1993)
- [23] Nunthanid J, Puttipipatkhachorn S, Yamamoto K, Peck GE, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 143 (2001)
- [24] Sakurai K, Maegawa T, Takahashi T, *Polymer*, **41**, 7051-7056 (2000)
- [25] Kittur FS, Haris Prashanth KV, Udaya Sankar K, Tharanathan RN, *Carbohydr. Polym.*, **49**, 185 (2002)

[26] Airaksinen S “*Role of excipients in moisture sorption and physical stability of solid pharmaceutical formulations*”. Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki, Finlandia (2005)