

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

“PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE DERIVADOS DEL QUITOSANO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MUESTRAS AMBIENTALES EMPLEANDO ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO Y ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA”

**Trabajo Especial de Grado presentado ante la
ilustre Universidad Central de Venezuela, por
la Br. Ailyn Andreína Canache Ruíz para optar
al Título de Licenciado (a) en Química.**

Caracas, Junio 2016.

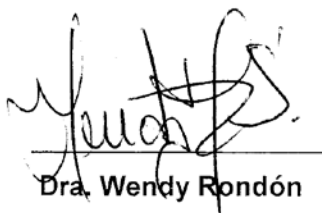
Nosotros, Profesora María Rodríguez, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y Dra. Wendy Rondón, Investigadora del Laboratorio de Química Analítica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

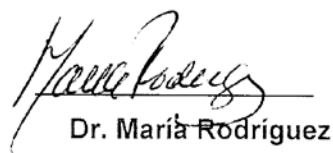
“PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE DERIVADOS DEL QUITOSANO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MUESTRAS AMBIENTALES EMPLEANDO ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO Y ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA”

Que presenta la Br. Ailyn Canache, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central Venezuela, y en el Laboratorio de Química Analítica Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) bajo nuestra dirección, durante los años 2015 y 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Junio 2016.



Dra. Wendy Rondón
Tutor

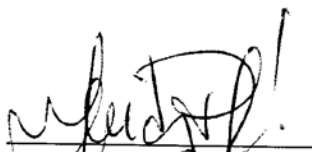


Dr. María Rodríguez
Tutor


Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela como jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

“PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE DERIVADOS DEL QUITOSANO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MUESTRAS AMBIENTALES EMPLEANDO ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO Y ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA”

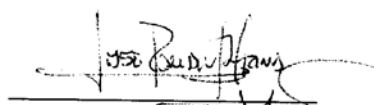
Presentado por la Br. Ailyn Canache, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.




Dra. Wendy Rondón
Tutor



Dra. María Rodríguez
Tutor



Dr. José Chirinos
Jurado



Dra. Beth Díaz
Jurado

Resumen

Se realizó la extracción de la α -quitina a partir de desechos de conchas de camarón a través del tratamiento con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, obteniendo rendimientos entre 24-26% a partir del material crudo seco. Adicionalmente, el tratamiento con base concentrada resultó muy eficaz para el aislamiento del quitosano con un grado de desacetilación mayor al 90 % y porcentajes de rendimiento entre 70-80%, a partir de la quitina extraída. Por otro lado, se realizó la modificación del quitosano empleando aldehídos aromáticos para la formación de bases de Schiff con piperonal, benzaldehído, vainillina y 4-nitrobenaldehído, tomando este último como material de partida para la evaluación de la reacción de copulación con 8-Hidroxiquinolina. Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por FT-IR y RMN H-1. Posteriormente, los derivados de quitosano obtenidos fueron evaluados como material de empaque de minicolumnas analíticas para la preconcentración en línea de soluciones acuosas de plomo empleando análisis por inyección en flujo acoplado a espectroscopia de absorción atómica FIA-EAA. En este sentido, en comparación con el resto de los materiales obtenidos, la base de Schiff de quitosano con vainillina (BSQ-V) demostró tener la mejor linealidad en el rango de concentraciones estudiadas siendo empleada para la evaluación de las figuras de mérito. Los resultados obtenidos demostraron que el sistema de preconcentración en línea por FIA-EAA es más sensible ($0,002 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) que el método de determinación de Pb^{2+} por absorción directa ($30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), aumentando hasta 10.000 veces la sensibilidad del analito, con un valor de límite de detección de hasta 100 veces menor ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) con respecto al obtenido por absorción directa ($148 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Adicionalmente, se obtuvo una frecuencia de muestreo de 20 muestras h^{-1} lo cual es favorable para ser empleado como análisis de rutina. Por otro lado, la evaluación de la exactitud del método demostró valores superiores a 99,3 %, lo que demuestra la validez del mismo.

Palabras claves: Quitosano, bases de Schiff, FIA, EAA.

Agradecimientos

Gracias doy a dios por siempre acompañarme en este camino y nunca dejarme perder la fe en los momentos más difíciles. A mis padres Yngri y Alí porque me dieron la vida, los valores y principios necesarios para alcanzar esta meta, los amo. A mis hermanos Asli y Carlos por soportar todos mis cambios de humor, a mi tía Erika única e incondicional, mis ahijadas bellas Valeria y Shantal por llenar de alegría mis días en los momentos que más lo necesite, en fin gracias a toda mi familia.

A mis suegros, especialmente a mi suegro Luis Fernández por adoptarme y ser como un segundo padre para mí, sin tu apoyo no hubiera sido posible. Además, a mi familia adoptiva tías, tíos y primos que siempre me han brindado una mano amiga.

A mi compañero de vida Luis Fernández Jr. mi novio, mi amigo, mi compañero y mi futuro esposo, gracias a tu amor, respeto y paciencia soy una mejor persona y después de tanto sacrificio alcanzamos esta meta juntos. Te amo mi amor.

A los amigos y hermanos que nos da la vida, José Luis Lugo por ser mi inspiración en esta formación, gracias por tus consejos. Mis amigas Johana, Estefanía, Nairim, Iriadna, gracias por estar allí y siempre escucharme. Así mismo, a los que aun estando lejos siempre me apoyaron, Yenifer, Fabián, Julieta.

A mis profesores por la formación, en especial a Jairo Bermúdez por ayudarme siempre con su humildad y talento. A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales y del Laboratorio de Química Analítica del IVIC por toda la colaboración para la realización de este proyecto.

A mis tutoras Wendy Rondón y María Rodríguez por su apoyo incondicional, por sus consejos y guiarme en el desarrollo de este trabajo. A mi UCV por ser mi alma mater y no solo brindarme conocimiento académico sino también de la vida siempre estaré orgullosa de ser UCEVISTA.

INDÍCE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEORICO.....	4
2.1 Contaminación ambiental por metales pesados.....	4
2.2 Metales pesados.....	5
2.3 ANALITOS DE INTERÉS Y SUS PROPIEDADES.....	8
2.3.1 Analitos.....	6
2.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	8
2.5. PRECONCENTRACIÓN.....	9
2.6 ANALISIS POR INYECCION EN FLUJO (FIA).....	10
2.7 PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA Y ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO.....	12
2.8 SISTEMAS FIA CON PRECONCENTRACIÓN ACOPLADOS A MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	14
2.9 QUITINA Y QUITOSANO.....	16
2.9.1 Factores que afectan la calidad y las propiedades de adsorción del Quitosano.....	19

2.9.1.1	Cristalinidad y propiedades de hinchamiento.....	19
2.9.1.2	Peso molecular.....	21
2.9.1.3	Grado de desacetilación.....	22
3.	QUITOSANO Y SUS MODIFICACIONES.....	23
3.1	Modificaciones físicas del quitosano.....	23
3.2	Modificaciones químicas del quitosano.....	23
3.3	Caracterización espectroscópica del Quitosano y sus derivados...	27
3.4	Quitosano modificado para preconcentración en línea.....	29
4.	OBJETIVOS.....	34
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	35
5.1	Materiales y equipos.....	35
5.2	Origen de las muestras de conchas de camarón.....	36
5.3	Aislamiento de α-quitina.....	37
5.3.1	Desmineralización de las conchas de camarón.....	37
5.3.2	Desproteización de las conchas desmineralizadas.....	38
5.4	Obtención de quitosano.....	39
5.4.1	Desacetilación de la α -quitina aislada.....	39
5.5	Modificación química del quitosano.....	40
5.5.1	Formación de la Base de Schiff de Quitosano con piperonal...	42

5.5.1.2 Acilación de la base de Schiff de quitosano con piperonal....	43
5.5.2 Formación de base de Schiff de Quitosano con benzaldehído, vainillina y 4-nitrobenzaldehído.....	45
5.5.3 Copulación de la base de Schiff modificada de quitosano 4- nitrobenzaldehído con 8-Hidroxiquinolina.....	48
5.6 Determinación de plomo en soluciones acuosas empleando derivados de quitosano como material adsorbente mediante FIA-EAA.....	50
5.6.1 Configuración de flujo empleada.....	50
5.6.2 Sistema de preconcentración y elución en la configuración de flujo empleada.....	52
5.6.3 Condiciones de trabajo para el sistema de preconcentración en línea acoplado a espectrometría de absorción atómica	54
5.6.4 Evaluación de derivados de quitosano en el sistema FIA-EAA....	56
5.6.5 Caracterización analítica.....	56
5.6.5.1 Figuras de mérito.....	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
6.1 Extracción y caracterización de α -quitina a partir de conchas de camarón.....	58
6.2 Aislamiento y caracterización de quitosano a partir de α -quitina.....	60
6.3 Modificación química del quitosano.....	69
6.3.1 Formación de base de Schiff de quitosano con piperonal.....	69
6.3.2 Acilación de la base de Schiff de quitosano con piperonal.....	74
6.3.3 Formación de base de Schiff de quitosano con benzaldehído...	76

6.3.4 Formación de base de Schiff de quitosano con vainillina.....	80
6.3.5 Formación de base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído.....	84
6.3.6 Copulación de la base de Schiff modificada de quitosano 4- nitrobenzaldehído con 8-Hidroxiquinolína.....	88
6.4 Evaluación de los derivados de quitosano en el sistema FIA-EAA..	94
6.5 Caracterización analítica.....	99
6.5.1 Figuras de mérito.....	99
7. CONCLUSIONES.....	103
8. RECOMENDACIONES.....	104
9. REFERENCIAS.....	106
10. ANEXOS.....	114

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de una configuración FIA.....	10
Figura 2. Movimiento de los flujos y formación de la respuesta instrumental dentro de un sistema FIA	11
Figura 3. Válvulas rotatorias de seis puertos en la etapa de carga e inyección	12
Figura 4. Dispersión de la muestra poco después de la inyección.....	13
Figura 5. . Estructura de la quitina.....	16
Figura 6. Estructura del quitosano.....	17
Figura 7. Esquema de obtención de la quitina a partir de conchas de crustáceos.....	18
Figura 8. Estructura α -quitina.....	20
Figura 9. Estructura β -quitina.....	20
Figura 10. Proceso de desmineralización de las conchas de camarón.....	37
Figura 11. Proceso de desproteínización de las conchas de camarón.....	38
Figura 12. Proceso de desacetilación de la quitina obtenida.....	39
Figura 13. Esquema de modificación sintética planteado.....	41

Figura 14. Esquema de modificación del quitosano con piperonal.....	43
Figura 15. Esquema de acilación de la base de Schiff de quitosano con piperonal.....	44
Figura 16. Esquema de modificación del Quitosano con Vainillina, Benzaldehído y 4-nitrobenzaldehído.....	47
Figura 17. Esquema de modificación sintética de la base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído.....	49
Figura 18. Sistema de inyección en flujo continuo para la determinación de Pb ²⁺ empleando derivados de quitosano.....	51
Figura 19. Sistema de preconcentración en línea FIA-EAA.....	53
Figura 20. Espectro FT-IR de la muestra de quitina.....	60
Figura 21. Espectro FT-IR de la muestra de Q-2.....	63
Figura 22. Comparación física entre Quitina y Quitosano.....	63
Figura 23. Espectro FT-IR de los Quitosanos: Q-1, Q-2, Q-3, y Q-4.....	64
Figura 24. Espectro RMN H-1 del Q-2 en D ₂ O/HCl 1%.....	65
Figura 25. Ampliación del espectro RMN H-1 del Q-2.....	66

Figura 26. Ampliación del espectro FT-IR del Q-2.....	68
Figura 27. Estructura propuesta para el producto de la reacción entre piperonal y quitosano.....	70
Figura 28. Espectro FT-IR de quitosano y base de Schiff de quitosano con piperonal.....	71
Figura 29. Espectro RMN H-1 de la base de Schiff de quitosano con piperonal.....	72
Figura 30. Espectro RMN H-1 del piperonal/ acetona.....	73
Figura 31. Espectro FT-IR del producto de la reacción de la BSQ-P y cloruro de p-nitrobenzoilo.....	75
Figura 32. Espectro RMN H-1 del producto de reacción entre BSQ-P y cloruro de p-nitrobenzoilo.....	76
Figura 33. Estructura propuesta para el producto de la reacción entre el benzaldehído y quitosano.....	77
Figura 34. Espectro FT-IR de quitosano y base de Schiff de quitosano con benzaldehído.....	78
Figura 35. Espectro RMN H-1 de la base de Schiff de quitosano con Benzaldehído.....	79
Figura 36. Espectro RMN H-1 del benzaldehído.....	80

Figura 37. Estructura propuesta para el producto de reacción entre el quitosano y la vainillina.....	81
Figura 38. Espectro FT-IR de quitosano y base de Schiff de quitosano con vainillina.....	81
Figura 39. Espectro RMN H-1 de la base de Schiff de quitosano con Vainillina.....	82
Figura 40. Espectro RMN H-1 de la Vainillina/acetona.....	83
Figura 41. Estructura propuesta para el producto de la reacción entre quitosano y 4-nitrobenzaldehído.....	84
Figura 42. Espectro FT-IR de quitosano y base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído.....	85
Figura 43. Espectro RMN H-1 de la base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído.....	86
Figura 44. Espectro RMN H-1 del 4-nitrobenzaldehído/acetona.....	87
Figura 45. Estructura propuesta para la BSQ-8HQ.....	89
Figura 46. Espectro FT-IR de la BSQ-8HQ.....	89
Figura 47. Comparación entre los espectros FT-IR de: el producto de partida (BSQ-4NBz), el producto de reducción con NaS_2O_4	

(BSQ-Red) y el producto final (BSQ-8HQ).....90

Figura 48. A) Pruebas de solubilidad del producto de copulación
Obtenido en solventes polares y B) Apariencia física del producto
de copulación.....91

Figura 49. Estructura del complejo formado entre el Plomo y el
APDC.....94

Figura 50. Diagramas obtenidos para altas y bajas concentraciones
de muestra.....95

Figura 51. Estructura química de los aldehídos aromáticos empleados
en la modificación sintética.....97

Figura 52. Ensayos de solubilidad de las bases de Schiff de
Quitosano en agua.....98

Figura 53. Hinchamiento de la base de Schiff de quitosano con
Benzaldehído.....98

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales elementos considerados metales pesados.....	5
Tabla 2. Sistemas de preconcentración en línea de elementos traza y su determinación por diferentes técnicas espectroscópicas.....	15
Tabla 3. Aplicaciones de algunos materiales de quitosano modificado para la preconcentración en línea de elementos traza.....	33
Tabla 4. Condiciones empleadas en la desacetilación de la α -quitina extraída a partir de conchas de camarón.....	40
Tabla 5. Reactivos y condiciones de reacción para la formación de Bases de Schiff de Quitosano con: Benzaldehído, Vainillina y 4-nitrobenzaldehído.....	46
Tabla 6. Condiciones de trabajo empleadas para la preconcentración en línea de Pb^{2+} empleando derivados de quitosano y FIA-EAA.....	55
Tabla 7. Resultados y rendimiento de la extracción de quitina a partir de conchas de camarón.....	58
Tabla 8. Resultados de la desacetilación de la quitina.....	61

Tabla 9. Desplazamientos químicos de los protones de (Q-2) en D₂O/ HCl.....67

Tabla 10. Porcentajes de rendimiento para cada derivado
de Quitosano.....93

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas en la actualidad es la contaminación de aguas por metales pesados⁽¹⁾. El rápido desarrollo de industrias como: la minería, la metalurgia, la fabricación de fertilizantes y baterías, papel, pesticidas, entre otros, son responsables de la presencia de metales pesados en el ambiente⁽²⁾. Estos, al no ser biodegradables tienden a acumularse en los organismos vivos pudiendo alcanzar concentraciones excesivas que causen efectos perjudiciales a la salud, por lo cual algunos de estos son considerados como cancerígenos humanos^{(3) (4)}. En vista de los hechos anteriores, la determinación de metales pesados en cantidades traza (mg L^{-1}) se ha convertido en una necesidad para la solución de problemas ambientales. Sin embargo, se presentan dos dificultades principales para su determinación como son: las bajas concentraciones de los iones metálicos y los efectos de interferencia de matriz^{(2) (5)}. Por tal motivo, se hace necesario realizar procedimientos de pretratamiento de muestras selectivos y confiables que involucren preconcentración de los analitos en estudio y a su vez extracción de agentes interferentes⁽⁶⁾. Para este propósito se han empleado varios métodos entre los cuales se encuentran: extracción en fase sólida (SPE)⁽⁷⁾, extracción líquido-líquido⁽⁸⁾, métodos cromatográficos⁽⁹⁾, métodos de membrana⁽¹⁰⁾, electroforesis capilar⁽¹¹⁾, intercambio iónico⁽¹²⁾, punto de nube⁽¹³⁾, entre otros.

La SPE es considerada la técnica más favorable y la más comúnmente empleada debido a su simplicidad, tiempos de análisis cortos y altos factores de preconcentración. Es una técnica muy atractiva ya que no se necesita el uso de solventes orgánicos que puedan causar potenciales efectos tóxicos^{(2) (5)}. Además, en comparación con técnicas de extracción tradicionales la SPE permite obtener altos rendimientos analíticos, menos contaminación al ambiente y puede ser fácilmente automatizada a sistemas como los de flujo continuo^{(2) (14)}.

La necesidad del control analítico se ha incrementado cada vez más con el avance científico y tecnológico, siendo una de las tendencias más prometedoras en la actualidad, el poder remplazar la participación humana empleando métodos de análisis automatizados ⁽¹⁵⁾. Entre las alternativas se encuentran la utilización de métodos continuos los cuales se diferencian en la manera como transporten tanto los reactivos como las muestras, como por ejemplo los de análisis de flujo segmentado y los de análisis por inyección en flujo continuo (SFA y FIA por sus siglas en inglés) ⁽¹⁶⁾.

El nombre de la técnica de FIA apareció por primera vez en 1975 propuesto por Ruzicka y Hansen ⁽¹⁷⁾, cuyo sistema de flujo tiene entre sus ventajas fundamentales: la facilidad de su implementación, bajo consumo de muestras y reactivos, buena reproducibilidad y el aprovechamiento de sistemas de detección usados comúnmente en los laboratorios tales como espectrofotómetros, sistemas potenciométricos y amperométricos, equipos de absorción atómica entre otros ⁽¹⁶⁾. Recientemente los sistemas de inyección en flujo equipados con minicolumnas SPE empacadas con adsorbentes para la preconcentración en línea son la gran promesa para los análisis de rutina ya que con el empleo de los adsorbentes adecuados mejora significativamente la selectividad y sensibilidad en la determinación analítica de metales en cantidades trazas (mg L^{-1}) y ultra trazas ($\mu\text{g L}^{-1}$) en muestras con matrices complejas ⁽⁵⁾ ⁽¹⁴⁾. Entre los materiales de empaque para minicolumnas de preconcentración se han usado: resinas quelantes ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁸⁾, sílica gel ⁽¹⁹⁾, carbón activado ⁽²⁰⁾, RP-C18 ⁽²¹⁾, zeolitas ⁽²²⁾, entre otros, empleando como sistema de detección la espectroscopia de absorción atómica (EAA). También, se han empleado materiales como quitina y quitosano cuyas fuentes principales son las conchas de cangrejo y camarón, aunque también se encuentra en otras fuentes tales como biomasa fúngica, cutícula de insecto y pluma de calamar ⁽⁷⁾ ⁽²³⁾. El quitosano, es un poliaminosacárido obtenido por desacetilación de la quitina, la cual es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. El quitosano es biocompatible, biodegradable y no tóxico, contiene un alto porcentaje de grupos amino que favorecen su modificación, siendo estos los responsables de la captación de iones

metálicos por diferentes mecanismos como quelación, adsorción y atracción electrostática ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾. Las características de adsorción se deben a la estructura flexible del biopolímero que lo hace adoptar una configuración adecuada y su alta hidrofiliidad se debe a la presencia de grupos hidroxilo ⁽²⁴⁾. El quitosano es fácilmente soluble en soluciones ácidas por lo que ha sido necesaria la preparación de derivados que proporcionen su estabilidad química y preserven o mejoren su capacidad de adsorción ⁽²⁶⁾. En este sentido, se han desarrollado sistemas automatizados de pretratamiento de muestras incorporadas a minicolumnas empacadas con resinas sintetizadas a partir de quitosano para la preconcentración en línea de metales empleando como sistema de detección la espectroscopia de absorción atómica de llama EAA ⁽²⁴⁾.

En esta investigación se realizó la obtención del quitosano por desacetilación de la quitina, la cual fue obtenida a partir de las conchas de camarón provenientes de desechos industriales. La modificación química del quitosano mediante la formación de bases de Schiff y reacciones subsecuentes permitieron evaluar derivados funcionalizados de los cuales se seleccionó aquel que poseía las características de material adsorbente más adecuadas. Luego de tener el material adsorbente se procedió a construir un sistema FIA acoplado a un EAA según el diseño de Rondón y col ⁽²⁷⁾, constituido por una unidad de preconcentración representado por una minicolumna analítica elaborada en el Laboratorio y empacada con el quitosano modificado la cual fue colocada en el sistema FIA para la separación y preconcentración en línea de Plomo en muestras acuosas.

2. MARCO TEORICO

Este capítulo presenta la naturaleza del analito a determinar en diferentes matrices ambientales, describiendo el estado actual de los métodos de determinación para Pb. Se incluye además una breve introducción de los sistemas de flujo continuo, herramienta necesaria que mejora el tratamiento de las muestras permitiendo en muchos casos la automatización al ser acoplados a detectores espectrofotométricos.

2.1 Contaminación ambiental por metales pesados y tratamiento de muestras por extracción en fase sólida.

En sentido amplio la contaminación es definida como la introducción de agentes biológicos, químicos, o físicos a un medio al cual no pertenecen, o a las perturbaciones producidas sobre los seres vivos como resultado de una modificación o alteración no deseable de la composición natural del medio ⁽²⁸⁾. La contaminación ambiental puede generarse debido a manifestaciones naturales (fuentes naturales) o debido a las actividades diarias realizadas por el hombre (fuentes antropogénicas) necesarias para el desarrollo productivo ⁽²⁹⁾.

Uno de los principales problemas en la actualidad es la contaminación debido a la presencia de metales pesados, los cuales son liberados al ambiente por emisiones no controladas de industrias como: la fundición del metal, la minería, la metalurgia, petróleo, pinturas, fertilizantes, papelera, textiles, entre otras ⁽³⁰⁾. Los metales pesados debido a su alta solubilidad en ambientes acuáticos pueden ser adsorbidos por organismos acuáticos y se desplazan fácilmente de un lado a otro en el medio ambiente por su alta reactividad, acumulándose en plantas y animales de la zona, lo que puede resultar en enfermedades crónicas y daños a la población ^{(29) (31)}.

2.2 Metales pesados

Se denominan metales pesados aquellos que poseen densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 , excluyendo generalmente a los metales alcalinos y alcalinotérreos ⁽³²⁾ ⁽²⁸⁾. Estos elementos se pueden encontrar ampliamente distribuidos en el medio ambiente. En general, tienen pesos atómicos entre 63,546 y 299,59 g/mol ⁽³³⁾.

Algunos de estos metales son esenciales para la vida, tales como el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio y zinc. Sin embargo, cuando su concentración sobrepasa la óptima para los organismos se convierten en metales tóxicos. El cadmio, cromo, mercurio, plomo, arsénico y antimonio entre otros son muy tóxicos para el organismo aunque estén presentes en cantidades trazas ⁽²⁸⁾.

Los metales pesados que se encuentran en el ambiente pueden tener un origen natural o antrópico. Cuando se habla de origen natural, se entiende que no existe ninguna influencia del hombre, por lo que depende de la composición de la roca original y de los procesos de erosión y meteorización sufridos por la misma. En cambio cuando se habla de origen antrópico, se entiende que existió una intervención del hombre mediante actividades industriales, agricultura, ganadería, o simplemente por actividad urbana ⁽³³⁾.

La contaminación por metales pesados presenta tres particularidades que la hacen especialmente peligrosa: toxicidad, persistencia y bioacumulación, como cualquier otro la cual se desarrolla rápidamente después del contacto con una dosis elevada, o crónica por exposición a bajas dosis de forma repetida por cortos plazos ⁽³⁴⁾.

2.3 ANALITOS DE INTERÉS Y SUS PROPIEDADES.

2.3.1 ANALITOS

En las últimas décadas se han multiplicado cada vez más los trabajos de investigación en los cuales se determinan tasas elevadas de metales en aguas cuyas áreas han sido sometidas a una fuerte contaminación debida a la gran cantidad de actividades industriales que desarrolla el hombre ⁽³⁵⁾. En este sentido, se hacen más numerosos los estudios en aguas subterráneas y superficiales que ponen en manifiesto la presencia de elevadas concentraciones de metales como cobalto, cadmio, níquel, plomo entre otros ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾. Estos metales son ampliamente tóxicos y pueden causar grandes daños debido a la acumulación en el organismo, al ser alterados de su estado natural, pueden cambiar a formas que son mas fácilmente asimiladas en los intestinos por los seres humanos causando problemas de envenenamiento severo hasta la muerte ⁽³⁷⁾.

Con el fin de contribuir con el análisis de metales pesados en cantidades trazas en este trabajo se llevó a cabo la determinación de plomo en soluciones acuosas mediante en la técnica de análisis por inyección en flujo empleando preconcentración en línea acoplado a un detector de espectrometría de absorción atómica (EAA). El Plomo es un elemento de peso atómico 207,21 g/mol, se encuentra en el grupo 14 de la tabla periódica. Es un metal gris azulado, blando y pesado. Los minerales más ricos en plomo son la galena, la cerusita y la anglesita. El plomo puede ser utilizado como un metal puro, o combinado con otro metal para formar una aleación, o en la forma de un compuesto químico. El plomo se utiliza principalmente en las baterías para automóviles de plomo-ácido. Las aleaciones de plomo se encuentran típicamente en las municiones, tuberías, recubrimiento de cables, materiales, soldadura, protección contra la radiación, tubos plegables y en la construcción ⁽³⁸⁾. Por lo tanto, las aguas de desecho que provienen de estas industrias son las principales fuentes de plomo en el ambiente. Esta situación ha causado gran preocupación debido al los posibles efectos tóxicos que

causa en los humanos, ya que no es biodegradable y tiende a acumularse en los tejidos vivos causando varias enfermedades y desordenes en el sistema nervioso ⁽³⁶⁾. El Pb (II) se une a los grupos SH en enzimas o proteínas provocando la inhibición de las mismas. El plomo también puede afectar a los huesos, al interferir con los mecanismos metabólicos y homeostáticos, incluyendo la hormona paratiroidea, la calcitonina, vitamina D y otras hormonas que influyen en el metabolismo del Calcio D ⁽³⁸⁾. Según el decreto 883 el nivel máximo de plomo en aguas de uso domestico e industrial, así como para aguas de riego es de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ⁽³⁹⁾. En cuerpos de agua (ríos, estuarios, lagos y embalses) el nivel máximo de plomo es de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y en aguas de consumo el nivel máximo se encuentra entre $10\text{-}50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ⁽³⁹⁾. Para la OMS el valor de referencia de plomo en aguas de consumo es de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ⁽⁴⁰⁾. El envenenamiento leve puede causar anemia, dolor de cabeza y dolor muscular mientras que el envenenamiento agudo conduce a disfunciones en los riñones, sistema reproductivo, sistema cardiovascular, daño cerebral y del sistema nervioso central, hasta la muerte ⁽³⁶⁾ ⁽⁴¹⁾.

2.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Debido a la importancia de los efectos perjudiciales ocasionados por la presencia de metales pesados en el ambiente en cantidades trazas y ultra trazas y los grandes efectos de interferencia de matriz, ha sido necesario el desarrollo de técnicas de pretratamiento de muestras antes de su determinación⁽²⁹⁾. Por otro lado, muchos de los análisis de metales traza emplean sistemas de detección cuyos límites permisibles impiden detectar ciertos elementos, y para lograr una mejor sensibilidad y selectividad en el análisis es necesario pre-tratar las muestras⁽⁵⁾. Para este propósito varias metodologías de separación y/o enriquecimiento se han desarrollado para la determinación de metales pesados entre las cuales se pueden mencionar la preconcentración⁽⁵⁾, extracción⁽⁸⁾, intercambio iónico⁽¹²⁾, procesos de adsorción⁽³⁶⁾, digestión⁽⁴²⁾, entre otros.

La extracción en fase sólida es la técnica más comúnmente empleada para la preconcentración de muestras la cual consiste en hacer pasar una muestra problema a través de un cartucho o columna que contiene el sorbente sólido, reteniendo los analitos en los sitios activos del material. Después de la sorción de los analitos, estos son eluidos con un solvente adecuado para su recuperación⁽⁴³⁾. Como puede observarse, la SPE es una técnica confiable, rápida y precisa, en la cual tiene lugar un mecanismo que involucra intercambio iónico, adsorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo, estableciéndose un equilibrio entre la concentración del analito en la fase estacionaria y la fase móvil⁽⁴⁴⁾.

2.5 PRECONCENTRACIÓN

La tendencia a emplear menor cantidad de muestras y de buscar concentraciones cada vez más bajas ha obligado a introducir un paso llamado preconcentración el cual se basa en la separación no cromatográfica por extracción en fase sólida utilizando sorción en columna, el cual permite no solo incrementar la proporción de analito de interés en la muestra sino también la eliminación de los interferentes presentes en la matriz ⁽⁴⁵⁾. Las medidas empleadas en las técnicas de preconcentración son:

- El factor de preconcentración (FP), el cual se define como la relación entre la pendiente de la curva de calibración por medida directa del método convencional y la pendiente de la curva de calibración por el método propuesto.
- El factor de enriquecimiento, teóricamente se basa en una relación de concentraciones del analito en el concentrado y en la muestra de interés.

Los métodos de preconcentración se pueden emplear en línea (automatizados) y fuera de línea (batch). Según el mecanismo de retención la preconcentración se puede clasificar como: adsorción, intercambio iónico y quelación.

2.6. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

En el análisis por inyección en flujo, también conocido como FIA por sus siglas en inglés, la muestra se inyecta en una corriente portadora por la cual fluye reactivo ⁽⁴⁶⁾ (Ver Figura 1). La zona inyectada se desplaza en el sistema y la solución de muestra se mezcla con el reactivo formándose un producto en la interfaz entre la zona de muestra y el reactivo.

Posteriormente, un detector registra un determinado parámetro o respuesta instrumental a medida que el producto se forma y pasa a través de la celda de flujo ⁽¹⁷⁾, como se muestra en la Figura 2, donde podemos apreciar el gráfico conocido como fiagrama.

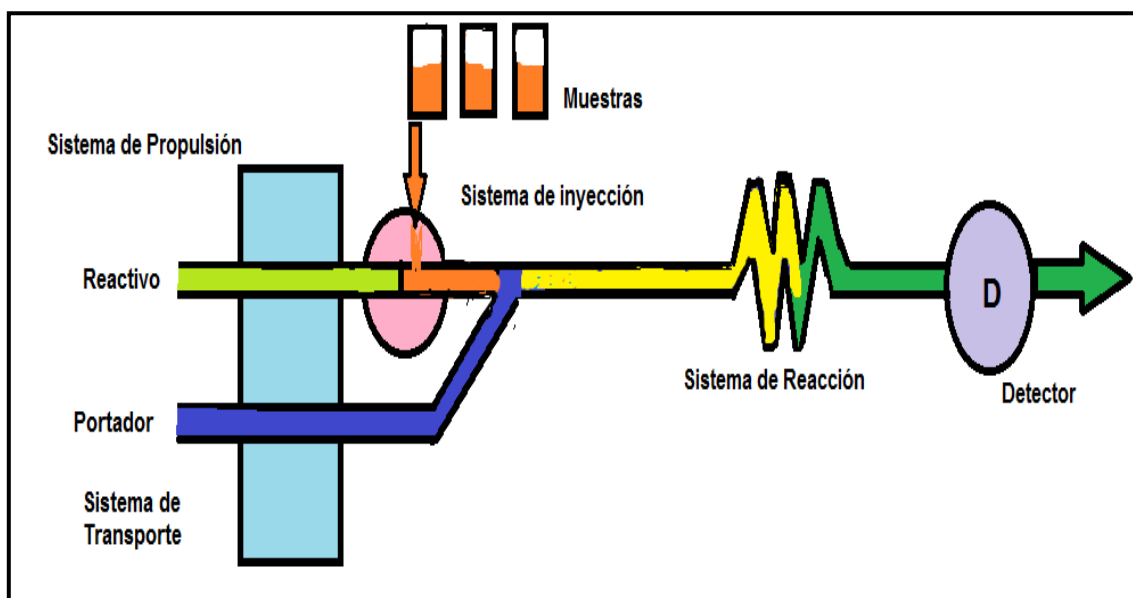


Figura 1. Esquema general de una configuración FIA.

