

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN DE QUITOSANO EMPLEANDO CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO.

Adrián Chávez*, Sabrina Acevedo y Enmanuel Luzardo

Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT), La Cañada de Urdaneta 4033, Zulia, Venezuela.

*Autor de correspondencia: ajchavez3000@gmail.com

RESUMEN

En esta investigación se desarrollaron ecuaciones para la determinación del grado de desacetilación (GDD) de quitosano por medio de la cuantificación de nitrógeno orgánico. El quitosano se obtuvo a partir de exoesqueletos de cangrejos mediante desproteinización, desmineralización y desacetilación de la quitina. Se cuantificó nitrógeno orgánico en muestras de quitina, quitosano experimental y quitosano comercial mediante el método de Kjeldahl. Para la aplicación de las ecuaciones se tomaron en cuenta los porcentajes de nitrógeno, humedad y cenizas de las muestras, para obtener gravimétricamente la relación del grado de desacetilación. Para verificar la utilidad de las ecuaciones, se compararon los resultados con los valores de GDD obtenidos mediante las ecuaciones de Brugnerotto, utilizando espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR). Para el quitosano experimental, se obtuvo un GDD de 84,35 % utilizando el método propuesto y 84,64 % con el método de Brugnerotto. Para el quitosano Sigma-Aldrich ≥ 75 %, el GDD obtenido con el método propuesto fue 82,12 %, mientras que con el método de Brugnerotto el resultado fue 80,19%.

Palabras clave: *Quitosano, grado de desacetilación, nitrógeno Kjeldahl, espectroscopía de infrarrojos.*

ABSTRACT

In this research, equations were developed to determine the degree of deacetylation (DD) of chitosan through the quantification of organic nitrogen. Chitosan was obtained from crab exoskeletons by deproteinization, demineralization, and deacetylation of chitin. Organic nitrogen was quantified in samples of chitin, experimental chitosan, and commercial chitosan, using the Kjeldahl method. For the application of the equations, the percentages of nitrogen, humidity, and ash of the samples were taken into account, to gravimetrically obtain the relationship of the degree of deacetylation. To verify the usefulness of the equations, the results were compared with the DD values obtained by the Brugnerotto equations, using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). For experimental chitosan, a DD of 84.35% was obtained using the proposed method and 84.64% using the Brugnerotto method. For Sigma-Aldrich chitosan $\geq 75\%$, the DD obtained with the proposed method was 82.12%, while with the Brugnerotto method, the result was 80.19%..

Keywords: *Chitosan, degree of deacetylation, Kjeldahl nitrogen, FTIR.*

1. INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polímero natural más abundante de la Tierra después de la celulosa. El quitosano es el derivado de la quitina que se produce parcialmente por desacetilación alcalina a alta temperatura. Con sus propiedades biocompatibles, biodegradables y no tóxicas, ha sido ampliamente utilizado en muchos campos, como la alimentación, la agricultura, la medicina, la ingeniería y el medio ambiente. El grado de desacetilación (GDD) se define como la fracción molar de la desacetilación en la posición C-2 en la 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos. El GDD del quitosano es uno de los parámetros más importantes para identificar la calidad del quitosano. Influye en varias propiedades fisicoquímicas del quitosano, como solubilidad, floculación, capacidad quelante con iones metálicos, acilación selectiva, formación de películas y fibras, entre otras, Wang [1].

El quitosano es soluble en ácidos acuosos o en ácidos orgánicos. Inicialmente, la solubilidad en ácido se utiliza para distinguir la quitina del quitosano. Posteriormente, se mide el grado de acetilación (DA) para distinguir los dos, en donde la quitina contiene más del 50 % de residuos de glucosamina N-acetilada ($DA > 50 \%$), mientras que el quitosano tiene de 0 a 50 % de residuos de glucosamina N-acetilada ($0 \% \leq DA < 50 \%$), el grado de desacetilación es $GDD = 100 - DA$. Se ha observado experimentalmente que, en algunos casos, cuando el DA se acerca al 0 %, el quitosano se torna altamente cristalino y se vuelve insoluble de nuevo en ácidos. Por lo tanto, la medición del GDD es la mejor forma cuantitativa de diferenciar quitina de quitosano. Han [2].

