



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ESTUDIO DE LA ACCION DE QUITOSANO COMO
ADSORBEDOR DE PROTEINAS HIDROSOLUBLE;
OPTIMIZACION DE PARAMETROS”**

Por

LUCIA MEDINA MAUREIRA

Trabajo de Titulo presentado a la
Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco
para optar al titulo de Ingeniero de Ejecución en Química.

Prof. Guía: Ramiro Díaz H.

Prof. Co-Guía: Angélica Francois C.

Temuco,2005.



COMISIÓN EXÁMEN DE TÍTULO

Este examen de título ha sido realizado en el Departamento de Ciencias Biológicas y Químicas.

Presidente Comisión:

Oswaldo Rubilar Alarcón
Decano Facultad de Ciencias

Profesor Guía:

Ramiro Díaz Harris
Doctor en Ciencias Químicas

Profesor Co-Guía:

Angélica Francois Cifuentes
Magíster en Ciencias Químicas

Profesor Informante

Galo Cárdenas Triviño
Doctor en Química
Universidad de Concepción

Director de Carrera (s):

Angélica Francois Cifuentes
Magíster en Ciencias Químicas

Coordinador de Tesis:

Mario Ramírez Espinoza
Master en Física



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO

FACULTAD DE CIENCIAS



INFORME TRABAJO DE TÍTULO

TÍTULO: "Estudio de la Acción de Quitosano como Adsorbedor de Proteínas Hidrosoluble; Optimización de Parámetros"

ALUMNO: Lucia Medina Maureira

Este trabajo de título realizado por Lucía consistió en evaluar la capacidad del polímero natural quitosano como agente atrapador de proteínas hidrosolubles, contaminante característico en efluentes de empresas faenadoras de carne.

En el desarrollo experimental, Lucía debió montar un sistema de laboratorio con el fin de hacer la pruebas. A partir de soluciones de proteínas comerciales, como albúmina de bovino y gelatina; determinó los parámetros experimentales pH y tiempo de contacto proteína-quitosano, de modo de lograr la mayor eficiencia de atrapamiento de la proteína sobre quitosano. Luego aplicó el método optimizado a una muestra real de efluente contaminado con proteínas. Así también, debió realizar las determinaciones analíticas correspondientes, e interpretar datos obtenidos. En general, logró un buen manejo de las técnicas y métodos necesarios para desarrollar su trabajo.

En el aspecto teórico, Lucía, debió aplicar conocimientos que le fueron entregados en su formación académica, como tratamiento de efluentes líquidos, fenómenos superficiales y análisis cuantitativo, pero a la vez, complementarlos con temas no propios de su currículo, como temas específicos de química de macromoléculas.

Su informe escrito cumple con el nivel académico de un trabajo científico y refleja el buen nivel de conocimientos y manejo que logró en su tema investigación.

Considerando el trabajo global de la alumna, se le califica con la nota 6,5 (seis coma cinco)

Angélica Francois C.
Profesor Co-Guía

Ramiro Díaz H.
Profesor Guía

Temuco, enero de 2005



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Polímeros
Edmundo Larenas 129, Casilla 160 - C, Correo 3
Ciudad Universitaria - Concepción - Chile
Fono(56 - 41) 204256 - Fax(56 - 41) 245974

Concepción, 28 de Noviembre de 2004.
POL.N° 100/2004.

Señor
Dr. Osvaldo Rubilar Alarcón
Decano
Facultad de Ciencias
Universidad Católica de Temuco
PRESENTE
FAX: 45 238256 - 204256

Estimado Dr. Rubilar:

Comunico a Ud. que la tesis de la Sra. Lucia Medina Maureira ha sido aprobada y los comentarios se le enviaron al profesor Ramiro Diaz. La Tesis de la alumna de la carrera Ingeniería de Ejecución en Química perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco ha sido aprobada con nota 6,0.

Le saluda cordialmente,

Dr. Galo Cárdenas Triviño

GCT/ta.
Incl.: Comentario de Tesis.
c.c.: Archivo



*Dedicado a mis queridos papitos
Carmen y Arnoldo
Y mis sobrinas y sobrinos Barbara,
Javiera, Max y Javier Andrés*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios por permitir llegar a esta gran etapa de mi vida, por darme la fuerza y animo en momentos en que me sentí derrotada.

Agradecer a mis padres, por ser mi pilar fundamental y darme la fuerza cuando lo necesite, por su confianza y cariño infinito.

A mi hermano Hector por ayudarme al comenzar mi etapa universitaria, por su fuerza y su incondicional apoyo.

A mi hermano Oscar y mi amiga y cuñada Andrea por su apoyo, cariño y confianza que me brindaron durante los últimos años de mi carrera universitaria.

A mi hermanito Pablo mi hermanita Sandra y mi cuñadito John por su preocupación y apoyo en los momentos más difíciles.

A mis amigas Aida y Nora quienes fueron cómplices y confidentes en todas mis aventuras a lo largo de mi carrera Universitaria, gracias por su amistad y apoyo incondicional. A mi compañero Jorge por su compañía y apoyo durante estos últimos años.

Gracias a cada uno de los profesores /os que de una u otra manera contribuyeron a mi formación profesional; en especial a mi profesor Ramiro Díaz por su paciencia, apoyo y orientación durante todo el proceso del trabajo de titulo; a mi profesora Patricia Mejias por su apoyo y ayuda desinteresada durante el desarrollo de este trabajo; a la profesora Angélica Francois por su ayuda y confianza durante mi desarrollo profesional y al profesor Informante Galo Cárdenas por su disponibilidad para con este trabajo.

Índice de contenido

Contenidos	Páginas
<i>Índice de contenidos.....</i>	<i>I</i>
<i>Índice de figuras.....</i>	<i>IV</i>
<i>Índice de tablas.....</i>	<i>VI</i>
<i>Resumen.....</i>	<i>IX</i>
<i>1.- Introducción.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.- Parámetros utilizados en la caracterización de efluente líquidos.....</i>	<i>3</i>
<i>1.2. - Caracterización de los residuos líquidos.....</i>	<i>4</i>
<i>1.3. - Depuración y tratamiento de las aguas.....</i>	<i>5</i>
<i>1.4.- Aplicaciones de adsorción.....</i>	<i>10</i>
<i>1.5.- Quitina.....</i>	<i>10</i>
<i>1.6.- Nueva perspectiva de utilización del Quitosano.....</i>	<i>14</i>
<i>1.7.- Objetivos.....</i>	<i>16</i>
<i>1.7.1. - Objetivo general.....</i>	<i>16</i>
<i>1.7.2. - Objetivos específicos.....</i>	<i>16</i>
<i>2.1.- Equipos, materiales, reactivos y métodos de análisis.....</i>	<i>18</i>
<i>2.2.- Desarrollo experimental.....</i>	<i>21</i>
<i>2.2.1.- Preparación de soluciones de gelatina y albúmina.....</i>	<i>24</i>

<i>2.2.2.- Determinación de la longitud onda de trabajo para gelatina y albúmina de bovino y curva de calibración.....</i>	24
<i>2.2.3.- Curva de Calibración para albúmina y gelatina.....</i>	25
<i>2.2.4.- Estudio de la acción del quitosano como adsorbente de proteínas. Optimización de parámetro; pH y tiempo de acción.....</i>	27
<i>2.2.5.-Método kjeldhal para determinación de proteínas totales en suero de sangre.....</i>	28
<i>2.2.6.- Determinación de la longitud onda para proteínas del suero de sangre y curvas de calibración.....</i>	29
<i>2.2.7.- Curva de calibración de suero de sangre de bovino.....</i>	29
<i>2.2.8.- Experimentos de adsorción; “Isotermas de adsorción”.....</i>	31
<i>3. Resultados y discusión.....</i>	33
<i>3.1.- Acción de quitosano en función del pH. Determinación del pH de máxima adsorción.....</i>	33
<i>3.2.- Optimización del parámetro tiempo de contacto de proteína sobre quitosano.....</i>	35
<i>3.3.- Isotermas de adsorción.....</i>	38
<i>3.4.- Análisis comparativo entre dos tipos de Quitosano de diferente grado de saturación.....</i>	47
<i>3.5.- Proyección y estudios futuros</i>	48

<i>3.5.1. Diseño de un modelo a escala real para llevar acabo la acción de quitosano como adsorbedor de proteínas solubles.....</i>	48
<i>4.- Conclusiones.....</i>	52
 ANEXO 1:	
<i>Método de Biuret.....</i>	54
 ANEXO 2:	
<i>Método Kjeldahl.....</i>	56
 <i>5.- Bibliografía.....</i>	 60

Índice de figuras

Figuras	Página
Fig .1.1: Tipos de isothermas de adsorción.....	7
Fig. 1.2: Isotherma de Freundlich.....	8
Fig. 1.3: Isotherma de Lagmuir.....	9
Fig. 1.4: Unidad repetitiva de la quitina.....	11
Fig. 1.5: Esquema elemental de la producción del derivado de la quitina, (quitosano).....	12
Fig.1.6: Unidad repetitiva del Quitosano.....	12
Fig.2.1: Ruta experimental de la acción de Quitosano como adsorbente de proteínas.....	23
Fig. 2.2: Curva de calibración de gelatina construida a 508 nm.....	26
Fig. 2.3: Curva de calibración de la albúmina construida a 508 nm.....	26
Fig. 2.4: Montaje experimental de adsorción de quitosano sobre muestra de proteínas.....	27
Fig. 2.5: Curva de calibración de suero de sangre.....	30
Fig. 3.1: Acción del Quitosano sobre gelatina a diferentes pH,(tiempo agitación 4 horas).....	34
Fig. 3.2: Acción del Quitosano sobre albúmina a diferentes pH, (tiempo de agitación 4 horas).....	35
Fig.3.3: Acción de gelatina sobre quitosano a diferentes tiempos.....	37
Fig.3.4: Acción de albúmina sobre quitosano a diferentes tiempos.....	37

Fig.3.5: <i>Isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q₁)</i>	43
Fig.3.6: <i>Isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q₁)</i>	43
Fig.3.7: <i>Isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q₂)</i>	44
Fig.3.8: <i>Isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q₂)</i>	44
Fig.3.9: <i>Isoterma de adsorción de albúmina a pH 4,1 (Q₁)</i>	44
Fig.3.10: <i>Isoterma de adsorción de albúmina a pH 3,1 (Q₁)</i>	44
Fig.3.11: <i>Isoterma de adsorción suero de sangre a pH 4,1 (Q₁)</i>	44
Fig.3.12: <i>Isoterma de adsorción suero de sangre a pH 3,1 (Q₁)</i>	44
Fig.3.13: <i>Isoterma de adsorción suero de sangre a pH 4,1 (Q₂)</i>	45
Fig.3.14: <i>Isoterma de adsorción suero de sangre a pH 3,1 (Q₂)</i>	45
Fig.3.15: <i>Posibles interacciones puente de hidrógeno entre Quitosano y proteína</i>	46
Fig.3.16: <i>Interacción entre protón del ácido y grupos nucleofílicos de quitosano y proteína</i>	47
Fig.3.17: <i>Síntesis de alquilación de una amina primaria</i>	49
Fig. 3.18: <i>Modelo de un tanque agitado</i>	50

Índice de tablas

Tablas	Página
<i>Tabla 1.1: Concentración de contaminante en residuo líquido de algunos mataderos chilenos.....</i>	2
<i>Tabla 1.2: Contenidos de los vertidos de los procesos individuales de una planta procesadora de carne.....</i>	3
<i>Tabla 2.1: Protocolo experimental para la curva de calibrado de gelatina.....</i>	25
<i>Tabla 2.2: Protocolo experimental para la curva de calibrado de albúmina.....</i>	26
<i>Tabla 2.3: Protocolo experimental para el desarrollo de la curva de calibrado de suero de sangre.....</i>	30
<i>Tabla 3.1: Resultados experimentales obtenidos para gelatina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes pH, por el método colorímetro de Biuret. Longitud de onda de trabajo 508 nm.....</i>	34
<i>Tabla 3.2: Resultados experimentales obtenidos para albúmina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes pH, por el método colorímetro de Biuret. Longitud de onda de trabajo 305 nm.....</i>	34
<i>Tabla.3.3: Resultados experimentales obtenidos para gelatina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes tiempos, por el método colorímetro de Biuret. Longitud de onda de trabajo 508 nm.....</i>	36
<i>Tabla.3.4: Resultados experimentales obtenidos para Albúmina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes tiempos, por el método espectroscópico de Biuret. Longitud de onda de trabajo 305 nm.....</i>	36

Tabla.3.5: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q_1).....	39
Tabla.3.6: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q_2).....	39
Tabla.3.7: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q_1).....	40
Tabla.3.8: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q_2).....	40
Tabla.3.9: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de albúmina a pH 4,1 (Q_1).....	41
Tabla.3.10: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de albúmina a pH 3,1(Q_1).....	41
Tabla.3.11: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 4,1 (Q_1).....	42
Tabla.3.12: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 4,1 (Q_2).....	42
Tabla.3.13: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 3,1 (Q_1).....	42
Tabla.3.14: Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 3,1 (Q_2).....	43
Tabla A1: Grupos funcionales de moléculas orgánicas y su producto de degradación.....	58

Tabla A2: Factor de multiplicación para determinar el contenido de proteínas en una muestra, según el tipo de alimento..... 59

RESUMEN

El desarrollo del presente trabajo está enfocado en el estudio de la acción del biopolímero *quitosano* como adsorbente de proteínas hidrosolubles. Se realizaron ensayos con muestras de proteínas comerciales, como gelatina y albúmina. Además, se aplicó el método utilizado para estas proteínas, en una muestra real de proteínas solubles de suero de sangre bovina.