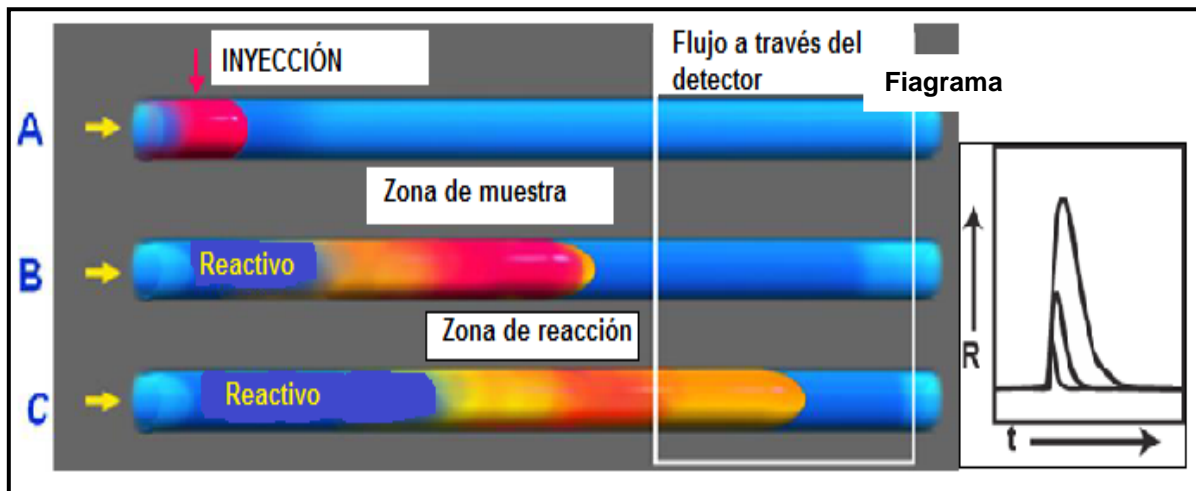


Figura 2. Movimiento de los flujos y formación de la respuesta instrumental dentro de un sistema FIA. R: respuesta instrumental, t: tiempo de elución.

En FIA los flujos son de régimen laminar y no turbulento, lo que proporciona algunas ventajas tales como: una zona de muestreo definida, caudales reducidos, poco consumo de reactivos, alta frecuencia de muestreo y reducción del peligro de mezcla de una muestra con la otra (contaminación cruzada) ⁽⁵⁾ ⁽⁴⁷⁾. Además, los métodos FIA tienen la capacidad de automatizar una amplia gama de ensayos en química húmeda mediante el empleo de una configuración experimental que permita tener un control total en la manipulación de la solución de muestra ⁽⁴⁷⁾.

Estas configuraciones de manera general están integradas por: una unidad de propulsión, un sistema de inyección de muestras, una unidad de reacción, una unidad de separación y un sistema de detección.

2.7. PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA Y ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO.

El principio de la técnica de preconcentración en línea se basa en hacer pasar una solución de muestra a través de una columna empacada con un material que contiene grupos funcionales activos, separando así la matriz de la muestra y reteniendo los analitos en columna ⁽⁴⁸⁾ ⁽²⁷⁾. Cada etapa de muestreo consiste en dos operaciones: preconcentración y elución. Inicialmente la muestra y/o reactivos son propulsados hacia una válvula de 6 puertos, la cual se encarga de inyectar un volumen definido de esta mezcla y luego por medio de la propulsión con la bomba peristáltica, esta mezcla es llevada hacia la columna. Luego al girar la válvula de inyección, se cambian las posiciones para dar paso, por otro canal, a que un pequeño volumen de reactivo eluyente sea inyectado a la columna, liberando al analito preconcentrado al detector ⁽⁴⁹⁾. En la Figura 3 se muestran las válvulas de seis puertos empleadas en FIA durante la etapa de carga e inyección.

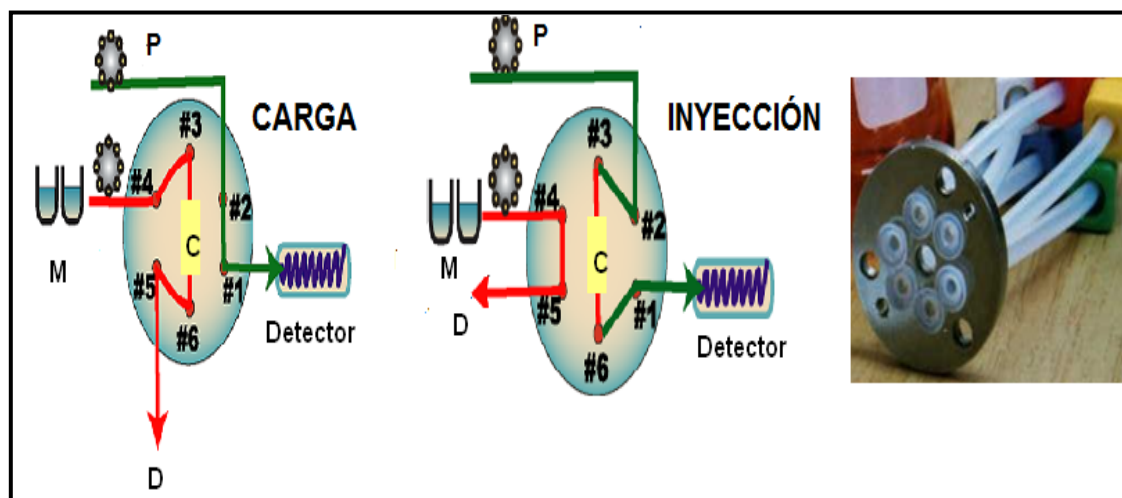


Figura 3. Válvulas de inyección rotatorias de seis puertos en la etapa de Carga e Inyección. P: portador, M: muestra, D: desecho, C: columna

Durante el proceso de inyección de la muestra y su viaje a través de la corriente de flujo portadora hasta el detector, el analito y el reactivo se entremezclan para generar un producto detectable y a su vez se produce una dilución de la muestra ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵⁰⁾. Este proceso se conoce como “dispersión” y se puede definir como la dilución que sufre un volumen de muestra inyectada en un determinado sistema de análisis en flujo antes de que esta se retenga en la columna y se lleve a cabo el posterior paso de desorción y elución ⁽⁵¹⁾. Debido a que en FIA el régimen de flujo es laminar se produce una zona bien definida de la muestra inyectada produciéndose un gradiente de concentraciones a lo largo de la misma, (Figura 4) y al tratarse de un sistema continuo se produce una señal transitoria cuyo máximo corresponde al punto de muestra menos diluido ⁽⁵²⁾. Debido a esto, no se logra alcanzar el equilibrio químico, sin embargo, el gradiente transitorio es reproducible en el tiempo, permitiendo tener una medida analítica relacionada con la concentración de la muestra a diferentes tiempos de elución conocido como Diagrama ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵²⁾.

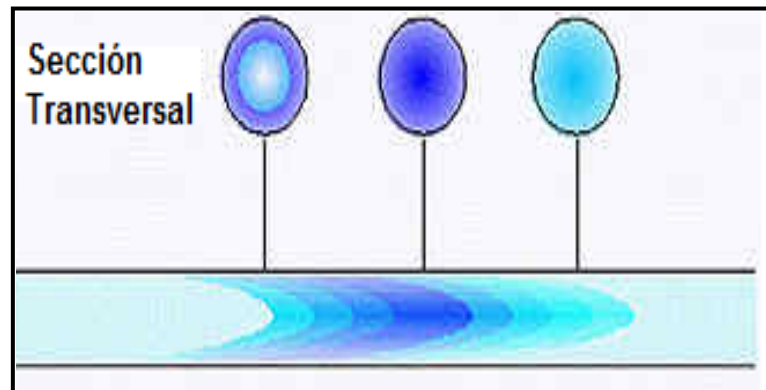


Figura 4. Dispersión de la muestra poco después de la inyección.

La tendencia de las metodologías por análisis por inyección en flujo es disminuir las etapas de pretratamiento de muestras y miniaturizar estas metodologías de forma automatizada para disminuir los errores por manipulación y aumentar la precisión de los resultados, debido a que se pueden realizar varios análisis de una misma muestra en tiempos más cortos por lo que disminuye el consumo de reactivos y la generación de desechos, lo que es una clave para mejorar el control de calidad de los métodos analíticos⁽⁵²⁾.

2.8 SISTEMAS FIA CON PRECONCENTRACIÓN ACOPLADOS A MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.

La combinación de esta técnica ha adquirido una gran importancia debido a su fácil implementación y los buenos resultados que se pueden obtener⁽⁵³⁾. Como se ha explicado en apartados anteriores, los sistemas de inyección en flujo permiten la introducción de muestras y/o reactivos de forma continúa. Por tanto se hace necesario un detector que posea algunas características tales como: consumo de pequeños volúmenes, bajo ruido, señal independiente del caudal, sensibilidad y una respuesta rápida y lineal en un amplio rango de concentraciones⁽⁵⁴⁾.

En la Tabla 2, se muestran algunos sistemas de preconcentración en línea de elementos traza y su determinación por diferentes métodos espectroscópicos.

Tabla 2. Sistemas de preconcentración en línea de elementos traza y su determinación por diferentes técnicas espectroscópicas.

Elementos	Matriz	Adsorbente	FP	Eluente	FM/h	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Detección	Ref.
Ni	Aguas naturales	C-18 con NADDC	20	Etanol	22	0,036	EAAET	(55)
	Alimentos	Amberlita XAD-2 con BTAC	31	HCl	48	1,1	EAA	(56)
	Aguas de mar	C-18	80	Metanol	30	1,0	EAA	(57)
Co	Aguas	Espuma poliuretana con TAC	—	HCl	24	3,2	EAA	(58)
	Agua de mar	C-18 con 5,7 dicloroxina	80	Metanol	30	1,0	EAA	(59)
	Aleación de acero, mejillón, hojas de tomate certificadas.	C-18-silice con NN	17	Etanol acidificado	90	3,2	EAA	(60)
	Muestras biológicas	Reactor anudado con Ditizona	52	MIBK	19	1,1	EAA	(61)
Pb	Muestras vegetales biológicas certificadas	C-18-silice con DDTC	60-189	MIBK	24	3,2	EAA	(62)
	Soluciones estándar	C-18-silice con DDTP	<1000	Etanol	—	0,3-3,0	EAA	(63)

NaDDC: dietilamonio dietilditiocarbamato de sodio, **BTAC:** 2-(2-benzotiazolilazo)-2-p-cresol, **TAC:** (2-(2-tiazolilazo)-p-cresol), **NN:** 1-nitroso-2-naftol, **DDTC:** dietilditiocarbamato, **EAAET:** Espectroscopia de Absorción Atómica Electrotérmica.

2.9 Quitina y Quitosano

El quitosano es un polisacárido que se obtiene por desacetilación de la quitina. La quitina es el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa^{(25) (36)}. La quitina está compuesta por unidades de N-acetilglucosamina conectadas entre sí mediante enlaces β (1,4) (Figura 5), y dependiendo de su fuente de extracción se presenta principalmente en dos formas polimórficas: α -quitina proveniente de los camarones y conchas de cangrejo, la cual se refiere a la disposición anti paralela a las cadenas adyacentes y la β -quitina proveniente mayormente de la pluma de calamar con disposición paralela^{(64) (65)}. La quitina es blanca, dura, inelástica e insoluble en la mayoría de los solventes más comunes. Por ser un adsorbente de bajo costo abundante y disponible en la naturaleza, el quitosano y sus derivados han recibido gran atención en la aplicación para la adsorción de iones metálicos debido a la alta relación de grupos hidroxilo y amino en su estructura⁽³⁶⁾. Estas propiedades de sorción se han empleado ampliamente con fines ambientales, para procesos de separación, remoción de metales tóxicos y como una etapa de preconcentración antes de usar el análisis espectrofotométrico o espectroscópico convencional⁽²⁵⁾.

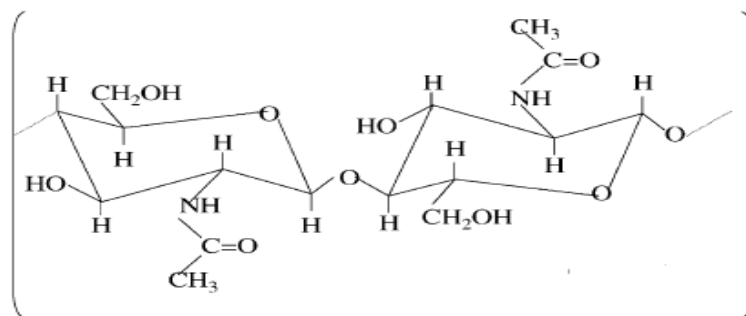


Figura 5. Estructura de la quitina.

Por su parte, el quitosano (Figura 6), no es nativo de fuentes animales pero se encuentra como componente estructural de un pequeño número de hongos como *Mucor*, especies de *Absidia* y *Rhizopus* ⁽⁶⁶⁾. Está constituido por unidades de N-glucosamina es insoluble en agua, pero es soluble en soluciones acidas diluidas debido a la protonación de los grupos amino presentes en su estructura a pH 6,5. El quitosano puede ser definido como una quitina lo suficientemente desacetilada en forma de sales de amina solubles cuyo grado de desacetilación está entre 80-85 % o más para ser considerada soluble ⁽⁶⁷⁾.

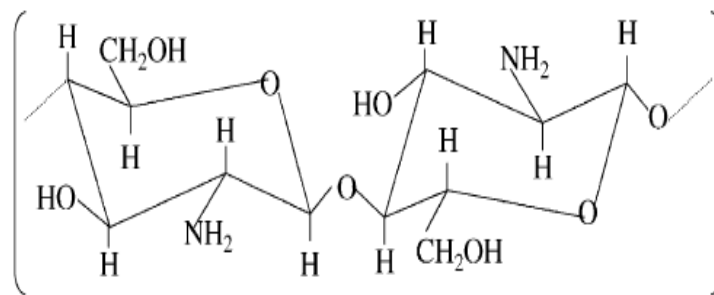


Figura 6. Estructura del quitosano.

En la Figura 7, se puede observar de manera esquemática el proceso de obtención de quitina y quitosano a partir de conchas de crustáceos. El primer paso es una desmineralización para eliminar el carbonato de calcio, la cual se realiza con una solución diluida de HCl entre $0,2-2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, luego una desproteización en caliente con NaOH diluido alrededor de $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, y una decoloración para la remoción de pigmentos que se realiza con etanol, acetona o peróxido de hidrógeno ⁽⁶⁸⁾. Una vez obtenida la α -quitina, el quitosano se puede obtener empleando el método de desacetilación de Kurita ⁽⁶⁹⁾, el cual permite obtener un quitosano con un mayor grado de desacetilación. En este método se puede emplear NaOH concentrado entre 40-50

%, a una temperatura entre 80-100 °C en un tiempo de 6-12 horas. Después del tratamiento con NaOH bajo condiciones dadas se lavan las muestras con agua destilada hasta llegar a pH neutro, y el residuo se lava con metanol y acetona. Para prevenir la degradación del polímero durante la desacetilación se han empleado NaBH_4 y tiofenol como reactivos en proporción 1:1 con la α -quitina⁽⁶⁵⁾.

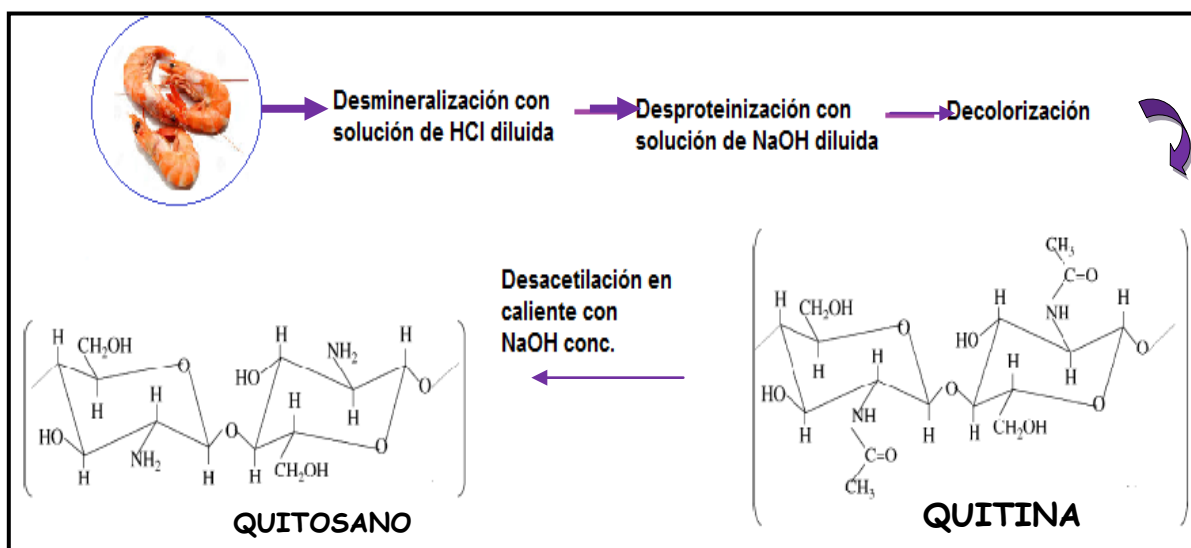


Figura 7. Esquema de obtención de quitina y quitosano a partir de conchas de crustáceos.

Los polisacáridos como quitina y quitosano son caracterizados por ser ampliamente bioactivos⁽⁷⁰⁾. El potencial de aplicación del quitosano es multidimensional, siendo empleado en diferentes áreas como: la industria alimenticia (preservativo y aditivo), la agricultura (fertilizantes), tratamiento de aguas (remoción de metales tóxicos), la industria del papel y cosméticos, entre otros⁽⁶⁵⁾. De la misma manera, los polímeros modificados de quitosano al igual que sus precursores pueden tener propiedades biológicas y químicas muy atractivas tales como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, atoxicidad, alta reactividad química, capacidad de adsorción y quelación, entre otras⁽⁷¹⁾.

Los principales parámetros para la caracterización del quitosano son la fracción de desacetilación, el peso del polímero y la cristalinidad los cuales pueden influir considerablemente en sus propiedades fisicoquímicas. Los grupos amino presentes en la estructura del quitosano pueden reaccionar fácilmente con cationes metálicos mediante mecanismos de quelación debido al par de electrones libres disponibles en el nitrógeno, o por atracción electrostática por la protonación de estos grupos amino en soluciones ácidas ⁽²⁵⁾. El quitosano es un polímero lineal que debido a la presencia de estos grupos reactivos puede ser fácilmente modificado química o físicamente para obtener derivados mediante distintos procesos que pueden ser empleados para tener un control sobre la reactividad del polímero o mejorar la cinética de sorción ⁽¹⁴⁾.

2.9.1 Factores que afectan la calidad y las propiedades de adsorción del Quitosano.

A continuación se describen los parámetros que controlan las propiedades fisicoquímicas de la quitina y el quitosano como lo son el peso molecular, el grado de desacetilación y la cristalinidad.

2.9.1.1 Cristalinidad y propiedades de hinchamiento.

En estado sólido el quitosano puede formar hojuelas, películas, fibras, polvo entre otras. Las propiedades del quitosano en este estado dependen del origen del material, método de procesamiento y obtención, grado de desacetilación y distribución de masas moleculares. La estructura cristalográfica del quitosano está necesariamente relacionada con la organización cristalina de la quitina y se presenta principalmente en las formas la α -quitina y β -quitina ⁽⁷²⁾.

La cristalinidad es un parámetro que controla la disponibilidad de los grupos amino y controla las propiedades de difusión y accesibilidad a los sitios internos de adsorción. Las proyecciones de la estructura cristalina de la α -quitina y la β -quitina se muestran en las Figuras 8 y 9 respectivamente ⁽⁷³⁾.

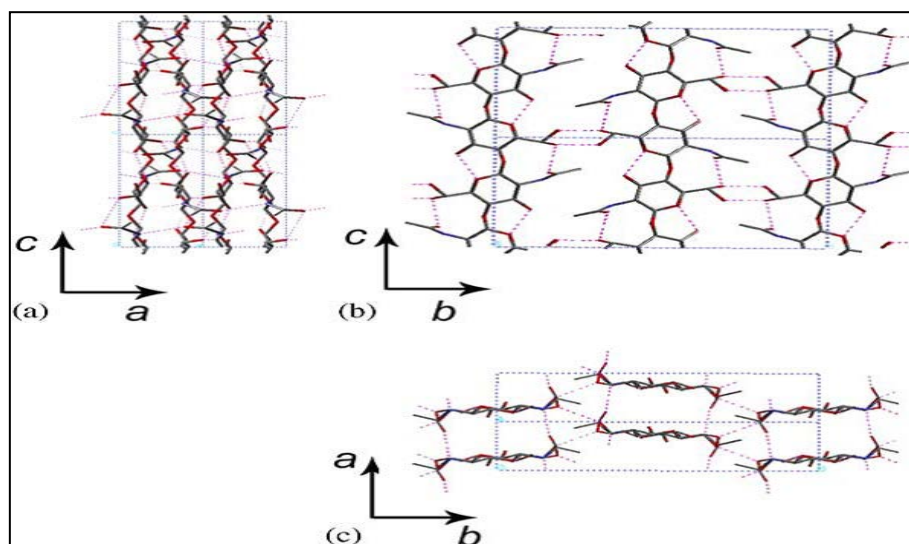


Figura 8. Estructura α -quitina ⁽⁷³⁾.

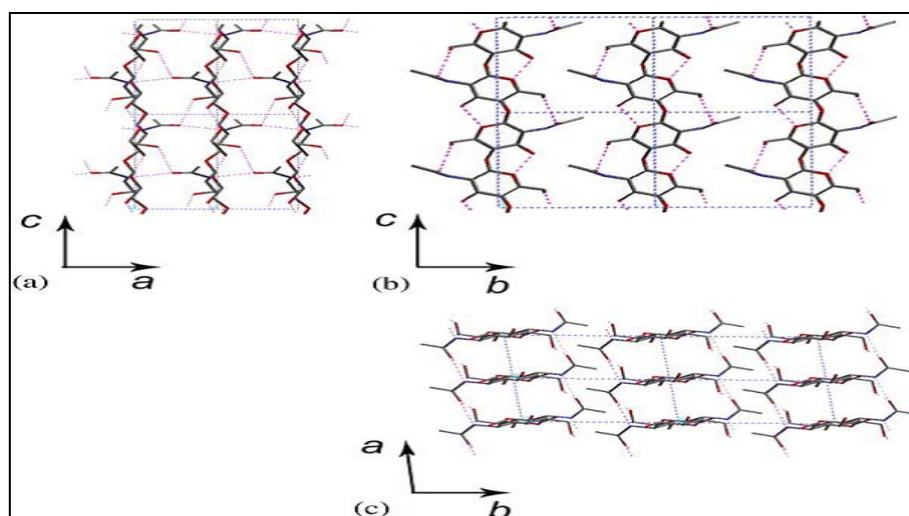


Figura 9. Estructura β -quitina ⁽⁷³⁾.

Las modificaciones químicas que se realizan en el quitosano también influyen en la cristalinidad, por ejemplo bajos niveles de entrecruzamiento incrementan la capacidad de adsorción y disminuyen el grado de sustitución por nuevos grupos en el polímero, debido a que impide que se creen cadenas que estén dispuestas muy juntas disminuyendo a su vez la capacidad de hinchamiento⁽⁷⁴⁾. El acceso a los sitios de adsorción incrementa con el carácter hidrófobo. En otros estudios se determinó que cuando el polímero es empleado en forma de perlas de gel el tratamiento de entrecruzamiento afecta la eficiencia de adsorción⁽²⁵⁾.

La cristalinidad puede ser determinada por difracción de rayos X, pero se puede obtener una buena estimación empleando FT-IR para muestras de quitina⁽⁷⁵⁾.

2.9.1.2 Peso molecular

Una característica importante que hay que tener en consideración para estos polímeros es el peso molecular y su distribución, ya que, una de las dificultades que se encuentra es la solubilidad de las muestras y la disociación de los agregados presentes en las soluciones del polisacárido⁽⁷⁶⁾.

El peso molecular de una muestra de quitosano es un promedio sobre el conjunto de distribuciones de pesos moleculares, esto puede deberse principalmente a que por tratarse de un polisacárido este no se codifica en el ADN del organismo pero es sintetizado a partir de enzimas polimerasa y durante el proceso de extracción puede sufrir depolimerización⁽⁷⁷⁾. La distribución del peso molecular en el quitosano afecta tanto las propiedades físicas como las químicas, y es un factor determinante en la solubilidad y viscosidad del mismo.

Existen diversas formas para su determinación tanto en quitina como en quitosano, entre los cuales se encuentran: viscosimetría, cromatografía de permeabilidad en gel y dispersión de luz⁽⁷⁸⁾. Sin embargo, determinar el peso molecular de estos polisacáridos de forma precisa resulta muy difícil debido al amplio rango de distribución del peso molecular, la diversidad estructural y las fuertes interacciones intermoleculares presentes en el polímero. Esta propiedad, también afecta su funcionalidad para ser empleado como espesante, regulador de de viscosidad, antifúngico, entre otros^{(78) (79)}.

2.9.1.3 Grado de desacetilación

El grado de desacetilación (GD) representa el contenido de grupos amino libres presente en la estructura del quitosano. De hecho, el quitosano se considera una quitina desacetilada en un 60-75 % o más, punto en el cual se vuelve soluble en ácidos orgánicos. Es un índice de mucha importancia que además, se encuentra directamente relacionado con su viscosidad, habilidad de intercambio iónico, floculabilidad, entre otros. Se puede definir como la relación de porciones de quitosano sin grupos acetilo de todas las porciones de quitosano presentes⁽⁷⁹⁾.

En la actualidad se han empleado diversos métodos para la medición del grado de desacetilación del quitosano tales como: titulación alcalimétrica, espectrometría infrarroja, índice de refracción, titración con análisis térmico, espectrometría UV- visible entre otros. El más común es el método de titración ácido- base seguido por la espectroscopia infrarroja en donde el GD puede ser medido por el pico de absorción de grupos característicos en el quitosano⁽²⁵⁾.

3. Quitosano y sus modificaciones

El quitosano debido a su alta solubilidad en soluciones ácidas se dice que posee un 60 % de grado de desacetilación ⁽²⁵⁾. En condiciones óptimas se puede obtener un quitosano que posea entre un 90-95 % de grado de desacetilación ⁽⁸⁰⁾. Además, debido a sus propiedades mecánicas y de hinchamiento no es un material adecuado para ser usado en SPE. Sin embargo, se puede hacer reaccionar mediante los grupos aminos libres para obtener materiales que cumplan con las condiciones necesarias. Para ello se realizan modificaciones tanto físicas como químicas a fin de mejorar sus propiedades de sorción ⁽²⁾.

3.1 Modificaciones físicas del Quitosano: El quitosano por su versatilidad puede ser fácilmente modificado físicamente mediante la preparación del polímero en diferentes formas ⁽²⁵⁾. La eficiencia de adsorción depende principalmente de algunas propiedades fisicoquímicas como la porosidad, el área superficial y el tamaño de partícula. El quitosano posee un área específica baja entre 2-30 m² ·g⁻¹ y debido a que sus partículas son muy pequeñas se ha demostrado que presentan limitaciones hidrodinámicas y causan obstrucción en los sistemas de columna ⁽²⁵⁾ ⁽⁶⁶⁾. El uso de perlas de gel mejora considerablemente la capacidad de adsorción. La porosidad y las características relacionadas pueden ser manipuladas usando separación de fase criogénica, por la inclusión de hidrocarburos como nonanilcloruro para disminuir el efecto hidrofóbico y empleando el injerto de compuestos que contienen grupos funcionales del quitosano ⁽⁶⁷⁾.

3.2 Modificaciones químicas del Quitosano: Las modificaciones químicas del quitosano son interesantes debido a que no producen cambios en el esqueleto fundamental del polímero sino más bien generan propiedades nuevas y mejoradas ⁽⁸⁰⁾. Estas modificaciones tienen dos objetivos principales: la mejora de las propiedades de adsorción y la prevención de la disolución del polímero en soluciones

ácidas ⁽²⁵⁾. Para ello se han implementado diversos procesos de reticulación usando diferentes agentes como EDGE (etilenglicoldiglicidileter), reactivos de epiclorhidrina, glutaraldehído y reacciones de base de Schiff. También, se ha utilizado el proceso de incorporación de grupos funcionales con el objetivo de mejorar la capacidad de adsorción de metales. Las sustituciones involucran las reacciones químicas del grupo amino en el C-2 y del grupo hidroxilo en el C-3 ⁽²⁵⁾.

La modificación de biopolímeros como el quitosano ofrece un gran número de posibilidades ya que a través de reacciones químicas como reticulación y reacciones de injerto de moléculas se pueden obtener macromoléculas superestructurales, como: hidrogeles, resinas poliméricas, membranas, fibras o materiales compuestos, cuyos materiales, pueden ser empleados como adsorbentes ⁽⁸¹⁾.

3.2.1 -Entrecruzamiento del Quitosano

La reticulación (o entrecruzamiento) se lleva a cabo cuando un agente entrecruzante introduce puentes intermoleculares y/o enlaces cruzados entre las macromoléculas del polisacárido. El agente entrecruzante puede reaccionar con macromoléculas de cadena lineal o ramificadas (reticulación/entrecruzamiento) y/o consigo mismo (polimerización), dependiendo de su naturaleza y las condiciones de reacción.

El proceso de entrecruzamiento disminuye drásticamente la movilidad de los segmentos en el polímero, si el grado de entrecruzamiento es suficientemente alto el polímero disminuye la capacidad de absorción del agua (hinchamiento). Los dos factores más importantes que controlan la medida de las propiedades de adsorción de materiales, a base de polisacáridos, son la hidrofiliidad del polímero y la densidad de reticulación. Cuando el grado de entrecruzamiento es alto, el material es poco cristalino ^{(82) (83)}.

3.2.2 -Modificación del Quitosano de tipo Bases de Schiff.

La reacción de formación de una base de Schiff ocurre debido a que el grupo amino del quitosano puede atacar al carbono carbonílico activo de un aldehído. Esta reacción es catalizada en presencia de ácidos y se obtiene como un grupo imino ($R-HC=N-$). Las iminas más estables se forman cuando se utiliza un aldehído aromático o una arilamina; en cambio, las iminas no sustituidas son inestables y polimerizan cuando se dejan en reposo⁽⁸⁴⁾. Esta constituye una reacción de adición-eliminación la cual depende del pH, debido a que la primera etapa es la adición de la amina libre al grupo carbonilo, la cual no debe estar protonada porque pierde su nucleofilidad, mientras que en la segunda etapa se elimina el OH como agua, esta etapa se favorece al aumentar la concentración de ácido. Se puede obtener un pH óptimo (entre 4-5) donde la velocidad de la reacción es máxima, manteniendo la cantidad de ácido suficiente para que la amina este parcialmente protonada y los grupos NH_2 disponibles inicien la adición nucleofílica⁽⁸⁵⁾.

La introducción de grupos funcionales en la matriz del quitosano mejoran la capacidad de interaccionar con iones metálicos por formación de complejos, por lo cual, la modificación del quitosano para generar bases de Schiff proporciona un material potencialmente acomplejante de especies metálicas, así como, para ser empleados en otras aplicaciones analíticas y ambientales^{(86) (70)}.

A continuación se presentan algunos trabajos de investigación en los cuales se han realizado modificaciones químicas al quitosano con diferentes aldehídos aromáticos a fin de proveer la obtención de nuevos materiales biodegradables que puedan ser amigables con el ambiente.

Dos Santos y col. ⁽⁸⁶⁾, realizaron la síntesis y caracterización de bases de Schiff de quitosano y derivados del salicilaldehído. Para ello se partió de un quitosano purificado el cual se disolvió en una solución de ácido acético $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se colocó en agitación por 6 horas. Luego el salicilaldehído y sus derivados 5-Bromo, 5-Cloro, 5-Nitro y 5-Metoxi disueltos en metanol (2:1, v/v) fueron añadidos resultando una solución viscosa la cual se agito por 16 horas. La formación de un gel amarillo oscuro indico la formación de la base de Schiff en la matriz del quitosano. Este gel se concentró en un rota vapor bajo vacio y se lavo con etanol varias veces, filtrándolo y secándolo a temperatura ambiente y en una horno al vacio a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 horas.

Simionatto y col. ⁽⁸⁷⁾, estudiaron la influencia de algunos parámetros de reacción como: relación molar, tiempo y temperatura en el grado de sustitución de bases de Schiff biopoliméricas obtenidas a partir de quitosano y salicilaldehído. Para ello las bases de Schiff se prepararon disolviendo 400 mg de quitosano previamente purificado con 25 mL de ácido acético $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Luego de reaccionar por 12 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, se añadió la cantidad deseada de salicilaldehído disuelto en 10 mL de etanol a la solución de quitosano y se evaluaron diferentes condiciones de reacción. El gel amarillo oscuro que se obtiene revela la formación de la base de Schiff en la matriz biopolimérica del quitosano y este gel fue colectado por filtración y lavado varias veces con etanol para remover el exceso de aldehído y secado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a presión reducida y colocado posteriormente en un desecador.

Wang y col. ⁽⁸⁸⁾, realizaron la preparación de un p-aminobenzoilo quitosano mediante la esterificación de una base de Schiff de quitosano con benzaldehído y estudiaron sus propiedades antibacterianas. Inicialmente prepararon la base de Schiff disolviendo el quitosano en una solución de ácido acético al 1% (m/m), posteriormente se le añadió 20 ml de benzaldehído disuelto en etanol colocándolo a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, con agitación por 5 horas, luego realizaron lavados con etanol varias veces y lo colocaron a secar a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24

h. Por otro lado, se empleó cloruro de p-amino benzoilo para la esterificación de esta base de Schiff el cual fue obtenido a partir del ácido p-amino benzoico y su respectiva reacción con cloruro de tionilo. La base de Schiff con benzaldehído se disolvió en una mezcla de éter y piridina y se hizo reaccionar con el p-aminobenzoilo obteniendo el derivado esterificado.

Singh y col. ⁽⁸⁹⁾, realizaron la síntesis en dos pasos de dos bases de Schiff de quitosano aciladas y evaluaron la aplicación de estos derivados como aditivos biolubricantes multifuncionales. Para ello, en un primer paso prepararon la base de Schiff de quitosano con 3,5-terbutil-4-hidroxi-benzaldehido disolviendo el quitosano con una mezcla de metanol y ácido acético diluido, posteriormente el aldehído disuelto en metanol se añadió gota a gota y con agitación, colocándolo en reflujo por 10 horas. El producto obtenido se seco a 50 °C al vacío. Luego una cantidad de la base de Schiff obtenida se colocó en un balón con 10 mL de dimetilacetamida a 80 °C por 30 min dejando enfriar luego hasta 50 °C. Posteriormente se añadió cloruro de lauroilo en dos proporciones diferentes (a fin de obtener dos derivados distintos) previamente disueltos en dimetilaminopiridina gota a gota a la mezcla de reacción incrementando gradualmente la temperatura hasta 90 °C con agitación por 3 horas. El producto filtrado y lavado con NaHCO_3 0,2 mol·L⁻¹ se dejó secar a 60 °C toda la noche.