La cuantificación del grado de desacetilación (GDD) de quitosano es el parámetro más importante cuando se realizan investigaciones con este compuesto, la variación del GDD depende del tipo de condiciones empleadas en la reacción de desacetilación de la quitina, y la utilidad del mismo varía dependiendo de este parámetro y de la masa molecular, Duarte [3]. La caracterización de quitosano más empleada para determinar el grado de desacetilación es por medio de la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), empleando las ecuaciones de Brugnerotto [4]. Este método consiste en la medición de las áreas en absorbancia (A) de las bandas que aparecen en los espectros FTIR. En los análisis realizados, se reportó que las mediciones con ATR son de baja resolución, por lo que es difícil la cuantificación de las áreas, por lo que deben realizarse los análisis empleando transmisión con pastillas de KBr. Para este análisis, se realizó una curva de calibración empleando áreas de las bandas de absorción de 1420 cm^{-1} (A1420, grupos C-H) y 1320 cm^{-1} (A1320, grupos amida III), y la relación entre ellas A1320/A1420.

La ecuación despejada se muestra a continuación:

$$GDD = 87,8 - 31,92\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}}\right) \quad (1)$$

Donde GDD es el grado de desacetilación.

Otras formas de caracterizar la quitina y el quitosano pueden ser mediante el uso de diferentes técnicas como el análisis espectral, RMN C13, Wang [5], difracción de rayos X, Marsico [6], análisis elemental, microscopía electrónica de barrido (SEM), Yulianti [7] cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectroscopía RAMAN, Zajak [8] y calorimetría diferencial de barrido (DSC), Kumari, [9].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Muestras

Los exoesqueletos de cangrejo empleados para la preparación de quitosano, fueron suministrados por la empresa Vikingo Seafood C.A, de crustáceos provenientes del Lago de Maracaibo, Venezuela.

2.2 Obtención de quitosano

Los exoesqueletos de cangrejo fueron lavados, limpiados y secados durante 1 hora a 100 °C, luego fueron triturados hasta obtener un tamaño de partícula de aproximadamente 4 mm de diámetro. La desproteinización de exoesqueletos de cangrejos se realizó calentando 100 g en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10 % m/V. Se desmineralizó agregando una solución 6 M de ácido clorhídrico (HCl) a temperatura ambiente por 1 h. La desacetilación de la quitina se realizó con una solución acuosa de NaOH al 40 % m/V a temperaturas entre 100-110 °C durante 4 h, repitiendo 2 veces este procedimiento. Al finalizar la muestra se lavó con agua desionizada, se filtró y se secó a temperatura ambiente. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se obtuvieron 15 muestras de quitosano experimental.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Desarrollo de ecuaciones

3.1.1 Ecuación para determinar el grado de desacetilación (GDD)

Se desarrollaron las ecuaciones para la determinación del grado de desacetilación de quitosano empleando nitrógeno orgánico, en la Tabla 1 se muestran los valores teóricos de las unidades de masa atómicas (u) y moleculares empleadas y el valor teórico obtenido de nitrógeno para quitina y quitosano.

Tabla 1. Valores teóricos moleculares de quitina y quitosano.

Compuesto	MMM (u)	MAN (u)	Nitrógeno (%)
Quitina (Qa)	201	14	6,96
Quitosano (Qo)	160	14	8,75

MMM: masa molecular monomérica.

MAN: masa atómica del nitrógeno.

Una muestra de quitina cuando aún se encuentra mezclada con otros compuestos o humedad, presenta un valor de nitrógeno orgánico menor al valor teórico de 6,96 %, siendo este el máximo valor de nitrógeno. A medida que la quitina se convierte en quitosano se pierden grupos acetilos ($-\text{COCH}_3$), siendo reemplazados por hidrógenos ($-\text{H}$), este reemplazo mediante el proceso de desacetilación disminuye gradualmente la masa total monomérica de quitina de 201 u a quitosano 160 u (Tabla 1), lo que aumenta la proporción de nitrógenos en la estructura, aumentando el valor teórico de nitrógeno de 6,96 % en la quitina hasta 8,75 % en el quitosano 100 % desacetilado. Debido a este proceso, existe un rango de aumento del porcentaje de nitrógeno correspondiente a la pérdida de grupos acetilos (Figura 1), lo que implica que el rango de porcentaje de nitrógeno de 6,96 % a 8,75 % corresponde de 0 a 100 en el porcentaje o grado de desacetilación (GDD). En la figura 1 se muestra tal relación.