La cuantificación de proteínas antes y después del tratamiento con quitosano, se realizó por el método colorimétrico de Biuret. En el caso del suero de sangre, se determinó la cantidad total de proteínas por el método de Kjeldahl. En los ensayos de adsorción se utilizó quitosano de grado de desacetilación 79,3%.

Se optimizaron dos parámetros de trabajo: pH y tiempo de contacto proteína-quitosano. En cada caso se trabajó con 35 mg de quitosano y 10 ml de solución de proteína a diferentes concentraciones.

En la optimización de parámetro pH, se fijó un tiempo constante de 4 horas y se ensayó a tres pH: 3.1, 4.1 y 7.1. Los mejores resultados se obtuvieron a pH 3.1 con 69,6 % de retención para gelatina y 38,14% para albúmina. Para el parámetro tiempo se trabajó a tiempos 1, 4, 8, 12 y 18 h a un pH constante de 3.1. Los mejores resultados se obtuvieron a tiempos de 4 h para gelatina y 18 h para albúmina. En la muestra de suero de sangre bovina se utilizaron los parámetros optimizados para albúmina, ya que es esta proteína que presente en mayor proporción en este medio.

Finalmente, se elaboraron isotermas de adsorción para cada proteína con dos tipos de quitosano de diferentes grados de desacetilación ($Q_1 = 79,3\%$ Y $Q_2 = 100\%$). Se obtuvieron isotermas de tipo III en todos los casos, lo que reveló que la interacción del sistema quitosano-proteína corresponde a una adsorción física, representada por una curva desfavorable por su baja adsorción.

1.- INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las industrias ha llevado consigo ventajas indiscutibles para la humanidad, aunque ligadas a efectos secundarios, como es la generación de residuos contaminantes y complejos, lo que ha producido una alteración del equilibrio ecológico, afectando tanto a especies animales como vegetales.

El aumento de producción industrial genera volúmenes cada día más importantes de residuos sólidos, líquidos y gaseosos, los cuales llegan al medio ambiente por distintos cuerpos receptores como suelo, agua, ríos, mares y aire, generando contaminación.

En nuestra región una de las industrias que no se escapa a esta gravedad es la frigorífica.

Las actividades asociadas a este rubro generan gran cantidad de residuos líquidos y sólidos, en donde sus fuentes generadoras lo constituyen las aguas de lavados y las corrientes provenientes de los procesos de sangrado y eviscerado. Los residuos se componen de estiércol, uñas, cascos, patas, restos de pelos, contaminantes solubles y sangre. La sangre está constituido por un 60% de plasma y un 40% de células sanguíneas. El plasma, por su parte, contiene agua, nutrientes como glucosa, grasas, aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas.

Las proteínas totales del suero se pueden separar en dos grandes grupos: la albúmina y las globulinas. La albúmina es la proteína de más concentración en la sangre representando un 60% de las proteínas que contiene el suero y el resto son las globulinas.

La sangre como principal contaminante, aporta una DQO total de 375.000 mg/lit y una elevada cantidad de nitrógeno, con una relación carbono / nitrógeno del orden de 3:4.

Además se estima que entre el 25- 55% del total de la carga contaminante medidas en DBO₅, son arrastradas por las aguas de limpieza.

La carga orgánica de las aguas de lavado contiene mayoritariamente proteínas, grasas y otras sustancias como heparina y sales biliares; además de hidratos de carbono, (glucosa y celulosa), y generalmente detergentes y desinfectantes. Cabe destacar que estas corrientes presentan un contenido de microorganismos patógenos importante.

En la tabla 1.1 se muestran las composiciones típicas en mg/l de efluentes de algunos mataderos chilenos⁽¹⁾:

Tabla 1.1: Concentración de contaminante en residuo líquido de algunos mataderos chilenos¹

Componentes	Matadero I	Matadero II	Matadero III	Matadero IV
DQO		8000	6400	11950
DBO	1204	1700	1100	7000
SST	965	920	890	1100
Grasa y aceites	717	79	340	114
pH	10	7.9	7	7.2

De acuerdo al consumo de agua, los mataderos son de tipo I, II, III y IV. Estas mediciones fueron efectuadas en Chile por INTEC-CHILE,

Matadero I: 16,8 m³/ton producto

Matadero II: 3,8 m³/ton producto

Matadero III: 9,8 m³/ton producto

Matadero IV: 9,5 m³/ton producto

Análisis realizados en varias muestras de vertidos de las zonas de sacrificio, tomados de un matadero de tipo medio,(entre 50 a 99 trabajadores), muestran un promedio de DBO

de 2000 ppm y un contenido total de nitrógeno de unas 500 ppm con un caudal de 19.000 litros diarios.

El contenido de los vertidos de los procesos individuales de una planta de preparación de carnes, está caracterizado según se muestra en la tabla siguiente;

Tabla 1.2: Contenidos de los vertidos de los procesos individuales de una planta procesadora de carne²

Procedencia	Sólidos en suspensión ppm	Nitrógeno orgánico ppm	DBO ppm	pH
Zona de sacrificio	220	134	825	6,6
Sangre y agua del tanque	3690	5400	32000	9,0
Zona de escaldar	8360	1290	4600	9,0
Cortado de carne	610	33	520	7,4
Lavado de intestinos	15120	643	13200	6,0

1.1.- Parámetros utilizados en la caracterización de efluente líquidos.

Como los efluentes líquidos son la principal fuente de contaminación en la industria frigorífica, a continuación se hará una breve descripción de los parámetros comúnmente utilizados en la caracterización de efluentes líquidos;

- **Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅):** Es una medida de la cantidad de oxígeno requerida por los microorganismos para asimilar los nutrientes disponibles en los sistemas líquidos en 5 días a 20°.
- **Sólidos suspendidos (SS):** Es una medida de los residuos totales no filtrables que son retenidos en un filtro normalizado.

¹ Fuente: Comisión Nacional de Medio Ambiente-Región Metropolitana. Santiago de Chile

² Fuente: Nemerow N., Dagsputa A

- **Grasas y aceites:** Es una medida de las sustancias (grasas y Aceites) que se obtienen con la extracción con hexano o éter de petróleo.
- **Nitrógeno total (Kjeldahl):** Es una medida del nitrógeno total presente en la muestra.

1.2. - Caracterización de los residuos líquidos.

Para que un residuo líquido pueda ser vertido ya sea a la colectora cloacal, conducto pluvial o curso de agua, existen ciertas condiciones que tienen que cumplir los vertidos, algunos se detallan a continuación:

- **Temperatura:** La temperatura máxima aceptada es de 45°C, ya que por encima de dicho valor se produce el aumento de la sedimentación de sólidos en suspensión en lugares no deseados; las grasas se funden pasando los filtros destinados para retenerlas y por último, la concentración gaseosa en el líquido es menor en general y en particular menor la cantidad de oxígeno disuelto.
- **pH:** Este parámetro nos indica la acidez del medio y debe ser cercano a 7 (no menos de 5,5 y no mayor de 10), para evitar las alteraciones químicas con formación de sustancias tóxicas o corrosivas y crecimiento inadecuado de la flora microbiana.
- **Sólidos sedimentables:** Su estimación permite hacer una proyección de la concentración total de sólidos del efluente, tanto orgánicos como inorgánicos, y en la cual es aceptado un valor de 1 ml/dm³.
- **Sustancias solubles:** Su valor máximo es de 100 mg/dm³.

- **DBO:** La demanda bioquímica de oxígeno representa indirectamente una medida de la concentración de materia orgánica biodegradable contenida en el agua. Es la cantidad de oxígeno requerido para la respiración de los microorganismos responsables de la estabilización (oxidación) de la materia orgánica a través de su actividad metabólica en medio aeróbico. Se acepta valores promedio de 50 a 200 mg/lit.
- **DQO:** El valor de la DQO, es mayor que la DBO, ya que toma en cuenta materia orgánica resistente a ser oxidada y es una medida de la materia carbonosa contenida en los diferentes tipos de materia orgánica presentes en las aguas residuales.
- **Oxígeno disuelto:** Son los niveles de oxígeno en forma de gas disuelto en un medio acuático, si estos están por debajo de 3 ppm son estrésicos para la mayoría de los organismos y por debajo de 2 o 1 ppm los organismos mueren. Se requieren niveles de 5 a 6 ppm.⁽²⁾

1.3. - Depuración y tratamiento de las aguas.

Los métodos para la eliminación de los contaminantes pueden basarse en fenómenos físicos o en procesos químicos y/o biológicos.

Los tratamientos físicos utilizan propiedades físicas de sustancias contaminantes para lograr su eliminación total o parcial. Entre los más usados están: sedimentación, flotación, filtración, desorción, y adsorción.

La *sedimentación* se basa en la separación de los contaminantes sólidos por acción de la gravedad.

La *flotación* se basa en la separación por diferencia de densidad de los contaminantes sólidos cuya densidad es menor que la del líquido. Esta flotación puede ser natural o provocada, como ocurre en el caso de introducción de aire a presión.

La *filtración* se fundamenta en la retención de sólidos provocada por la interposición de un medio poroso. Los sólidos quedan retenidos en la superficie o en el interior del medio poroso. Como medios porosos se utilizan materiales como arenas, carbón activo, vidrio, o membranas sintéticas. La filtración puede realizarse a presión o sin ella.

La *desorción*; se provoca una desorción cuando una masa líquida se pone en contacto con una corriente de aire al cual se transfiere el contaminante. Este proceso es típico para la eliminación de amoníaco en aguas industriales con altas concentraciones del mismo.

Por último la *adsorción* implica la fijación física o química del contaminante en la superficie de un sólido. A través de este último proceso se logra concentrar una especie en una interfase formada por adsorbente – adsorbato que interactúan entre sí.⁽³⁾

Dependiendo del tipo de interacción existente entre las especies, puede ocurrir una *adsorción física (fisisorción)* o una *adsorción química (quimisorción)*. En el primer caso, las interacciones son débiles y de largo alcance. En el segundo caso, se forma un enlace químico entre adsorbato y adsorbente. La distinta naturaleza de estas interacciones genera diferencias entre ambas adsorciones:

- La velocidad de adsorción es mayor en el caso de la fisisorción debido a que en este caso la barrera energética es pequeña.
- La mayor energía de interacción en la quimisorción implica una mayor entalpía de adsorción.

- En la adsorción química la formación de enlaces químicos limita a una capa de adsorbato, mientras que en la fisisorción es común la presencia de múltiples capas. También es posible la presencia de una capa quimisorbida y capas adicionales fisisorbidas.
- La adsorción química es, lógicamente, muy selectiva, como cualquier reacción química, mientras que la adsorción física no lo es. ⁽⁴⁾

El proceso de adsorción puede ser representada por *isotermas de adsorción, las cuales relacionan la cantidad de sustancia adsorbida por un adsorbente y la concentración de equilibrio a temperatura constante.*

Existen 5 tipos de isotermas⁽⁵⁾, las que se ilustran en la figura 1.1.

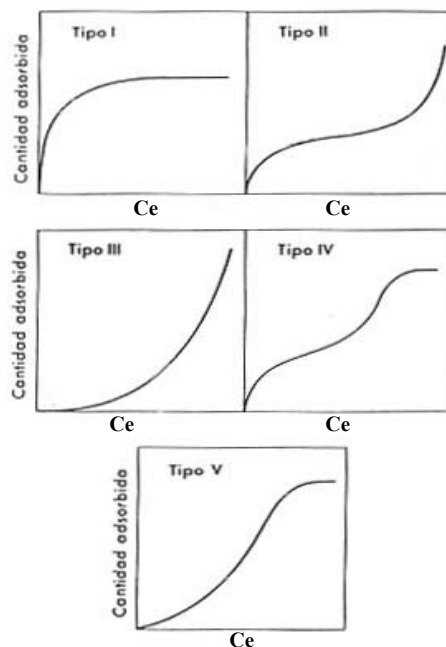


Fig .1.1. Tipos de isotermas de adsorción

En quimisorción sólo se encuentra isotermas de tipo I, en tanto que en adsorción física ocurren los cinco tipos.

