

QQQ-2

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITINAS PARCIALMENTE DESACETILADAS MEDIANTE TRATAMIENTO BIOLÓGICO-QUÍMICO. (OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF PARTIALLY DEACETYLATED CHITINS BY BIOLOGICAL AND CHEMICAL TREATMENTS).

Ramírez- Coutiño, L. (1), Plascencia-Jatomea, M. (1), Huerta, S. (1), Vázquez, H. (2) y Shirai K.(1)*

(1)* Lab. Biopolímeros, Departamento de Biotecnología, (2) Lab. de Polímeros, Dpto. Física, Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa, México, D.F. Tel. + 5804921/Fax +58044712. E-mail: smk@xanum.uam.mx

ABSTRACT. The purpose of this study was to determine the suitable conditions of α -chitin deacetylation under alkaline treatments to obtaining chitins with higher solubilities in aqueous acid solutions, in order to facilitate enzymatic hydrolysis. The degree of deacetylation (DD), solubility and molecular weight (MW) of samples of several days of treatment (0 to 7), showed that with alkali (65 %) at room temperature a mixture of chitosan and chitins were obtained with 70% DD and MW of 200 kDa (figures 1 and 2). The depolymerization of chitin due to the process achieved the solubility of 7 days sample. According to Sashiwa *et al* [9] and Kurita *et al* [10], a more effective enzymatic hydrolysis could be done employing chitins with DD ranged 40 to 60%, because minor decrements of molecular weight were observed, and also the solubilities were high for samples of 4 to 6 days.

INTRODUCCIÓN. La quitina, segundo biopolímero natural existente en la naturaleza, ha ampliado y diversificado su campo de aplicación dentro de la biotecnología, debido a las aplicaciones que presentan sus derivados (quitosano). Propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, reparación de tejidos y heridas, entre otras, son el resultado de modificaciones efectuadas sobre la estructura cristalina de la quitina, ya que a esta característica debe dicho polímero su baja solubilidad en la mayoría de solventes orgánicos. Se ha atribuido a la existencia de puentes de hidrógeno intercatenarios e intracatenarios la resistencia de la quitina a disolverse en agua. Un tipo de modificación que parece mejorar el problema de la baja solubilidad, es la desacetilación homogénea por la eliminación de los grupos acetilo que conduce a una pérdida de la cristalinidad y a un paralelismo entre las cadenas de quitina que es característico de la β -quitina, la más soluble de las 3 conformaciones existentes [1]. El quitosano derivado de la quitina, posee propiedades que dependen del grado de desacetilación (DD) y de polimerización (DP), que están muy relacionadas a su vez con el peso molecular y con propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, entre otras. El quitosano es un material heterogéneo cuyo DD varía desde un 60 hasta 90%, y los pesos moleculares (MW) se reportan de 50 hasta 2000 kDa, atribuyéndose esta heterogeneidad a la falta de control durante el procesamiento [2,3]. Los procesos tradicionales de obtención de quitina y quitosano utilizan ácidos y álcalis que afectan el DD y DP, mientras que los métodos biológicos, como fermentación ácido-láctica, permiten eliminar proteínas y minerales de manera más específica y menos destructiva [4]. El objetivo principal de este trabajo fue obtener quitinas parcialmente desacetiladas mediante tratamiento biológico- químico, para modificar la estructura y facilitar la posterior hidrólisis enzimática del polímero.

METODOLOGÍA. *Grado de acetilación (DA).* Diferentes muestras de quitina obtenidas mediante tratamiento biológico-químico [4] fueron tratadas con álcali (NaOH al 65%), durante diferentes tiempos de reacción (1 a 7 días) en agitación y a temperatura ambiente. El producto obtenido de cada tratamiento fue secado, molido y mezclado con KBr, para obtener pastillas, las cuales fueron analizadas por espectroscopía de infrarrojo (IR). Los espectros se obtuvieron en el intervalo de 400-4000 cm^{-1} , utilizando el método de línea base de Miya *et al* [5] considerando la relación de absorbancias A_{1655}/A_{3450} . El DA fue también calculado mediante resonancia magnética nuclear (^1H), considerando las relaciones C/N, determinadas con un analizador elemental (Perkin Elmer II 2100,E.U) en muestras con diferentes grados de desacetilación. El DD se obtuvo restando del 100%, el DA encontrado.

Solubilidad. La solubilidad de las muestras de quitosano fue determinada mediante soluciones al 0.5% (p/v) de quitina en ácido acético 0.1 M a temperatura ambiente.

Peso molecular (MW). El peso molecular fue obtenido a partir de los resultados de viscosidad intrínseca, utilizando la ecuación de Mark-Houwink [6], $[\eta] = K MW^a$, en donde $K= 13.8 \times 10^{-5}$ y $a=0.85$ son las constantes de viscosidad específicas para el solvente utilizado (2% ácido acético/0.2 M acetato de sodio), a 25°C.

RESULTADOS Y DISCUSIONES. De las determinaciones de DD se encontró que, para los primeros cuatro días de tratamiento, la eliminación de los grupos acetilo fue apenas del 40% y no fue sino hasta después del sexto día en que los DD alcanzaron un valor del 70% (figura 1). Por otra parte, al observar la evolución de los espectros de IR con respecto al tiempo de tratamiento, se aprecia la eliminación de los picos característicos de quitina (espectro A, figura 2), tales como: a 3269 cm^{-1} debida al alargamiento de N-H, el cual ha sido reportado como un grupo cuya absorción se atenúa a mayor grado de desacetilación; a 1663 y 1626 cm^{-1} , que corresponden a amida primaria; el segundo de estos dos picos disminuye por la eliminación del grupo C=O. El pico a 1561 cm^{-1} , amida secundaria, permanece sin cambio en todas las muestras, y un aumento en la concentración se observa para las muestras de 3 a 6 días (espectros B y C de la figura 2), esto indica que a partir del sexto día de tratamiento se ha obtenido quitosano.