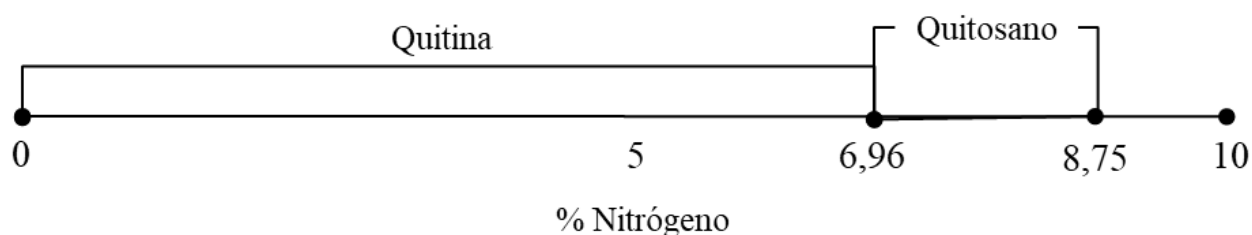


Figura 1. Relación del porcentaje de nitrógeno entre la quitina y el quitosano. (Fuente propia)

La diferencia teórica (\neq % NT) entre el porcentaje de nitrógeno del quitosano y la quitina sería expuesta en la siguiente relación:

$$\neq \% NT = \% NTQo - \% NTQa \quad (2)$$

Donde:

\neq % NT es la diferencia teórica en el porcentaje de nitrógeno entre el quitosano y la quitina.

% NTQo es el porcentaje de nitrógeno teórico del quitosano.

% NTQa es el porcentaje de nitrógeno teórico de la quitina.

Sustituyendo por los valores teóricos:

$$\neq \% NT = 8,75 \% \frac{m}{m} - 6,96 \% \frac{m}{m} = 1,79 \% \frac{m}{m} \quad (3)$$

Tomando este valor para la siguiente ecuación tenemos que:

$$GDD = \left(\frac{\% NEQo - \% NTQa}{\neq \% NT} \right) * 100 \quad (4)$$

Sustituyendo los valores teóricos tenemos:

$$GDD = \left(\frac{\% NEQo - 6,96 \% m/m}{1,79 \% m/m} \right) * 100 \quad (5)$$

Donde % NEQo, es el porcentaje de nitrógeno experimental obtenido de una muestra de quitosano.

En la figura 2 se muestra gráficamente la relación entre el porcentaje de nitrógeno teórico del quitosano y el grado de desacetilación (GDD). Empleando la ecuación 5 se puede corroborar que, por ejemplo; para un valor de nitrógeno de 8,16, sustituyendo en esta ecuación, el grado de desacetilación sería de 67,03, lo cual coincide con la gráfica de la figura 2.