La variación de la cantidad de adsorción por unidad de masa con la concentración puede representarse por las ecuaciones de Freundlich y Langmuir⁽⁶⁾

La isoterma de Freundlich fue una de las primeras ecuaciones propuestas para relacionar la cantidad adsorbida con la concentración del material en la solución. Su formulación matemática es:

$$\frac{x}{m} = K_f C_e^{1/n} \quad \text{ecs (1)}$$

donde x/m es la cantidad adsorbida por peso unitario de adsorbente, C_e es la concentración de equilibrio del adsorbato en solución después de la adsorción, K_f y n son constantes empíricas que se determinan representando gráficamente la relación entre (x/m) y C y empleando la ecuación 1 la cual queda reescrito de la siguiente forma:

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad \text{ecs (2)}$$

Una grafica que representa esta ecuación es la siguiente:

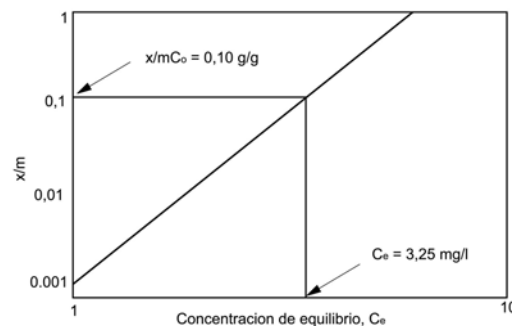


Fig.1.2. Isoterma de Freundlich

Una ecuación que describe mejor la adsorción con isothermas de tipo I fue deducida por Irving Langmuir a partir de consideraciones teóricas. La isoterma de adsorción de Langmuir se basa en los siguientes supuestos: a) sólo tiene lugar una adsorción monomolecular, b) la adsorción es localizada y c) el calor de adsorción es independiente del recubrimiento de la superficie.

La ecuación de Langmuir se define de la siguiente forma:

$$\frac{x}{m} = \frac{abCe}{1+bCe} \quad \text{ecs (3)}$$

donde x/m es la cantidad adsorbida por peso unitario de adsorbente, C_e es la concentración en equilibrio de adsorbato en solución después de la adsorción, a y b son constante empíricas. Las constante se pueden determinar graficando $C_e/(x/m)$ frente a C_e empleando la ecuación 3, expresada de la siguiente forma:

$$\frac{C_e}{(x/m)} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a}C_e \quad \text{ecs (4)}$$

Una representación gráfica de la isoterma de adsorción de Langmuir es la que se muestra a continuación:

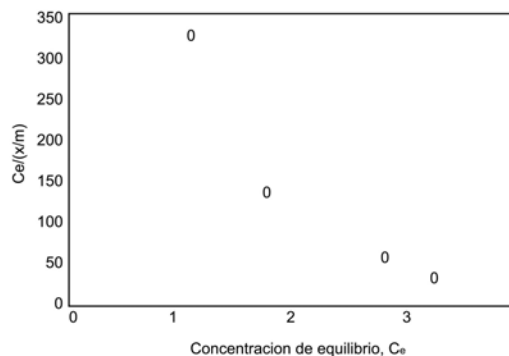


Fig.1.3. Isotherma de Langmuir

1.4.- Aplicaciones de adsorción

Como aplicaciones⁽⁷⁾ de la adsorción de una solución se pueden mencionar la clarificación de jarabes o licores de azúcar por carbón vegetal, la eliminación de materia colorante de otros tipos de soluciones y la recuperación de tintes a partir de soluciones diluidas. la adsorción se ha utilizado también para la recuperación y concentración de vitaminas y otras sustancias biológicas. Otra alternativa de adsorción hace uso de polímeros naturales llamados *biopolímeros*.

Dentro de las aplicaciones de los biopolímeros como medio adsorbente, se puede mencionar la eliminación de contaminantes metálicos de efluentes mineros.

Su aplicación provee una ventaja técnica y económica frente a otros; como el intercambio iónico o el uso de membranas, ya que estos polímeros presentan una baja toxicidad convirtiéndose así en una medida de descontaminación sin efectos secundarios, ya que son biodegradables. Algunos de ellos son derivados de algas como los alginatos, poliamidas de cabellos, colágeno de tejidos óseos o *quitina* y *quitosano* provenientes del caparazón de crustáceos. Estos últimos han sido ampliamente estudiados y cada día son más las aplicaciones que se están desarrollando.

1.5.- Quitina⁽⁸⁾

La quitina es el segundo polisacárido en abundancia después de la celulosa. Fue descubierto por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos. Posteriormente Odier en un artículo 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).

Payen, en 1843, inició una controversia que duró más de cien 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.

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos⁽⁹⁾, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas. Su estructura química es la siguiente:

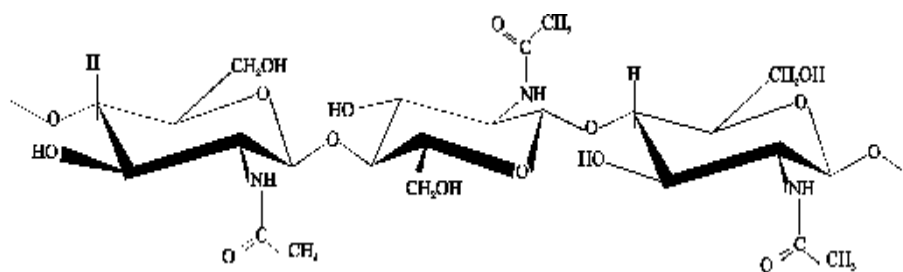


Fig. 1.4. Unidad repetitiva de la quitina

Por su parte, el quitosano es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente con hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas.

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtuvo 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. Mas tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler, quien la denominó “*quitosano*”.

En el siguiente esquema se aprecia los pasos elementales de la obtención del Quitosano⁽¹⁰⁾:

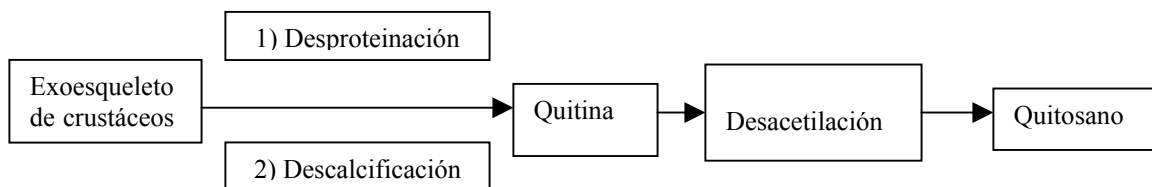


Fig. 1.5. Esquema elemental de la producción del derivado de la quitina, (Quitosano).

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido. Sin embargo, cuando la deacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ - 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera “*quitosanos*” con distintas propiedades. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden llegar a tener. La estructura química del quitosano se muestra a continuación:



Fig.1.6: Unidad repetitiva del quitosano.

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se han estudiado por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones⁽¹¹⁾, tales como las reacciones de atrapar enzimas.

A continuación se presenta una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le ha dado;

- **Química analítica:** Aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos⁽¹²⁾, fabricación de electrodos específicos para metales, entre otros
- **Biomedicina:** Membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, liberadores sistemáticos de fármacos⁽¹³⁾, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA.
- **Agricultura y ganadería:** Recubrimiento de semillas para su conservación⁽¹⁴⁾ durante el almacenamiento, sistemas liberadores controlados de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, formulaciones de pesticidas⁽¹⁵⁾.
- **Cosméticos:** Espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo.
- **Dietéticos:** Productos adelgazantes que actúan como atrapador de grasas en el estomago.
- **Industria:** Del papel, textil, alimentaría.
- **Tratamiento de agua:** Agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua⁽¹⁶⁾, agentes filtrantes para piscinas, remoción de metales⁽¹⁷⁾, remoción de surfactantes.

En un trabajo reportado por Cárdenas *et al*⁽¹⁸⁾, se estudió la capacidad de retención sobre quitosano de especie iónicas como cobre y mercurio. El quitosano se obtuvo de las cáscaras de langosta rojas (monodon de pleuroncodes), con un peso molecular de 54.000 g/mol y con un grado de saturación del 80%. Los datos obtenidos fueron estudiados en base a los modelos de Freundlich y Langmuir, obteniéndose así las isothermas de adsorción de las especies de Cu(II) y Hg(II); Además, se probaron la retención de estas especies a diferentes pH (2,5 y 4,5).

Las isothermas de Langmuir revelaron valores de $q_{m\acute{a}x}$ para Hg de 0,0018 mol/g a pH = 2.5 y 0.0023 mol/g a pH = 4.5. Para el caso del cobre el valor de $q_{m\acute{a}x}$ fue de 0.0023 mol/g a pH = 2.5 y 0.0041 mol/g a pH = 4,5.

Los estudios mostraron que el quitosano atrapa mejor cobre que mercurio siendo el pH más efectivo 2,5. Esta diferencia puede ser explicada por el carácter básico de los grupos NH_2 del quitosano. El grupo amino es una base dura y permite la mejor retención de ácidos duros como es el caso del Cu(II) no así el Hg(II) el cual es un ácido suave.

La influencia del pH en la retención se explica por la mayor presencia de iones cloruro a pH 2,5 en comparación a pH 4,5 y por consiguiente la mayor posibilidad de que el anión cloruro actúe como puente para formar complejos.

1.6.- Nueva perspectiva de utilización del Quitosano.

Dentro de la dinámica actual de minimización de residuos producidos por las actividades industriales, se hace necesario potenciar métodos que ayuden a eliminar el problema ambiental producido por efluentes líquidos industriales. Por ello se propone, en este

trabajo un estudio de la acción de “Quitosano”, como adsorbente de proteínas solubles, la cual podría ser una alternativa efectiva para el problema de la contaminación de agua por este tipo de sustancia en desechos líquidos proveniente de industrias procesadora de carne.

Para tal efecto, dicho estudio consistirá en la realización de ensayos de Quitosano sobre muestras de proteínas tales como albúmina, gelatina y suero de sangre de bovino, para la optimización de parámetros de trabajo como pH y tiempo de contacto, además se realizará un análisis de modelos isotérmicos de adsorción.

1.7.- OBJETIVOS

1.7.1. - Objetivo general

Estudiar la capacidad y uso potencial del polímero natural “Quitosano” como adsorbente de proteínas.

1.7.2. - Objetivos específicos.

- Diseñar un sistema a escala de laboratorio para realizar pruebas de la acción del quitosano como adsorbente sobre proteínas solubles como gelatina, albúmina y suero de sangre de bovino.
- Optimizar parámetros de trabajo, como pH y tiempo de contacto, tendiente a obtener una máxima adsorción de proteínas sobre Quitosano.
- Evaluar el comportamiento cinético de adsorción de proteínas solubles sobre quitosano a través del estudio y análisis de isothermas de adsorción o curvas de equilibrio.
- Estudiar en forma comparativa la acción de dos tipos de Quitosano con diferentes grados de desacetilación.

- Proponer un modelo general a escala real, que permita utilizar quitosano como agente adsorbente de proteínas solubles contenidas en efluentes líquidos industriales

2.1.- EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

En el desarrollo del trabajo experimental, se utilizó el material y equipos disponibles en los laboratorios de docencia y laboratorio de investigación bioinorgánica del Departamento de Ciencias Biológicas y Químicas de la Universidad Católica de Temuco.

Los métodos empleados para la determinación de proteínas fueron los de Biuret y Kjeldhal. En cada uno se utilizaron materiales, reactivos y equipos que se detallan a continuación;

➤ Instrumentación para el método de reacción de biuret.

a) Equipos y Materiales;

- Espectrofotómetro UV-VIS, Cecil 2000, con celdas de cuarzo.
- Centrífuga: Heraeus Sepatech, 5000 rpm máx.
- Tubos de ensayos, pipeta parcial de 5 ml, matraces de aforo de 100 ml, agitadores magnéticos, embudos analíticos, pH-metro, papel filtro 692 DE 45 x 45 cm Macherey.

b) Reactivos:

- Reactivo de Biuret; Consistió en una solución diluida de sulfato de cobre en un medio alcalino (NaOH).

➤ **Instrumentación para el método de Kjeldhal:**

a) Equipos y materiales;

- Digestor Büichi
- Unidad de destilación Kjeldhal
- Tubo de digestión
- Instrumentación para titulación; bureta de 50 ml, pipeta total de 10ml, matraz enlermeyer de 500ml

b) Reactivos

- NaOH estándar 8M
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Ácido Clorhídrico estándar 0,14675N
- Ácido Bórico con indicador mixto; (verde bromo cresol, rojo de metilo)
- Catalizador; sulfato de cobre y sulfato de potasio 1:10

➤ **Material biológico para los ensayos de la acción de quitosano como adsorbente de proteínas:**

- Albúmina; “ albumin bovine fracción V”
- Gelatina para microbiología
- Sangre de bovino: Obtenida del matadero de Temuco, IX región

- Quitosano (Q₁); → Especificaciones: Peso molecular = 63.000 g/mol
Grado de saturación = 79.3%
Cenizas = 0.38%
Hierro = 153 mg / Kg

- Quitosano¹ (Q₂); → Especificaciones: Peso molecular = 57.600 g/mol
Grado de saturación = 100%
Humedad = 9,31%
Cenizas = 0,84%
Viscosidad = 18,6 cps

¹ El Quitosano fue proporcionado por el Dr. Galo Cárdenas de la Universidad de Concepción

2.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se llevó a cabo, realizando pruebas preliminares de Quitosano sobre dos muestras de proteínas; gelatina y albúmina de bovino para finalmente realizar análisis sobre muestras de sangre de bovino ya que es aquí en donde radica el mayor interés del estudio.