3.3 Caracterización espectroscópica del Quitosano y sus derivados.

Para la quitina y el quitosano es importante la determinación de su estructura química debido a que poseen un gran número de actividades fisicoquímicas, biológicas y mecánicas que están íntimamente relacionadas con el grado de acetilación ⁽⁷³⁾. De esta manera, la caracterización espectroscópica por FT-IR (Infrarrojo con Transformada de

Fourier) constituye una técnica rápida para la evaluación cualitativa del grado de acetilación por relación entre las bandas de absorción ⁽⁹⁰⁾.

El método empleado para cuantificar el grado de desacetilación es el reportado por Brugnerotto y col. ⁽⁹¹⁾, cuyo método consiste en la medición de las áreas en absorbancia que aparecen en los espectros FT-IR. En estos análisis se debe emplear transmisión con pastillas de KBr a fin de obtener la mejor resolución. Para este análisis, se realizó una curva de calibración empleando áreas de las bandas de absorción de 1420 cm^{-1} (A_{1420} , grupos C-H) y 1320 cm^{-1} (A_{1320} , grupos amida III), y la relación entre ellas A_{1320}/A_{1420} . La ecuación obtenida se muestra a continuación:

$$A_{1320}/A_{1420} = 0,3822 + 0,03133DA$$

Donde DA es el grado de acetilación.

Del mismo modo, existen dos unidades repetitivas en el quitosano, en cada unidad existen seis carbonos (C1-C6), ubicados en la unidad N-acetilglucosamina (GluNAc) y N-glucopiranososa (GluNH₂). Además, cada unidad del polímero tiene cuatro átomos de hidrógeno que están unidos con cuatro átomos de oxígeno formando grupos del tipo O-H. Cada uno de estos enlaces ubicados en las unidades repetitivas poseen características propias que se modifican en diferentes ambientes químicos proporcionando distintos desplazamientos químicos en Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^{(86) (92)}.

Así mismo, el grado de acetilación puede ser determinado mediante RMN H¹ empleando la relación entre la señal del protón del grupo metilo en las unidades de 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan (A_{CH_3}) y el protón del C-2 en las unidades de 2-amino-2-deoxy-D-glucopiranososa (A_{H-2}), según la ecuación:

$$DA = (A_{CH_3} / 3 A_{H-2}) * 100 \text{ }^{(87)}$$

3.4 Quitosano modificado empleado para preconcentración en línea

Las resinas de quitosano modificado se han empleado recientemente para la separación, preconcentración y recuperación de metales en química analítica. Para ello, se han utilizado agentes acomplejantes a fin de mejorar las capacidades de sorción del material. El desarrollo de estas resinas quelantes para preconcentración en columna utilizando extracción en fase sólida y la combinación con técnicas de inyección en flujo constituyen una alternativa para la determinación de metales en niveles trazas y ultra trazas usando sistemas de detección espectroscópicos.

A continuación se muestran algunos trabajos de investigación en los cuales se han realizado modificaciones químicas al quitosano a fin de evaluar su capacidad de adsorción de iones metálicos y otros elementos.

Hosoba y col. ⁽²⁶⁾, sintetizaron una novedosa resina de quitosano reticulado funcionalizado con histidina para la preconcentración de trazas de plata en muestras acuosas. En primer lugar colocaron 5 g del quitosano reticulado con EDGE en una mezcla de agua ultra pura y etanol (50:50), a la cual también le añadieron clorometiloxirano como brazo espaciador y la mezcla la colocaron en reflujo por 3 horas. El producto obtenido fue filtrado y lavado tres veces con agua y etanol. Luego el producto y 10 g de L-histidina fueron suspendidos en una mezcla de dioxano y NaOH 2 mol·L⁻¹, colocándose en reflujo por 6 horas. El producto final fue filtrado y lavado con agua y etanol tres veces. A una cantidad de la resina húmeda le añadieron ácido nítrico 2 mol·L⁻¹ para remover cualquier impureza metálica, con agitación por 6 horas a baja velocidad. Finalmente el producto fue filtrado y lavado con agua ultra pura. Esta resina sintetizada fue empacada en minicolumnas (2mm d.i. x 40mm longitud) para ser empleada en un sistema triple de pretratamiento automático acoplado a un detector de espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES por

sus siglas en inglés). El factor de enriquecimiento para 20 mL de muestra fue de 73 %. La curva de calibración fue lineal para Ag (I) a niveles de concentración de sub-ppb obteniendo un coeficiente de correlación de 0,999 con un límite de detección (LD) de $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (en comparación con el obtenido por medida directa del ICP-AES $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La frecuencia de muestreo fue de 18 muestras h^{-1} , usando 5 mL de solución de muestra. Además, los autores mostraron que el material tiene una buena adsorción de plata en regiones de pH entre 5-9.

Sabarudin y col. ⁽⁹³⁾, modificaron químicamente un quitosano reticulado con 2-propanolamina a través de un brazo de clorometiloxirano para ser empleada en una columna para SPE para la adsorción de algunos elementos. Inicialmente los autores sintetizaron el quitosano reticulado con el brazo de clorometiloxirano, luego el producto obtenido fue suspendido en dioxano con 2-propanolamina (DPA). A esta suspensión se le añadió NaOH $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y colocado en reflujo por 3 horas a fin de acoplar el grupo amino de la DPA con el cloro terminal del quitosano modificado con clorometiloxirano. El producto final fue filtrado empleando un filtro de vidrio y lavado con tres porciones pequeñas de agua y etanol. La resina obtenida por los autores fue agitada por 6 horas con ácido nítrico $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para remover cualquier impureza metálica y posteriormente lavado con agua ultra pura. Ellos observaron que la resina mostró una excelente capacidad de adsorción para germanio entre pH 6-9, demostrando su aplicabilidad para la separación y preconcentración de germanio en muestras ambientales.

Dai y col. ⁽⁷⁾, sintetizaron una nueva base de Schiff de quitosano (S-CS) con nanotubos de carbono de pared múltiple injertados (S-CS-MWCNTs) para ser empleado como adsorbente para la preconcentración y determinación de metales pesados en muestras ambientales y biológicas y detección por ICP-MS. Para ello, disolvieron 1000 mg de quitosano obtenido mediante procedimientos previos en 80 mL de ácido acético al 0,2 % (p/p), La solución se dejó reposar durante la noche, y luego le añadieron lentamente

4 ml de 4-metilbenzaldehído en metanol (2:1, v/v). Después de agitar durante 24 h a temperatura ambiente, la mezcla resultante fue lavada con etanol varias veces, filtrada y secada en un horno de vacío a 40 °C durante 8 h. El polvo amarillo obtenido fue de S-CS. Luego prepararon un cloruro de acilo modificado con los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs-COCl) y mezclaron 50 mg de este con 400 mg de la base de Schiff de quitosano (S-CS) en 30 mL de dimetilformamida. Una vez obtenido el adsorbente modificado, optimizaron las variables de las cuales depende la preconcentración tales como pH, flujo de muestra, concentración y volumen de eluente. Bajo las condiciones óptimas empleando una minicolumna empacada con 40 mg de material adsorbente los factores de enriquecimiento obtenidos para V (V), Cr (VI), Cu (II), As (V), y Pb (II) alcanzaron 111, 95, 60, 52, y 128, respectivamente, y los límites de detección oscilaron entre 1,3 y 3,8 ng·L⁻¹. El método desarrollado fue aplicado con éxito para la determinación de iones de metales traza en el arenque, la espinaca, agua de río, y agua del grifo con buenas recuperaciones que variaron entre 91% y 105%.

Carletto y col. ⁽¹⁴⁾, mediante una reacción de diazotación realizaron la modificación química del quitosano con 8-Hidroxiquinolina (8-HQ) para ser empleado como resina quelante en una micro columna para la preconcentración en línea de Zn (II) y su determinación en muestras acuosas. Para ello, prepararon una muestra de solución gelatinosa de quitosano al 5% (m/v) mediante la gelificación de quitosano comercial en polvo en una solución al 5% (m/v) de ácido acético. Después de completarse la mezcla, precipitaron la solución gelatinosa con una solución de NH₃ 20% (v/v), usando una bomba peristáltica para gotear la suspensión coloidal, las microesferas obtenidas se colocaron en un matraz sellado a 50 °C con 300 mL de una solución de cloroformo que contenía p-nitrobenzaldehído y 10 mL de trietilamina para promover la reacción. Las microesferas se lavaron y filtraron y luego el quitosano benzoilado fue reticulado con glutaraldehído al 10% (m/ v) y luego realizaron la reducción del grupo -NO₂ a -NH₂ con

300 ml de ditionito de sodio al 5% (m/v) y las microesferas se vertieron lentamente en un matraz sellado a 45 °C. Este derivado aminofenil fue diazotado durante 40 min a 0 °C con 200 mL de nitrito de sodio al 3% (m/v) en ácido acético 10% (v/v). Después de la filtración y lavado, el gel de quitosano benzoilado modificado fue mezclado con 100 mL de 8-HQ 3% (m/v), disuelto previamente en una solución de NaOH al 5% (m/v) en alcohol etílico. El derivado de quitosano fue lavado con 100 mL de HNO₃ 1 mol·L⁻¹ y luego con agua destilada para eliminar la solución de ácido. Por otro lado, el sistema de preconcentración fue lineal entre 2,5 y 75 µg·L⁻¹, con un factor de preconcentración de 17,6, frecuencia de muestreo de 18 muestras por hora, límites de detección y cuantificación de 0,8 y 2,5 ng·L⁻¹ respectivamente para 100 mg de material sorbente empleado y los resultados para los estudios de recuperación oscilaron entre 85 y 95%.

En la Tabla 3 se muestran la aplicación de algunos materiales modificados del quitosano para la preconcentración en línea de algunos elementos y su determinación por diferentes técnicas espectroscópicas.

Tabla 3. Aplicaciones de algunos materiales de quitosano modificado para la preconcentración en línea de elementos traza.

Elementos	Matriz	Adsorbente	FP	Eluente	LD ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Detección	Ref.
Cd, Cu	Agua Natural	Quitosano modificado con 8-HQ (oxina)	24-25	HNO ₃	0,1-0,4	EAA	(18)
Cu	Muestras acuosas	Quitosano modificado con ácido 5- sulfónico-8-HQ	19,1	HNO ₃	0,3	EAA	(24)
Zn	Muestras acuosas	Quitosano modificado con 8-HQ	17,6	HNO ₃	0,8	EAA	(14)
Ag, Bi, Cu, Ga, In, Mo, Ni, U,V	Muestras acuosas ambientales	Quitosano modificado con ácido 3,4-dihidroxi-benzoico	8 --12	HNO ₃	0,07-0,90	EEA	(94)
Ag, Be, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, U, V, y tierras raras	Muestras acuosas ambientales	Quitosano funcionalizado con ácido 2-amino-5-hidroxibenzoico químicamente unido a un brazo de clorometiloxirano	—	HNO ₃	0,002-0,930	ICP-AES	(93)

4. OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL: Emplear un quitosano funcionalizado obtenido de un desecho orgánico como las conchas de camarón, como material adsorbente en la separación y preconcentración de trazas de plomo mediante una configuración de flujo continuo acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica como sistema de detección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extracción de la α -quitina de las conchas de camarón por tratamiento con HCl y desproteinización con NaOH diluido.
2. Aislamiento del quitosano a partir de la α -quitina por tratamiento con base.
3. Sintetizar derivados del quitosano por modificación química mediante formación de base de Schiff empleando aldehídos aromáticos y reacciones de diazotación empleando quinolinas como agentes quelantes.
4. Caracterizar los quitosanos funcionalizados a través de FTIR, RMN H-1.
5. Construir la configuración de flujo continuo a utilizar.
6. Realizar la preconcentración y determinación de trazas de Pb.
7. Determinar la presencia de Pb en muestras ambientales acuosas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiales y equipos utilizados:

- Los reactivos utilizados en la obtención de quitosano y sus derivados tales como: NaOH, NaBH₄, HCl, CH₃COOH, Dimetilformamida, Piridina, Cloruro de p-nitrobenzoilo, Piperonal, Benzaldehído, Vainillina, p-nitrobenzaldehído, NaNO₂, 8-Hidroxiquinolina, fueron de las marcas Merck, Aldrich, Riedel de Hæn y Scharlau.
- Los solventes empleados fueron de grado técnico y en algunas ocasiones solventes destilados tales como: cloroformo, metanol, etanol.
- Se empleo un rotavapor marca Büchi, un ultrasonido marca Sonicar modelo AA253.
- Los espectros de infrarrojo se tomaron en su mayoría por pastillas de KBr en un espectrofotómetro de Infrarrojo medio (FT-IR) marca Nicolet, modelo 380 operado en modo de Transformada de Fourier.
- Equipo de resonancia magnética nuclear: BRUKER, modelo AM500, de 600 MHz para RMN H-1 (IVIC).
- Equipo de resonancia magnética nuclear marca JEOL, modelo Eclipse de 270 MHz.

En cuanto a los utilizados en el sistema de análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de absorción atómica (FIA-EAA) se encuentran:

- Espectrómetro de Absorción Atómica de Llama Perkin-Elmer, modelo 5100 PC. La longitud de onda y corriente de lámpara empleada fue 217 nm y 10 mA respectivamente.
- Patrón de Plomo 1000 ppm 99,9 % pureza, Merck.
- APDC: pilorridintiocarbamato de amonio para análisis, 99% Sigma Chemicals.
- MIBK: metilisobutilcetona, 99% Riedel de Hæn.

- Derivados de quitosano obtenido mediante la modificación química con aldehídos aromáticos.
- Acetileno AGA Gas.
- Una bomba peristáltica GILSON Miniplus 3 de cuatro canales.
- Lámpara de cátodo hueco de Plomo, Varian.
- Dos válvulas de inyección manuales Rheodyne.
- Una botella de desplazamiento para desplazar el solvente orgánico.
- Cronómetro.
- Material volumétrico de vidrio.
- Agua desionizada, purificada en un sistema Barnstead Nano pure-infinity, para obtener agua 18 M Ω .cm

5.2 Origen de las muestras de conchas de camarón.

Las muestras de conchas de camarón fueron donadas por la empresa PROCAM S.A, la cual es una empresa procesadora de camarones y alimentos del mar ubicada en Barcelona, estado Anzoátegui- Venezuela. Como para muchas empresas a nivel mundial para PROCAM S.A las conchas de camarón constituyen un desecho bastante abundante, representando entonces una fuente disponible y económica de α -quitina. Estas muestras fueron colocadas en bolsas de propileno y refrigeradas a ($4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$). En el laboratorio estos desechos fueron lavados con agua de grifo y con agua destilada extrayendo el material cárnico posible que aún estaba presente en las muestras. Luego estas se dejaron secar en un horno a ($100,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 12 horas aproximadamente. Una vez secas estas fueron trituradas a fin de obtener un tamaño de partícula más pequeño.

5.3 Aislamiento de α -quitina.

5.3.1 Desmineralización de las conchas de camarón.

El tratamiento de las muestras se realizó según la metodología planteada por Kurita ⁽⁶⁸⁾. Para el primer ensayo se pesaron ($10,0450 \pm 0,0001$) g de las conchas de camarón secas en una fiola de 250 mL y se les añadió 150 mL de HCl 5% (relación 1g/15 mL) y se colocó en agitación a temperatura ambiente por 2 horas.

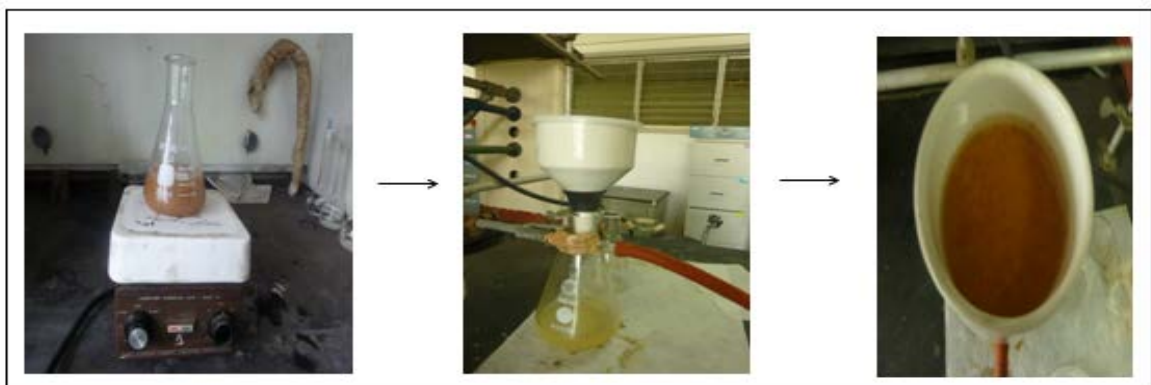


Figura 10. Proceso desmineralización de las conchas de camarón.

Luego el residuo se filtró y se lavó hasta la neutralidad y se colocó en una capsula de porcelana para secarlo en la estufa a ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) alrededor de 8 horas. Sin embargo, fue necesario dejarlo 8 horas más a una temperatura de aproximadamente de ($74\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$). El residuo seco se sacó de la estufa y se pesó.

5.3.2 Desproteínización de las conchas desmineralizadas.

El residuo desmineralizado se colocó en un balón de reacción de 250 mL y se sometió a un proceso de desmineralización con NaOH 5% en relación aproximada de 1g/15 mL, para lo cual se montó un sistema de reflujo con agitación empleando baño de arena, la metodología plantea colocar el sistema a temperaturas entre ($100\text{-}110\text{ }^{\circ}\text{C}$). Luego de 4 horas de controlar la temperatura se alcanzó ($92\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se dejó en reflujo a esta temperatura aproximadamente 3 horas. Se filtró por succión y se lavó hasta pH neutro colocándolo en la estufa alrededor de 15 horas a ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

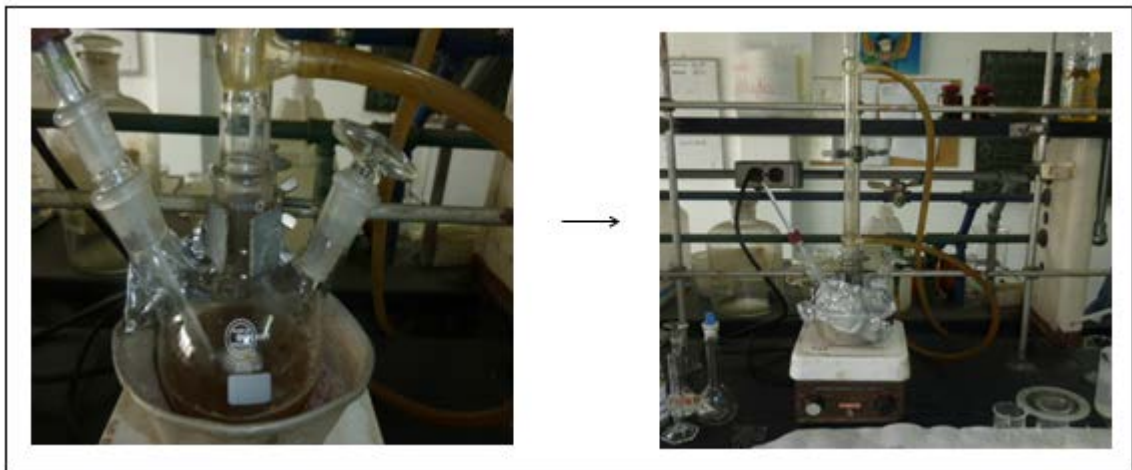


Figura 11. Proceso de desproteínización de las conchas de camarón.

Una vez seca la muestra tenía un aspecto rosa pálido por lo cual se realizaron tratamientos con etanol para eliminar restos de pigmentos, proteínas y trazas

metálicas, montando un sistema de reflujo con etanol. Se dejó secar el residuo nuevamente obteniendo una muestra de aspecto más claro la cual se pesó.

Esta metodología de obtención de la quitina se repitió tres veces más partiendo de cantidades variables de conchas de camarón.

5.4 Obtención de Quitosano

5.4.1 Desacetilación de la α -quitina aislada.

El tratamiento de desacetilación de la quitina se realizó por el método de Kurita y la metodología planteada por Tolaimate y col. ⁽⁶⁵⁾. Para ello se pesó 1,0145 g de la α -quitina obtenida y se pesó 1,0030 g de NaBH_4 para evitar la degradación del polímero, estos se añadieron en un balón de reacción con 60 mL de NaOH 50% empleando atmósfera de nitrógeno y sistema de reflujo con agitación a fin de mantener la mezcla de reacción a $(100\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C})$ durante 3 horas.

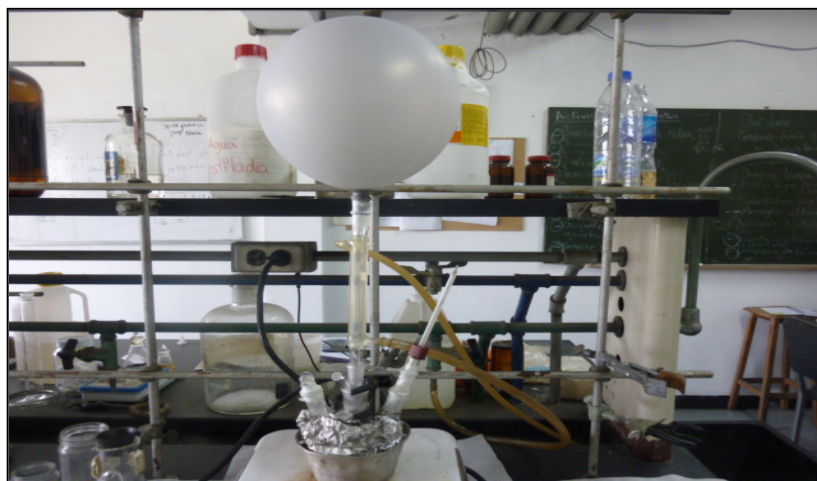


Figura 12. Proceso de desacetilación de la quitina obtenida.

Una vez finalizadas las tres horas el residuo se dejó enfriar, se filtró y se repitió nuevamente el proceso ya que el método recomienda repetir el proceso en dos

pasos de 3 horas cada uno para obtener una α -quitina con un mayor grado de desacetilación. El residuo obtenido se filtró y se lavó hasta pH neutro, luego se secó en el horno aproximadamente a $(50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C})$ por tres horas y se pesó, obteniendo finalmente la primera muestra de quitosano (Q-1). El procedimiento se realizó tres veces más (Quitosano: Q-2, Q-3 y Q-4 respectivamente) bajo las mismas condiciones partiendo de cantidades variables de α -quitina. En la Tabla 4 se pueden resumir las condiciones empleadas para el proceso de desacetilación de la α -quitina.

Tabla 4. Condiciones empleadas en la desacetilación de la α -quitina extraída a partir de conchas de camarón.

SOLVENTE	NaOH 50 % (m/v)
TEMPERATURA	(90-110) $^{\circ}\text{C}$
TIEMPO DE AGITACIÓN	6 Horas (3-3), con reflujo bajo atmósfera de N_2 .
AGENTE ANTIOXIDANTE	NaBH_4 (en cantidades estequiométricas de quitina)
FILTRADO	Al vacío
LAVADO Y SECADO	Agua destilada hasta pH neutro, y secado a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.
NUMERO DE CICLOS	4

5.5 Modificación Química del Quitosano.

Para este trabajo de investigación se obtuvieron cuatro quitosanos diferentes correspondientes a los procesos de desacetilación de la α -quitina: Q-1, Q-2, Q-3 y Q-4 respectivamente. Sin embargo, debido a que de Q-1 se obtuvo poca cantidad y esta fue empleada en ensayos fallidos en donde se perdió muestra, se emplearon los quitosanos Q-2, Q-3 y Q-4 para la modificación sintética planteada (Figura 13) basándonos en Dai y col. ⁽⁷⁾, y Carletto y col. ⁽¹⁴⁾.

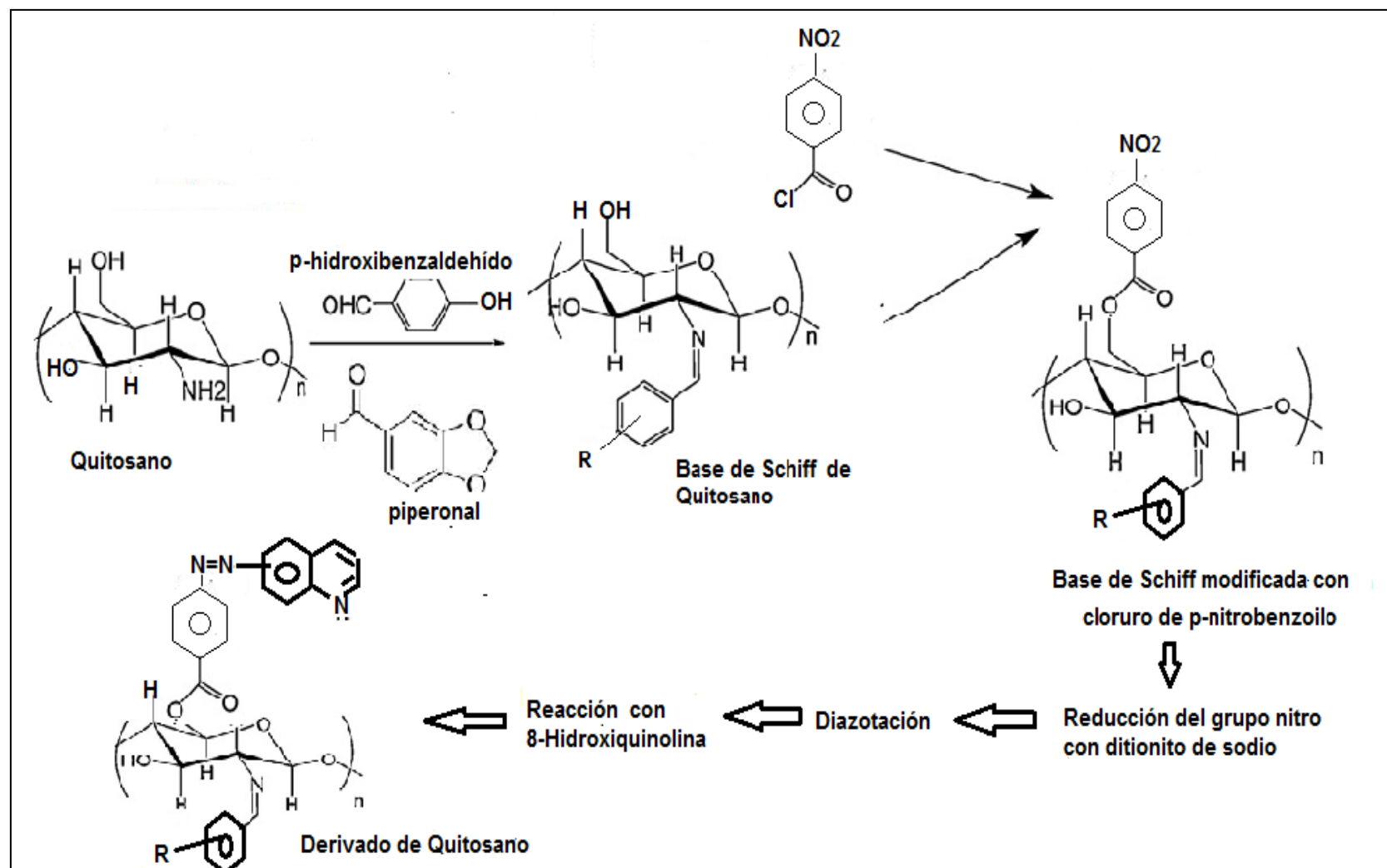


Figura 13. Esquema de modificación sintética planteado.

En este esquema se propone inicialmente la formación de Bases de Schiff de quitosano con aldehídos aromáticos como piperonal y p-hidroxibenzaldehído con la posterior acilación del grupo hidroxilo empleando un cloruro de benzoilo. En vista de los resultados obtenidos en esta primera etapa de la reacción, y de la disponibilidad de reactivos en el laboratorio se emplearon tres aldehídos más tales como: benzaldehído, vainillina y p-nitrobenzaldehído para la modificación sintética del tipo base de Schiff con los cuales se realizó un ensayo a microescala de la reacción de acilación. A partir de los resultados obtenidos, se tomó la decisión de emplear la Base de Schiff de Quitosano con p-nitrobenzaldehído para evaluar la reacción de copulación con 8-Hidroxiquinolina. La descripción de la metodología empleada se muestra a continuación:

5.5.1 Formación de Base de Schiff de Quitosano con Piperonal (BSQ-P).

Se empleó la metodología planteada por Dos Santos y col. ⁽⁸⁶⁾ y por Simionatto y col. ⁽⁸⁷⁾ para la obtención de bases de Schiff de quitosano con aldehídos aromáticos. Para la base de Schiff de quitosano con piperonal (BSQ-P) se disolvieron 0,5020 g de quitosano obtenido a partir del segundo proceso de desacetilación (Q-2) con 30 mL de CH₃COOH 2% y posteriormente se colocó en agitación por 6 horas, posteriormente a esta mezcla se añadió 10 mL de una solución de Piperonal en metanol (1g/10mL) dejando la mezcla en agitación hasta el día siguiente. Luego esta mezcla de reacción se trasvasó a un balón de reacción extrayendo el gel con metanol para colocarlo en un rota vapor por 20 minutos, luego se realizaron lavados con etanol y se colocó nuevamente en el rota vapor por alrededor de dos horas, se dejó secar y se pesó. En el esquema que se muestra en la Figura 14 podemos observar esta síntesis.

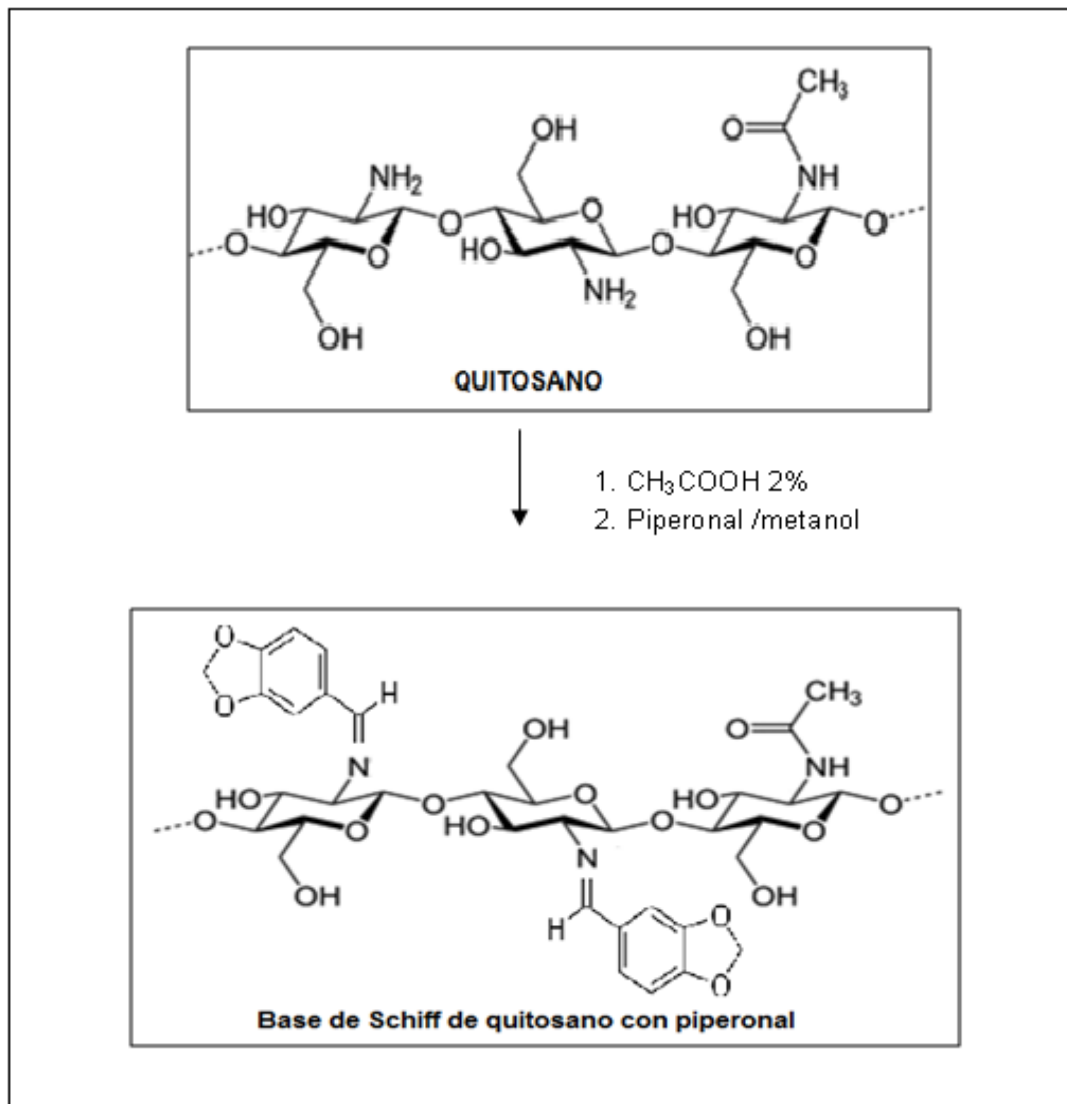


Figura 14. Esquema de modificación del quitosano con piperonal.