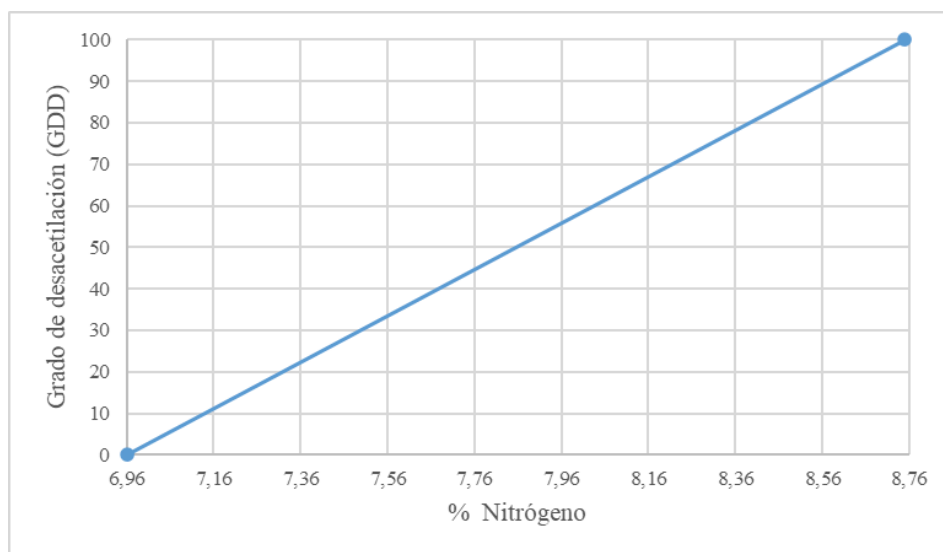


Figura 2. Relación entre el porcentaje de nitrógeno teórico del quitosano y el grado de desacetilación (GDD). (Fuente propia)

3.1.2 Ajuste de nitrógeno con cenizas y humedad

Para realizar el ajuste de nitrógeno empleando los valores de cenizas y nitrógeno, se puede emplear la siguiente ecuación:

$$\% N_{ajt} = \frac{\% N_{exp} \times 100}{100 - \% cenizas - \% humedad} \quad (6)$$

Donde, % Najt es el nitrógeno ajustado con los valores de cenizas y humedad y % Nexp es el porcentaje de nitrógeno experimental.

3.2 Caracterización del quitosano por FTIR

Se realizó la caracterización química de las muestras mediante la espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), preparando pastillas de KBr y condiciones de medida se usó una resolución de 4 cm⁻¹ y 100 barridos en el rango de 4000-400 cm⁻¹. En la Figura 3a) se muestra el espectro de quitosano comercial Sigma-Aldrich GDD ≥ 75 %, en la figura 3b) se observa uno de los espectros del quitosano experimental realizado en el laboratorio, observándose la similitud entre ambos espectros, se observan las bandas características del quitosano de la amida I en el rango 1650-1630 cm⁻¹ y de NH₂ de 1580-1560 cm⁻¹ Osemba [10].