Los ensayos se desarrollaron en dos etapas, *A* y *B*. En la primera (*A*) se prepararon las soluciones de gelatina y albúmina para las pruebas con quitosano.

La determinación cuantitativa del contenido de proteínas antes y después del tratamiento con quitosano, se realizó por el método de Biuret¹, el cual es un método colorimétrico para cuantificar proteína a través de la interpolación de valores de absorbancia en una curva de calibración, esta gráfica relaciona la absorbancia de una muestra con la concentración de ésta.

Las curvas de calibración se construyeron midiendo absorbancia de soluciones a diferentes concentraciones y a la longitud de onda de máxima de absorción y con el cual se determinó la concentración de soluciones desconocidas luego de las pruebas con quitosano.

Los ensayos se llevaron a cabo optimizando dos parámetros: pH y tiempo de contacto; manteniendo constante la cantidad de quitosano y el volumen de solución.

La segunda etapa (*B*), consistió en pruebas de adsorción sobre quitosano de proteínas de suero de sangre de bovino, para ello la proteína soluble de la muestra de sangre se separó de los componentes sólidos por centrifugación.

¹ La teoría del método se detalla en el anexo 1

El análisis cuantitativo del contenido total de proteínas en la sangre de bovino se realizó mediante el método estandarizado de Kjeldhal. Esta técnica analítica consistió básicamente en la determinación del contenido de nitrógeno de la muestra, tras la eliminación de la materia orgánica con ácido sulfúrico, mediante los métodos de destilación, digestión y valoración.

Posteriormente, el valor de la concentración fue determinada por la siguiente expresión matemática;

$$Proteína \text{ (ppm)} = (\text{mg} * N) * 6.25^2 \quad \text{ecs (2.1)}$$

Determinada la concentración de proteínas, se determinó la máxima absorción utilizando una muestra de proteína soluble y un blanco, posteriormente se prepararon disoluciones para elaborar la curva de calibración por el método de Biuret de la misma forma que para el caso de la albúmina y la gelatina.

Finalmente se realizaron las pruebas de adsorción de las muestras de suero sobre quitosano midiendo absorbancia antes y después de su acción, para luego establecer el contenido de proteína considerando la ecuación que caracteriza la curva de calibración correspondiente.

Por último, se realizaron los correspondientes estudios cinéticos de isotermas de adsorción para cada muestra de proteína, (gelatina, albúmina y suero de sangre).

La ruta experimental esta detallado en el esquema 2.2

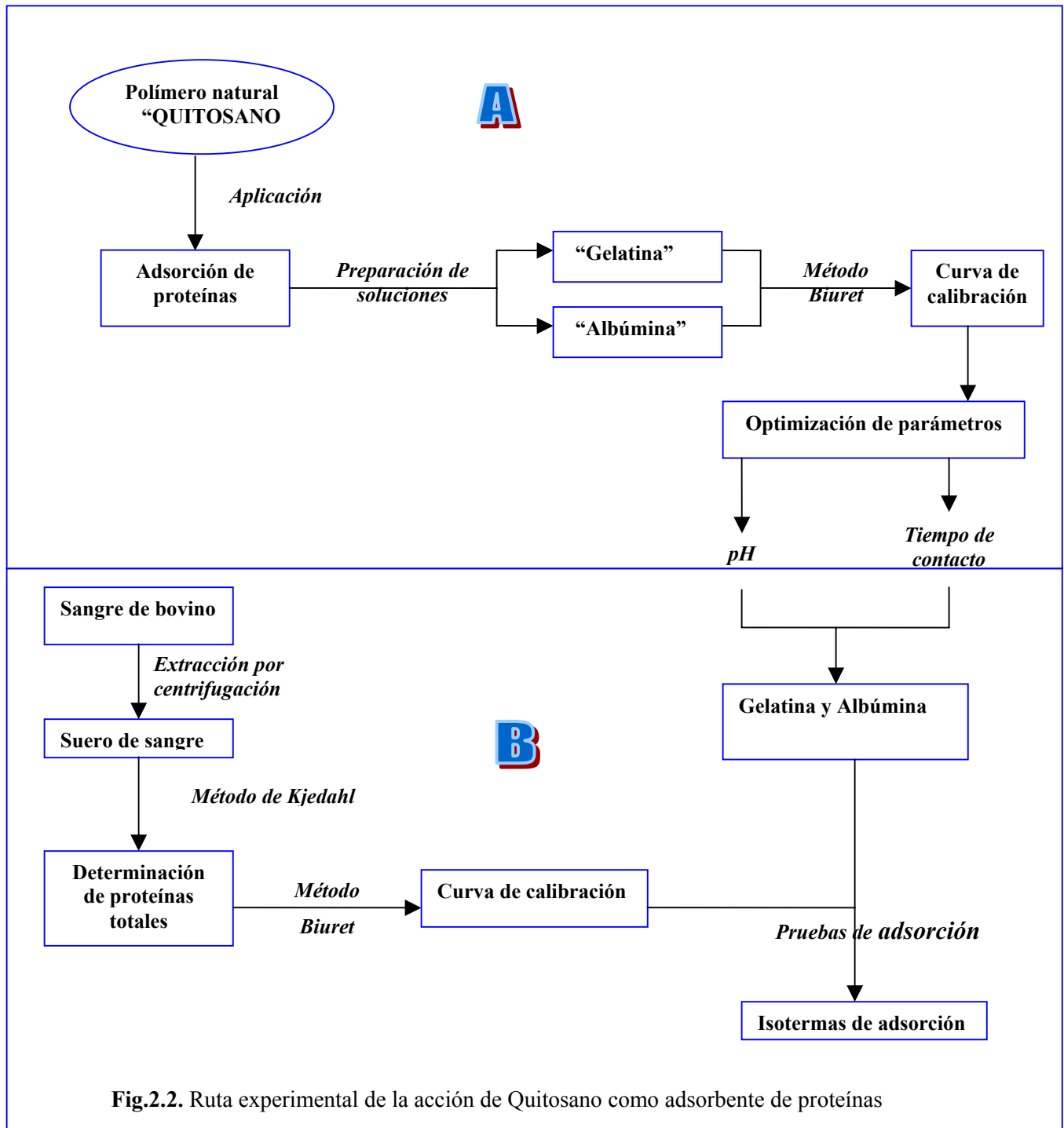


Fig.2.2. Ruta experimental de la acción de Quitosano como adsorbente de proteínas

² Factor considerado según tabla A.2 del anexo 2

2.2.1.- Preparación de soluciones de gelatina y albúmina.

➤ Solución patrón de gelatina.

Se preparó una solución de gelatina al 1% p/v de acuerdo a la siguiente especificación:

1 gramo de gelatina fue masado y suspendido en aproximadamente 15 ml de agua destilada. La mezcla fue agitada y dejada en reposo por aproximadamente dos minutos. Posteriormente, fue trasvasijada a un vaso precipitado que contenía aproximadamente 10 ml agua caliente. Una vez fría la solución se trasvasijó a un matraz de aforo en donde se aforó a 100 ml con agua destilada

➤ Solución patrón de Albúmina.

La solución de albúmina fue preparada al 1 % p/v. El procedimiento seguido se describe a continuación:

1 gramo de albúmina fue masado y adicionado en un vaso el que contenía agua destilada fría y fueron dejadas en reposo a temperatura ambiente hasta la total disolución del sólido. Finalmente se trasvasijó a un matras de aforo de 100 ml en donde se aforó con agua destilada.

2.2.2.- Determinación de la longitud onda de trabajo para gelatina y albúmina de bovino y curva de calibración.

La longitud de onda de trabajo se obtuvo del espectro de absorción de soluciones de cada proteína. Esta se determinó mediante un barrido en el espectrofotómetro entre un rango de longitud de 300 a 600 nm utilizando un blanco y una solución estándar de cada proteína. Se seleccionó la longitud de onda de absorbancia máxima.

El procedimiento práctico consistió en lo siguiente;

En dos tubos con tapa rosca, se adicionó 1 ml de gelatina al 1 % y 1 ml de agua respectivamente, posteriormente se le agregó 3 ml de reactivo de Biuret. De igual forma se procedió en el caso de la albúmina. Las mezclas se homogenizaron y fueron dejadas en reposo por un tiempo de 20 minutos. Se realizaron medidas de absorbancia a diferentes longitudes de onda (λ) para cada muestra y se determinó la longitud de onda máxima de absorción.

Los resultados fueron: 508 nm para gelatina y 305 nm para albúmina

2.2.3.- Curva de Calibración para albúmina y gelatina

Para la elaboración de las curvas de calibración, se prepararon diferentes disoluciones a partir de una solución de concentración conocida y se determinaron su valor de absorbancia por el método de Biuret.

Los resultados obtenidos se representaron en una gráfica de absorbancia v/s concentración, (mg/l), caracterizada por su correspondiente ecuación.

El procedimiento consistió en dos protocolos experimentales detallado en la tabla 2.1 y 2.2.

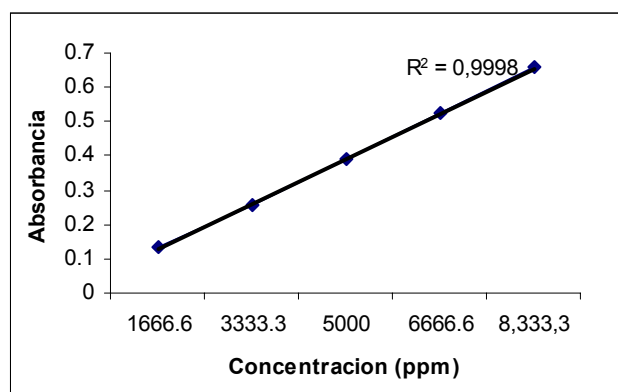
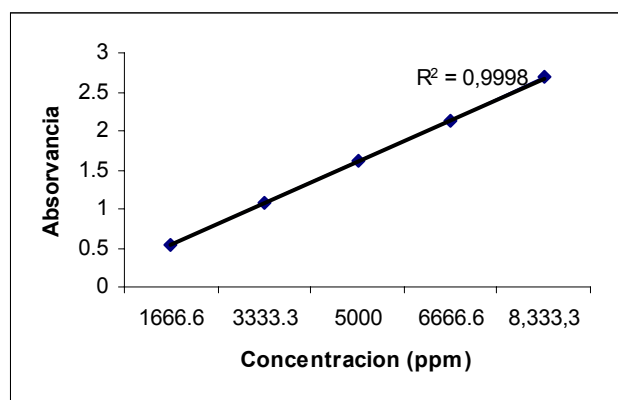
Tabla 2.1: protocolo experimental para la curva de calibrado de gelatina

Muestra	V gelatina (ml)	Agua (ml)	Biuret (ml)	Proteínas (ppm) x	Absorbancia (nm) y
1	0.5	2.5	3	1666.66	0.132
2	1.0	2	3	3333.3	0.258
3	1.5	1.5	3	5000	0.390
4	2.0	1.0	3	6666.66	0.524
5	2.5	0.5	3	8333.3	0.658
Blanco	-	3	3	-	-

Tabla 2.2: protocolo experimental para la curva de calibrado de albúmina

Muestra	V albúmina (ml)	Agua (ml)	Biuret (ml)	Proteínas (ppm) x	Absorbancia (nm) y
1	0.5	2.5	3	1666.66	0.536
2	1.0	2	3	3333.3	1.072
3	1.5	1.5	3	5000	1.610
4	2.0	1.0	3	6666.66	2.120
5	2.5	0.5	3	8333.3	2.691
Blanco	-	3	3	-	-

Con los datos obtenidos de concentración y absorbancias se elaboraron las curvas de calibración las que se muestran a continuación;

**Fig. 2.3.** Curva de calibración de gelatina construida a 508 nm**Fig. 2.4.** Curva de calibración de la albúmina construida a 508 nm

Cada curva esta caracterizada por su correspondiente ecuación; para la gelatina es;

$$Y = 7.9 \times 10^{-5} X - 2.99 \times 10^{-3} \quad \text{ecs (2.2)}$$

Y para la albúmina la ecuación es:

$$Y = 3.21 \times 10^{-4} X - 1.59 \times 10^{-3} \quad \text{ecs (2.3)}$$

2.2.4.- Estudio de la acción del quitosano como adsorbente de proteínas.

Optimización de parámetro; pH y tiempo de acción.

La optimización de parámetros de trabajo, pH y tiempo de contacto, se inició empleando soluciones de gelatina y albúmina a diferentes concentración; las que se prepararon por dilución de una solución de concentración conocida.

Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente, procediendo de acuerdo a los siguientes pasos experimentales.