5.5.1.2 Acilación de base de Schiff de quitosano con piperonal.

A partir de los resultados obtenidos de la reacción de formación de la base de Schiff de quitosano con piperonal (BSQ-P), se realizó una prueba para continuar con la modificación sintética planteada (Figura 13). Para ello se pesaron 80 mg de la BSQ-P y 20 mg de cloruro de p-nitrobenzoilo disuelto previamente en 20 mL de dimetilformamida (DMF), colocándolo bajo atmosfera de nitrógeno, con sistema de reflujo con agitación y manteniendo la temperatura entre (108-112) °C por 48 horas. Una vez culminadas las 48 horas el sólido obtenido se filtró por succión empleando

un embudo de placa porosa de 0,2 μm y se lavo con CH_3COOH 2% y etanol. Luego de varios lavados se colocó el sólido en una capsula de porcelana en un desecador al vacío para su posterior análisis. Este proceso se repitió nuevamente bajo las mismas condiciones empleando cantidades variables de los reactivos. Así mismo, se empleo la metodología de Wang y col. ⁽⁸⁸⁾, colocando 51,6 mg de la BSQ-P en agitación con 15 ml de piridina por 1 hora. Posteriormente y con agitación se añadió gota a gota cloruro de p-nitrobenzoilo disuelto en piridina (150mg/15 mL) y se dejo en reacción 4 horas a $(30\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C})$, se realizaron lavados con NaCO_3 1% y etanol. La modificación propuesta basándonos en Dai y col. ⁽⁷⁾ es el que se muestra en la Figura 15.

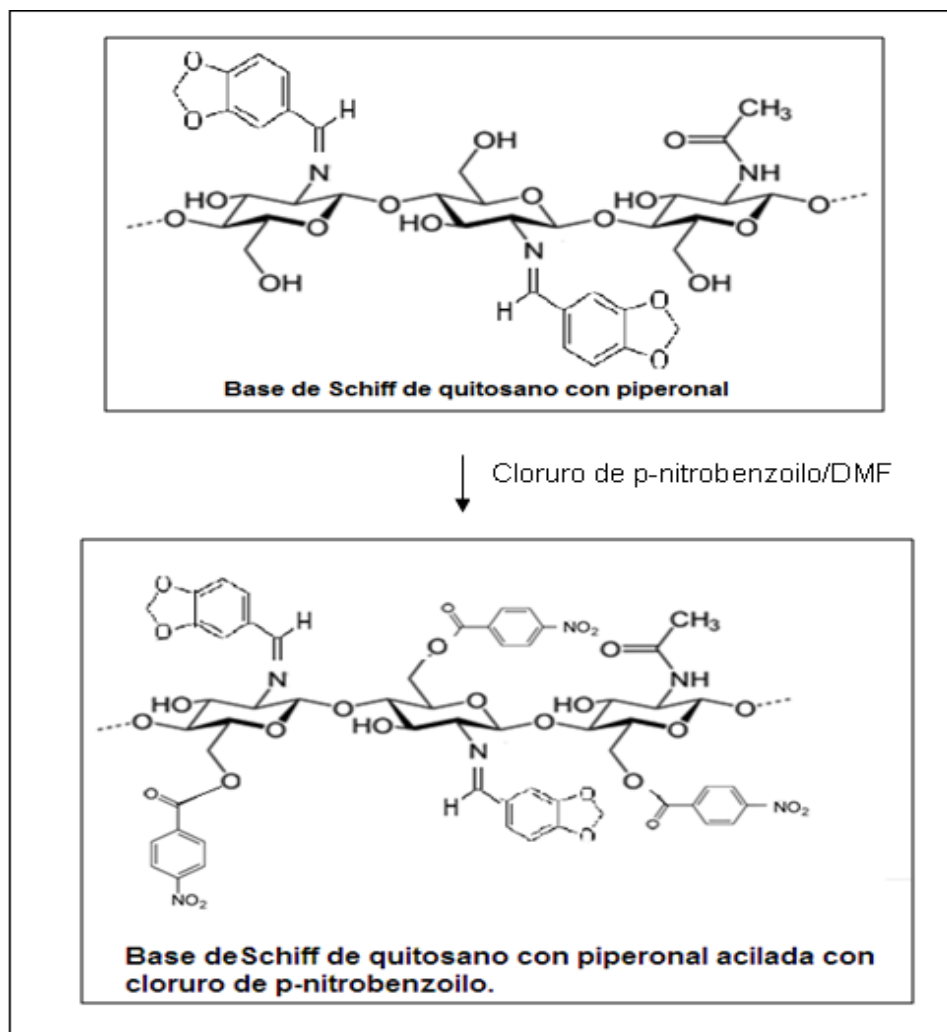


Figura 15. Esquema de modificación de BSQ-P con Cloruro de p-nitrobenzoilo.

5.5.2 Formación de Base de Schiff de Quitosano con Benzaldehído, Vainillina y 4-nitrobenzaldehído.

El procedimiento general para la formación de la Base de Schiff de Quitosano con: Benzaldehído (BSQ-Bz), Vainillina (BSQ-V), y 4-nitrobenzaldehído (BSQ-4NBz) se realizó siguiendo la metodología de Wang y col. ⁽⁸⁸⁾, en donde inicialmente se disolvió el quitosano obtenido a partir de los procesos de desacetilación anteriormente descritos en 30 mL de CH₃COOH 2%, y se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se le añadió 10 mL de etanol a la mezcla y se añadió lentamente y con agitación el aldehído correspondiente disuelto en metanol en relación 2:1, se colocó en agitación y se dejó en calentamiento a (60 °C ± 0,1 °C) por 5 horas. Una vez culminado el tiempo de reacción se dejó enfriar y se lavo con etanol colocándolo en ultrasonido para posteriormente filtrar el producto y dejarlo secar en un horno entre (50-80) °C. Las proporciones de los reactivos, así como, las condiciones de reacción se resumen en la Tabla 5. El esquema de modificación del quitosano se muestra en la Figura 16.

Tabla 5. Reactivos y condiciones de reacción para la formación de Bases de Schiff de Quitosano con: Benzaldehído, Vainillina y 4-nitrobenzaldehído.

Derivado	Quitosano (g)	CH ₃ COOH 2% (mL)	Aldehído/metanol (mL)	Temperatura y tiempo de reacción	Lavado	Secado
BSQ-Bz	0,5120 (Q-3)	30	5	(60 °C ± 0,1 °C) por 5 horas	ETANOL	Rota evaporador y horno 50 °C
BSQ-V	0,209 (Q-3)		5			
BSQ-4NBz	0,1534 (Q-3)		5			
	2,7485 (Q-4)		50			Horno 50 °C – 80 °C

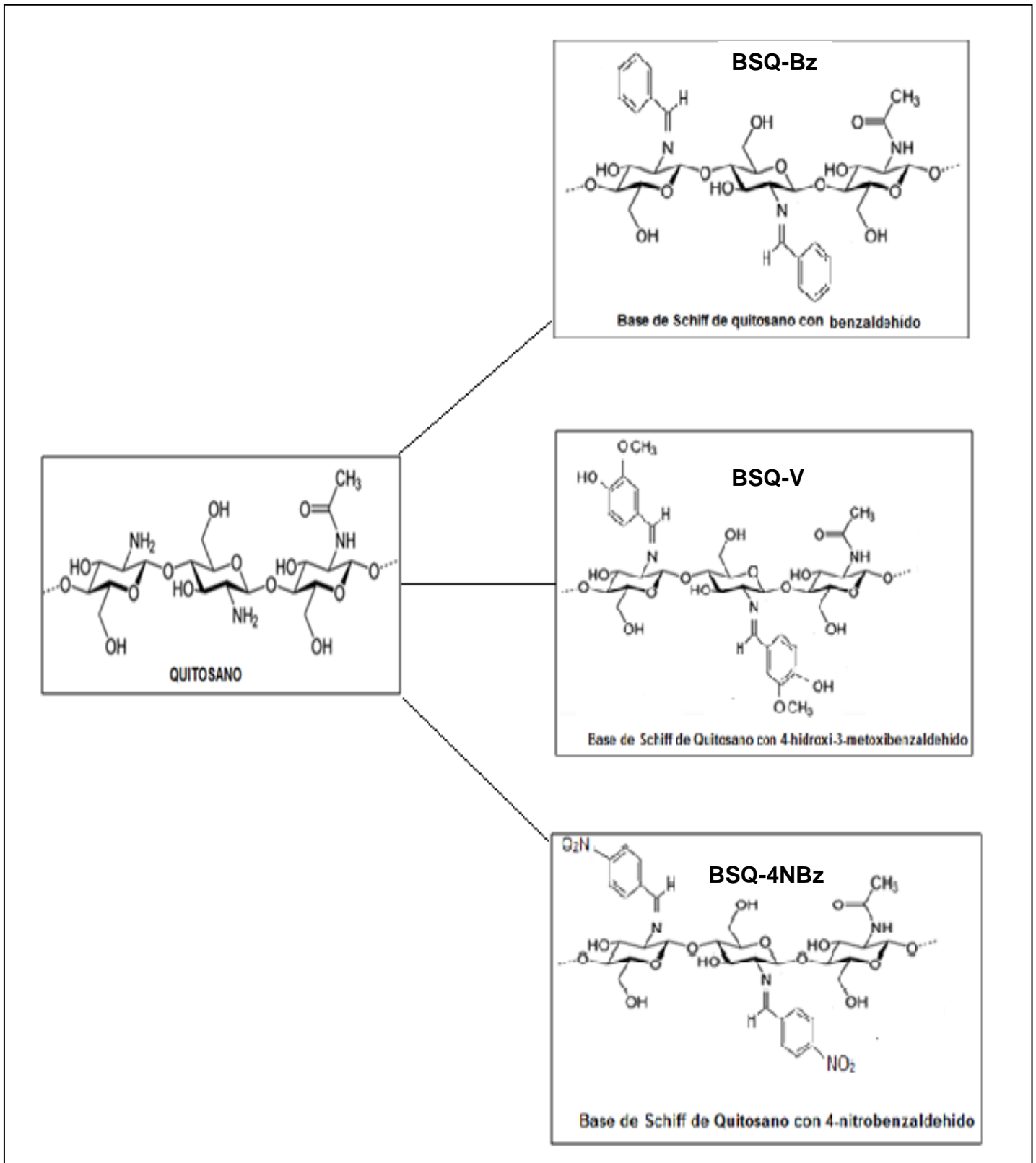


Figura 16. Esquema de modificación del Quitosano con Vainillina, Benzaldehído y 4-nitrobenzaldehído.

5.5.3 Copulación de la base de Schiff modificada de quitosano 4-nitrobenzaldehído con 8-Hidroxiquinolina.

Se realizaron varios intentos para funcionalizar el grupo de hidroxilo de las bases de Schiff de quitosano obtenidas empleando cloruro de p-nitrobenzoilo. Sin embargo, esta modificación no fue posible bajo las condiciones de reacción utilizadas según los resultados obtenidos del espectro FT-IR en donde no se apreció la banda característica del grupo carbonilo del cloruro de benzoilo alrededor de 1700 cm^{-1} . En este sentido, tomando como reactivo de partida la base de Schiff de Q-4 con 4-nitrobenzaldehído se ensayó la modificación sintética que se muestra en el esquema de la Figura 17 siguiendo la metodología de Martins y col. ⁽²⁴⁾.

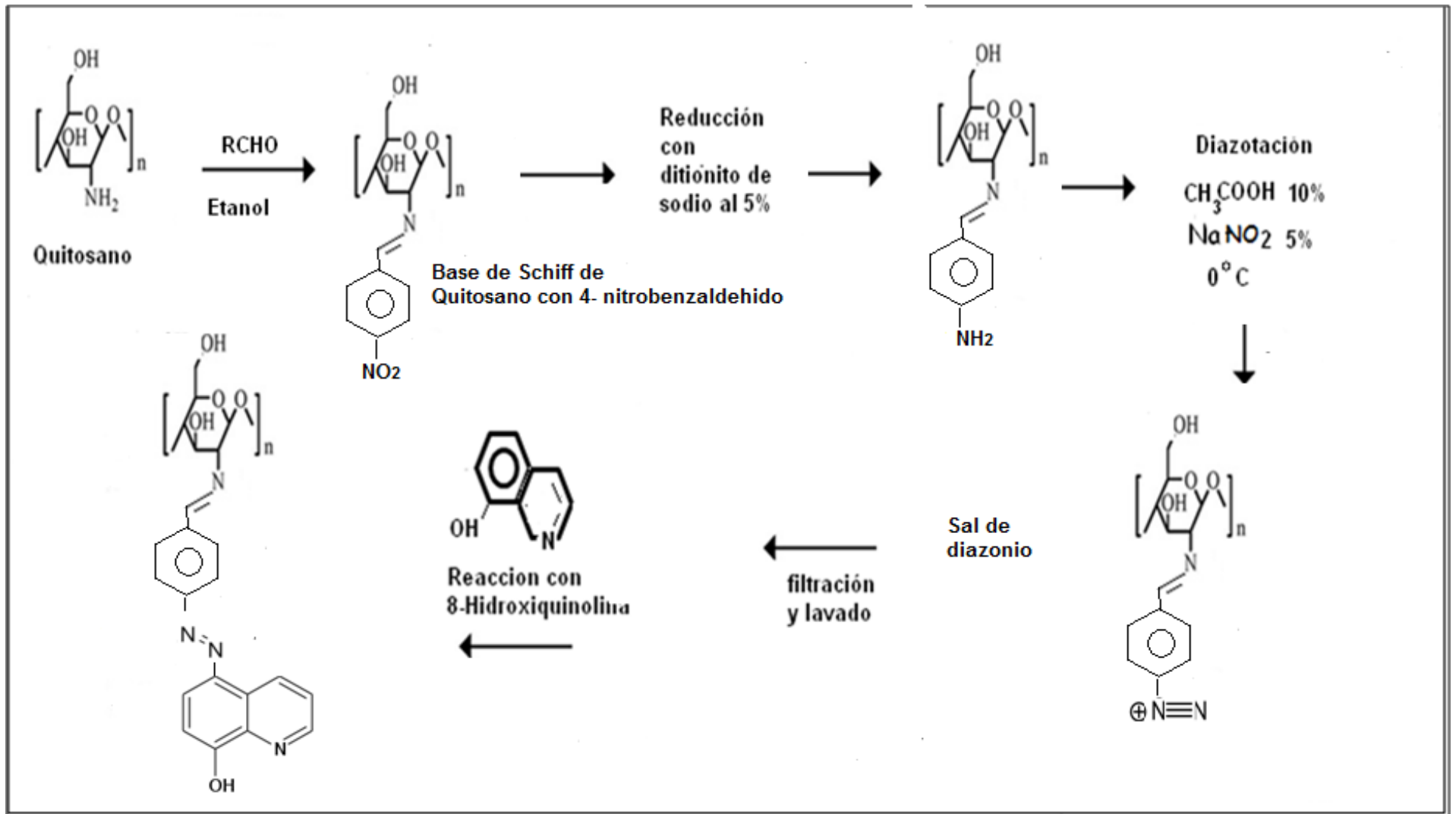


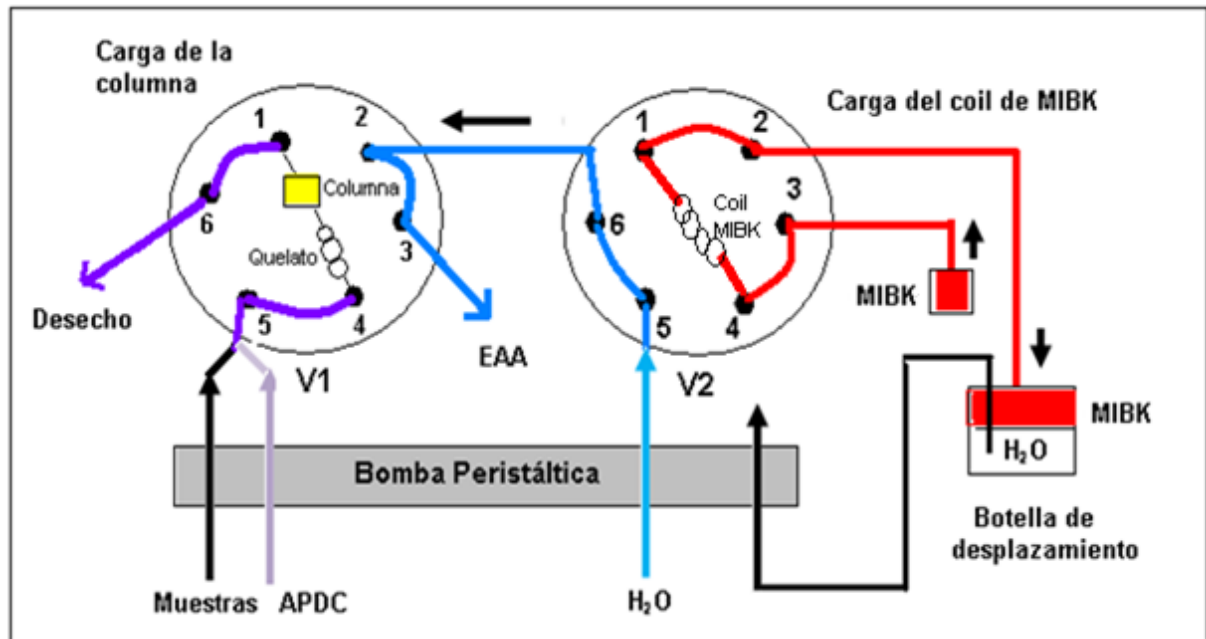
Figura 17. Esquema de modificación sintética de la base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído.

En este esquema puede observarse que el segundo paso de la modificación consiste en una reducción del grupo nitro presente en la base de Schiff formada inicialmente. Para ello, se pesó inicialmente 2,3715 g del producto de la reacción entre Q-4 y el 4-nitrobenzaldehído y se colocó en reacción con 300 mL de NaS_2O_4 5% (m/v). La reacción se mantuvo a $(60\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C})$ por aproximadamente 4 horas. Posteriormente el residuo se filtró y se secó en una estufa a $(80\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C})$. El siguiente paso de la modificación consiste en una reacción de diazotación del producto de reducción obtenido, para ello se pesó 0,9083 g y se añadió en una fiola con 50 mL de CH_3COOH 10%, manteniendo la mezcla en baño de hielo. Por otro lado, se preparó 100 mL de solución de NaNO_2 al 3% (m/v) en CH_3COOH 10% y se colocó en baño de hielo. Estas dos soluciones se mezclaron y se mantuvo la mezcla a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por 40 minutos. Posteriormente, el gel de quitosano modificado fue mezclado con una solución de 8-Hidroxiquinolina al 3% (m/v) en NaOH 5% (m/v). El gel gelatinoso obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y de aquí se tomó una porción y se le realizaron pruebas de solubilidad en agua, dimetilformamida (DMF), y tetrahidrofurano (THF).

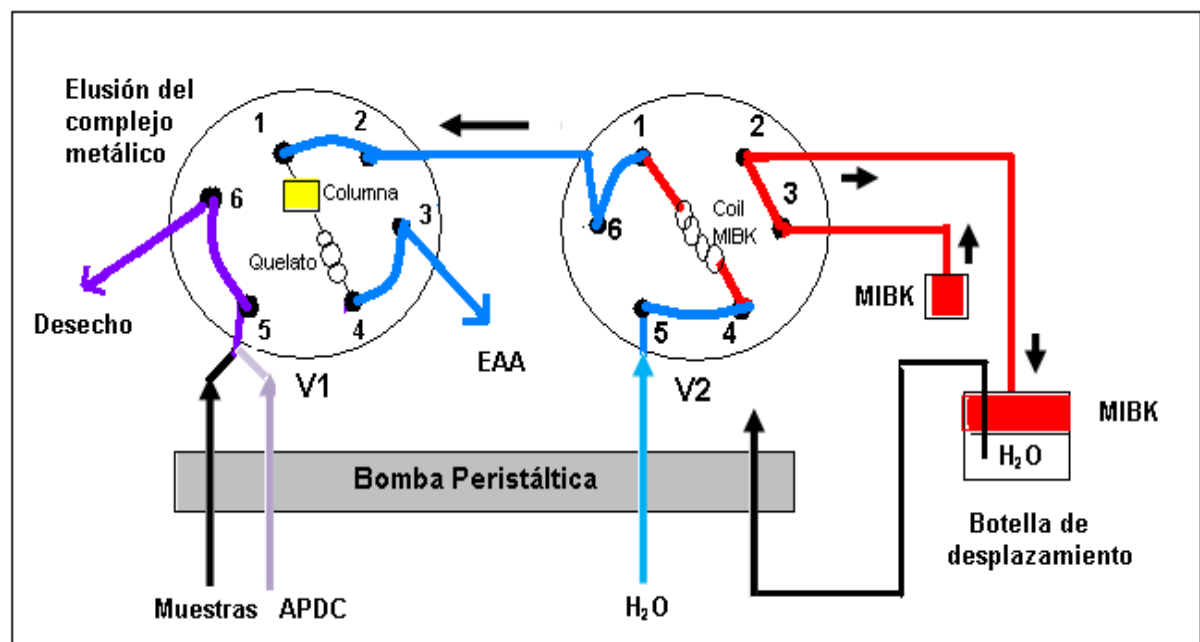
5.6 Determinación de plomo en muestras acuosas empleando derivados de Quitosano como material adsorbente mediante Análisis por inyección en flujo acoplado a Espectrometría de Absorción Atómica (FIA-EAA).

5.6.1 Configuración de flujo empleada.

Se empleó una configuración de flujo mostrada en la Figura 18, partiendo del diseño de Rondón y col. ⁽²⁷⁾, la cual fue construida en el Laboratorio de Química Analítica del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).



A) Etapa de Preconcentración.



B) Etapa de Elución.

Figura 18. Sistema de inyección en flujo continuo para la determinación de Pb^{2+} empleando derivados de quitosano en sus etapas de: a) Preconcentración y b) Elución.

5.6.2. Sistema de preconcentración y elución en la configuración de flujo continuo empleada.

En la configuración de flujo Figura 18 se puede apreciar que ocurren dos etapas: una de preconcentración y otra de elución. En la etapa de preconcentración también denominada etapa de carga, la muestra (o estándares) se hace pasar continuamente durante un tiempo de preconcentración al sistema mediante la propulsión de la bomba peristáltica. En esta etapa, la muestra se mezcla con el reactivo quelante (APDC), en donde se forma un quelato con el metal que es retenido en la minicolumna empacada con el material adsorbente que en nuestro caso son los derivados de quitosano, la cual se encuentra localizada en el bucle de la válvula de inyección V1, mientras que la matriz de la muestra es enviada al desecho, y a su vez a través de la válvula de inyección V1 hasta V2 se hace pasar una corriente de agua para alimentar al detector. Posteriormente para pasar a la etapa de elución, se procede a girar las válvulas de inyección V1 y V2 al mismo tiempo, por lo cual se cambian las posiciones para dar paso a través de la válvula de inyección V2 al solvente orgánico (MIBK) hacia V1, de forma tal de eluir el complejo metálico formado en la columna, liberando al analito preconcentrado al detector. En la Figura 19 se muestra el sistema de preconcentración en línea FIA-EAA.

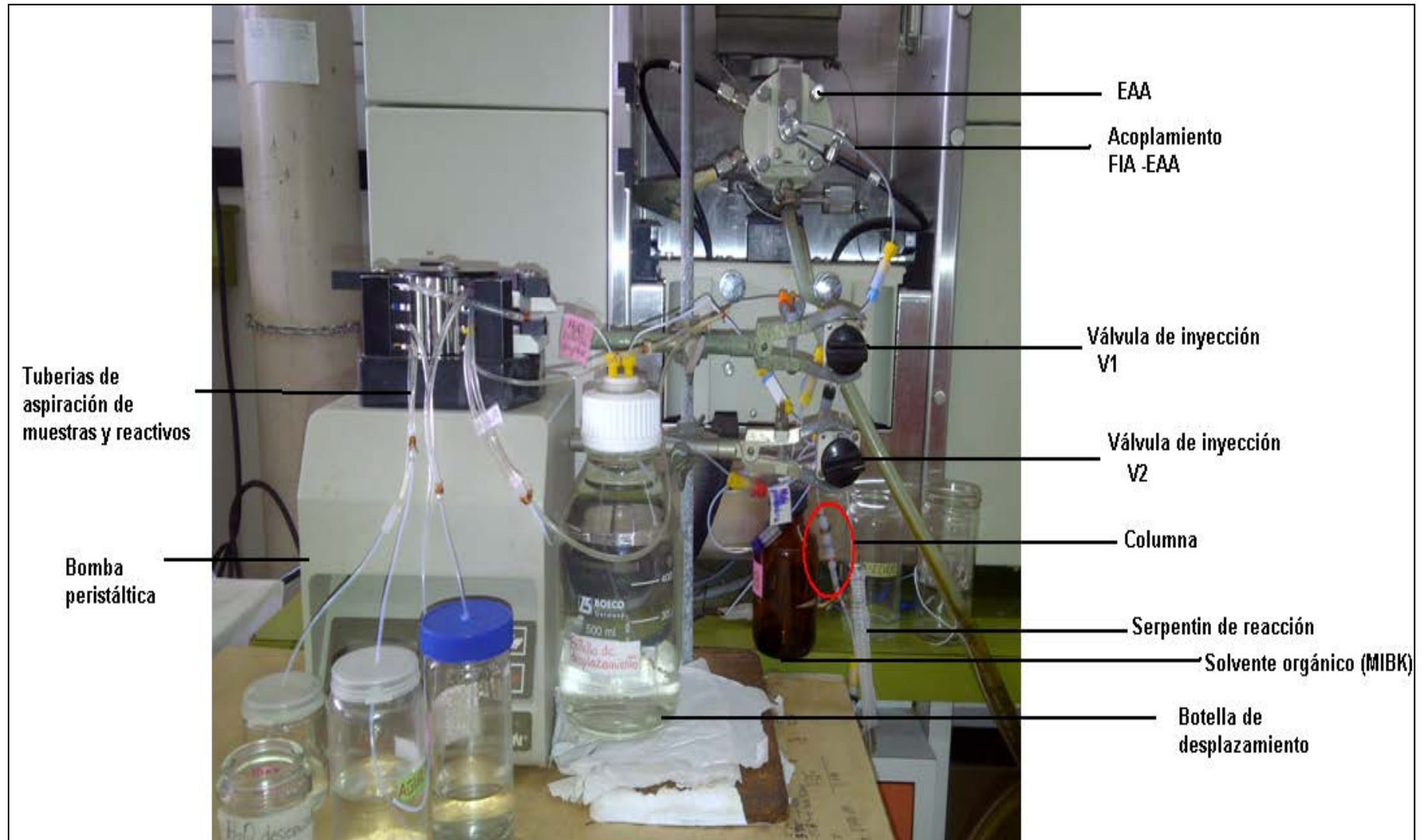


Figura 19. Sistema de preconcentración en línea FIA-EAA.

5.6.3 Condiciones de trabajo para el sistema de preconcentración en línea acoplado a espectrometría de absorción atómica de llama.

En la Tabla 6, se muestran las condiciones de trabajo empleadas en el sistema de flujo continuo las cuales fueron optimizadas para plomo y otros metales por Rondón y col. ⁽²⁷⁾. De esta manera, se partió de unas condiciones óptimas reportadas en la literatura que han sido utilizadas con otros materiales sorbentes tales como: zeolitas, a fin de evaluar si existía la necesidad de optimizaciones adicionales para obtener una señal reproducible en el tiempo, cuando se empleara como material de empaque los derivados de Quitosano descritos anteriormente. Por la naturaleza química de los derivados obtenidos fue necesario trabajar a pH del agua desionizada con soluciones acuosas de plomo de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabla 6. Condiciones de trabajo empleadas para la preconcentración en línea de Pb²⁺, utilizando derivados de quitosano y un sistema de flujo continuo acoplado a un espectrómetro de absorción atómica.

Sistema	Parámetro	
Llama (AAS)	▪ Longitud de onda (nm)	217
	▪ Corriente de lámpara (mA)	10
	▪ Ancho de rendija (nm)	0,7
	▪ Relación de aire/acetileno (L min ⁻¹)	10/2
Químico	▪ pH de muestra/estándar	6,5
	▪ Concentración de APDC (%m/v)	0,1
	▪ Flujo de muestra (ml/min ⁻¹)	2,5
Flujo Continuo	▪ Flujo de reactivo acomplejante APDC (ml min ⁻¹)	0,4
	▪ Flujo del portador H ₂ O (mL min ⁻¹)	3
	▪ Volumen de reactivo eluyente, MIBK (μl)	100
	▪ Longitud del serpentín de reacción (cm)	172
Inyector	▪ Tiempo de preconcentración (min)	2,4
	▪ Tiempo de elución (s)	30
Minicolumna	▪ Dimensiones de la columna: longitud (cm) x diámetro interno (mm)	0,3 x 4
	▪ Cantidad de material (derivados) mg	20

5.6.4 Evaluación de derivados de Quitosano en el sistema FIA-EAA.

Como se describió en secciones anteriores se realizó la modificación de la estructura del Quitosano obtenido a partir de conchas de camarón empleando aldehídos aromáticos con la finalidad de obtener derivados del tipo base de Schiff los cuales fueron caracterizados para determinar si su formación fue efectiva o no, y de esta manera poder evaluarlos como material de empaque de minicolumnas analíticas empleadas para preconcentración en línea de soluciones estándares acuosas de Pb en sistemas de flujo continuo. El primer derivado a evaluar consistió en el obtenido de la reacción de Quitosano con Vainillina (BSQ-V), posteriormente se evaluaron los derivados obtenidos de la reacción de Quitosano con: Benzaldehído (BSQ-Bz), Piperonal (BSQ-P), y 4-nitrobenzaldehído (BSQ-4NBz) respectivamente. Para los estudios de precisión y exactitud se seleccionó aquel derivado que tuviera el mejor comportamiento lineal en el rango de concentraciones estudiadas.

5.6.5 Caracterización analítica.

5.6.5.1 Figuras de Merito.

Una vez conocidas las condiciones de trabajo en el sistema de flujo continuo mostrado en la Figura 18, se realizó el estudio de las curvas de calibración para la preconcentración de soluciones estándares acuosas de plomo, usando para ello minicolumnas empacadas con BSQ-V, BSQ-P y BSQ-4NBz respectivamente. Por otra parte, para la evaluación de las figuras de mérito se empleó el material que presentó el mejor ajuste lineal en el rango de concentraciones estudiadas. En este sentido, se evaluaron las figuras de mérito como: a) sensibilidad, que es obtenida por la pendiente de la curva de calibrado; b) límite de detección, el cual se define como la señal del blanco mas tres veces la desviación estándar de la absorbancia correspondiente a los picos obtenidos para 5 inyecciones consecutivas del blanco; c) la

precisión, expresada como la desviación estándar relativa, se verificó con dos soluciones estándares diferentes conteniendo cada una concentraciones iguales del analito e inyectándolas por triplicado; d) el factor de preconcentración, el cual se obtiene de la razón de las pendientes de las curvas de calibrado por el sistema FIA ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y por aspiración directa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); y finalmente e) la exactitud, la cual se evaluó a través de los estudios de recuperación, tomando para ello muestras de agua de mina provenientes del Parque Nacional General Juan Pablo Peñaloza, ubicado en la parte alta de la montaña, a 2500 m.s.n.m., Sector Las Minas, Aldea Las Tapias, Bailadores, Municipio Rivas Dávila, estado Mérida, las cuales fueron facilitadas por el laboratorio de Química Analítica. Estas muestras fueron fortificadas con una concentración conocida de iones Pb^{2+} y evaluadas con el sistema FIA-EAA.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción y caracterización de quitina a partir de las conchas de camarón.

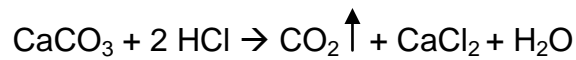
La metodología empleada se realizó según el método de Kurita, para lo cual se realizaron cuatro ensayos con cantidades variables de la fuente natural. En la Tabla 7, se muestran las cantidades empleadas de materia prima, así como, el rendimiento de la extracción.

Tabla 7. Resultados y rendimiento de la extracción de quitina a partir de conchas de camarón.

Muestra	Masa conchas (g)	Masa de quitina en conchas (g)	% Quitina en conchas
1	10,045	2,305	22,943
2	10,014	2,613	26,088
3	40,021	9,967	24,904
4	69,941	17,277	24,702

Se puede observar que el rendimiento del procedimiento de extracción de quitina a partir de conchas de camarón está entre 24 % y 26 %. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado en la literatura para este tipo de muestras el cual está entre 14% y 33% ⁽⁹⁵⁾. Como ya se mencionó anteriormente este procedimiento involucra tres procesos principalmente los cuales son: desmineralización, desproteinización y despigmentación.

En la etapa de desmineralización se produce una efervescencia (CO₂), debido al consumo de los minerales que en su mayoría son carbonatos de calcio y de magnesio. Según la reacción:



El tiempo de exposición al ácido fue entre 2-3 horas en una sola etapa a temperatura ambiente, empleando ácido diluido, debido a que concentraciones muy altas pueden causar la degradación de la quitina por ruptura de los enlaces 1-4 glucosídicos en la cadena polimérica, siendo necesario realizar lavados con agua para eliminar el exceso de ácido.

Durante la etapa de desproteización se tratan las conchas desmineralizadas en medio alcalino a altas temperaturas a fin de romper los enlaces de hidrogeno que mantienen unidas a las moléculas de las proteínas, haciendo que estas se separen y se dispersen en la solución acuosa, esto produce una solución marrón oscura como sobrenadante la cual fue desechada por filtración y este filtrado se lavo hasta la neutralidad con abundante agua a fin de eliminar restos del sobrenadante y del NaOH en exceso. El producto obtenido tenía un leve color rosa producto de la presencia de pigmentos como astaceno, astaxantinas, cantaxantinas y β -caroteno en el material crudo, por lo cual se sometió a una despigmentación con etanol, obteniendo un producto de color blanco hueso.