Al comparar el peso molecular de las muestras de uno y siete días de desacetilación, se observó un descenso de aproximadamente el 40% en este parámetro; tal pérdida se atribuye a una ligera depolimerización en la estructura de la

quitina debida a las condiciones de la hidrólisis alcalina efectuada, ya que es bien conocido que el fenómeno de degradación de la quitina ocurre durante la desacetilación. A este respecto, Chang *et al.* [7] encontraron que, durante la desacetilación homogénea de quitina, se detectaron oligómeros y residuos de D-glucosamina, y su concentración aumentó proporcionalmente al tiempo de reacción. En lo que respecta al MW, se encontró que para las muestras desacetiladas durante 7 días, fue de ~200 kDa, lo cual corresponde al límite inferior de pesos reportados para quitosano; sin embargo, Tanigawa *et al* [8] reportan quitinas con porcentajes de desacetilación de 66% hasta 84% con peso molecular de 190kDa. De acuerdo a los espectros de infrarrojo (figura 2), y a los resultados de viscosidad de las muestras de 6 y 7 días de reacción, se observan mezclas de quitina y quitosano de bajos pesos moleculares, esto debido a que se detecta el pico característico de quitina, amida secundaria (1561 cm^{-1}).

En la Figura 1, se puede apreciar que la solubilidad de las muestras de quitina analizadas aumenta conforme se incrementa el tiempo de hidrólisis alcalina a temperatura ambiente, observando una máxima solubilidad en las muestras de 7 días, esto último se atribuye a la desacetilación, así como la posible degradación de la quitina, con la subsiguiente presencia de quitina y quitosano de bajos peso moleculares, lo que resulta en menor impedimento para solvatar un polímero de cadena más corta e implica una mayor solubilidad.

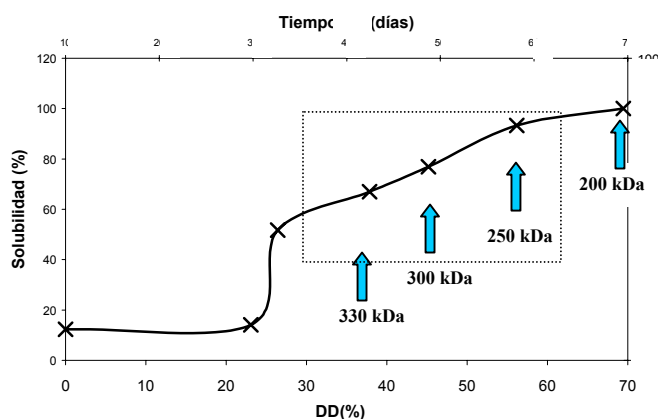


Figura 1. Cambios en la Solubilidad con respecto al tiempo de desacetilación y al DD. Se incluyen los datos de pesos moleculares (en kDa) de las muestras más solubles, señalados con las flechas.

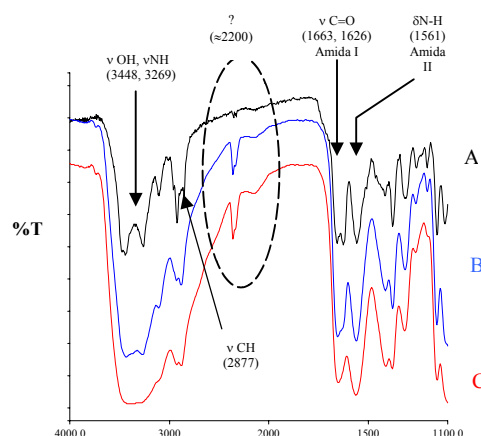


Figura 2. Cambios en los picos característicos de los espectros obtenidos en el primero (A), tercero (B) y sexto días (C) de tratamiento alcalino.

Sashiwa [9] ha reportado quitinas solubles a partir de un porcentaje de desacetilación del 50%, y Kurita *et al* [10] encontraron que la degradación enzimática de α y β -quitinas es alta a un porcentaje de desacetilación de aproximadamente 50%, disminuyendo si el DD es de aproximadamente el 97%. Por lo que es conveniente que para realizar modificaciones e hidrólisis posteriores, se empleen quitinas con DD de 40 a 60%, ya que los pesos moleculares y solubilidad alcanzados (rectángulo de líneas punteadas, figura 1), indican que hubo modificación en la estructura, mejorándose la solvatación del polímero.

AGRADECIMIENTOS. Los autores agradecen a CONACyT por el financiamiento a través del proyecto No. 400200-5-J33566-E.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cho, Y-W., Jang, J., Rae-Park, C., and Ko, S-W. (2000). Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* 1 (4): 609-614.
2. Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *J. Polym. Int.*, 48: 732-734.
3. Rege, R.P. and Block, H.L. (1999). Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research*, 321: 235-245.
4. Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M., and Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37: 1359-1366.
5. Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., and Yoshikawa, S. (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 28: 1909.
6. Kasaai, M.R., Arul, J., and Charlet, G. (2000). Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 38: 2591-2598.
7. Chang, K.L.B., Tsai, G., Lee, J., and Fu, W.R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303: 327-332.
8. Tanigawa, T. *et al.* (1992). Various biological effects of chitin derivatives, in: "Advances in chitin and chitosan", (Brine, C.H.J., Sandford, P.A., and Zikakis, J.P., editors), pp. 206-215. Ed. Elsevier Ltd. Essex, England.
9. Sashiwa, H. and Shigemasa, Y. (1999). Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohydrate Polymers*, 39: 127-138.
10. Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., and Nishiyama, Y. (2000). Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 42: 19-21.