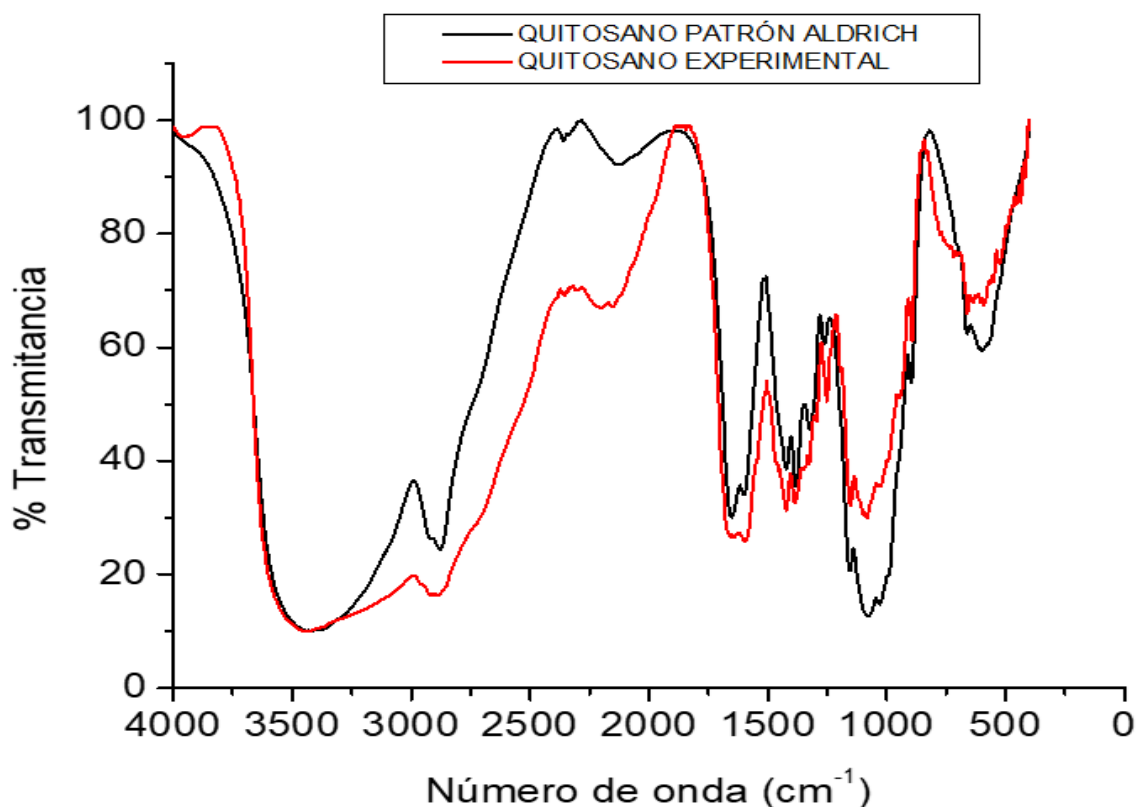


Figura 3. Espectro de quitosano comercial Aldrich GDD ≥ 75 % (negro) y quitosano obtenido en el laboratorio con desacetilación de 40 % m/v de NaOH (rojo).

3.3 Caracterización de quitosano por nitrógeno Kjeldahl.

Se realizó la determinación de nitrógeno Kjeldahl de muestras de quitina y quitosano, a las cuales se les determinó previamente el porcentaje de humedad y cenizas, en la Tabla 2 se muestra el porcentaje de nitrógeno, el porcentaje de nitrógeno ajustado con la Ec. 6, el grado de desacetilación (GDD) empleando nitrógeno Kjeldahl (Ec. 5) y el grado de desacetilación determinado con FTIR y el método de Brugnerotto (Ec. 1), el $\neq\%$ GDD se calcula como la diferencia porcentual entre ambos métodos. El valor certificado de GDD del quitosano patrón Sigma-Aldrich es mayor de 75 %. En el caso de la quitina, no se calcula el porcentaje de desacetilación con esta ecuación, ya que se sobreentiende que su GDA debería ser cero y siendo 6,79 menor al valor teórico 6,96, mostraría un valor negativo. Este valor menor al teórico sugiere que hay otro tipo de concomitantes e impurezas en la muestra y no solo humedad y cenizas. La cuantificación por FTIR de quitina y quitosano de bajo grado de desacetilación no es posible debido a que, aunque sí se observa la banda de referencia para la ecuación de Brugnerotto en 1420 cm⁻¹ (flexión C-H), la banda a 1320 cm⁻¹ (Amida III, estiramiento C-N) es más definida cuando el grado de desacetilación es mayor de 40-50 %, lo que restringe su uso cuantitativo a grados de desacetilación superiores, cuando el grado de desacetilación es muy bajo es muy difícil obtener la resolución adecuada de esta banda. En el caso

del método propuesto, al depender solo del análisis elemental, supera esta limitación espectroscópica y se puede determinar GDD en todo el rango de 0 a 100 %, pero como se puede observar en la Tabla 2, al utilizar Kjeldahl, se puede manifestar un valor ligeramente mayor que con FTIR, posiblemente debido a que esta determinación es de nitrógeno total, no es selectiva y no hace diferencia entre el nitrógeno de los grupos aminos y acetamidas del quitosano y potenciales impurezas proveniente de proteínas residuales o sales de amonio en la muestra. La determinación Kjeldahl es un método antiguo más robusto y estandarizado, pero emplea una digestión química compleja, en la cual puede derivar algún error. Sin embargo, el método FTIR tampoco hace diferencia entre los grupos amino de distintos compuestos, pero sí entre otros grupos funcionales nitrogenados. La presencia de estos compuestos puede producir una sobreestimación del grado de desacetilación calculado. El patrón comercial empleado, al provenir de un proceso industrial, puede contener impurezas diferentes al quitosano elaborado en el laboratorio. Para determinar la diferencia porcentual (%) entre los dos métodos se empleó la siguiente ecuación:

$$\neq \% GDD = \left(\frac{GDD_{Kjeldahl} - GDD_{FTIR}}{\frac{GDD_{Kjeldahl} + GDD_{FTIR}}{2}} \right) * 100 \quad (7)$$

Tabla 2. Resultados de la determinación de nitrógeno Kjeldahl (n=15).