La Figura 20 muestra el espectro FT-IR obtenido para la quitina en donde se observa una banda intensa a 3418 cm^{-1} la cual corresponde al estiramiento del enlace-OH de los grupos presentes en las aminoglucosas. Adicionalmente, se observan bandas entre 2890 cm^{-1} y 2690 cm^{-1} correspondientes a la vibración de alargamiento de los grupos -CH y -CH₂. En la zona de la huella dactilar se puede apreciar una banda en 1637 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O de la amida (amida I) y en 1555 cm^{-1} deformación angular del enlace N-H (modo amida II), las bandas entre $1000\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$ corresponden a las vibraciones de estiramiento del enlace -C-O en los enlaces β (1-4) de los glucósidos. Los datos obtenidos son coincidentes con valores reportados en la literatura⁽⁹⁶⁾, por lo cual se garantiza la

efectividad durante el proceso de extracción de la quitina. Una ampliación de este espectro se muestra en el apartado de Anexos 1.

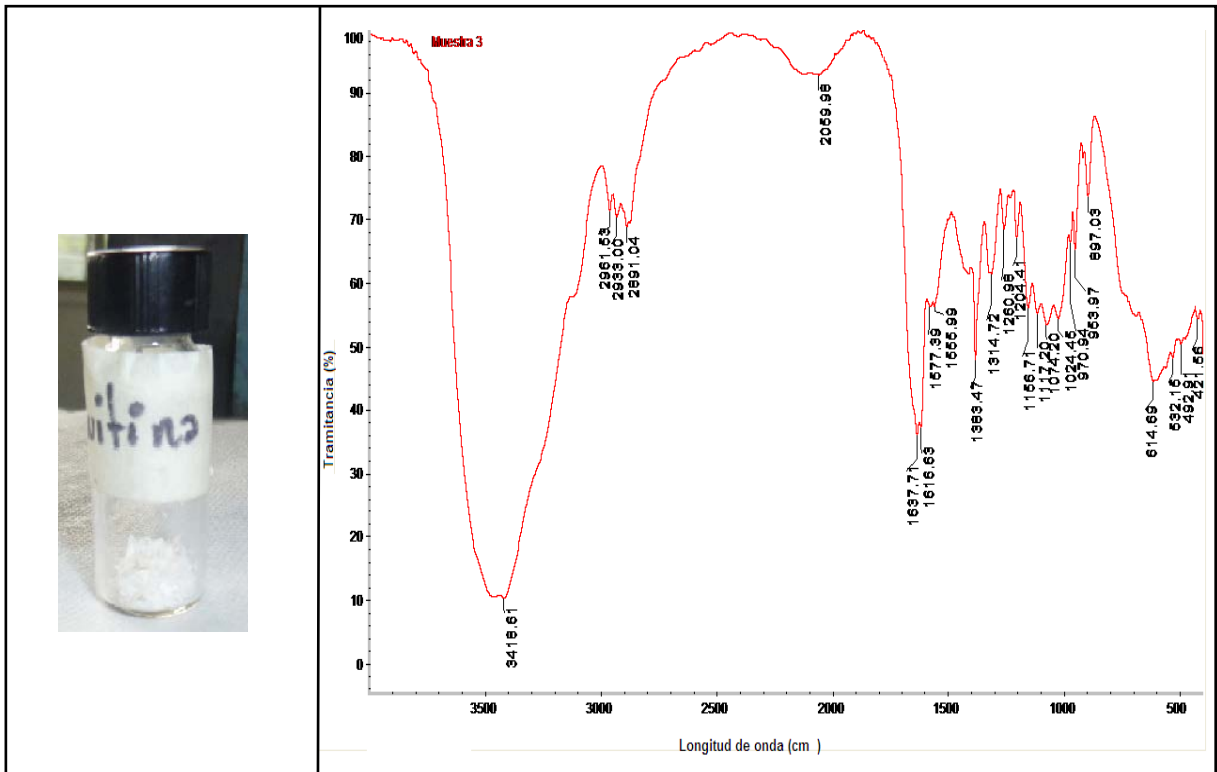


Figura 20. Espectro FT-IR de la muestra de quitina.

6.2 Aislamiento y caracterización del quitosano a partir de quitina.

La metodología empleada fue la de Kurita ⁽⁶⁸⁾ y Tolaimate ⁽⁶⁵⁾, en donde fueron empleadas cuatro muestras diferentes de quitina para la obtención de quitosano utilizando como solvente NaOH 50%. La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en el proceso de desacetilación de la quitina.

Tabla 8. Resultados de la desacetilación de la quitina.

Quitina (g)	Quitosano (g)	%R	Solubilidad en ácido diluido
1,0145	(Q-1) 0,7131	70,3	Positiva
1,0058	(Q-2) 0,7491	74,5	Positiva
2,5453	(Q-3) 2,0270	79,6	Positiva
5,0253	(Q-4) 4,0495	80,6	Positiva

Durante esta reacción se produce la hidrólisis de los grupos acetamido ubicados en el C-2 de la quitina, siendo necesario emplear altas temperaturas para llevar a cabo la reacción. Como se puede observar en la Tabla 8 los rendimientos obtenidos se encuentran entre 70 y 80 %, por lo cual el método resulto con una buena eficiencia. Además el producto obtenido resulta soluble en soluciones de CH₃COOH 2%, siendo esta la principal diferencia entre la quitina y el quitosano. El quitosano posee una mayor cantidad de grupos amino en su estructura los cuales pueden ser protonados con soluciones de ácidos diluidos con pH menores a 6 .La solubilidad del quitosano depende a su vez de la masa molecular por lo cual mientras posea mayor masa más difícil es su solubilización originándose soluciones de mayor viscosidad ⁽⁹⁷⁾.

La Figura 21 muestra el espectro FT-IR para una muestra del segundo quitosano obtenido (Q-2) , en donde se observa una banda ancha a 3438 cm⁻¹ atribuida a la vibración de estiramiento de los –OH de las unidades de aminoglucosidos y las elongaciones de N-H de las unidades de N-acetil-D-glucosamina. En 2884 cm⁻¹ vibraciones de alargamiento de los –C-H simétricos y asimétricos, en 1653 cm⁻¹ la vibración estiramiento modo amida I y la vibración de tensión del C=O. En 1594 cm⁻¹ deformación angular de los –NH en el plano, 1421 cm⁻¹ vibración de flexión de los grupos –CH₂. Por último, en 1380 cm⁻¹ vibración de flexión en el plano de los grupos –C-H, entre 1000-1151 cm⁻¹ vibraciones de estiramiento del enlace -C-O en los enlaces β (1-4) de los glucósidos. Además, se observa la desaparición de la banda

alrededor de 1550 cm^{-1} correspondiente al modo amida II. La presencia de la banda a $1653,7\text{ cm}^{-1}$ asignada al modo amida I indica que la desacetilación no fue completa ya que este parámetro varía con las condiciones empleadas, resultando muy difícil una desacetilación total de la cadena polimérica. En la Figura 22 se muestra la comparación física entre la quitina y quitosano observando mayor cristalinidad en la muestra de quitosano, la cual se debe principalmente a las diferencias estructurales en cada uno de los biopolímeros por el aumento de la proporción de unidades de N-glucosamina durante el proceso de desacetilación. Además, en la Figura 23 se muestra la comparación entre los cuatro quitosanos obtenidos, en donde se señalan las frecuencias de vibración correspondientes al modo Amida I y la deformación angular en el plano de los -N-H en el espectro FT-IR correspondiente a cada uno de ellos. En este punto puede notarse la diferencia en la señal identificada como amida I para las cuatro muestras. La ampliación de estos espectros se presenta en el apartado de Anexos 2-4.

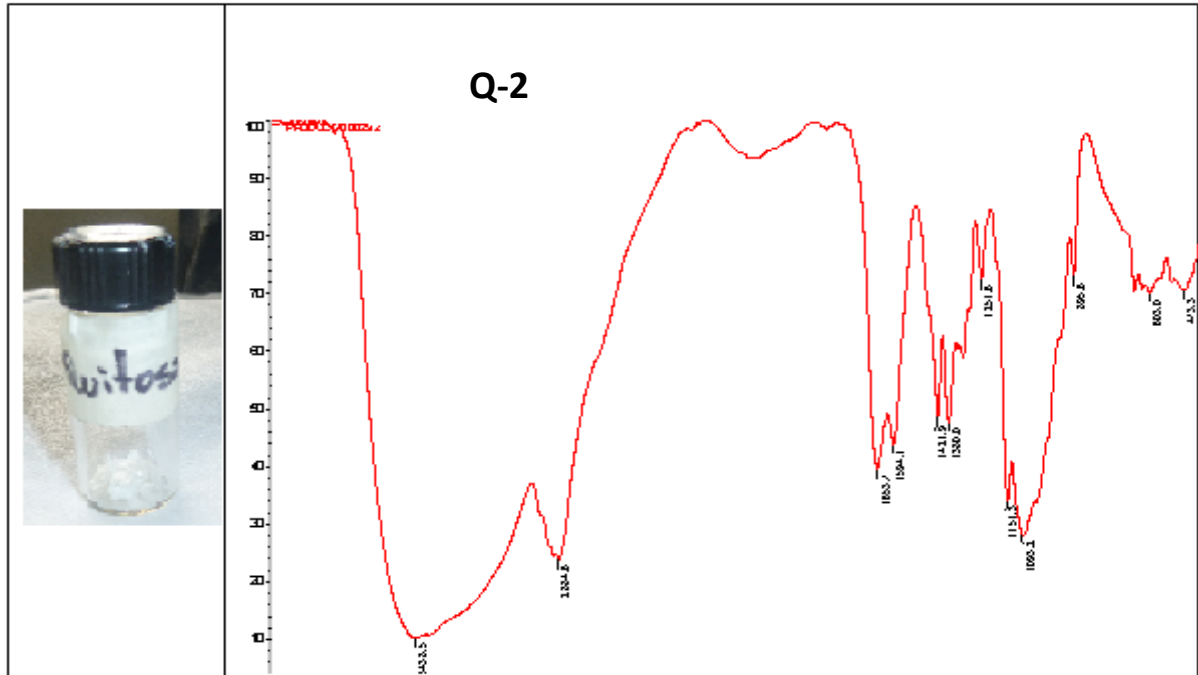


Figura 21. Espectro FT-IR de la muestra de Q-2.

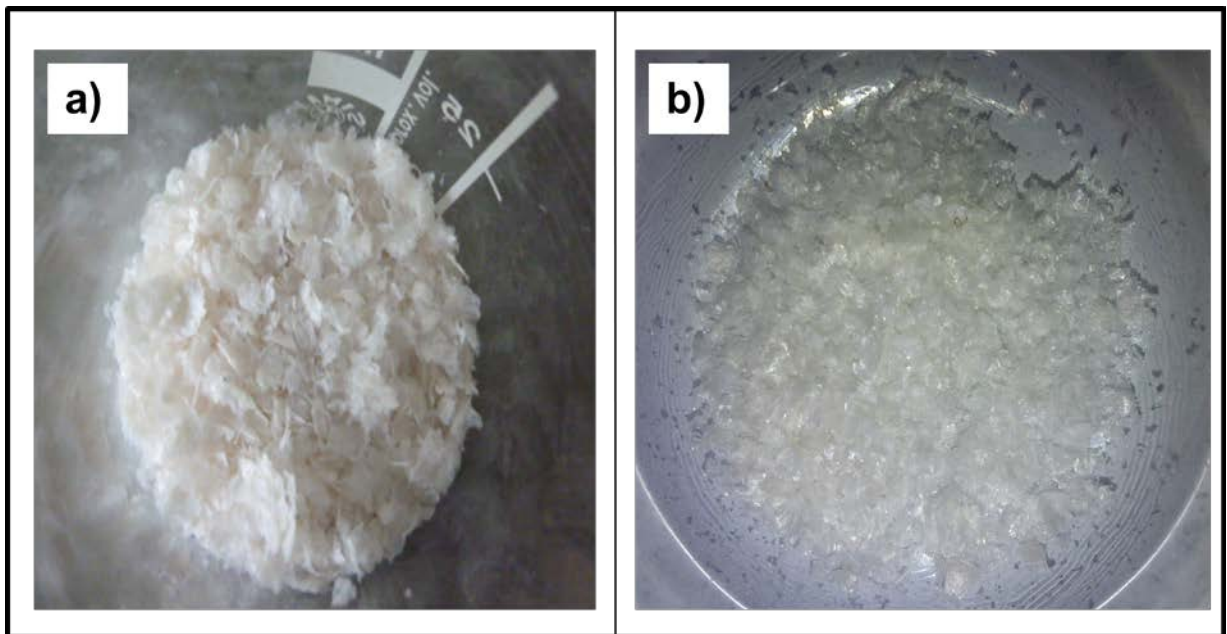


Figura 22. Comparación física entre a) Quitina y b) Quitosano.

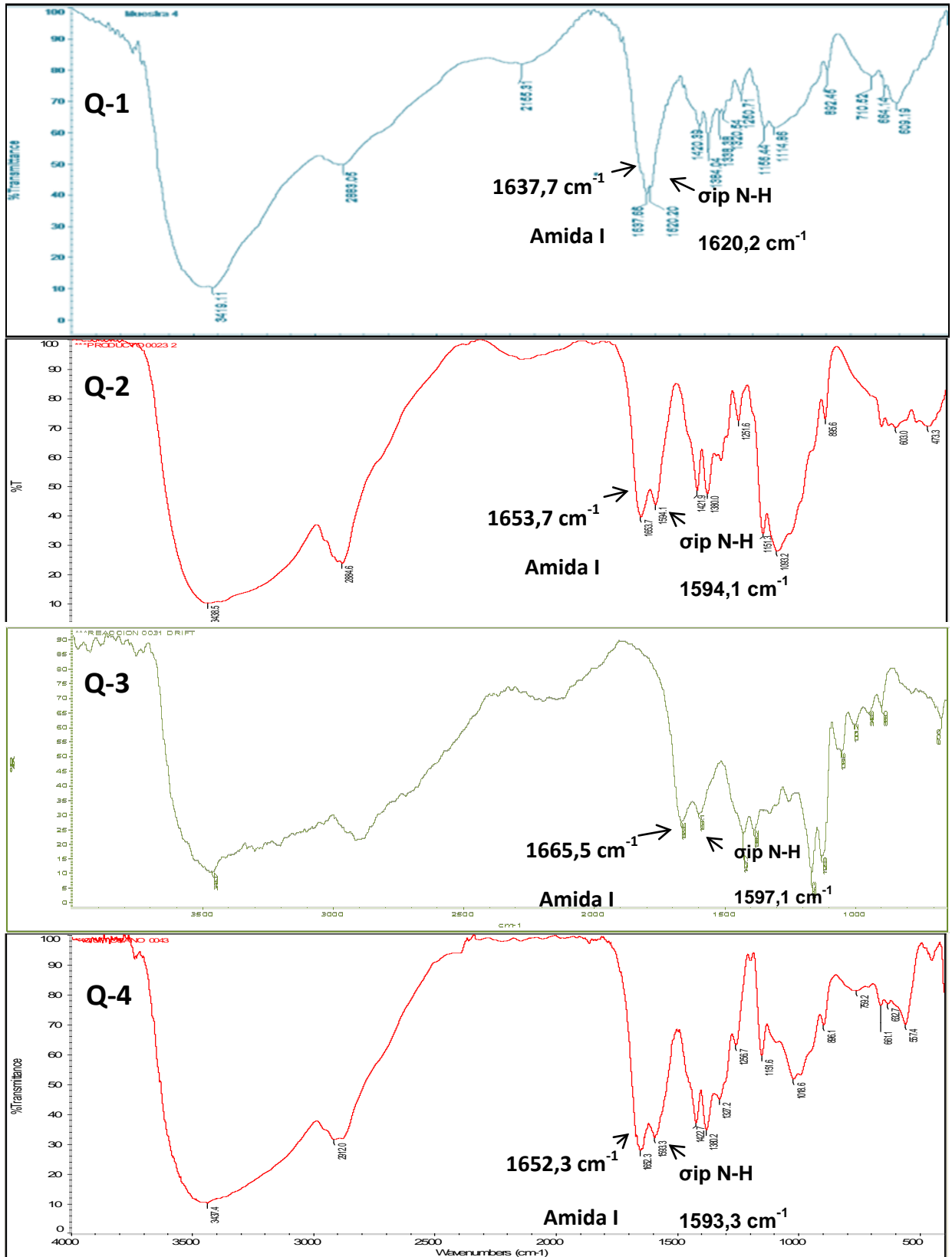


Figura 23. Espectro FT-IR de los Quitosanos: Q-1, Q-2, Q-3, y Q-4

En el análisis del espectro de RMN de protones para las muestras de quitosano permite observar las señales asociadas a la desacetilación de la quitina. En la Figura 24 y 25 se observa el espectro RMN H-1 del Quitosano obtenido del segundo proceso de desacetilación (Q-2) (Anexos 5-6) empleando como solvente D₂O/HCl 1%. Así, se observa un singlete localizado alrededor de 1,98 ppm, el cual puede asignarse a los protones del grupo metilo en las unidades de N-acetilglucosamina H-Ac. Adicionalmente, es posible observar en 3,09 ppm la señal asignada para el protón H-2 del resto de glucosamina. Centrado en 3,65 ppm se observan dos singletes anchos asociado a los protones H-3', H-4', H-5' y H-6' de las unidades de D-glucosamina y N-acetilglucosamina.

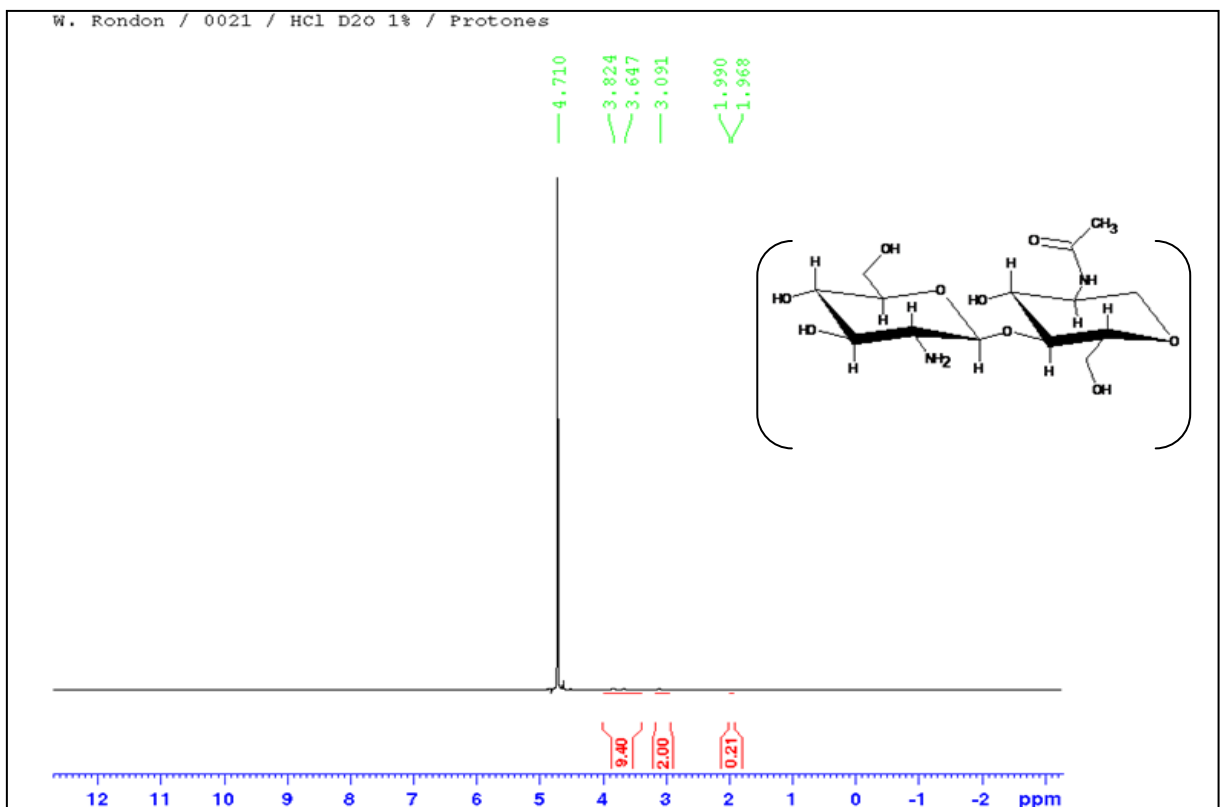


Figura 24. Espectro RMN H-1 del Q-2 en D₂O/HCl 1%.

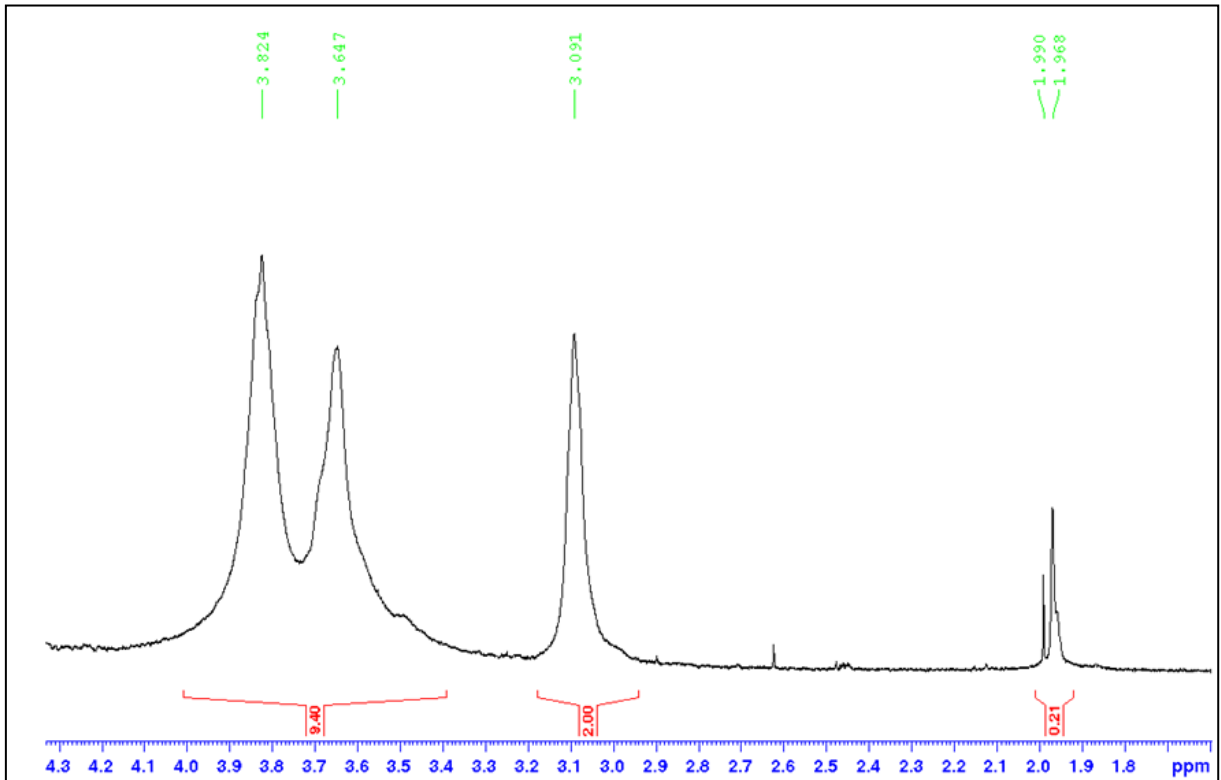


Figura 25. Ampliación del espectro RMN H-1 del Q-2.

Además, una propiedad importante del quitosano es el grado de acetilación el cual puede calcularse empleando la relación entre el área de la señal del protón del grupo metilo en las unidades de N-acetilglucosamina (A_{CH_3}) y el área del protón del C-2 en las unidades de N-glucosamina (A_{H-2}), según la ecuación:

$$DA = (A_{CH_3} / 3 A_{H-2}) * 100$$

El cálculo de áreas para cada señal (A_{CH_3} , A_{H-2}) se realizó manualmente ($\text{Área} = B \cdot h / 2$) a partir del espectro RMN H-1 que se observa en la Figura 25, obteniendo el grado de acetilación (GA), que se muestra en la Tabla 9. Adicionalmente, se muestran los desplazamientos químicos de los protones del quitosano empleando D_2O / HCl 1%, como solvente.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de los protones del Quitosano 2 (Q-2) en D₂O/ HCl 1%.

Desplazamientos químicos en (δ) ppm

H-2	H3-H6	CH ₃	GA%
3,09	3,65	1,99	7,5

A partir de los datos obtenidos en la Tabla 9 se puede observar que existe aproximadamente un 7,5 % de unidades de acetilglucosamina en la estructura del Q-2 este grado de acetilación (GA) es restado al 100% de acetilación y se obtiene el grado de desacetilación (GDA) del quitosano, es decir, el porcentaje de grupos amino presentes en su estructura, por lo tanto:

$$\text{GDA} = 100 - \text{GA}$$

$$\text{GDA} = 100 - 7,5 = 92,5 \%$$

Estos resultados indican que bajo las condiciones de trabajo empleadas para las muestras de quitina procesadas se puede obtener un quitosano con más de un 70% de grupos amino en su estructura, lo cual resulta en un producto ampliamente interesante para realizar las subsecuentes modificaciones sintéticas. Por otro lado, se realizó el cálculo del grado de desacetilación (GDA) según el método propuesto por Brugnerotto y col. ⁽⁹¹⁾, en donde se emplea la relación entre el área de la banda de absorción de 1420 cm⁻¹ (A₁₄₂₀, grupos C-H) y 1320 cm⁻¹ (A₁₃₂₀, grupos amida III), mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{A_{1320}/A_{1420} = 0,3822 + 0,03133DA}$$

Donde DA es el grado de acetilación. Para ello se empleó el espectro FT-IR del Q-2 y se realizó el cálculo de las áreas correspondientes a las bandas de absorción en 1320 cm⁻¹ y 1420 cm⁻¹ respectivamente, las cuales son señaladas en una ampliación del espectro que se muestra a continuación en la Figura 26:

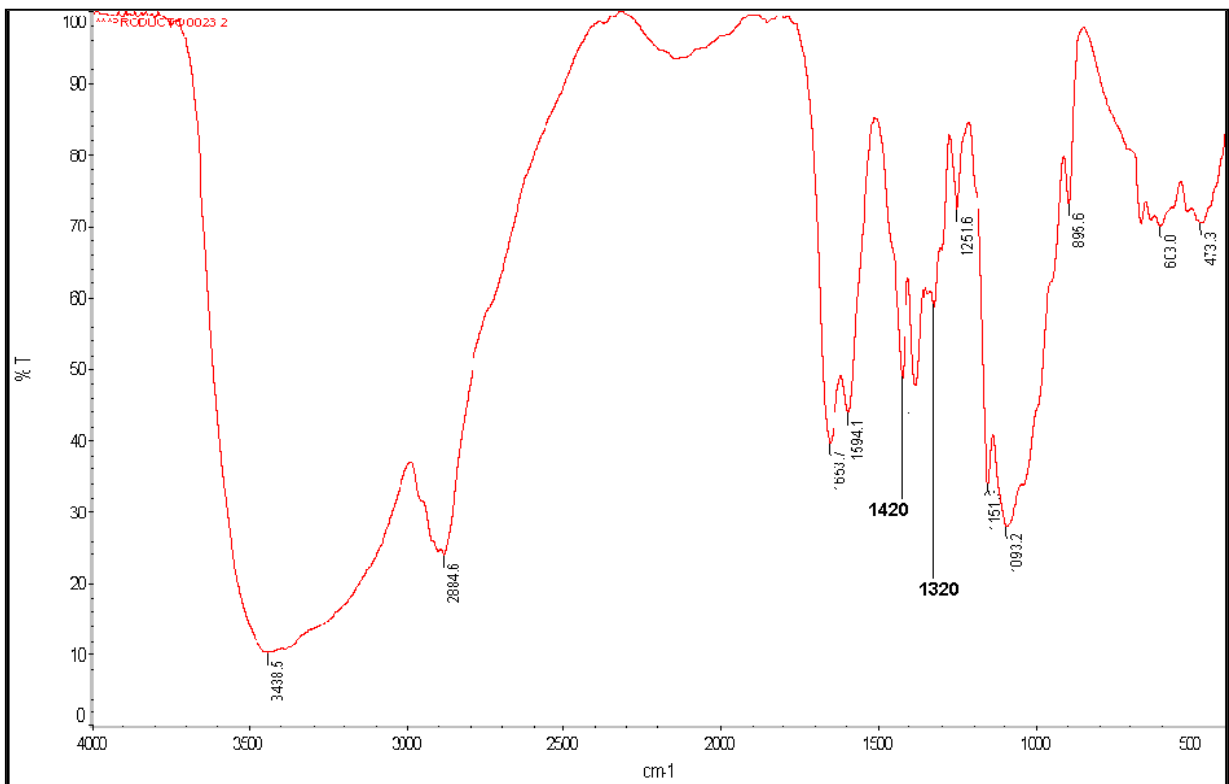


Figura 26. Ampliación del espectro FT-IR del Q-2.

Al realizar el cálculo manual de las áreas se obtuvo un valor aproximado de 0,5 para la relación entre A_{1320}/A_{1420} . Este valor fue sustituido en la ecuación anterior, y mediante las relaciones correspondientes se obtuvo un grado de acetilación por encima del 95 %, similar al obtenido al utilizar el espectro de protones. Como se se menciona anteriormente, el GDA constituye una propiedad importante del polímero, a fin de evaluar su funcionalidad y desempeño en los diversos campos donde es empleado.

6.3 Modificación Química del Quitosano.

El esquema de modificación sintética planteado inicialmente se muestra en la Figura 13, en donde se propone la formación de derivados del quitosano por modificación química mediante formación de base de Schiff con aldehídos aromáticos y reacciones de diazotación empleando quinolinas como agentes quelantes. Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo fue necesario realizar el proceso de desacetilación varias veces obteniendo cuatro quitosanos diferentes como se indico en la sección 6.2, en donde por la poca cantidad de Q-1 se emplearon el Q-2, Q-3, y Q-4 en la modificación sintética inicial del tipo Base de Schiff en donde además de piperonal, se empleo benzaldehído, vainillina y 4-nitrobenzaldehído, así como, el ensayo de acilación empleando cloruro de p-nitrobenzoilo como reactivo. Los resultados para cada aldehído se muestran a continuación:

6.3.1 Formación de Base de Schiff de quitosano con piperonal.

La reacción de formación de la base de Schiff de quitosano con aldehídos aromáticos es catalizada por ácidos y se lleva a cabo en dos etapas. La primera involucra la adición de la amina nucleofílica del quitosano al carbono carbonílico del aldehído aromático, seguida de la pérdida de un protón por parte del nitrógeno y la protonación del oxígeno del aldehído. La segunda etapa conlleva a una reacción de eliminación en donde se pierde el grupo OH en forma de agua para generar la imina correspondiente la cual contiene al grupo C=N⁽⁹⁸⁾. Esta reacción de adición – eliminación es fuertemente dependiente del pH del medio, ya que, a pH muy ácido la amina se encuentra protonada perdiendo su nucleofilicidad, por lo cual se disminuye la velocidad de la reacción y se puede eliminar a la amina como nucleófilo. Por esta razón, se conoce según la literatura que existe un pH óptimo entre 4-5 en donde la velocidad de reacción es máxima y la amina se encuentra parcialmente protonada y se inicia la adición de los grupos amino al grupo carbonilo del aldehído.⁽⁹⁹⁾

La síntesis de la base de Schiff de Quitosano con piperonal (BSQ-P) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Dos Santos y col. ⁽⁸⁶⁾ y Simionatto y col. ⁽⁸⁷⁾ en donde se observó que al mezclar el Q-2 con CH₃COOH 2% se formó una solución gelatinosa transparente. Posteriormente al añadir la solución metanólica de piperonal y dejar en agitación el gel pasaba de ser transparente a ser de color blanco. Este gel se colocó en el rotavapor y se observó que a medida que el solvente se evaporaba el gel se iba oscureciendo, pasando de blanco a un color amarillo pálido. Este residuo sólido se lavo varias veces con etanol colocándose finalmente de un color grisáceo en el sólido seco con un aspecto más duro, se pesó obteniendo 0,4619g para un rendimiento del 92% en función de la cantidad de quitosano empleado. La estructura propuesta se muestra en la Figura 27. La comparación del espectro FT-IR del Q-2 y del producto de reacción de quitosano con piperonal se muestra en las Figuras 28 a) y 28 b) respectivamente.

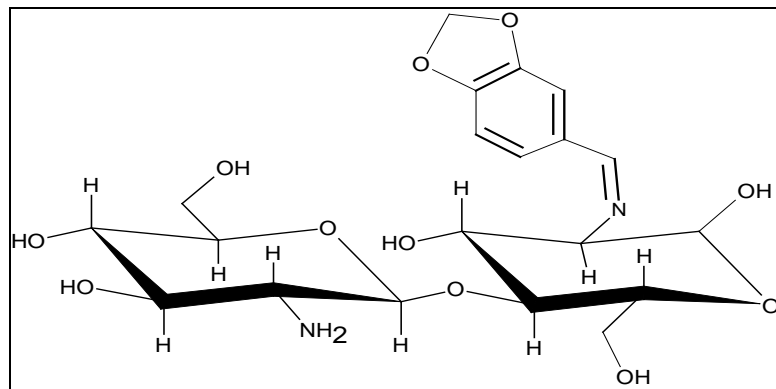


Figura 27. Estructura propuesta para el producto de la reacción entre piperonal y quitosano (BSQ-P).