Se dispuso de un set de muestra de un volumen de 10 ml, las que fueron tratadas sobre 35 mg de quitosano ($Q_1 = 79.3\%$ grado de saturación) contenidos en un frasco de vidrio con tapa plástica de 20 ml de capacidad. El pH de cada solución fue ajustado adicionando ácido sulfúrico hasta pH 3,1; 4,1 y 7,1 y agitadas durante 4 horas. El sistema experimental se muestra en la figura 2.4



Fig. 2.5: Montaje experimental para el estudio de la acción de quitosano como adsorbente de proteínas

Concluida la agitación, se filtró la mezcla, y el sobrenadante fue analizado por el método de Biuret, obteniendo valores de absorbancia en cada caso y con los cuales se determinaron las concentraciones de proteínas, considerando la ecuación correspondiente a la curva de calibración de cada proteína. (ver ecuaciones 2.2 y 2.3)

En la optimización del tiempo de contacto, el procedimiento práctico consistió en el desarrollo de pruebas similares a las descritas anteriormente, manteniendo constante la cantidad de quitosano (35 mg), volumen de muestra (10ml en cada caso) y variando el parámetro de tiempo de contacto

Se realizaron pruebas a dos pH 3.1 y 4.1, tomando en cuenta los datos obtenidos en los experimentos anteriores como tiempo de contacto y pH, se pudo estimar valores óptimos de trabajo que luego fueron aplicados en una muestra problema de sangre de bovino.

La muestra de sangre de bovino fue tratada previamente antes de realizar las pruebas con Quitosano, para ello se determinó la fracción soluble de proteína contenida en dicha muestra, la que se obtuvo centrifugando a una velocidad de 5000 rpm por un tiempo 15 minutos. La fracción soluble, que llamamos suero de sangre, se extrajo por filtración corriente para ser finalmente analizada por el método de Kjeldhal en la determinación del contenido total de proteínas.

2.2.5.-Método kjeldhal³ para determinación de proteínas totales en suero de sangre.

El método Kjeldahl consiste en el desprendimiento del amoníaco de una muestra contenida en un matraz, mediante la destilación de la disolución fuertemente

³ El fundamento teórico del método Kjeldhal se encuentra detallado en el anexo 3

alcalinizada con NaOH. El NH_3 se recoge sobre ácido bórico y el borato formado, se valora con ácido sulfúrico.

En el procedimiento se dispuso de 5 ml de muestra recogidos en un balón Kjeldhal de 500ml. Se le agregó aproximadamente 15 ml de agua, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y se adicionó catalizador. La muestra fue digerida a ebullición hasta que se obtuvo un aspecto cristalino transparente. Terminada la digestión, y una vez frío se adicionó 10 ml de agua destilada para iniciar la destilación con 30 ml de NaOH 40 %. Terminada la destilación la fracción de destilado fue colectado en un matraz enlermeyer de 500 ml que contenía 100 ml de ácido bórico con indicador mixto. Finalmente, las muestras fueron valoradas con ácido sulfúrico 0,14675N previamente estandarizado con un patrón secundario (hidróxido de sodio).

Al realizar los cálculos pertinentes se obtuvo una concentración de proteínas totales de 844.613 ppm contenidas en 5 ml de una muestra de suero de sangre de bovino

2.2.6.- Determinación de la longitud onda para proteínas del suero de sangre y curvas de calibración.

En la determinación de la longitud de onda de trabajo para la muestra de suero de sangre, se empleó una porción de muestra para realizar un barrido obteniéndose un máximo de absorción a los 420 nm.

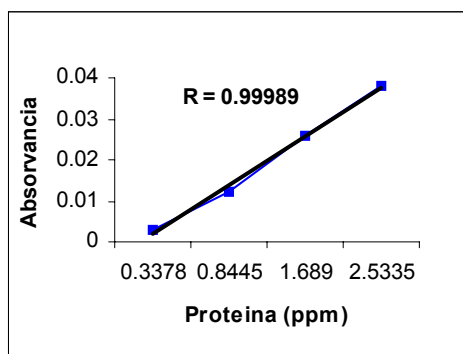
2.2.7.- Curva de calibración de suero de sangre de bovino.

La curva de calibración se elaboró siguiendo el protocolo experimental que se muestra en la tabla 2.3.

Tabla.2.3: Protocolo experimental para el desarrollo de la curva de calibrado de suero de sangre

Muestra	V suero de Sangre (ml)	Agua (ml)	Biuret (ml)	Proteínas (ppm) x	Absorbancia (nm) y
1	0.2	1.8	3	0.3378	0.0003
2	0.5	1.5	3	0.8445	0.012
3	1	1	3	1.689	0.026
4	1.5	0.5	3	2.5335	0.038
Blanco	-	2	3	-	-

Cada tubo se dejó en reposo por 20 minutos y luego se leyó a 420 nm. Con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración que se muestra en la figura 2.6.

**Fig. 2.6:** Curva de calibración de suero de sangre

La ecuación correspondiente a la curva de calibración de suero de sangre es la siguiente;

$$Y = -0.00843 + 0.01372X \quad \text{ecs. (2.4)}$$

2.2.8.- Experimentos de adsorción; “Isotermas de adsorción”

Los experimentos de adsorción consistieron en un estudio cinético de isotermas de adsorción para cada especie en estudio.

En la elaboración de las isotermas para cada muestra de proteína, se consideraron un conjunto de soluciones de diferentes concentraciones preparadas a partir de soluciones de concentraciones conocidas. En cada caso se determinaron las concentraciones de proteína por el método de Biuret antes y después del tratamiento con quitosano, considerando el correspondiente valor de longitud de onda de trabajo Durante los ensayo se tomaron volúmenes de muestra de 10 ml, las que fueron tratadas con 35 mg de quitosano a dos pH; 3.1 y 4.1. Las mezclas se agitaron por 4 horas para gelatina y 18 horas para albúmina y suero de bovino de acuerdo al sistema que muestra la figura 2.5.

Finalizada cada agitación, el quitosano fue separado de las soluciones de proteínas mediante filtración corriente y fueron determinadas sus absorbancia por el método de Biuret

Obtenidos los valores de absorbancia, se determinaron las concentraciones de cada especie de acuerdo a las ecuaciones que caracterizaron las curvas de calibración correspondiente a cada proteína.

Con los datos de concentración se construyeron las isotermas de adsorción considerando la siguiente relación matemática;

$$q(M) = \frac{(C_i - C_e) * V}{m}$$

donde $q(M)$ son los miligramos de proteínas adsorbidos por miligramos de quitosano utilizados, C_i es la concentración inicial de proteína (ppm), C_e es la concentración en equilibrio de proteína (ppm). V es el volumen de muestra (L) y finalmente m es la cantidad de quitosano utilizados en cada prueba (g).

Obtenido los valores de q , se representaron las isotermas de adsorción graficando q v/s C_e .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación con las experiencias realizadas en los ensayos de adsorción de muestras de proteínas solubles sobre quitosano, se obtuvieron resultados que se describen a continuación:

3.1.- Acción de quitosano en función del pH. Determinación del pH de máxima adsorción.

Como se describió en la parte experimental, (2.2), las soluciones de proteínas fueron tratadas con quitosano a tres pH diferentes durante un periodo constante de tiempo de 4 h. Las concentraciones iniciales C_i , (antes del tratamiento), y finales C_f (después del tratamiento), de cada solución de proteína soluble, fueron determinada por el método de Biuret, midiendo las absorvancias A_i y A_f antes y después del tratamiento respectivamente, y considerando las ecuaciones que caracterizan las curva de calibración para cada especie en estudio (ver ecuaciones 2.2 y 2.3) Se trabajó a la longitud de onda de máxima absorción previamente determinada para cada solución de proteína (sección 2.2.2.). A saber: Solución de Gelatina, 508 nm; solución de albúmina, 305 nm.

En cada procedimiento se utilizó quitosano de grado de desacetilación 79.3% (Q_1).

Los resultados referidos a los análisis realizados en cada ensayo se presentan a continuación:

➤ **Gelatina:**

Tabla.3.1. Resultados experimentales obtenidos para gelatina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes pH, por el método colorimétrico de Biuret. Longitud de onda de trabajo 508 nm.

pH	A_i	C_i (ppm)	A_f	C_f (ppm)	% de adsorción
3,1	0.020	291	0.004	88.4	58.3%
4,1	0.020	291	0.018	265.69	31%
7,1	0.020	291	0.020	291	0

➤ **Albúmina:**

Tabla.3.2. Resultados experimentales obtenidos para albúmina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes pH, por el método colorimétrico de Biuret. Longitud de onda de trabajo 305 nm.

pH	A_i	C_i (ppm)	A_f	C_f (ppm)	% de adsorción
3,1	0.055	176.29	0.02	67.25	38.14%
4,1	0.055	176.29	0.049	157.6	10.6%
7,1	0.055	176.29	0.055	176.29	0

En las figuras 3.1 y 3.2 se comprime gráficamente los resultados de las tablas 4.1 y 3.2

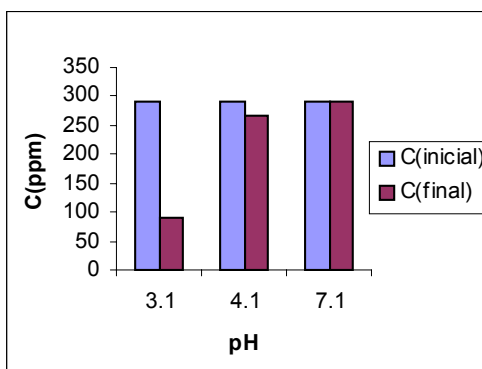


Fig. 3.1. Acción del Quitosano sobre gelatina a diferentes pH, (tiempo de agitación 4 horas)

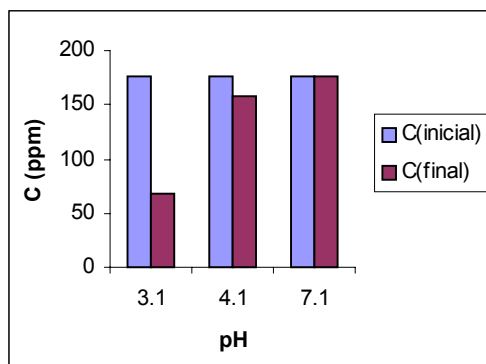


Fig.3.2. Acción del Quitosano sobre albúmina a diferentes pH, (tiempo de agitación 4 horas)

Los resultados obtenidos indican que para ambas proteínas, a pH 3,1 se logra la máxima adsorción sobre quitosano. Además, la gelatina presenta una adsorción notablemente mayor que albúmina bajo las mismas condiciones de pH. A pH 4,1, en el caso de la gelatina, la retención disminuye a la mitad y para albúmina, a un tercio de los valores obtenidos a pH 3,1. A pH 7,1, en ambos caso no se observó retención. Debido a la tendencia mostrada en los resultados obtenidos, no se trabajó a pH intermedios.

3.2.- Optimización del parámetro tiempo de contacto quitosano-proteína.

En el desarrollo de los experimentos para optimizar el tiempo de contacto, se trabajó de forma casi similar como en la optimización del pH, la diferencia radicó en que en este caso se varió el tiempo de acción del quitosano manteniendo constante el pH a 3,1, por ser la condición de máxima adsorción.

Los resultados obtenidos en cada caso se detallan a continuación.

➤ **Gelatina:**

Tabla.3.3. Resultados experimentales obtenidos para gelatina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes tiempos, por el método colorimétrico de Biuret. Longitud de onda de trabajo 508 nm.

Tiempo (h)	A_i	C_i (ppm)	A_f	C_f (ppm)	% de adsorción
1	0.053	708.73	0.047	632.78	10.7%
2	0.053	708.73	0.041	556.83	21.4%
4	0.053	708.73	0.02	291	58.9%
6	0.053	708.73	0.02	291	58.9%

➤ **Albúmina**

Tabla.3.4. Resultados experimentales obtenidos para Albúmina, antes y después del tratamiento con quitosano a diferentes tiempos, por el método colorimétrico de Biuret. Longitud de onda de trabajo 305 nm.