Muestras	Kjeldahl					FTIR	Diferencia porcentual (%)
	% C (\bar{x})	% H (\bar{x})	% Nexp. ($\bar{x} \pm DS$)	% Najt. (\bar{x})	(GDD) (\bar{x})	GDD ($\bar{x} \pm DS$)	$\neq \% GDD$
Quitina (n=5)	16,88	8,09	5,10 \pm 0,36	6,79	-	-	-
Quitosano Lab. (n=15)	11,02	12,36	6,49 \pm 1,85	8,47	84,35	84,64 \pm 1,11	0,34
Quitosano Sigma-Aldrich $\geq 75 \% \text{®}$ (n=5)	1,30	11,43	7,36 \pm 0,05	8,43	82,12	80,19 \pm 1,32	2,37

% C: cenizas, % H: humedad, % N: nitrógeno, \bar{x} : media, DS: desviación estándar.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron ecuaciones para determinar el grado de desacetilación (GDD) de muestras de quitosano, generadas a partir de la relación entre los valores teóricos del porcentaje de nitrógeno de la quitina y el quitosano.

Los valores del GDD obtenidos a partir de las ecuaciones propuestas para las muestras seleccionadas experimentalmente empleando el método de nitrógeno Kjeldahl, se compararon con los valores de GDD calculados mediante el método de Brugnerotto utilizando FTIR, encontrándose similitud entre los métodos.

La exactitud del método propuesto depende de la pureza de la muestra, ya que impurezas pueden arrojar valores sobreestimados del grado de desacetilación. Sin embargo, es más robusto y puede determinar de 0 a 100 el GDD de quitosano, a diferencia del método FTIR que requiere una alta resolución de bandas, limitándolo a valores mayores al 40-50 % de GDD.

5. AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación a través de los proyectos nacionales FONACIT.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang, C., Yuan, F., Pan, J., Jiao, S., Jin, L., & Cai, H. (2014). A novel method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan by coulometric titration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.007>
2. Han, Z., Zeng, Y., Lu, H., & Zhang, L. (2015). Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products. *Carbohydrate Research*, 413, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.03.002>
3. Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R., & Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International journal of biological macromolecules*, 31(1-3), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00039-9)
4. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
5. Wang, P., Lv, X., Zhang, B., Wang, T., Wang, C., Sun, J., Zhang, K., Wu, Y., Zhao, J., & Zhang, Y. (2021). Simultaneous determination of molar degree of substitution and its

- distribution fraction, degree of acetylation in hydroxypropyl chitosan by ^1H NMR spectroscopy. *Carbohydrate polymers*, 263, 117950.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117950>
6. Marsico, M., Azari, R., Curcio, M., Teghil, R., Triunfo, M., Falabella, P., Boccaccini, A. R., & de Bonis, A. (2024). Enhancing the antibacterial properties of chitosan coatings: Ag@Chitosan and chitosan from insects. *Coatings*, 14(8).
<https://doi.org/10.3390/coatings14080925>
 7. Yulianti, E., Karo, A. K., & Susita, L. (2012). Synthesis of electrolyte polymer based on natural polymer chitosan by ion implantation technique. *Procedia Chemistry*, 4, 202-207..
<https://doi.org/10.1016/j.proche.2012.06.028>
 8. Zając, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>
 9. Kumari, S., Rath, P., Sri Hari Kumar, A., & Tiwari, T. N. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology and Innovation*, 3, 77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>.
 10. Osemba, M. O., Muriuki-Hutchins, M., Karenga, S., & Keru, G. (2024). Production of chitosan from crab shells. *International Journal of Advanced Research*, 7(1), 244–250.
<https://doi.org/10.37284/ijar.7.1.2193>