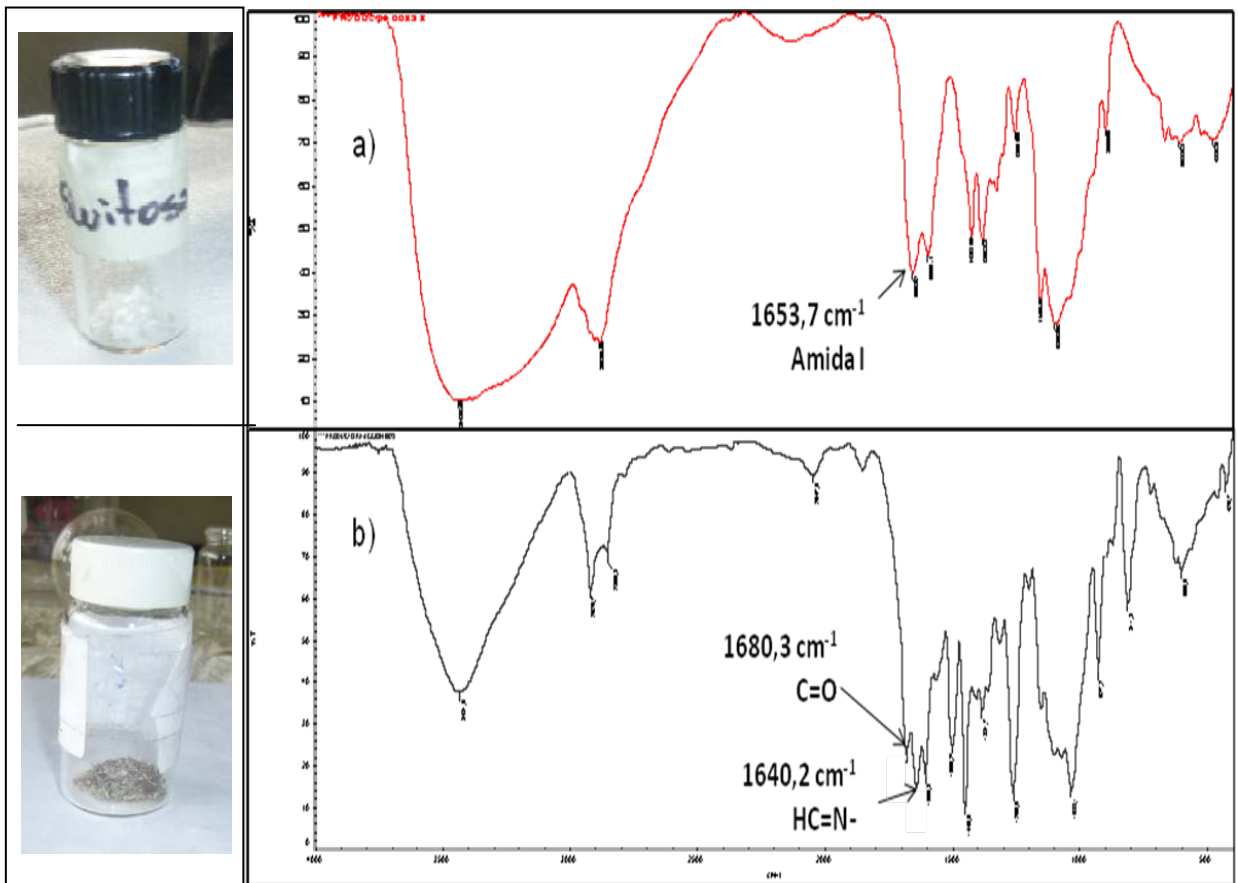


Figura 28. Espectro FT-IR: a) Q- 2, b) BSQ-P.

En la Figuras 28 a) y 28 b) se observa el espectro FT-IR del Q-2 y el obtenido para la BSQ-P respectivamente. En la Figura 28 b) (Anexos 7) se pueden observar las bandas características de los grupos -OH y -N-H libres presentes también en el quitosano, así como la bandas correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del enlace C-H entre $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$. Así mismo, se puede apreciar la aparición de una banda en $1640,2\text{ cm}^{-1}$ que puede ser atribuida a la formación del enlace HC=NR del grupo imino. En $1606,3\text{ cm}^{-1}$ vibraciones correspondientes al estiramiento del enlace C=C en el anillo aromático del aldehído, así como las vibraciones de deformación del enlace C-H del anillo aromático entre $700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, los cuales no se aprecian en el espectro del quitosano. Por otro lado, se evidencia la presencia de restos de aldehído libre en el producto por la aparición del pico de absorción en 1680 cm^{-1} , por lo cual, a pesar que se evidencia la formación de la

base de Schiff de quitosano con piperonal es necesario evaluar soluciones de menor concentración del aldehído para lograr con los lavados correspondientes una remoción más efectiva de este en el producto final.

En la Figura 29 se muestra el espectro RMN H-1 obtenido para el producto de reacción entre el Q-2 y el piperonal (Anexos 8), así como, en la Figura 30 se muestra el espectro RMN H-1 del aldehído de partida 8 (Anexos 9).

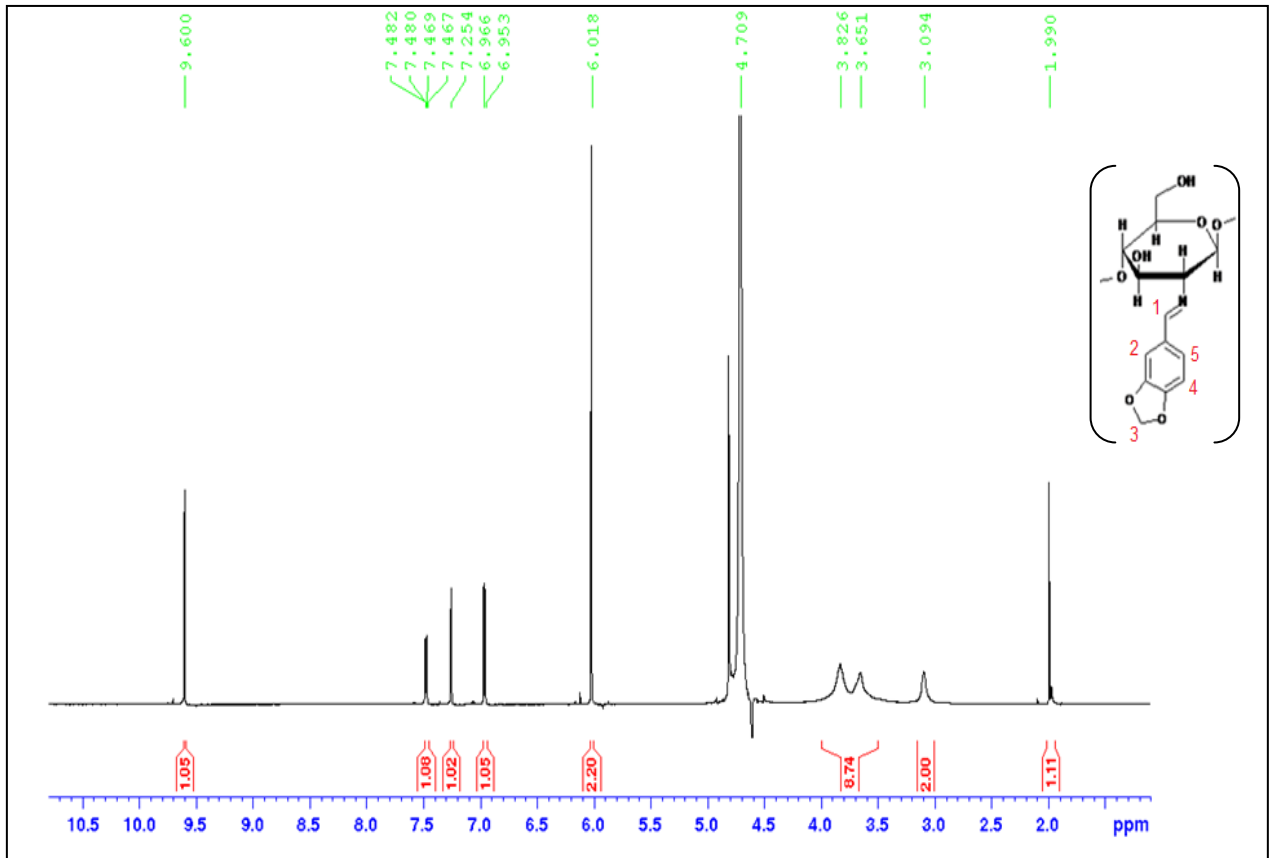


Figura 29. Espectro RMN H-1 de la BSQ-P.

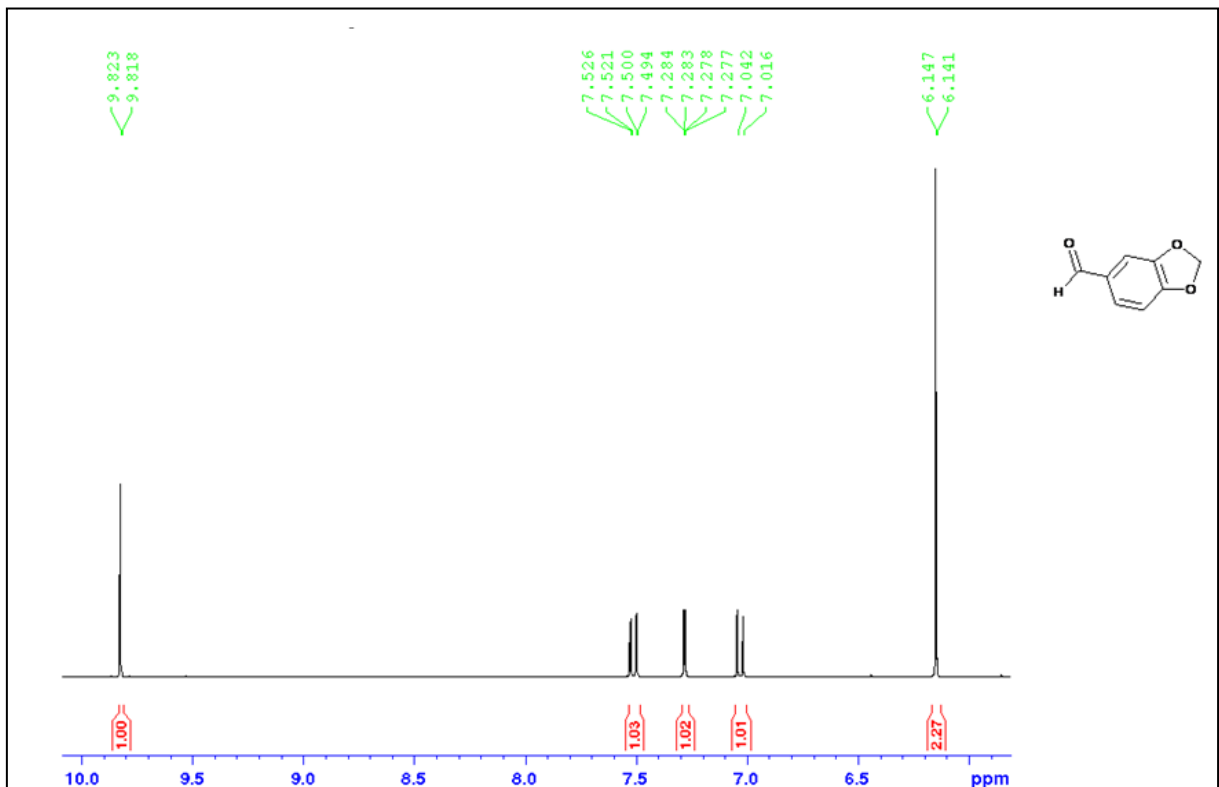


Figura 30. Espectro RMN H-1 del piperonal/ acetona.

En la Figura 29 se muestra el espectro RMN H-1 de la BSQ-P empleando como solvente D₂O/HCl 1%. En la región que se observa entre 2-4,7 ppm se observan las señales características de la estructura del quitosano, en donde la señal en 1,99 ppm corresponde a los hidrógenos del grupo metilo en las unidades de N-acetilglucosamina, entre 3-3,8 ppm se obtiene las señales para los hidrógenos H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6' de las unidades de N-acetilglucosamina y glucosamina respectivamente. Adicionalmente, se observa un singlete ancho en 4,7 ppm, el cual pueden asignarse al protón anomérico H-1 en las unidades de N-acetilglucosamina solapado a su vez con el protón correspondiente al solvente. El espectro a campo bajo muestra las señales características de la estructura aromática del piperonal, se observa así un singlete en 6,01 ppm que integra para dos protones asignado al grupo metilendioxi. Se observa también para el protón designado como H-4 un doblete en 6,9 ppm con una constante de acoplamiento de 8 Hz, debido al acoplamiento orto con el protón H-5. Así mismo, el protón H-5 se observa como un doblete de doblete (d,d) en 7,4 ppm debido al acoplamiento orto con el H-4 y meta

con H-2 con constantes de acoplamiento de 7,8 Hz. Adicionalmente, se observa un singlete en 9,6 ppm el cual puede ser atribuido tanto al protón del grupo imino (proton H-1), como al protón del aldehído libre debido a la contaminación existente de este último en el producto final según lo observado en el espectro FT-IR (banda 1680 cm^{-1} , Figura 28 b). A fin de observar la señal del aldehído libre, se realizó el espectro RMN H-1 del piperonal que se muestra en la Figura 30 observando que este tiene un ligero desplazamiento a campo más bajo cuya señal aparece alrededor de 9,8 ppm. Este desplazamiento entre la señal del aldehído libre y la señal del protón en 9,6 ppm asignado al grupo imino (proton H-1), además de la banda en 1640 cm^{-1} en el espectro FT-IR (Figura 28 b) indican que existió una conversión de estos grupos amino a grupos imino evidenciando la formación del derivado de quitosano con piperonal.

6.3.2. Acilación de la base de Schiff de quitosano con piperonal empleando cloruro de p-nitrobenzoilo.

Según los resultados obtenidos de la caracterización por FT-IR Y RMN H-1 de la base de Schiff de quitosano con piperonal (BSQ-P) en donde se evidenció la presencia del grupo $\text{HC}=\text{NR}$ en la estructura del quitosano, se continuó con el siguiente paso de la modificación sintética planteada inicialmente, la cual consistía en evaluar la acilación del alcohol primario presente en la estructura de la BSQ-P empleando para ello cloruro de p-nitrobenzoilo en DMF como solvente. El sistema se mantuvo bajo reflujo por 48 horas con temperaturas superiores a los $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. A medida que la reacción transcurría se observó que el sólido inicialmente grisáceo se fue oscureciendo hasta tomar un color marrón oscuro en el producto final. Luego de los lavados y el secado correspondiente se observó que este tenía un aspecto más cristalino que el material de partida. El espectro FT-IR del producto obtenido se muestra en la Figura 31 (Anexos 10).

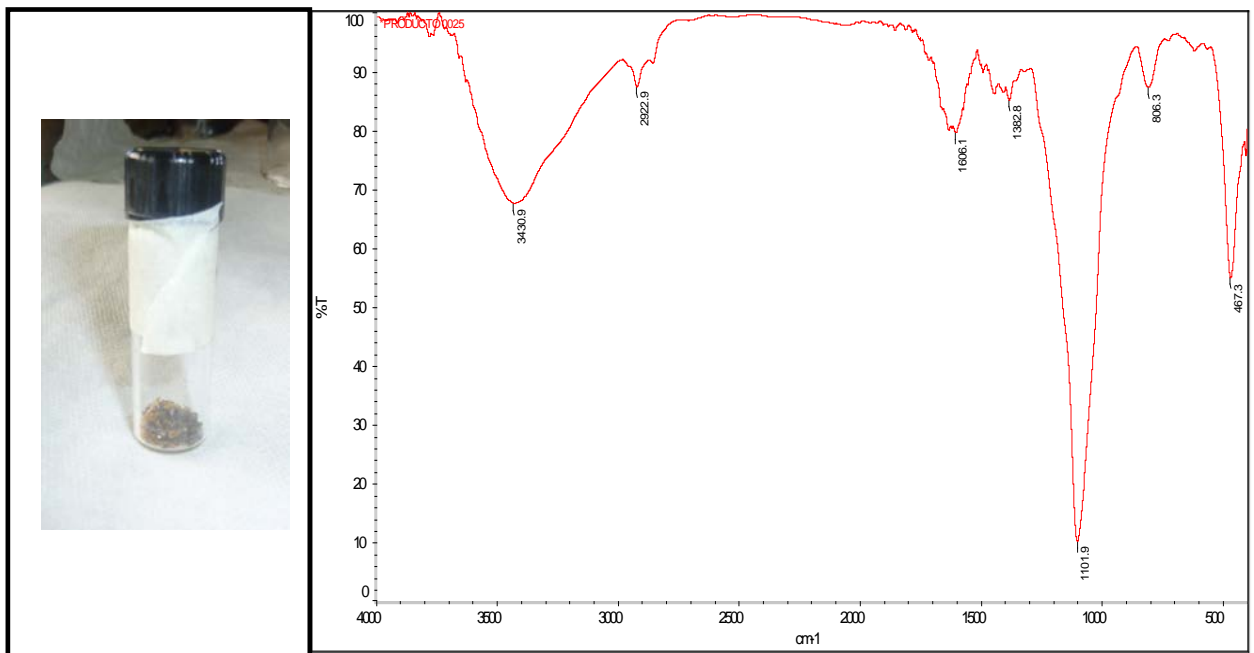


Figura 31. Espectro FT-IR del producto de la reacción de la BSQ-P y cloruro de p-nitrobenzoilo.

En el espectro que se muestra en la Figura 31 se puede apreciar las bandas características de la estructura del quitosano entre $2800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Además se aprecia una banda de fuerte intensidad en 1101 cm^{-1} que puede ser atribuida a las vibraciones de los enlaces glucosídicos C-O-C, no se aprecia ninguna banda de fuerte o media intensidad alrededor de 1700 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones del grupo carbonilo del grupo acilo por lo cual se asume que no se llevo a cabo la acilación de la base de Schiff correspondiente. De la misma forma se realizó el espectro RMN-H (Figura 32) (Anexos 11) y se comparó con el de la BSQ-P (Figura 29) observando las mismas señales descritas para este compuesto sin nuevas señales que describan la presencia del grupo carbonilo en la estructura del biopolímero siendo concluyente que no ocurrió reacción entre el cloruro de p-nitrobenzoilo y la BSQ-P.

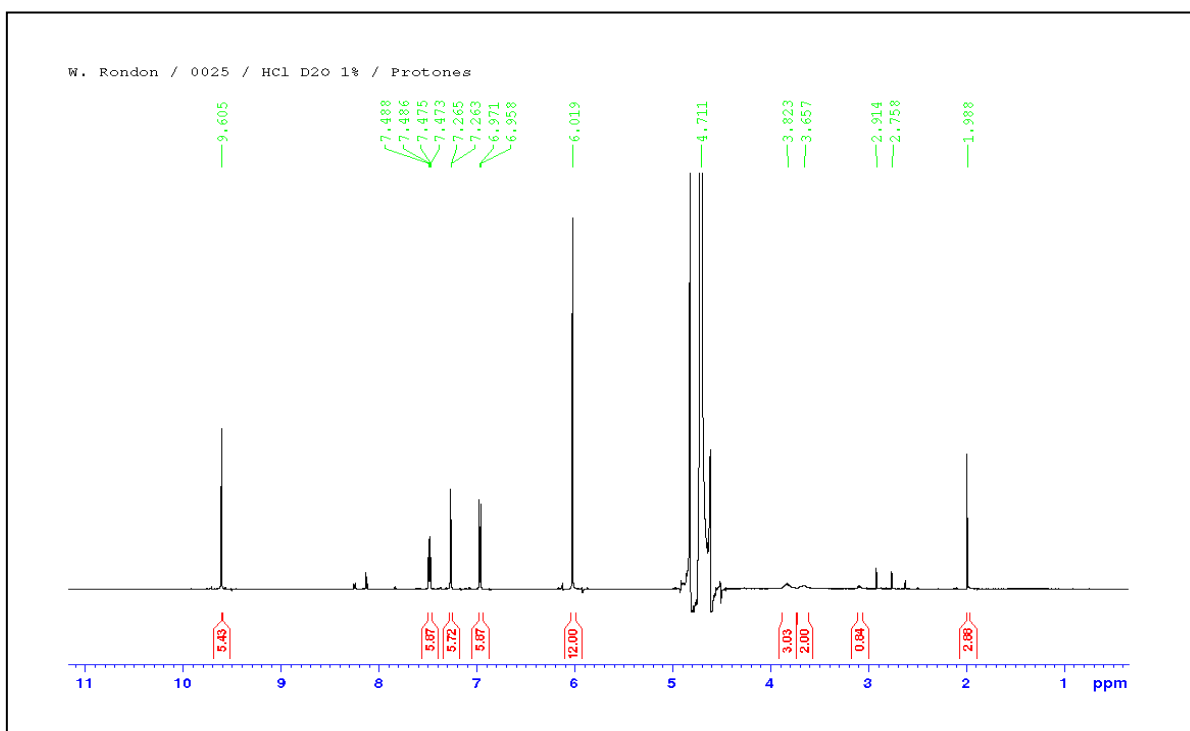


Figura 32. Espectro RMN H-1 del producto de reacción entre BSQ-P y cloruro de p-nitrobenzoilo.

Este procedimiento se repitió dos veces más bajo las mismas condiciones obteniendo los mismos resultados por lo cual se realizó un ensayo empleando piridina como solvente, cuyos resultados tampoco fueron los esperados, por lo cual se planteó la realización de bases de Schiff empleando otros aldehídos tales como benzaldehído, vainillina y p-nitrobenzaldehído.

6.3.3 Formación de Base de Schiff de Quitosano con Benzaldehído (BSQ-Bz).

Al mezclar la solución de quitosano con el benzaldehído en etanol y colocar la mezcla en agitación y en calentamiento a 60°C por 5 horas, se observó que el gel transparente presentaba partículas blancas finamente divididas. Una vez culminado el tiempo de reacción, se dejó enfriar y se lavó con etanol. Posteriormente, y siguiendo la metodología de Dos Santos y col., se colocó la mezcla de reacción en

otro balón y se evaporó 30 min observando que el gel blanco cambiaba a un color amarillo pálido a medida que se evaporaba el solvente. Luego, se realizó un segundo lavado y se colocó en el rotavapor nuevamente obteniendo un sólido de color amarillo más oscuro. Este sólido se colocó en el horno a 50 °C por 24 horas y se pesó obteniendo 0,4050g para un 79% de rendimiento. La estructura propuesta para la BSQ-Bz se muestra en la Figura 33. El espectro IR y RMN-H del producto obtenido se muestran en la Figura 34 y Figura 35 respectivamente. (Anexos 12-13).

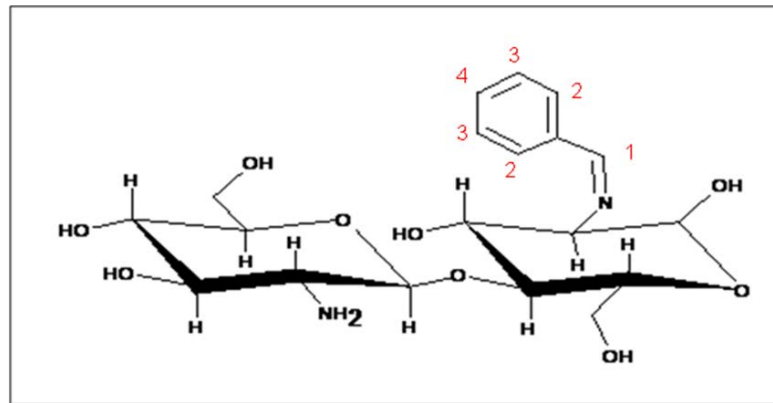


Figura 33. Estructura propuesta para el producto de la reacción entre el benzaldehído y quitosano (BSQ-Bz).

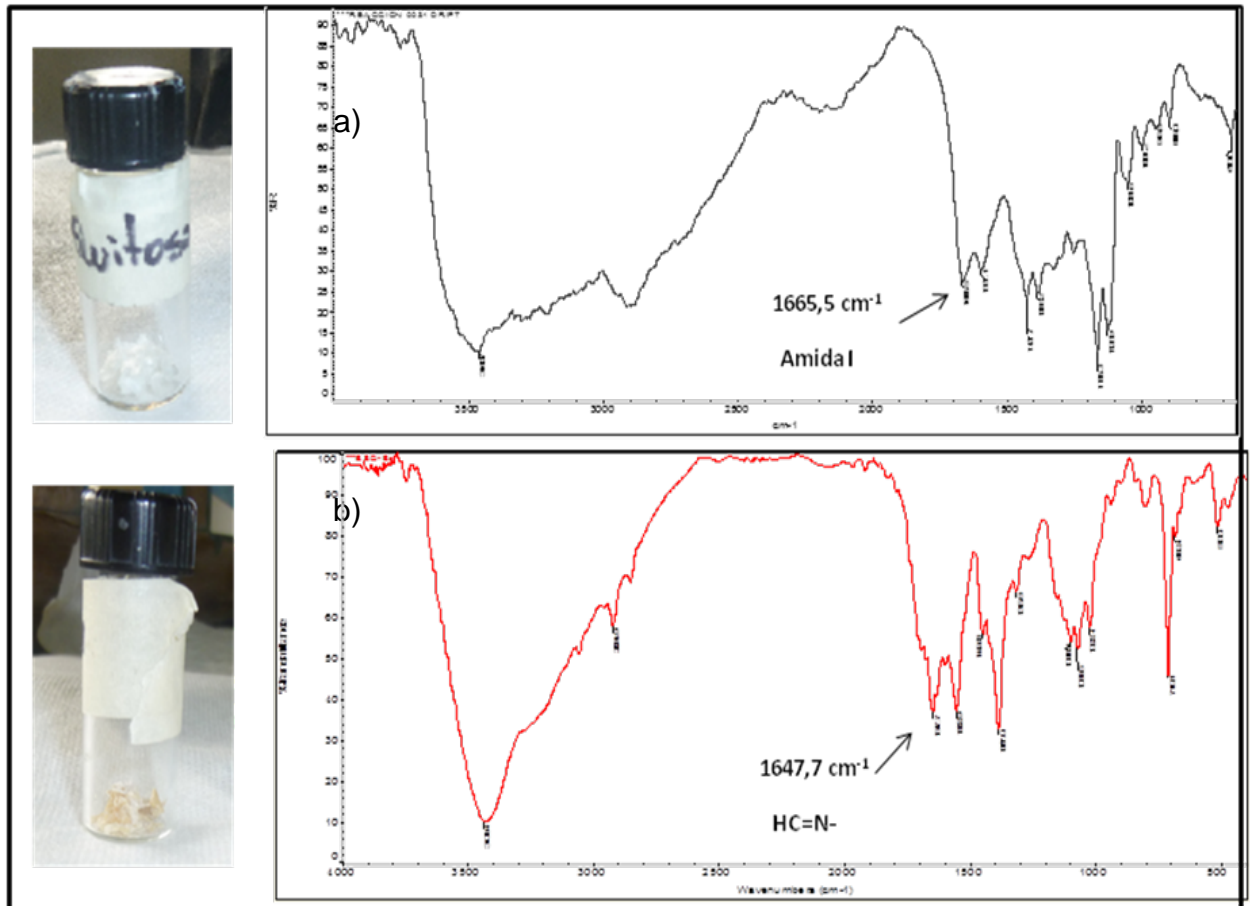


Figura 34. Espectro FT-IR de a) Q-3, b) BSQ-Bz.

En la Figura 34 se puede apreciar la comparación entre los espectros FT-IR del Q-3 y la BSQ-Bz. En la Figura 32 b) se pueden observar las bandas características de los grupos $-OH$ y $-N-H$ libres presentes también en el quitosano, así como la bandas correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del enlace $C-H$ entre $2800-3000\text{ cm}^{-1}$. Así mismo, se puede apreciar la aparición de una banda en $1647,7\text{ cm}^{-1}$ que puede ser atribuida a la formación del enlace $HC=NR$ del grupo imino. Por otro lado es posible observar una banda en 1552 cm^{-1} asociada a la deformación del enlace $C=C$ en el anillo aromático. Entre $1000-1387\text{ cm}^{-1}$ se aprecian bandas agudas correspondientes a las vibraciones de flexión en el plano de los enlaces $C-H$ en el anillo aromático y $C-O$, así como, las vibraciones de flexión fuera del plano de los enlaces $C-H$ en el anillo aromático que pueden apreciarse entre $700-900\text{ cm}^{-1}$.

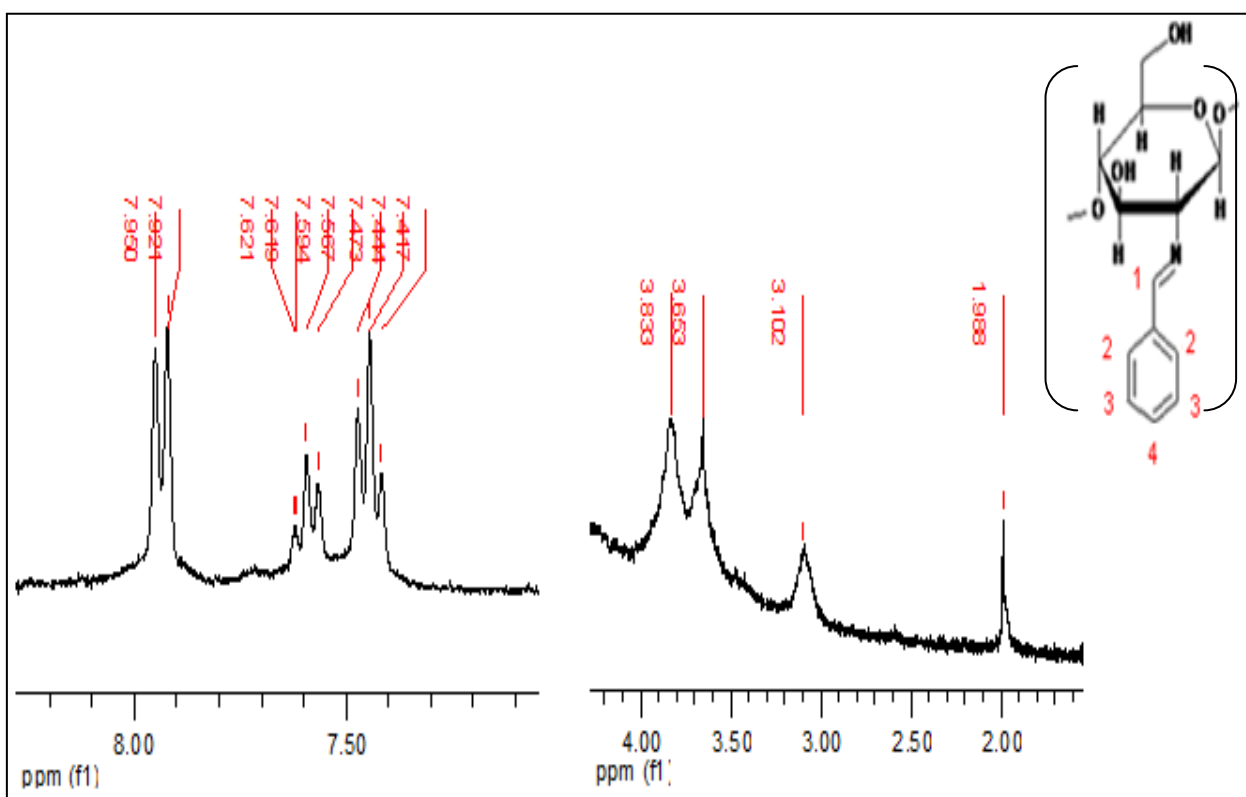


Figura 35. Espectro RMN H-1 de la BSQ-Bz.

En la Figura 35 se muestra el espectro RMN H-1 para la BSQ-Bz, en donde es posible observar las señales características de la estructura del quitosano descritas anteriormente entre 2-4 ppm. Además, es posible observar las señales correspondientes a los protones aromáticos del anillo del benzaldehído entre 7,4 y 8 ppm. Así, se observa un triplete en 7,42 ppm asignados a los protones *meta* a la imina. Así mismo, es posible observar una triplete en 7,62 ppm asociado al protón en posición *para* y un doblete de doblete no resuelto asociado a los protones *orto* al grupo imino. Vale la pena destacar que no pudo observarse la señal correspondiente al protón del grupo imino el cual debería aparecer como un singlete entre 9-10 ppm, lo cual no permitió confirmar si ocurrió la formación efectiva del enlace entre los grupos amino del quitosano y el carbono del aldehído aromático, por lo cual se considero que las condiciones de la toma del espectro debían ser estudiadas más a fondo para otras investigaciones ya que el espectro fue repetido empleando un

equipo distinto obteniéndose el mismo resultado, mostrándose en la Figura 35 el mejor de ellos. Sin embargo, se realizó el espectro del benzaldehído el cual se muestra en la Figura 36 (Anexos 14), a fin de observar la señal del protón en el aldehído libre, el cual aparece en 9,8 ppm aproximadamente.