Tiempo (h)	A_i	C_i (ppm)	A_f	C_f (ppm)	% de adsorción
1	1.176	3668.5	1.062	3313.36	9.68%
4	1.176	3668.5	1.046	3263.52	11.03%
8	1.176	3668.5	0.950	2964.40	19.19%
12	1.176	3668.5	0.774	2416.16	34.13%
18	1.176	3668.5	0.49	1531.43	58.2%
21	1.176	3668.5	0.537	1677.85	54.26%
25	1.176	3668.5	0.611	1908.38	47.97%

Si se compara la acción del Quitosano sobre la gelatina y la Albúmina a diferentes tiempos de contacto se puede observar que la retención de la gelatina es más efectiva que para el caso de la Albúmina, según lo demuestran las figuras siguientes:

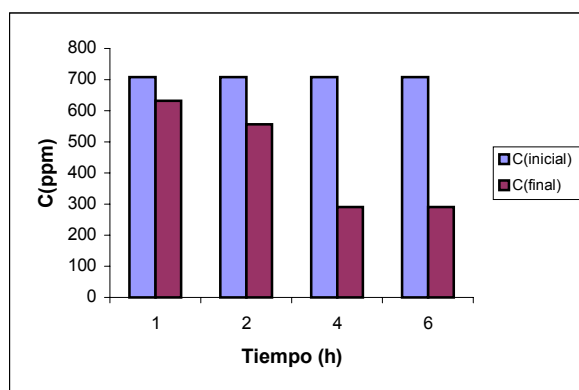


Fig.3.3. Acción de gelatina sobre quitosano a diferentes tiempos

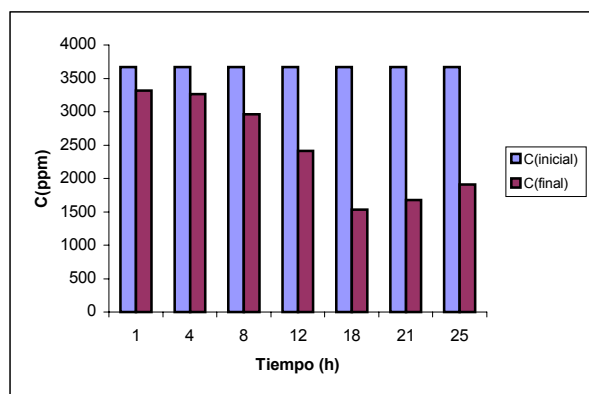


Fig.3.4. Acción de albúmina sobre quitosano a diferentes tiempos

En la figura 3.3, se representa gráficamente la adsorción de gelatina por quitosano a diferentes tiempos de contacto, se observa que luego de un tiempo de 4 horas, la acción de gelatina sobre quitosano es mucho más efectiva con un porcentaje de 58.9% comparada con albúmina. Por otro lado en la figura 3.4, donde se muestran los porcentajes de adsorción quitosano – albúmina, se observa que luego de 18 horas, la albúmina retiene un 58.2% de proteína semejante a la obtenida a las 4 horas para gelatina.

Este comportamiento pudiera estar asociado en que ambas especies tienen diferentes masas moleculares, en el caso de gelatina oscila en los 35000 daltons y para

albúmina es de 69000 daltons lo que se traduciría en una mayor facilidad de contacto entre el quitosano sobre gelatina, quien tiene un peso molecular menor, en comparación con la albúmina quien presenta un mayor peso molecular. Por otro lado se observó que pasado las 21 horas de agitación, en el caso de la albúmina, se producía un aumento en el valor de adsorbancia. Una posible explicación a esto podría ser que estuviese ocurriendo un fenómeno de desorción debido a que ya no existirían sitios activos en donde se enlace la proteína con el quitosano es decir se encontraría saturado. Con este resultado se podría establecer como tiempo máximo de contacto del sistema quitosano – proteína antes que comience la desorción.

3.3.- Isotermas de adsorción.

Las pruebas de adsorción a temperatura constante de cada muestra de proteína se realizaron a dos pH, (3,1 y 4,1) obteniéndose los mejores resultados a pH 3,1. Además se trabajó con dos tipos de Quitosano que se diferenciaron en su grado de saturación: A saber, $Q_1 = 79.3\%$ grado de saturación y $Q_2 = 100\%$ grado de desasetilación.

Las concentraciones iniciales C_i , (antes del tratamiento), y finales C_f (después del tratamiento), de cada solución de proteína soluble, fueron determinada por el método de Biuret, midiendo las absorbancias A_i y A_f antes y después del tratamiento con quitosano.

Los datos anteriormente descritos además de los valores calculados para el parámetro $q(\text{mg de proteína/g de quitosano})$ se resumen en las tablas siguientes;

➤ **Gelatina:** Tiempo de agitación 4 horas

- A pH 4,1 (Q₁)

Tabla.3.5. Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q₁)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,035	0,032	480,80	442.9	10,82
0,04	0,33	544,17	455.56	25,31
0,052	0,043	696,07	582.15	32,54
0,075	0,058	987,21	772.02	61,48
0,1	0,074	1303,6	974.55	94,01
0,139	0,099	1797,34	1292	144,66
0,188	0,143	480,80	1847.97	10,82

- A pH 4,1 (Q₂)

Tabla.3.6. Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q₂)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0.026	0.023	366,96	328.98	10,35
0,032	0,028	442,91	392.27	14,46
0,04	0,032	544,17	442.91	28,93
0,052	0,04	696,07	544.17	43,4
0,075	0,055	987,21	734.05	72,33
0,1	0,059	1303,67	784.68	148,28
0.139	0.075	1797,34	987.21	231,46
0.188	0.087	2417,59	1139.11	365,28

- A pH 3,1 (Q₁)

Tabla.3.7.Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q₁)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,026	0,013	366,96	202.4	47,01
0,032	0,018	442,91	265.69	50,63
0,04	0,022	544,17	316.32	65,1
0,052	0,03	696,07	417.59	79,56
0,075	0,045	987,21	607.46	108,5
0,1	0,049	1303,67	658.10	184,44
0,139	0,065	1797,34	860.63	267,63
0,188	0,077	2417,59	1012.53	401,44

- A pH 3,1 (Q₂)

Tabla.3.8.Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q₂)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,023	0,008	328,98	139.11	54,24
0,032	0,015	442,91	227.72	61,48
0,041	0,020	556,83	291.01	75,94
0,053	0,027	708,73	379.62	94,03
0,075	0,041	987,21	556.83	122,96
0,1	0,045	1303,67	607.46	198,91
0,139	0,059	1797,34	784.68	289,33
0,188	0,061	2417,59	810	459,31

➤ Albúmina de bovino: Tiempo de agitación 18 horas

- A pH 4,1(Q_i)

Tabla.3.9. Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de albúmina a pH 4,1 (Q_i)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,239	0,096	749,5	304	127,28
0,247	0,1	774,42	316.47	130,84
0,272	0,115	852,3	363.2	139,74
0,29	0,12	908,38	378.7	151,33
0,32	0,124	1001,8	391.2	174,45

- A pH 3,1(Q_i)

Tabla.3.10. Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de albúmina a pH 3,1(Q_i)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,239	0,023	749,5	76.6	192,25
0,247	0,027	774,42	89.06	195,8
0,272	0,043	852,3	138.9	203,82
0,29	0,047	908,38	151.37	216,26
0,32	0,051	1001,8	163.83	239,42

➤ **Suero de sangre de bovino:** Tiempo de agitación 18 horas

- A pH 4,1 (Q_1)

Tabla.3.11.Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 4,1 (Q_1)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,016	0,015	178,06	170,77	2,08
0,024	0,021	236,37	214,5	6,24
0,042	0,032	367,56	294,67	20,8
0,058	0,039	484	345,69	39,51
0,091	0,061	724	506	62,28

- A pH 4,1 (Q_2)

Tabla.3.12.Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 4,1 (Q_2)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,016	0,014	178,06	163,48	4,16
0,024	0,019	236,37	199,92	10,41
0,042	0,029	367,56	272,8	27,07
0,058	0,036	484	323,83	45,76
0,091	0,053	724	447,7	78,94

- A pH 3,1 (Q_1)

Tabla.3.13.Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 3,1 (Q_1)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,016	0,012	178,06	148,9	8,33
0,024	0,017	236,37	185,34	14,58
0,042	0,027	367,56	258,23	31,23
0,058	0,035	484	316,54	47,84
0,091	0,051	724	433,16	83,09

- A pH 3,1 (Q_2)

Tabla.3.14.Datos experimentales y calculados para la elaboración de la isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 3,1 (Q_2)

A_i	A_f	C_e (ppm)	C_f (ppm)	q
0,016	0,008	178,06	119,7	16,67
0,024	0,013	236,37	156,19	22,9
0,042	0,023	367,56	229	39,5
0,058	0,03	484	280	58,2
0,091	0,047	724	404	91,4

El proceso de adsorción a temperatura constante se puede representar matemáticamente mediante una serie de expresiones de origen fundamentalmente empírico denominadas isothermas empíricas de adsorción. Al graficar q (mg de proteína /g de quitosano) v/s C_e (concentración final de proteína en ppm) se obtiene *isothermas del tipo III*. Estas isothermas se muestran en las figuras 3.5 a .3 14.

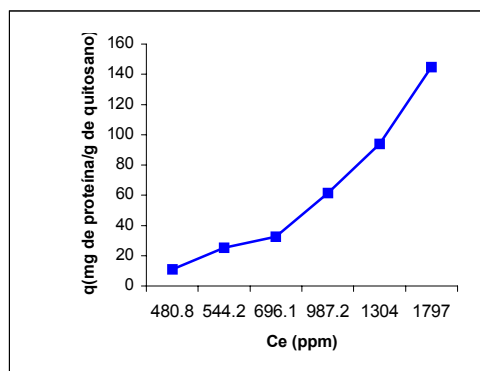


Fig.3.5- isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q_1)

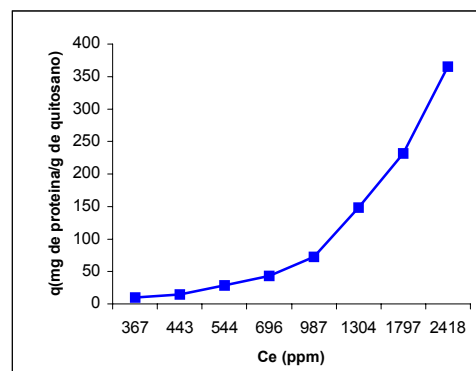


Fig. 3.6. isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q_2)

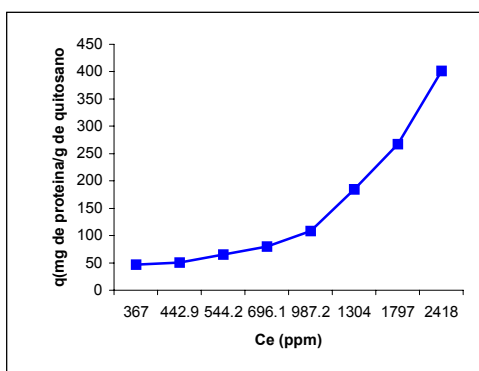


Fig.3.7. isoterma de adsorción de gelatina a pH 4,1 (Q_2)

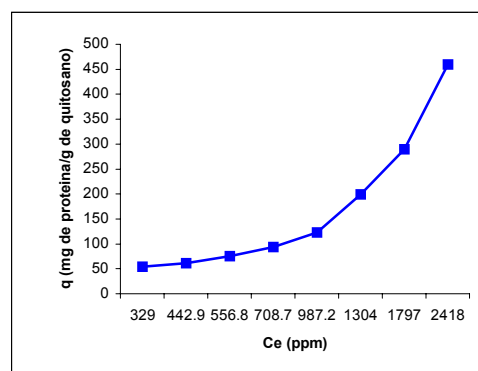


Fig.3.8. isoterma de adsorción de gelatina a pH 3,1 (Q_2)

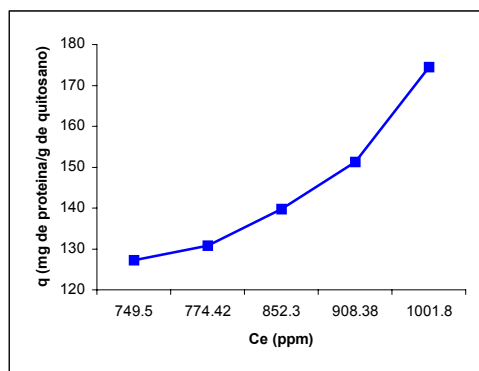


Fig.3.9. isoterma de adsorción de albumina a pH 4,1 (Q_1)

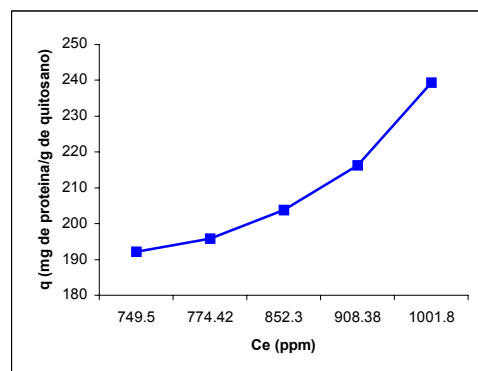


Fig.3.10. isoterma de adsorción de albumina a pH 3,1 (Q_1)

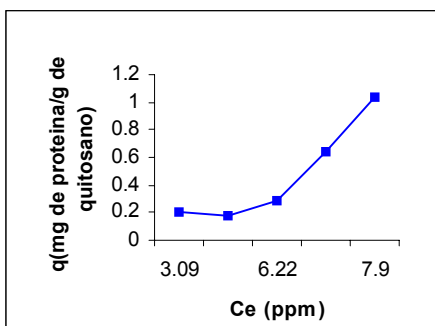


Fig.3.11. isoterma de adsorción de Suero de sangre a pH 4,1 (Q_1)