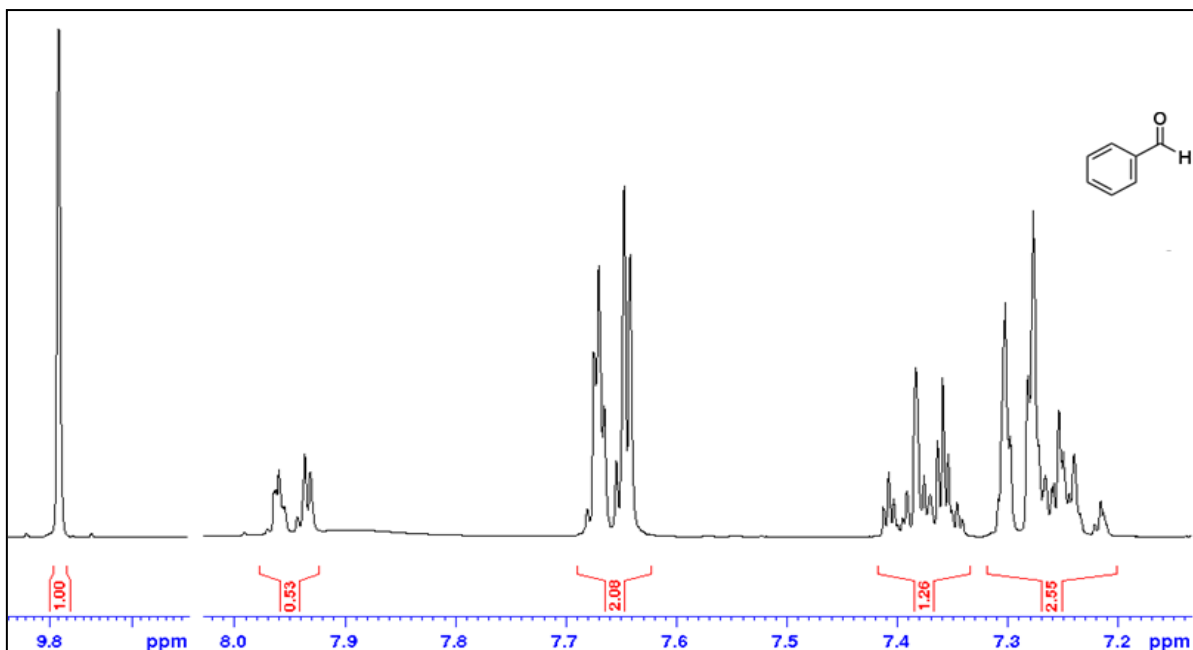


Figura 36. Espectro RMN H-1 del benzaldehído.

6.3.4 Formación de Base de Schiff de Q-3 con Vainillina (BSQ-V).

Al añadir gota a gota y con agitación los 4 mL de 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Vainillina) al Q-3 disuelto en CH_3COOH 2%, se observó que el gel cambió de transparente a un color amarillo a medida que transcurría la reacción. Posteriormente se añadió más etanol a fin de extraer el gel del balón de reacción, este gel se filtró por succión, se lavó varias veces con etanol a fin de eliminar el exceso de aldehído y se colocó en la campana para dejarlo secar a temperatura ambiente observando la formación de una película delgada color amarillo. Esta posteriormente se secó en un horno a 50 °C y se pesó obteniendo 0,2061g para un 98% de rendimiento. La estructura propuesta para la BSQ-V se muestra en la Figura 37. El espectro FT-IR se muestra en la Figura 38 (Anexos 15).

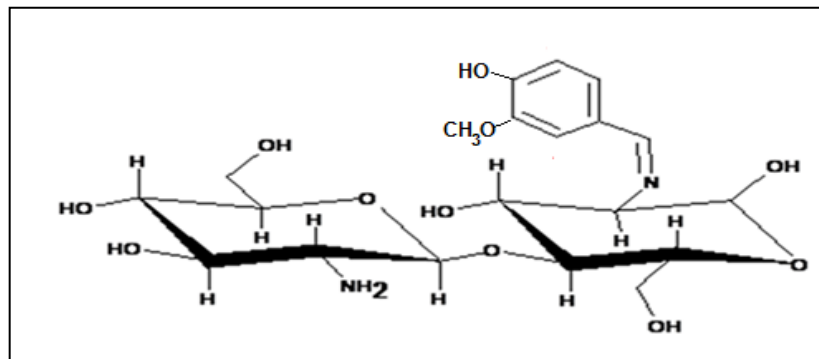


Figura 37. Estructura propuesta para el producto de reacción entre el quitosano y la vainillina (BSQ-V).

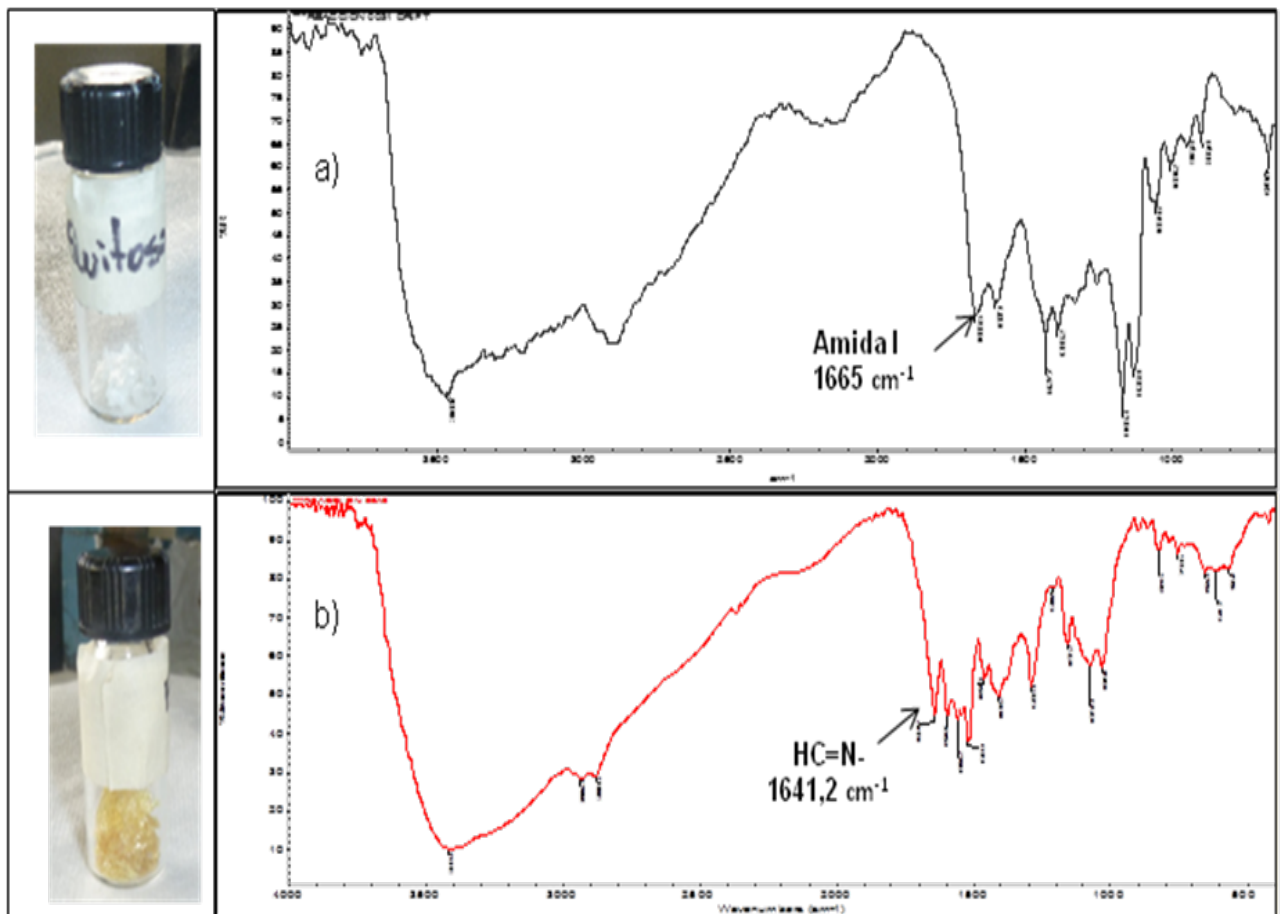


Figura 38. Espectro FT-IR de a) Q-3, b) BSQ-V.

En la Figura 38 se observa la comparación entre los espectros FT-IR del Q-3 y la BSQ-V. En la Figura 38 b) se pueden observar las bandas características de los grupos -OH y -N-H libres presentes también en el quitosano, así como la bandas correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del enlace C-H entre $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$. Así mismo, se puede apreciar la aparición de una banda en $1641,2\text{ cm}^{-1}$ que puede ser atribuida a la formación del enlace HC=NR del grupo imino y la ausencia de la banda amida I alrededor de 1665 cm^{-1} . En $1594,7\text{ cm}^{-1}$ es posible observar la banda de deformación angular de los -N-H de los grupos amino libres y las vibraciones correspondientes al estiramiento del enlace C=C aromático. Adicionalmente, se observa en $1157,2\text{ cm}^{-1}$, la banda asociada al estiramiento C-O-C , así como las vibraciones de flexión fuera del plano del enlace C-H del anillo aromático entre $700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, los cuales no se aprecian en el espectro del quitosano.

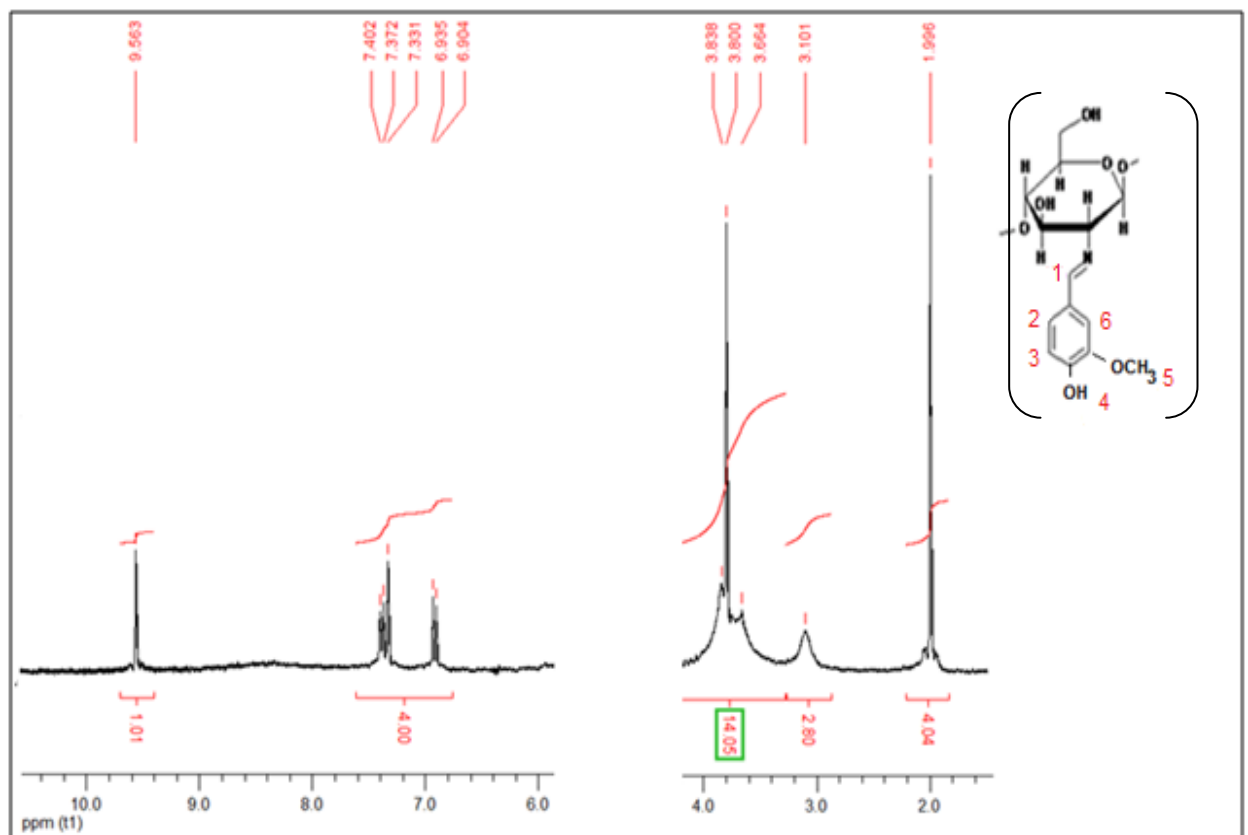


Figura 39. RMN H-1 de la BSQ-V.

El análisis del espectro de protones de la BSQ-V (Figura 39) (Anexos 16), muestra las señales características de la estructura de las aminoglucosas presentes en el resto de quitosano entre 2-4 ppm. Adicionalmente, se observan las señales características de resto aromático perteneciente a la Vainillina como un singlete en 3,9 ppm asignado a los hidrógenos del grupo metoxi (H-5). Así mismo, en 6,9 ppm se observa un doblete con una constante de acoplamiento de 8,3 Hz asociado al protón *orto* al grupo –OH (H-3) y un doblete en 7,4 ppm con un acoplamiento de 8,1 Hz asignado al protón *para* al grupo metoxi (H-4). Así mismo, el protón identificado como (H-6) en la estructura se observa como un doblete meta (d) alrededor de 7,3 ppm (no determinada) por el acoplamiento en meta de este con (H-2). Por último, a campo bajo (9,5 ppm), se observa un singlete (s) asignado al protón del grupo imino de la base de Schiff (H-5) pues al comparar este con el desplazamiento de la señal para el protón del aldehído en la Vainillina (Figura 40) (Anexos 17) se observa que esta aparece desplazada a campo más bajo alrededor de 9,8 ppm, De esta manera, el análisis permite confirmar la formación de la Base de Schiff de Quitosano con Vainillina.

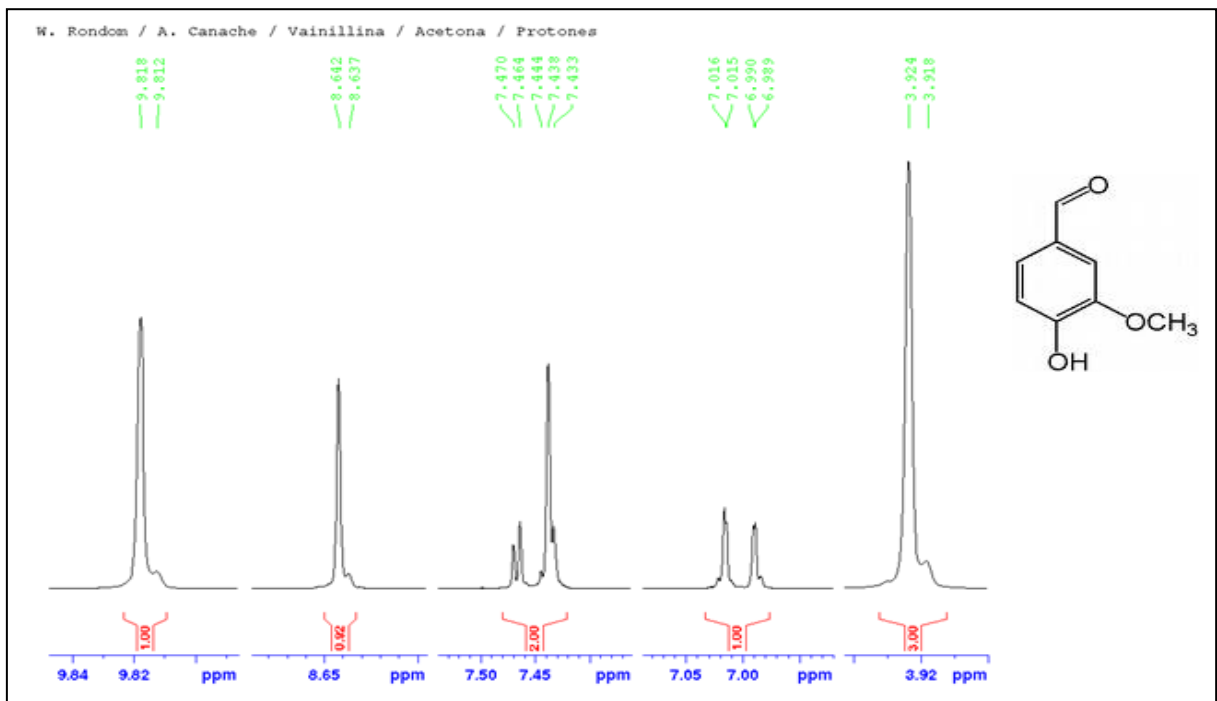


Figura 40. Espectro RMN H-1 de la Vainillina/acetona.

6.3.5 Formación de Base de Schiff de Quitosano con 4-nitrobenzaldehído. (BSQ-4NBz).

Al mezclar la solución de Q-3 con 5 mL de 4-nitrobenzaldehído en etanol y colocar la mezcla en agitación se observó que a medida que transcurría el tiempo el gel paso de ser transparente a blanco; finalizado el tiempo de reacción y luego de realizar los lavados con etanol para eliminar el exceso de aldehído, se dejo en calentamiento a 60°C con agitación y se lavó nuevamente con etanol observando la formación de gránulos gelatinosos de color amarillo pálido, los cuales una vez secos se pesaron obteniendo 0,1034g para un 67% de rendimiento.

Al repetir nuevamente el procedimiento con mayor cantidad de los reactivos de partida empleando una solución de Q-4 en acido acético 2% se observó la formación del gel blanco mencionado anteriormente el cual se colocó a secar a temperatura ambiente en una capsula de petri a fin de formar una película la cual se corto en pequeños trozos y se lavó con etanol y se dejo secar observando que el sólido tomo un color amarillo más oscuro obteniendo 2,5270g para un % 92 de rendimiento. La estructura propuesta para la BSQ-4NBz se muestra en la Figura 41. El espectro IR y RMN-H del producto obtenido se muestran en las Figuras 42 y Figura 43, respectivamente. (Anexos 18-19).

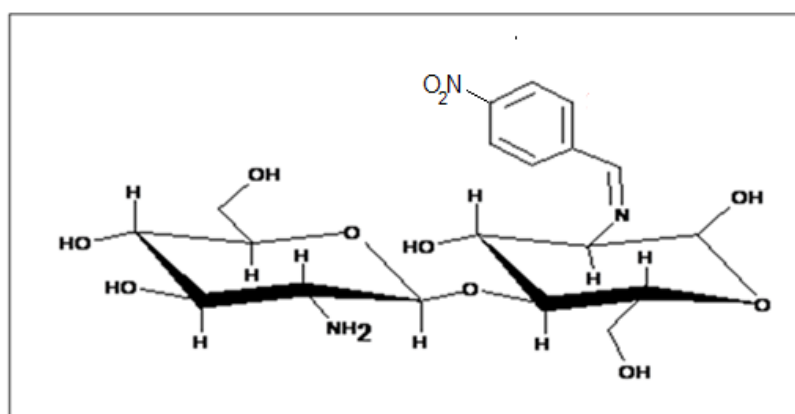


Figura 41. Estructura propuesta para el producto de la reacción entre quitosano y 4-nitrobenzaldehído (BSQ-4NBz).

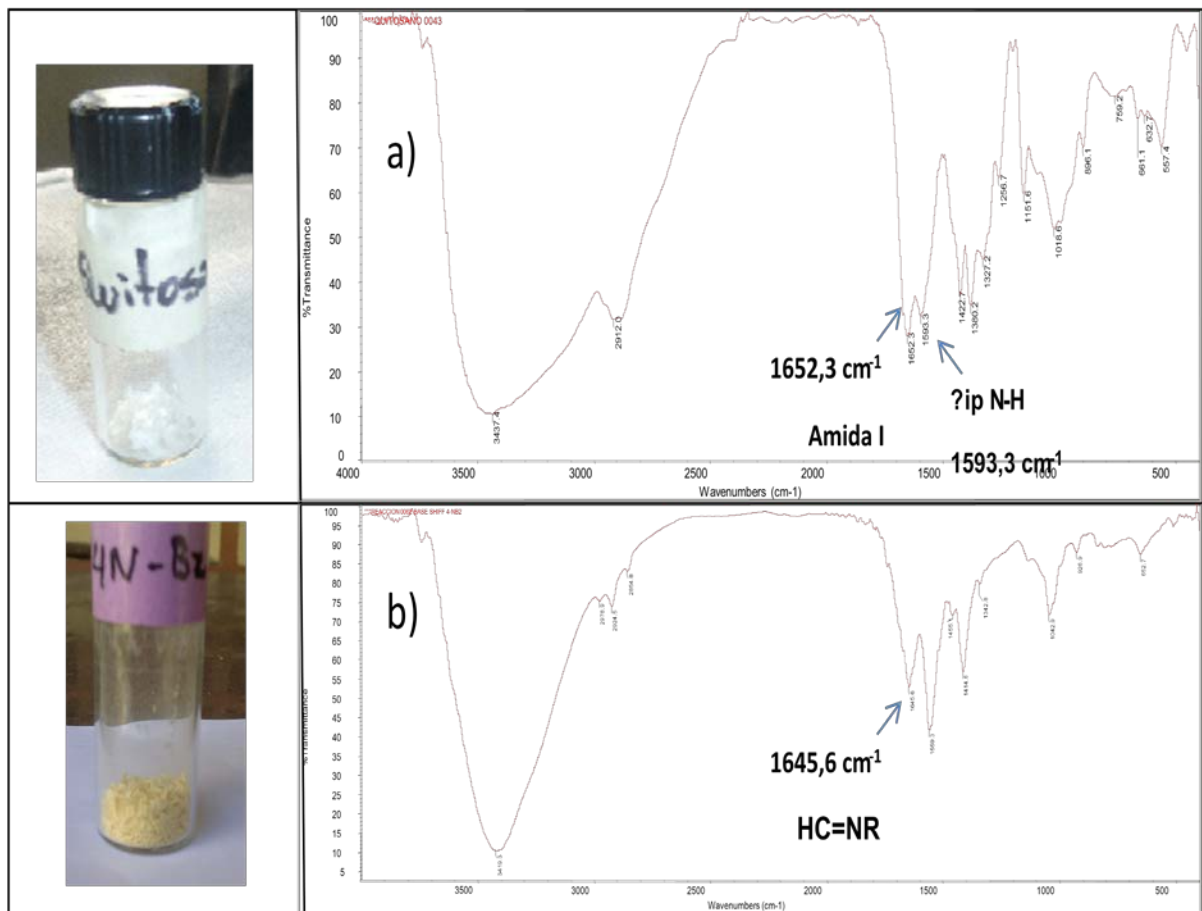


Figura 42. Espectro FT-IR de a) Q-4, b) BSQ-4NBz.

En la Figura 42 se observa la comparación entre los espectros FT-IR del Q-4 y la BSQ-4NBz. En la Figura 42 a) se pueden observar las bandas características de los grupos -OH y -N-H libres presentes en el quitosano, así como la bandas correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del enlace C-H entre 2800-3000 cm⁻¹, las vibraciones de estiramiento del enlace C=O (amida I) en 1652,3 cm⁻¹ y la deformación angular en el plano de los grupos N-H en 1593,3 cm⁻¹ (amida II). En la Figura 42 b) se puede apreciar la aparición de una banda en 1645,6 cm⁻¹ que puede ser atribuida a la formación del enlace C=N del grupo imino, mientras que desaparece la banda en 1652 cm⁻¹ asociada al estiramiento del enlace C=O (amida I) distinguible en el quitosano. Así mismo, es posible observar en 1559,3 cm⁻¹ una banda asociada al estiramiento asimétrico de los grupos -NO₂, en 1414,6 cm⁻¹ se observan las vibraciones de flexión en el plano de los grupos -CH₂, en 1342 cm⁻¹ puede verse una banda asignada al estiramiento simétrico de los grupos -NO₂, así

como el estiramiento C-N y C-O secundario en 1042 cm^{-1} . Por último, es posible observar bandas asociadas a las vibraciones de flexión fuera del plano del enlace C-H del anillo aromático entre $700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, los cuales no se aprecian en el espectro del quitosano.

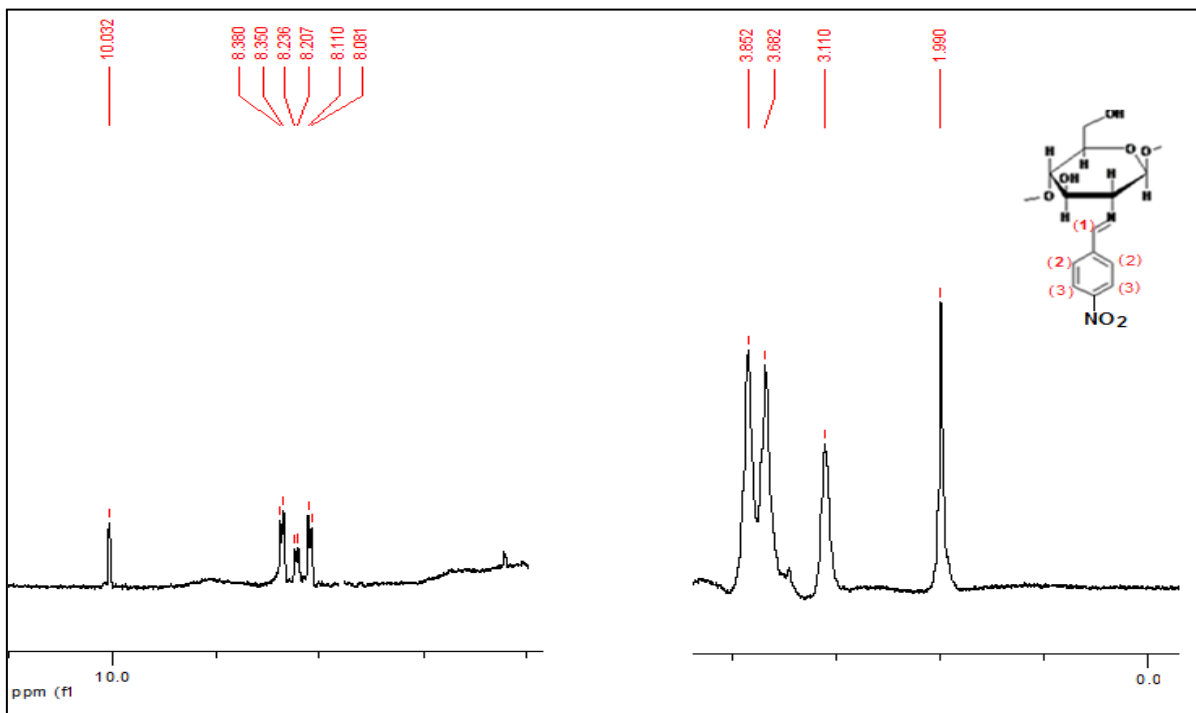


Figura 43. RMN H-1 de la BSQ-4NBz.

En la Figura 43 se muestra el espectro RMN H-1 obtenido para la BSQ-4NBz, en donde es posible observar las señales características del quitosano entre 2-4 ppm, tal como se ha indicado para los otros derivados sintetizados y adicionalmente, se muestran las señales correspondientes a los protones del anillo aromático del p-nitrobenzalimino entre 8,08-8,38 ppm. Así, es posible observar en 8,38 ppm un doblete con constante de acoplamiento de 8,1Hz, asociado a los protones orto al grupo nitro (H-3) que se encuentran a campo más alto por estar más apantallados. Así mismo, se observa un doblete en 8,0 ppm con una constante de 7,8 Hz, correspondiente a los protones orto (H-2) al grupo imino anclado al quitosano. Por último, se observa un singlete (s) en 10 ppm asignado al protón del grupo imino de la base de Schiff (H-1). Sin embargo, al comparar esta señal con la obtenida para el

protón del aldehído libre en el 4-Nitrobenzaldehído (Figura 44, Anexos 20) se observa que esta aparece desplazada a campo más bajo (10,2 ppm) pero muy cercana a la obtenida, sin embargo, como se mencionó anteriormente, el espectro de IR (Figura 42 b) no muestra las bandas características relacionadas con la presencia de aldehído libre en la muestra por lo que se presume que la base de Schiff fue sintetizada exitosamente.

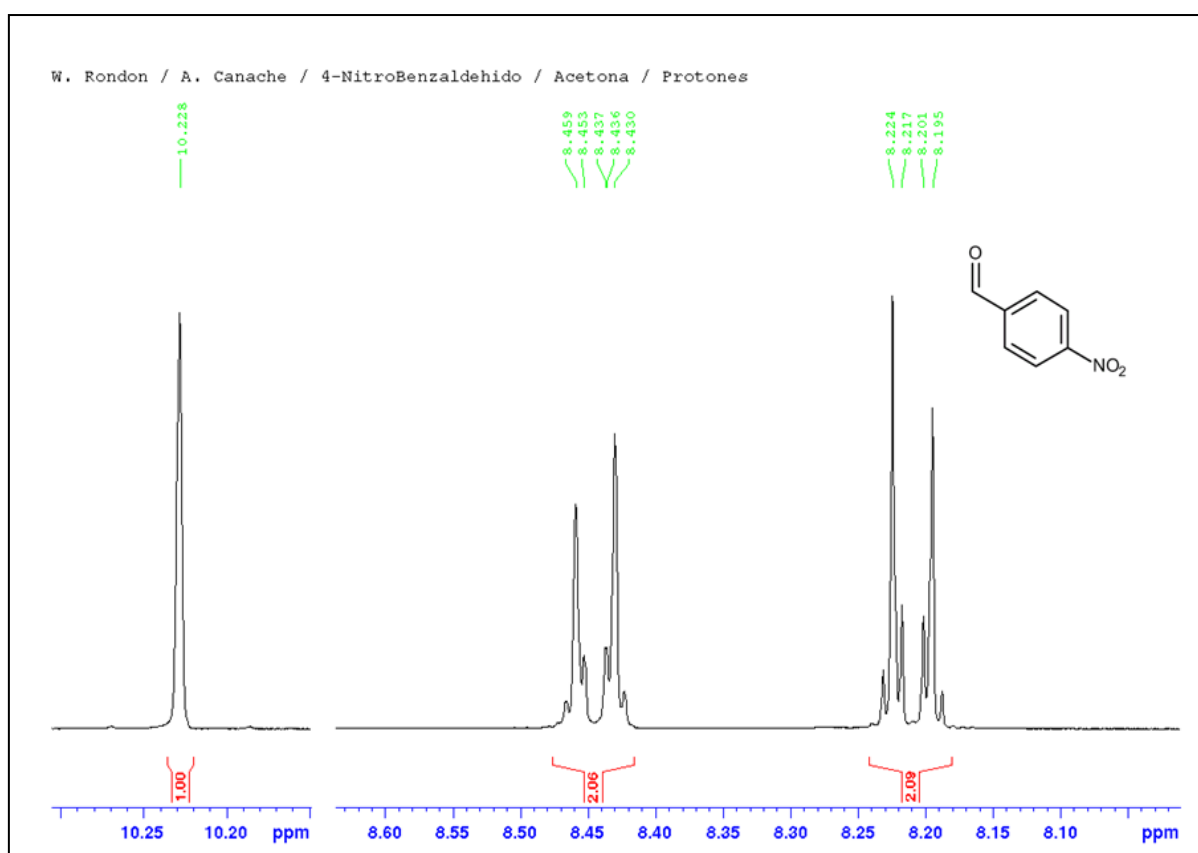


Figura 44. Espectro RMN H-1 del 4-Nitrobenzaldehído/ acetona.

6.3.6 Copulación de la base de Schiff modificada de quitosano 4-nitrobenzaldehído con 8-Hidroxiquinolina.

Partiendo del esquema que se muestra en la Figura 17, se pesó inicialmente 2,3715 g de la BSQ-4NBz y se colocó en reacción con 300 mL de NaS₂O₄ 5% (m/v) controlando la temperatura a (60°C ± 0,1°C) . Una vez culminada la reacción, se observó que el producto seco tomó un color marrón oscuro con un peso de 1,7031g y un 72 % de rendimiento. De este producto de reducción se pesaron 0,9083 g para el siguiente paso de la modificación, el cual consistió en una reacción de diazotación. Así, el sólido se añadió en una fiola con 50 ml de CH₃COOH 10%, manteniendo la mezcla en baño de hielo y posteriormente se le adicionaron 100 ml de solución fría de NaNO₂ al 3% (m/v) en CH₃COOH 10%, manteniendo la mezcla de color amarillo a 0°C por 40 minutos. Posteriormente, se observó que al mezclar una solución de 8-Hidroxiquinolina (8-HQ) al 3% (m/v) en NaOH 5% (m/v), con el gel de quitosano funcionalizado, la solución gelatinosa inicialmente de color amarillo, tomó una coloración naranja-rojiza que fue oscureciéndose al transcurrir el tiempo. La mezcla anterior se dejó secando en una capsula de petri a temperatura ambiente por dos días y se observó que paso a ser un sólido marrón oscuro con un resto de sólidos blancos finamente divididos con un peso de 0,8560g para un 89 % de rendimiento. Las pruebas de solubilidad realizadas a este sólido mostraron que era soluble en agua tornando la solución naranja-rojiza, y con solubilidad parcial en dimetilformamida (DMF) y tetrahidrofurano (THF) como soluciones de color marrón oscuro. La estructura propuesta para el producto de copulación entre la BSQ-4NBz y 8-Hidroxiquinolina (BSQ-8HQ) se muestra en la Figura 45.

El espectro FT-IR (Figura 46)(Anexos 21), así como el contraste entre los espectros FT-IR del producto de partida (BSQ-4NBz), el producto de reducción con NaS₂O₄ (BQS-Red) y el producto final (BSQ-8HQ), se muestran en la Figura 47 (Anexos 22).