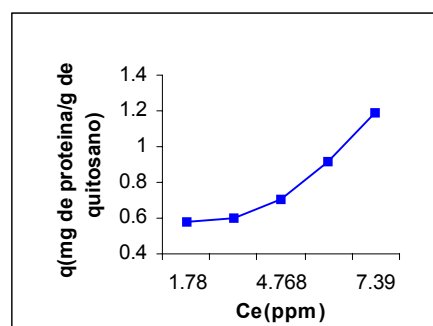


Fig.3.12. isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 3,1 (Q_1)

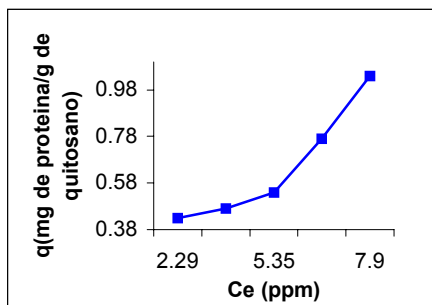


Fig.3.13. isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 4,1 (Q_2)

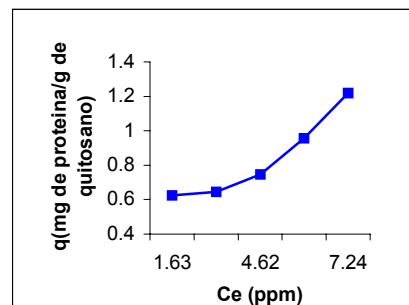


Fig.3.14. isoterma de adsorción de suero de sangre a pH 3,1 (Q_2)

Este tipo de isoterma revela que las interacciones de estas especies (quitosano-proteína), corresponde a una adsorción física, ya que no existe posibilidad de enlace químico, es por ello que se puede hablar de *fisisorción*, la cual es una interacción en múltiples capas entre el adsorbente y el adsorbato. En el caso de tratarse de adsorción química pura, al ser una *adsorción monocapa*, la gráfica tiende asintóticamente a un límite (Fig.1.1 tipo I), correspondiente a $q_{m\acute{a}x}$, el llamado límite de adsorción, independiente de la concentración. En una adsorción física pura no existe este límite y el número de gramos adsorbidos aumenta de forma continua con la concentración.

Con los resultados obtenidos de los ensayos de retención y de las isotermas de adsorción, es posible intentar comprender el comportamiento del sistema quitosano-proteína.

Haciendo un análisis simple de la estructura del Quitosano y de las posibles interacciones moleculares involucradas entre quitosano y las proteínas, se observa que se pueden establecer diferentes interacciones moleculares debido a la presencia de grupos nucleofílicos como OH, NH_2 y a enlaces heteroátomos-hidrógenos

polarizado (un ejemplo lo muestra la figura 3.15). Entre las interacciones más importantes está la de tipo de enlace hidrógeno, como por ejemplo:

- Entre dos grupos hidroxilo (HO—HO)
- Entre el hidrógeno del grupo amina y los oxígenos de los grupos hidroxilo (HO—HN)
- Entre el hidrógeno sobre el nitrógeno de la amina y el grupo carbonilo (C=O—HN).

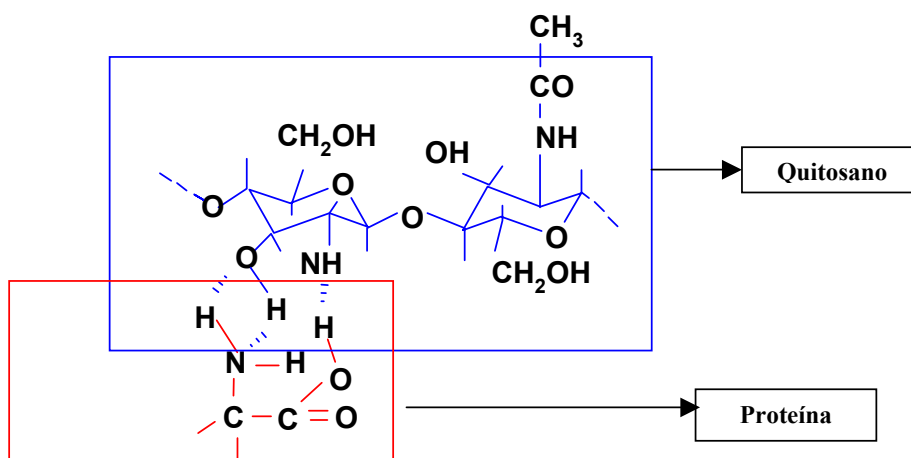


Fig.3.15. Posibles interacciones de enlace de hidrógeno entre Quitosano y proteína

Considerando los gráficos 3.3 y 3.4, que muestran la adsorción de las proteínas sobre Quitosano partiendo de soluciones de igual concentración y a diferentes pH, se puede observar que la mayor adsorción resultó ser a un pH de 3,1. La razón podría encontrarse en el hecho de que el exceso de protón en el medio, producto del ácido para el ajuste de pH, actuaría de enlace entre los grupos nucleofílicos (OH, NH,

C=O) y el protón del ácido. Una forma grafica de representar esto último, se muestra en la figura 3.16.

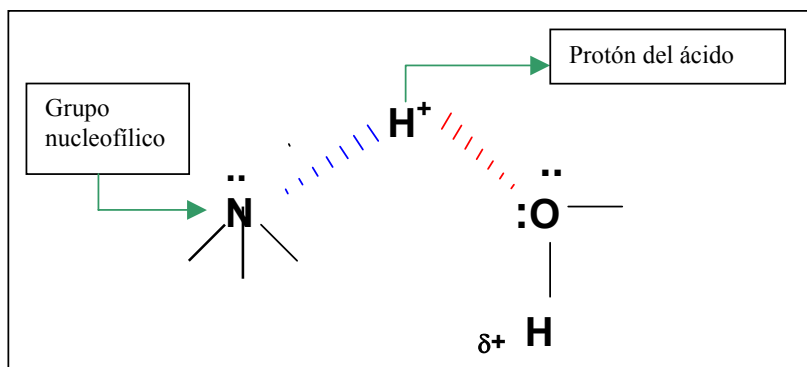


Fig.3.16. Interacción entre protón del ácido y grupos nucleofílicos de quitosano y proteína

3.4.- Análisis comparativo entre dos tipos de Quitosano de diferente grado de saturación.

Una de las propiedades que caracteriza al quitosano extraído de la quitina, es su grado de saturación, el cual esta directamente relacionado con el proceso de hidrólisis de los grupos acetamido de la quitina ($\text{CH}_3\text{CONH-}$) hasta grupos aminos (NH_2), la cual lleva en definitiva a la obtención del quitosano. De acuerdo a esto se puede esperar un comportamiento distinto en lo que se refiere a los posibles enlaces que ocurre con la proteína, si comparamos dos tipos de quitosano de diferente grado de desacetilación.

En la elaboración de las isotermas, se utilizaron dos tipos de quitosano de diferente grado de desacetilación, uno 79,3% (Q_1) y el otro 100% (Q_2) desacetilado. Esta diferencia indica que para el caso de Q_2 existe la desaparición de grupos carbonilo ya que la desacetilación es completa, en cambio Q_1 la desacetilación es parcial por lo tanto existen tanto grupos aminos como grupos carbonilos.

Para el primer caso (Q_2) hay un número menor de enlaces hidrógeno posible en los que intervienen los grupos carbonilo ($C=O-OH$ y $C=O-NH$), los cuales son más fuertes que cualquiera de los otros enlaces hidrógeno, sin embargo el grupo acetilo de la Q_1 puede presentar un impedimento estérico para la formación de enlaces hidrógeno en los que intervenga el grupo hidroxilo vecino o el hidrógeno amínico, lo que resulta en una desventaja relacionada con la adsorción de la proteína.

Si observamos los resultados nos podemos dar cuenta que la diferencia no es tan marcada esto se debe a la diferencia de masas moleculares del quitosano Q_1 y Q_2 . Como sabemos el quitosano es una gran estructura y su tamaño esta directamente relacionada con su masa molar por lo tanto a mayor masa molar existe mayor cantidad de grupos aminos o acetilos disponibles para enlazarse con la proteína. En el caso de Q_1 su masa molar es de 63.000 g/mol y para Q_2 es de 7.600 g/mol.

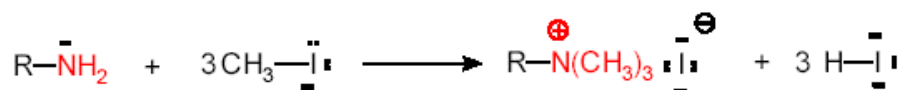
3.5.-Proyección y estudios futuros

A pesar que los resultados obtenidos en este estudio no arrojaron favorables resultados ya que se pudo establecer una capacidad de adsorción de sólo un 50% de proteínas sobre quitosano, el uso de este polímero tiene otras ventajas comparativas, como es el de ser no tóxico y biodegradable por ende no daña el medio ambiente, además se obtiene de un polisacárido (quitina) ampliamente distribuido en la naturaleza y que constituye el segundo polímero más abundante, esto lo hace ser favorablemente económico.

El quitosano se puede modificar químicamente para convertirlo en un material más versátil para así obtener mejores resultados. Dentro de este contexto existen métodos de cuaternización de los grupos aminos primarios y secundarios, algunos de los

cuales ya se han aplicado con éxito al quitosano, obteniéndose diferentes derivados alquilados.

Uno de los métodos más usados para realizar esta modificación hace uso de la preparación de intermediarios monoalquilados tipo base de Schiff's para su posterior alquilación exhaustiva usando yoduro de metilo. La reacción para dicho efecto es la siguiente;



Cuando la amina primaria ataca al yoduro de metilo se formará una amina secundaria, que es más nucleofílica que la amina primaria. La amina secundaria competirá con la amina primaria en el ataque al yoduro de metilo y formará una amina terciaria, que a su vez atacará al CH_3I y formará una sal de amonio. El resultado de la reacción será una mezcla de aminas y de la sal de amonio.

La alquilación de la amina está representada por la siguiente síntesis:

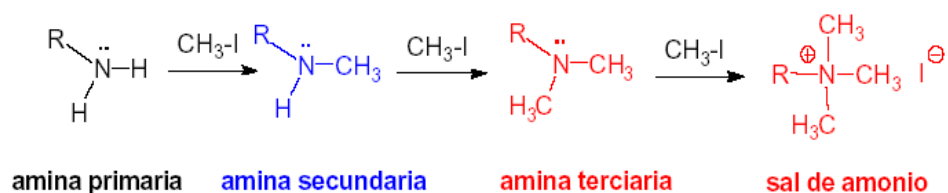


Fig.3.17 Síntesis de alquilación de una amina primaria

A través de esta síntesis se podría extender el intervalo de pH donde se pueda utilizar dicho biopolímero en solución, para darle una mayor aplicabilidad.

3.5.1 Diseño de un modelo a escala real para llevar a cabo la acción de quitosano como adsorbedor de proteínas solubles.

Con los datos obtenidos en el trabajo experimental realizado, se puede hacer un acercamiento estimativo para aplicar la acción de Quitosano como adsorbedor de proteínas en efluente industriales líquidos. Es posible diseñar un reactor de fácil manejo y control como por ejemplo un adsorbedor de tanque agitado de flujo continuo como lo muestra la figura 3.18

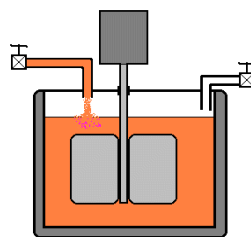


Fig. 3.17. Modelo de un tanque agitado

El tratamiento consistiría en añadir quitosano en forma manual o mecánica al tanque para que esté en contacto con el efluente por un tiempo determinado y posteriormente pueda separarse el quitosano por sedimentación o filtración.

El diseño de ingeniería del tanque agitado depende de factores tales como flujo del efluente y tiempo de contacto, con estos datos se puede calcular el diámetro del tanque, aplicando la siguiente ecuación

$$Tr(hr) = Vr(lt)F(lt/hr)$$

en donde T_r es el tiempo de retención en horas, V_r es el volumen del reactor representado por la ecuación; $V_r = \pi D_2^2 L / 4$ y finalmente F es el flujo del efluente expresado en lt/hr.

El calculo final del diámetro del reactor depende del valor de la altura que se le de, por lo tanto a mayor altura mayor será el diámetro.

Por otro lado un factor que se debe considerar es el tamaño de partícula del quitosano ya que si este es muy pequeño tendería a empaquetarse dificultando el contacto con el efluente y su posterior separación.

Queda claro que hace falta un trabajo más exhaustivo para llegar a completar un diseño optimo, sin embargo esto da pie para comenzar una nueva investigación el cual tenga un nuevo protagonista.

4.- CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo referido a la retención de quitosano sobre proteínas biosolubles como lo son gelatina, albúmina y proteínas de suero de sangre de bovino se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

- El Quitosano, presenta *propiedades adsorbente* frente a proteínas tales como; gelatina, albúmina y proteínas suero de sangre de bovino. De esta manera este estudio se convierte en una interesante opción para la purificación de efluentes contaminantes por ejemplo las que provienen de industrias procesadoras de carne.
- Los experimentos de adsorción revelaron que la acción del quitosano es más efectiva a *pH ácidos*. De acuerdo a los pH considerados en este estudio el orden sería, 3,1 > 4,1 > 7,1. La razón pudiera centrarse a que el protón del ácido para el ajuste de pH actuaría con enlace con los grupos nucleofílicos del quitosano y la proteína.
- La adsorción de proteínas sobre quitosano se ajustaron a isoterma de adsorción del *tipo III* en todos los casos, lo que reveló que el sistema Quitosano – proteína presenta interacción física. Este tipo de isoterma de forma cóncava hacia arriba recibe el nombre de desfavorable debido a que se obtiene de material adsorbido en cantidades bajas

- Los análisis realizados para la optimización del tiempo de acción para el sistema quitosano – proteína, demostraron que se requirió un menor tiempo de contacto para gelatina en comparación con albúmina. Se obtuvieron resultados óptimos a tiempos de contacto de 4 horas para la gelatina y 18 horas para la albúmina en donde el porcentaje de adsorción fue de un poco más del 50%. Esta diferencia se puede deber a que la albúmina presenta un mayor masa molar en comparación a gelatina lo que resultaría en una menor capacidad de contacto entre ella y el quitosano.

- En el análisis comparativo de dos tipos de quitosano cuya diferencia radica en su grado de saturación ($Q_1 = 79,3\%$ y $Q_2 = 100\%$) se tradujo en diferencias en lo que se refiere a su capacidad de adsorción de quitosano sobre las muestras de proteínas.
Los resultados obtenidos demostraron que el quitosano 100% desacetilado presentó una mayor adsorción en comparación al quitosano 79,3% desacetilado.
En el caso Q_2 existe grupos carbonilos y aminos no así en Q_1 quien al ser 100% desacetilado sólo presenta grupos aminos. Esta característica favorece la adsorción ya que la presencia de grupos carbonilos produciría un efecto estérico con el cual se ve desfavorecido la formación de puente de hidrógeno.

ANEXO 1

➤ **Reacción del Biuret.** ⁽²⁰⁾

La reacción del biuret está basada en la formación de un complejo azul-púrpura entre los enlaces peptídicos y el Ion Cu^{2+} en medio alcalino. Este complejo absorbe luz en el espectro visible ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

El reactivo reacciona con compuestos que tienen dos grupos $-\text{CO}-\text{NH}-$ unidos a un mismo átomo de N ó C. Por lo tanto, no es una reacción específica de proteínas. La intensidad del color, azul-violáceo, es proporcional a la concentración proteica del medio. El color se debe a la formación de un complejo de coordinación del catión cúprico con cuatro nitrógenos. Esto se observa en la figura siguiente;

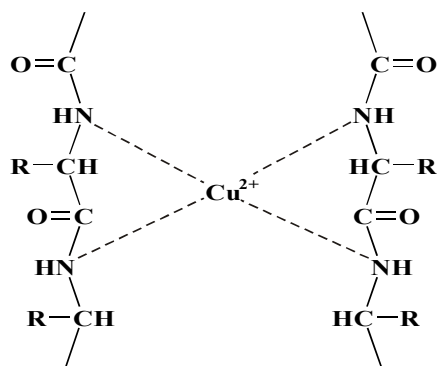


Fig. A.1 Complejo de coordinación que se forma entre el cobre y 4 nitrógenos de una proteína

Este método tiene la ventaja de que es poco influenciado por la composición aminoacídica de las proteínas presentes en la muestra ya que es una reacción en la que interviene directamente el enlace peptídico. Sin embargo, se trata de un método que,

comparado con otros métodos disponibles, resulta poco sensible, ya que cada ensayo requiere una cantidad de proteína superior a 0.1 mg. Además, son numerosos los compuestos que interfieren; entre otros, sacarosa, Tris, glicerol, EDTA.

ANEXO 2

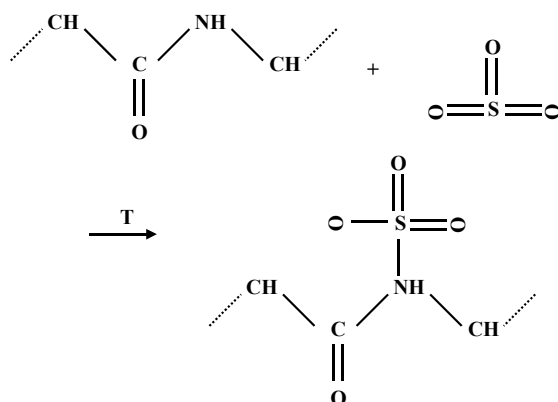
Método kjeldahl

➤ **Determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl.** ⁽²¹⁾

Las proteínas son compuestos altamente polimerizados, que están formados por aminoácidos. También se unen a componentes no proteicos. Las proteínas se encuentran entre los nutrientes más importantes, junto con los lípidos y los carbohidratos. Además de su función energética (1 g de proteína proporciona 4,1 Kcal al organismo), dada su naturaleza nitrogenada, son necesarias para la síntesis de compuestos propios del organismo implicados en la estructura de las membranas junto con los lípidos, como glicoproteidos en funciones de lubricación y como nucleidos que posibilitan la síntesis de las proteínas propias del organismo, así como la formación de los cromosomas y la división celular.

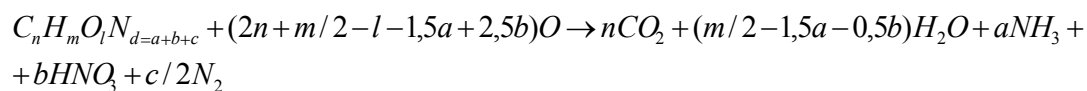
El valor nutritivo de las numerosas proteínas alimentarias existentes depende de su digestibilidad, que depende a su vez de la estructura, es decir, de su composición aminoácídica. El contenido de aminoácidos esenciales (de los aproximadamente 30 aminoácidos 8 son esenciales para el hombre dado que éste no es capaz de sintetizarlos) determina el valor biológico, es decir, el mayor aprovechamiento fisiológico de una proteína por parte del organismo. Rige la ley del mínimo, esto es, si la oferta de aminoácidos esenciales es demasiado limitada, el conjunto del rendimiento de las reacciones de síntesis dependerá del aminoácido que esté presente en menor cantidad (aminoácido limitante). Los aminoácidos limitantes más importantes son la lisina (cereales y patatas) y la metionina (carne y leche).

En el análisis de alimentos, el método de kjeldahl es el que ha alcanzado mayor importancia. Como consecuencia de su estructura a base de aminoácidos individuales, el contenido de nitrógeno de las proteínas varía sólo entre unos límites muy estrechos (15 a 18% y como promedio 16%). Para la determinación analítica del contenido en proteína total o “proteína bruta”, se determina por lo general el contenido de nitrógeno



tras eliminar la materia orgánica con ácido sulfúrico (método de kjeldahl que data de 1883), calculándose finalmente el contenido de proteína con ayuda de un factor (en general 6,25). se asume que el trióxido de azufre que se forma durante el tratamiento a altas temperaturas se adiciona como ácido de Lewis al grupo NH del enlace peptídico (base de Lewis) de la proteína, formándose el correspondiente ácido amidosulfónico. El ácido amidosulfónico es resistente a una posterior oxidación y se transforma en sulfato amónico por degradación. El sulfato amónico se determina a continuación, tras liberación del NH₃ y destilación, por medio de una valoración ácido-base.

La degradación oxidativa acelerada catalíticamente de compuestos orgánicos con ácido sulfúrico a temperaturas comprendidas entre 360 y 410 °C se denomina tratamiento kjeldahl. Las transformaciones químicas que tienen lugar son:



La degradación de grupos nitrogenados orgánicos funcionales tiene lugar dependiendo del compuesto que forme el nitrógeno a través de muchas etapas intermedias a sulfato amónico, ácido nítrico o nitrógeno elemental. Los grupos funcionales nitrogenados de moléculas orgánicas y sus correspondientes productos de degradación están representados en la tabla A.1

Tabla.A.1 :Grupos funcionales de moléculas orgánicas y su producto de degradación

Grupo funcional	Nombre	Producto de degradación	
-CONH-	grupo peptídico	NH ₃	
-CONH ₂	carbámico (amida)		
-OCN	oxocianato		
-NCO	isooxocianato		
-SCN	tiocianato		
-NCS	isotiocianato		
-CN	nitrilo		
-NC	isocianida		
-NH ₂	amino		
=NH	imino		
=N-	nitrógeno heterogéneo sin enlaces N-N		
-NO	nitroso		NHO ₃
-NO ₂	nitro		
-NOOH	isonitro		
-NHOH	hidroxilamino		
=NOH	oxima		
-NHNH ₂	hidrazina	N ₂	
=N-NH-R	hidrazona		
-N=N-	azo		
=N-N=	azino		
-N≡N	diazonio		

➤ **Fundamento teórico del método de Kjeldhal.**

La sustancia a investigar se somete a un tratamiento oxidativo con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador (sulfato férrico), un oxidante (peróxido de hidrógeno) y un elevador del punto de ebullición del sulfúrico (sulfato potásico). Del sulfato amónico formado se libera el amoníaco por tratamiento alcalino y éste se transporta con ayuda de una destilación en corriente de vapor a un recipiente con ácido bórico y se realiza su valoración con una disolución valorada de ácido clorhídrico. El contenido de proteína en la muestra se calcula teniendo en cuenta el contenido medio de nitrógeno en la proteína en cuestión.

Para expresar el contenido en proteínas de la muestra analizada es necesario multiplicar la cantidad de nitrógeno por un factor de acuerdo con la tabla siguiente:

Tabla.A.2.Factor de multiplicación para determinar el contenido de proteínas en una muestra, según el tipo de alimento

Alimentos	Factor
gelatina	5,55
leche, productos lácteos	6,38
carne, pescado, huevos	6,25
frutos secos y semillas oleaginosas	5,4
verduras, frutas y derivados cereales	6,25
maíz, leguminosas	6,25

5.- BIBLIOGRAFÍA

- (1).- Comisión nacional de medio ambiente - región metropolitana. “*Guía para el control y prevención de la contaminación industrial*”. industria procesadora de la carne. Santiago de Chile. Marzo **1998**.
- (2).- Seminario: *Industrias Cárnicas, residuos, su tratamiento y prevención de la contaminación*. Diciembre de **2002**
- (3).- www1.ceit.es/asignaturas/cursos/ii/cuarto/ciemedamtema1tratamagua.htm – “*Depuración y tratamiento de las aguas*”
- (4).- Web.uniove.es/QFAnalitica/trans/ExpQuimFis/Experimento4pdf
- (5).- Gelbert W. Castellan, *Fisicoquímica*, Fondo Educativo Interamericano S.A. México, **1974**.
- (6).- Metcalf & Hedí, *Ingeniería De Aguas Residuales*, Ed. Mc. Graw Hill, Tercera Edición, 1998.
- (7).- Samuel H. Maron Jorome B. Landon, *Fisicoquímica Fundamental*, Editorial Limusa, México, **1978**.
- (8).- Cristóbal Lárez Velásquez, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), abril, **2003**.
- (9).- Muzzarelli R, “*Chitin*”, Editorial Pergamon Press. Primera Edición, 2, **1974**.
- (10).- Dimitris Kajetzopoulos; Aggeliki Martinou and Vassilis Bouriotis. *Applied Biological Sciences*, 90, 2568, **1993**.

- (11).- Edelio Taboada; Gustavo Cabrera; Galo Cardenas, *Journal of Applied Polymer Science*, 91, 807, **2004**.
- (12).- Galo Cárdenas; Daniel Cuellar And Karen Neira, *J. Chil. Chem. Soc.* 49, 3, 237, **2004**.
- (13).- Rachel Auzely-Velty and Marquerite Rinaudo, *Macromolecules*, 34, 3574, **2001**.
- (14).- Sabina P. Strand; Maname S. Vandvik; Kjell M. Varun and Kjetell Otgaard. *Biomacromolecules*, 2, 126, **2001**.
- (15).- Peter P. Hoagland and Nicholas Panis, *J. Agric. Food Chem.*, 44 , 1915, **1996**.
- (16).- I. Konovalova; N. Stepanova; P. Vasilevskii y I. Bereza, *Russian J. Appl. Chem.*, 74(3), 449, **2001**.
- (17).- Zofia Modrzejewska and Wladyslaw Kaminski, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38, 4946, **1999**.
- (18).- Galo Cárdenas; Edelio Taboada y Gustavo Cabrera, *J. Chil. Chem. Soc.* 48 **2003**
- (19).- Carol L. Lasteo and Matthew. P. Hurst, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3622, **1999**.
- (20).- <http://bioquimica.fcien.edu.uy/seccion/distribucion/practicos/1.html> - 29k –
- (21).- www.uniovi.es/qfanalitica/trans/labavquiman/practical.pdf -