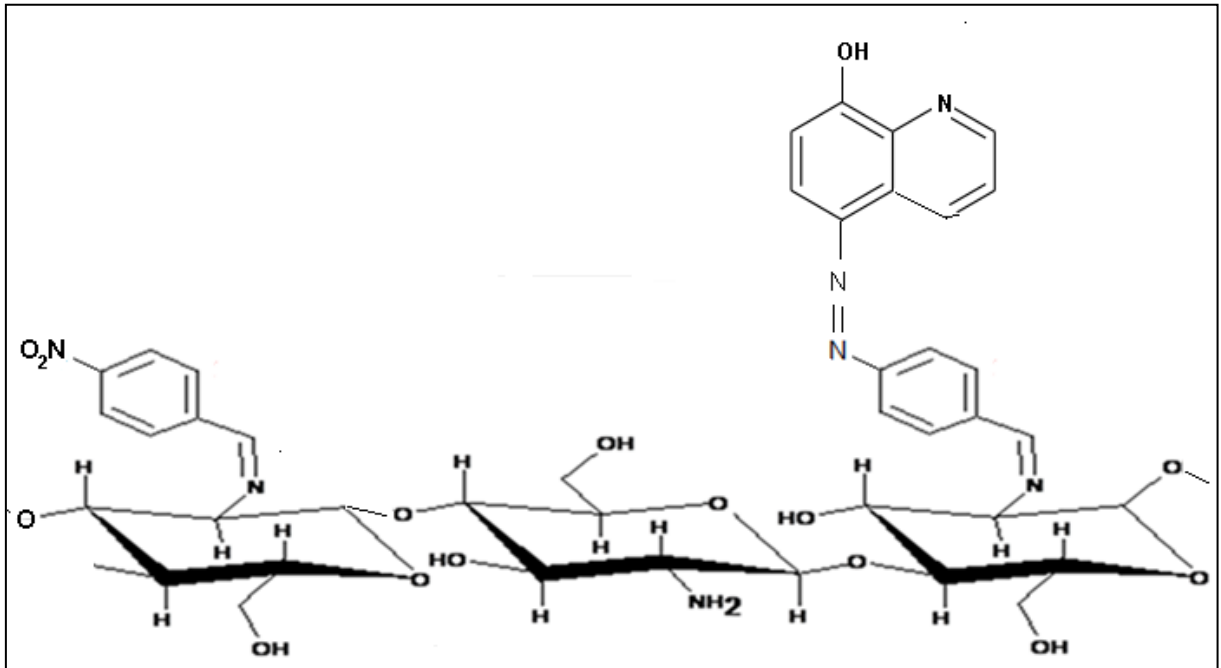


Figura 45. Estructura propuesta para la BSQ-8HQ.

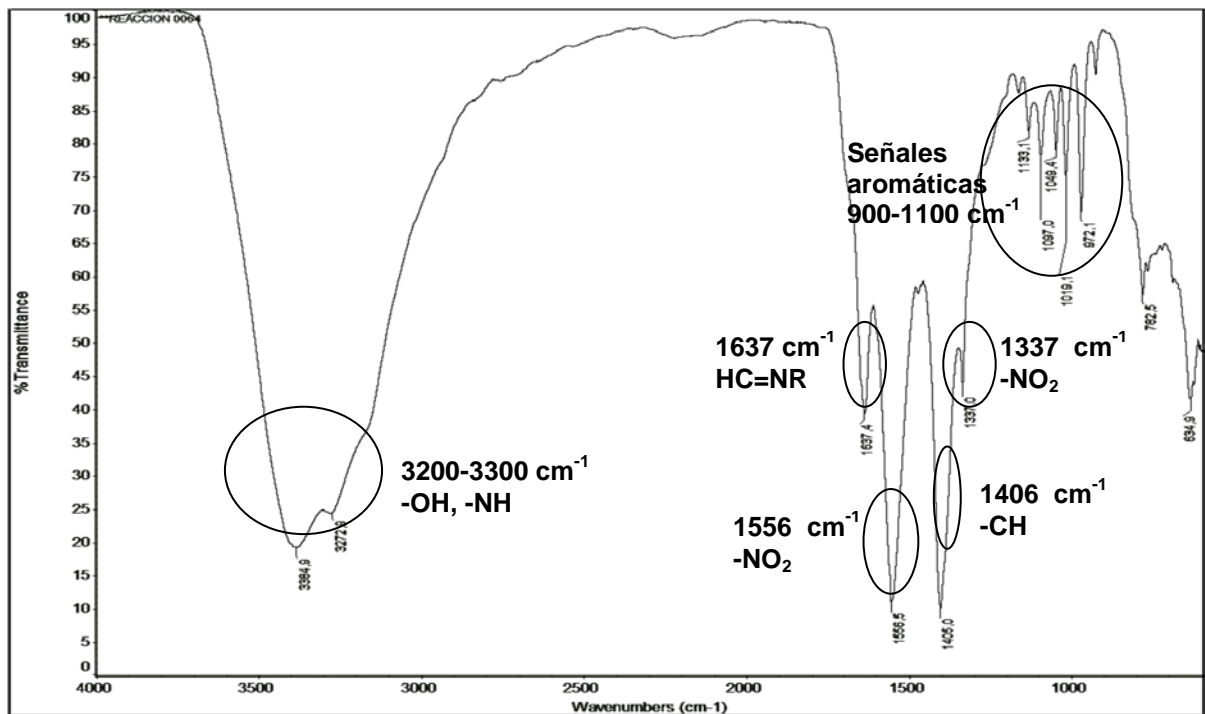


Figura 46. Espectro FT-IR de la BSQ-8HQ.

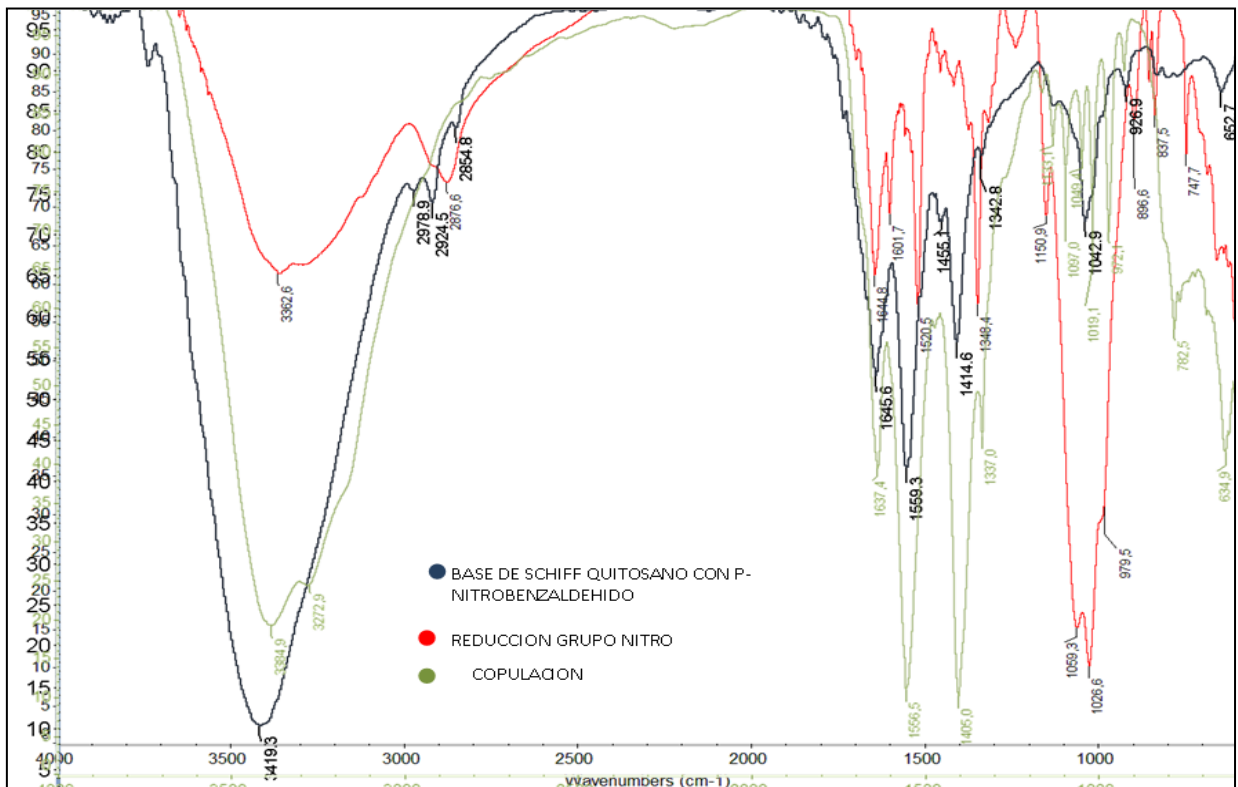


Figura 47. Comparación entre los espectros FT-IR de: el producto de partida (BSQ-4NBz), el producto de reducción con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (BSQ-Red) y el producto final (BSQ-8HQ).

En la Figura 45, se observa la estructura propuesta para el derivado BSQ-8HQ. Así mismo, se propone que una vez que se haya llevado a cabo la reducción efectiva del grupo nitro en la Base de Schiff de Quitosano con p-nitrobenzaldehído se realizaría la formación de la sal de diazonio con la cual se llevaría a cabo la reacción de copulación con la 8-HQ, favorecida en la posición para al grupo hidroxilo. Adicionalmente, en este tipo de reacciones es necesario mantener un pH entre 7- 8 para favorecer la copulación del fenol y no de la especie desprotonada (fenóxido), siendo importante también que la sal de diazonio exista en una concentración apreciable. Como se describió anteriormente, durante el desarrollo experimental se observaron cambios físicos y de color, que dieron indicios de que la reacción podía estar ocurriendo, obteniendo un producto final de apariencia cristalina color marrón oscuro, con amplia solubilidad en agua y en solventes polares (Ver Figura 48). Las

características físicas del compuesto obtenido contrastan con las reportadas por Martins y col., los cuales reportan la obtención del derivado como un producto insoluble en agua de color rojizo. Debido a las características físicas de nuestro material, no fue posible utilizarlo como material de empaque en las minicolumnas analíticas el cual constituye uno de los objetivos en esta investigación.

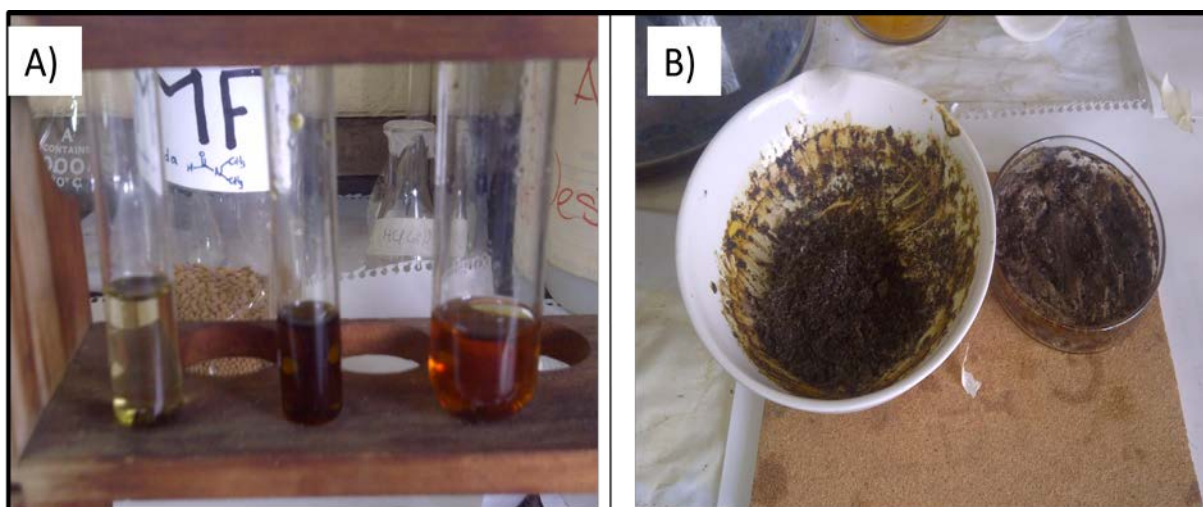


Figura 48. A) Pruebas de solubilidad del producto de copulación obtenido en solventes polares y B) Apariencia física del producto de copulación.

Con el fin de comprobar si la reacción se llevó a cabo efectivamente se realizó el espectro FT-IR mostrado en la Figura 46. Así, es posible observar una banda ancha entre $3272\text{-}3384\text{ cm}^{-1}$, las cuales pueden ser atribuidas a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -NH_2 , en la estructura del quitosano. Por otro lado, al observar la Figura 47 y comparar el espectro de la BSQ-4NBz (azul) y el correspondiente al producto de copulación (verde) se observa que algunas señales coinciden: una de gran intensidad en 1556 cm^{-1} y 1336 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos asimétricos y simétricos del grupo -NO_2 y 1405 cm^{-1} vibraciones de flexión en el plano de los enlaces -CH_2 , todas ellas con un ligero desplazamiento entre ambos espectros, lo cual indica que en el producto final siguen estando presentes grupos nitro que no fueron reducidos por el NaS_2O_4 ya que estas señales aparecen con gran intensidad. Vale la pena destacar que los productos derivados de

la base de Schiff con el p-nitro y la reducción de este, son insolubles en agua, mientras que el producto de copulación no lo es. Además, se observa un aumento de las señales aromáticas entre $900-1100\text{ cm}^{-1}$ las cuales pueden ser atribuidas a las vibraciones de los enlaces -CH y -C-N en el anillo aromático de la 8-HQ, señalando que existe la probabilidad de que pueden existir unidades del polímero donde si haya ocurrido la reacción y la formación del enlace -N=N-. Esta suposición no pudo ser confirmada por otros métodos de caracterización, siendo necesario la evaluación rigurosa de las condiciones de reacción a fin de obtener un derivado que posea en su estructura grupos funcionales que le garanticen tanto estabilidad química como un área superficial mayor y que a su vez mejore la capacidad de adsorción del material y pueda ser evaluado en sistemas de preconcentración en línea de metales traza por FIA-EAA.

En la Tabla 10 se muestra el porcentaje de rendimiento para cada derivado de quitosano a partir del reactivo de partida, con valores entre 67% y 98% dependiendo del producto obtenido.

Tabla 10. Porcentajes de rendimiento para cada derivado de Quitosano.

Reactivo de partida	Cantidad (g)	Derivado de Quitosano	Cantidad (g)	% Rendimiento
Q-2	0,5020	BSQ-P	0,4619	92
Q-3	0,5120	BSQ-Bz	0,4050	79
Q-3	0,2090	BSQ-V	0,2061	98
Q-3	0,1534	BSQ-4NBz	0,1034	67
Q-4	2,7485		2,5270	92
BSQ-4NBz	2,3750	BSQ-RED	1,7031	72
BSQ-RED	0,9083	BSQ-8HQ	0,8065	89

Q-2: Quitosano 2, **Q-3:** Quitosano 3, **Q-4:** Quitosano 4, **BSQ-P:** Base de Schiff de quitosano con piperonal, **BSQ-Bz:** Base de Schiff de quitosano con benzaldehído, **BSQ-V:** Base de Schiff de quitosano con vainillina, **BSQ-4NBz:** Base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído, **BSQ-RED:** Base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído reducida, **BSQ-8HQ:** Base de Schiff de quitosano reducida modificada con 8-hidroxiquinolina.

6.4 Evaluación de los derivados de Quitosano en el sistema FIA-EAA.

Una vez realizada la caracterización de los derivados de Quitosano obtenidos mediante la reacción con aldehídos aromáticos, se procedió a preparar minicolumnas empacadas con estos materiales, y de esta manera evaluar su capacidad como sorbente en la preconcentración de soluciones estándares acuosas de iones Pb^{2+} mediante la formación de complejos con pirrolidintiocarbamato de amonio (APDC) del tipo bidentado cuya estructura se muestra en la Figura 49, empleando la configuración de flujo mostrada en la Figura 18.

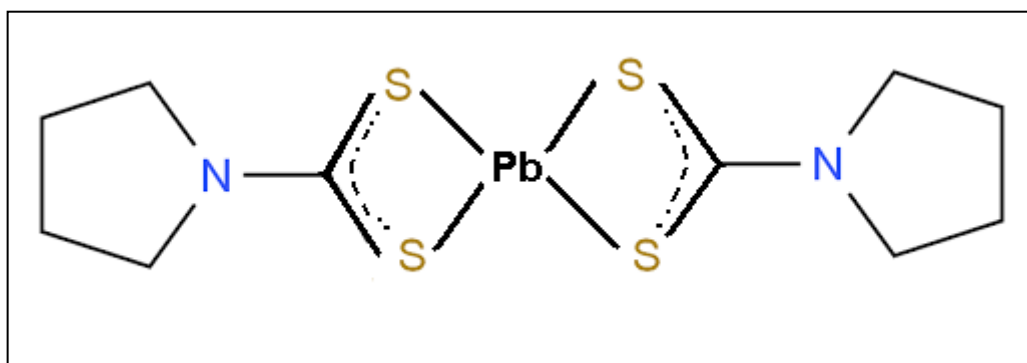


Figura 49. Estructura del complejo formado entre el Plomo y el APDC.

El primer material evaluado fue el codificado como BSQ-V, el cual tiene un aspecto físico de hojuelas cristalinas de color amarillo (Ver Figura 37).

Para la preparación de la minicolumna se pesaron 20 mg del material y esta fue colocada en el sistema, se emplearon concentraciones entre 0-150 ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Pb^{2+} para la preparación de la curva de calibración, cuyas soluciones fueron preconcentradas por un tiempo de 144 segundos (controlado con un cronómetro) durante el cual ingreso al sistema un volumen de 6 ml de muestra. Las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado para cada muestra utilizando las condiciones mostradas en la Tabla 6, donde se registraron las señales obtenidas para un tiempo de elución total del quelato con MIBK de 30 segundos, con la finalidad de obtener diagramas como los mostrados en la Figura 50.

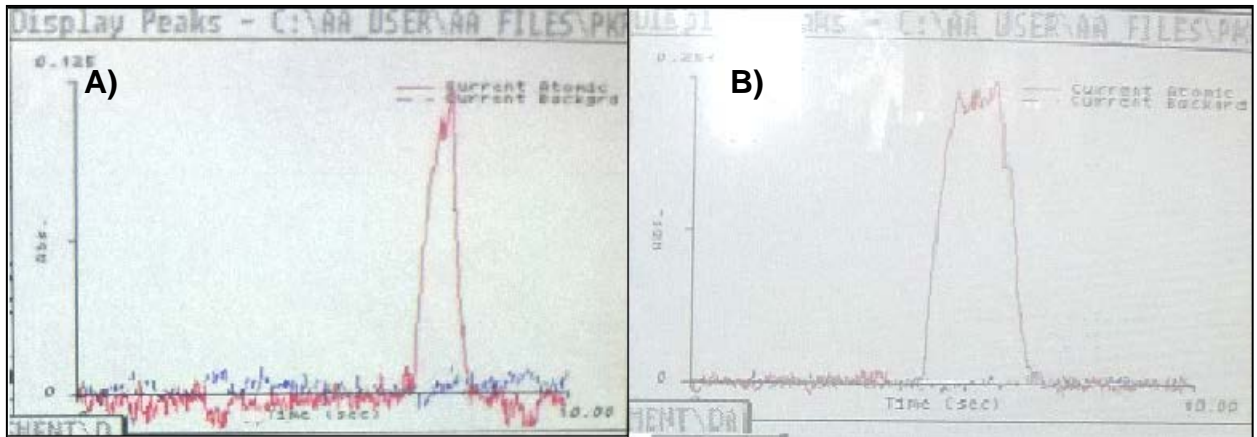


Figura 50. Diagramas obtenidos para A) Bajas concentraciones de muestra (70 ppb) y B) Altas concentraciones de muestra (150 ppb).

Como puede observarse en los diagramas A y B, hay un incremento de la señal analítica conforme aumenta la concentración de Pb^{2+} en la muestra, con valores de absorbancia de 0,125 en A y 0,246 en B, las cuales vienen determinadas como el punto máximo de respuesta instrumental. En este sentido, se observa que las condiciones de trabajo mostradas en la Tabla 6 fueron favorables debido a que se logro obtener una señal transitoria que es reproducible en el tiempo, con una dispersión muy pequeña del analito debido a la simetría y forma del pico.

Se realizó el mismo procedimiento con la BSQ-P (Figura 27), la BSQ- Bz (Figura 33) y BSQ-4NBz (Figura 41). Sin embargo, en el caso de la BSQ-Bz no fue posible realizar la medición debido al hinchamiento y dispersión del material en la minicolumna al ser cargado en el sistema. En este sentido, en la Tabla 11 se muestran las curvas de calibración obtenidas para el resto de los materiales las cuales fueron evaluadas entre 0-150 ($\mu\text{g L}^{-1}$) y 50-150 ($\mu\text{g L}^{-1}$), con la finalidad de observar la linealidad de estas en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla 11. Características de las curvas de calibración obtenidas para cada material.

Material	Cantidad (mg)	Curva Regresión lineal	Coefficiente de determinación (R^2)	Intervalo de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
BSQ-V	20	$A=0,001x-0,025$	0,959	0-150
		$A=0,002x-0,069$	0,997	50-150
BSQ-P	20	$A=0,001x-0,010$	0,981	0-150
		$A=0,001x-0,031$	0,986	50-150
BSQ-4NBz	20	$A=0,001x+0,001$	0,981	0-150
		$A=0,001x-0,006$	0,994	0-130

En las curvas de calibración para BSQ-V y BSQ-P se observa un mejor ajuste lineal en el rango de concentraciones entre 50-150 ($\mu\text{g L}^{-1}$) al comparar los coeficientes de determinación (R^2) con los obtenidos en el rango entre 0-150 ($\mu\text{g L}^{-1}$) como se muestra en la Tabla 11.

En el caso de la BSQ-4NBz a partir de 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ la señal analítica tiene un comportamiento constante, por lo cual se tomaron las concentraciones entre 0-130 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para observar la linealidad observando un mejor ajuste en este rango de concentraciones el cual es menor que el empleado con los otros dos materiales. Este comportamiento causa una disminución en la eficiencia de este material para ser empleado en el empaquetamiento de minicolumnas analíticas al evaluar concentraciones mayores a 130 $\mu\text{g L}^{-1}$, ya que se demuestra que este es el punto de saturación del material. Cuando se comparan los valores de los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos para BSQ-V y BSQ.P (Ver Tabla 11) se observa que en el intervalo de concentración 50-150 ($\mu\text{g L}^{-1}$) la mejor condición de linealidad del

método analítico se obtiene con BSQ-V, con una mejor correspondencia entre los valores de respuesta (Absorbancia) vs concentración.

Los resultados obtenidos indican que existe una relación importante entre la estructura y propiedades químicas de los materiales con la capacidad de adsorción. Esta a su vez, va a depender principalmente de las propiedades del material de partida (Quitosano) y de los grupos funcionales que sean introducidos en la matriz del polímero durante la modificación sintética, los cuales deben favorecer la interacción del material con el complejo metálico formado entre el plomo y el APDC.

Los materiales obtenidos de la reacción de quitosano con cada uno de los aldehídos estudiados (Figura 51) manifestaron un comportamiento diferente en el sistema de inyección en flujo en función de la respuesta analítica observada al ser empleados como material de empaque en las minicolumnas analíticas, lo cual puede deberse principalmente a la influencia de los grupos funcionales que se encuentran unidos directamente al anillo aromático. Podemos aseverar, según los resultados obtenidos que el efecto dador de densidad electrónica que poseen el grupo hidroxilo y el grupo metoxi en la Vainillina parece favorecer la preconcentración de niveles traza de plomo al emplear la BSQ-V, seguida de la BSQ-P y la BQSQ-4NBz, en donde esta última posee un grupo fuertemente atractor como lo es el grupo nitro ($-\text{NO}_2$).

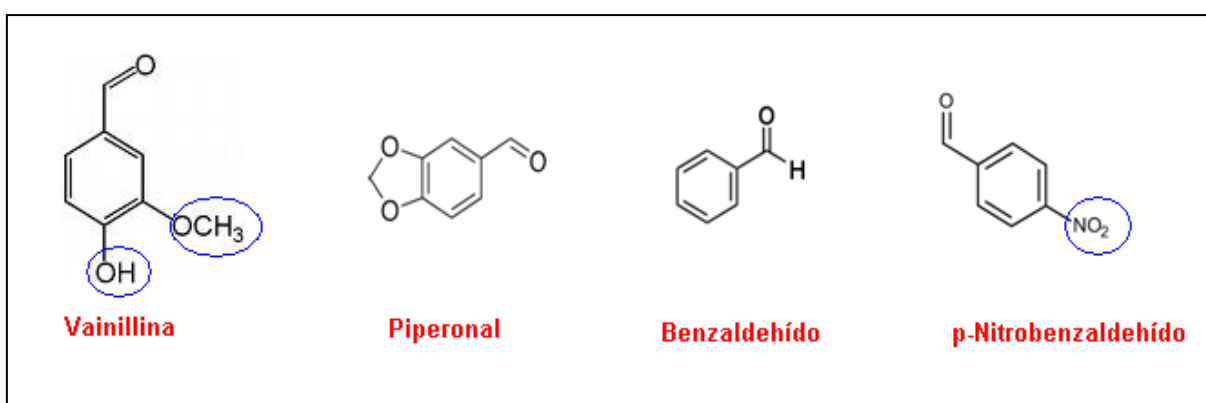


Figura 51. Estructura química de los aldehídos aromáticos empleados en la modificación sintética.

Por su parte, al emplear la BSQ-Bz se observó el hinchamiento y dispersión del material en el solvente por lo cual no pudo ser empleado como material de empaque de las mini columnas analíticas. En las Figuras 52 y 53 se muestran ensayos realizados con cada uno de los materiales en agua, donde se observa este hinchamiento de la BSQ-Bz y como los otros materiales empleados se mantienen depositados al fondo del tubo de ensayo.

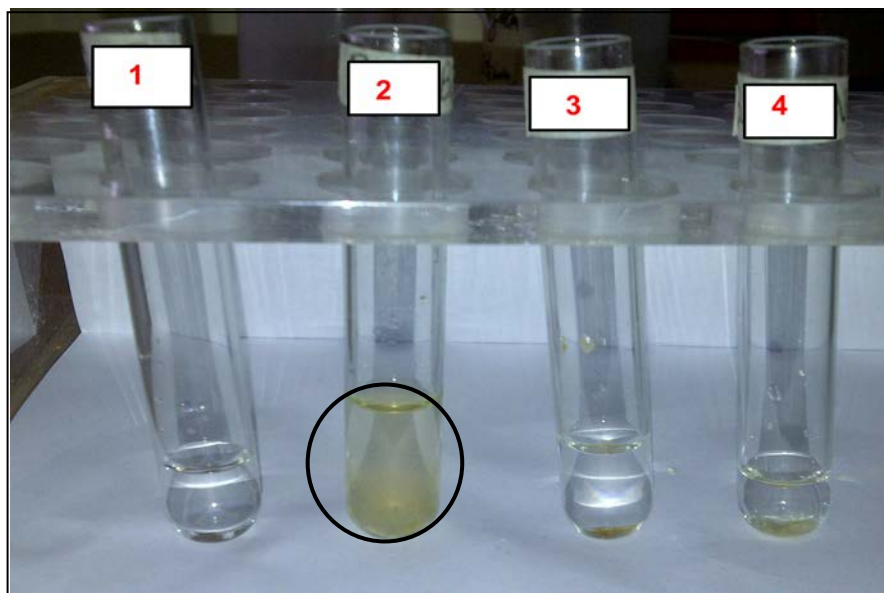


Figura 52. Ensayos de 1) BSQ-P, 2) BSQ-Bz, 3) BSQ-V y 4) BSQ-4NBz en agua.



Figura 53. Hinchamiento de la BSQ-Bz.

La caracterización de la BSQ-Bz por RMN H-1 no permitió confirmar si efectivamente ocurrió la formación del enlace HC=NR entre el quitosano y el benzaldehído. Sin embargo, el espectro IR mostro una señal que fue atribuida a este tipo de enlaces (1647 cm^{-1}) por no estar presente en el espectro FT-IR del quitosano de origen (Ver Figura 34b), por lo cual no se puede garantizar una degradación de la estructura del polímero que haya debilitado las fuerzas intermoleculares en el mismo y pueda ser responsable del hinchamiento del material. En este sentido, resulta interesante evaluar si la composición de la mezcla reaccionante (Quitosano/Aldehído) pudo tener un efecto sobre el carácter hidrofílico del material causando inestabilidad en la estructura con el posterior hinchamiento del gel. Así mismo, se puede considerar modificar las condiciones de reacción (temperatura, tiempo, de reacción, secado del gel) de manera tal de obtener un grado de hinchamiento aceptable y controlado que permita que el material sea evaluado en sistemas de preconcentración en línea de iones metálicos por FIA-EAA.

6.5 Caracterización analítica.

6.5.1 Figuras de merito.

Como se mencionó anteriormente empleando como material de empaque la BSQ-V se obtuvo el mejor comportamiento lineal en el rango de concentraciones estudiado, por lo cual fue el material seleccionado para la evaluación de las figuras de merito del método. Los resultados obtenidos de la caracterización analítica para la determinación de Plomo por absorción directa, así como, los obtenidos para la caracterización analítica del sistema de preconcentración en línea se muestran en la Tabla 12 y Tabla 13 respectivamente.

Tabla 12. Caracterización analítica del sistema para la determinación de Plomo por absorción directa.

Muestra	Rango de Concentración (mg L ⁻¹)	Modelo de regresión lineal	Coefficiente de determinación (R ²)	Sensibilidad (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)
Soluciones estándares de Pb	0-5	A=0,029x +0,001	0,9996	0,03	0,148

A: absorbancia; X. Concentración de Pb (II) en µg·l⁻¹; LD: límite de detección.

Tabla 13. Caracterización analítica del sistema para la preconcentración de Plomo.

Material	Cantidad (mg)	Modelo de regresión lineal	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango lineal (µg L ⁻¹)	Sensibilidad (µg L ⁻¹)	LD (µg L ⁻¹)	FPC	FM (muestra h ⁻¹)	DER %
BSQ-V	20	A=0,002x-0,069	0,9974	50-100	0,002	1,5	69	20	1,3

A: absorbancia; X. Concentración de Pb (II) en µg·l⁻¹; FPC: factor de preconcentración, comparado con la introducción directa al sistema de detección de muestra acuosa (A = 0,029X + 0,001. R² = 0,999) FPC= 35 para BSQ-P y BSQ-4NBz; FM: frecuencia de muestreo; LD: límite de detección; DER: desviación estándar relativa.

Al observar las Tablas 12 y 13, se pueden comparar dos características analíticas fundamentales como lo son la sensibilidad y el límite de detección obtenida por el método de absorción directa y FIA respectivamente. En donde se observa que el sistema de preconcentración en línea por FIA-EAA mucho más sensible ($0,002 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) que el método de determinación de Pb^{2+} por absorción directa ($30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), aumentando hasta 10.000 veces la sensibilidad del analito. En cuanto al límite de detección obtenido con el sistema FIA ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), se puede observar una disminución de hasta 100 veces su valor con respecto al obtenido por absorción directa ($148 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Adicionalmente, se obtuvo una frecuencia de muestreo de 20 muestras h^{-1} lo cual es favorable para ser empleado como análisis de rutina. Así mismo, la evaluación de la exactitud del método demostró valores superiores a 99,3 %, lo que demuestra la validez del mismo.

Es importante señalar, que los resultados obtenidos demuestran la efectividad que poseen los materiales derivados de quitosano tales como las bases de Schiff en la preconcentración de complejos de iones metálicos como el plomo, en donde la introducción de grupos funcionales en la matriz biopolimérica del derivado favorece las interacciones electrostáticas entre el complejo metálico y la superficie del material generando una mayor cantidad de sitios activos. Sin embargo, es necesario evaluar la introducción de grupos funcionales adicionales que permitan mejorar la estabilidad mecánica de los derivados en función del pH y evitar el hinchamiento del material en soluciones ácidas para un mejor desempeño del material. De esta manera, es posible realizar una optimización de pH que permita observar el valor adecuado para la formación del quelato metálico entre el Plomo y el APDC, según la señal obtenida al ser eluido con el solvente orgánico, mejorando así la eficiencia del sistema de preconcentración.

En definitiva, se puede decir que la combinación del sistema de preconcentración en línea por FIA acoplado a espectrometría de absorción atómica (EAA) presenta una serie de ventajas en cuanto a: a) la sensibilidad, ya que se puede ampliar el intervalo de concentraciones en varios órdenes de magnitud; b) selectividad, debido a que los

tiempos de reacción son muy cortos minimizando las posibles interferencias, además del hecho de que la matriz es enviada al desecho, siendo necesario realizar optimizaciones al método según el metal de estudio; c) rapidez, ya que se aumenta la frecuencia de muestreo al no ser necesario alcanzar el equilibrio químico; d) simplicidad, al tratarse de un sistema modular equipado con componentes básicos y menos costosos que otros métodos, d) amigable con el ambiente, debido al bajo consumo de muestras y reactivos , el cual además puede ser modificado según las necesidades del análisis ;e) la exactitud es mejorada notablemente en el análisis de ultra traza ya que el riesgo de contaminación es menor al trabajar en un sistema semiautomatizado. Todas estas características permiten que pueda ser empleado en procesos de control, usados como sistemas de control.

7. CONCLUSIONES

- La extracción de α -quitina a partir de conchas de camarón empleando método químico es una técnica que permitió obtener rendimientos entre 23-26 % a partir del material crudo.
- El proceso de desacetilación de la α -quitina con NaOH concentrado se llevó a cabo satisfactoriamente obteniendo quitosanos con rendimientos mayores al 70% y grados de desacetilación por encima del 90%.
- Se realizó la modificación química del quitosano mediante la formación de bases de Schiff con aldehídos aromáticos como: piperonal, vainillina y p-nitrobenzaldehído, con buenos porcentajes de rendimiento, los cuales fueron caracterizados por FT-IR y RMN H-1.
- La formación de la base de Schiff de quitosano con benzaldehído no pudo ser confirmada según los resultados obtenidos de las caracterizaciones por FT-IR y RMN H-1. Además, se evidenció un alto carácter hidrofílico debido al hinchamiento del material en agua.
- Se evaluó la reacción de copulación de la base de Schiff de quitosano con 4-nitrobenzaldehído reducida empleando 8-hidroxiquinolina como agente quelante, obteniendo un producto altamente soluble en solventes polares, el cual según el FT-IR mostró cambios estructurales significativos en comparación con el material de partida.
- Se construyó una configuración de flujo reportada en la bibliografía, en donde se evaluaron las bases de Schiff de quitosano para la preconcentración en línea de plomo en soluciones acuosas.

- El mejor modelo de regresión lineal para el sistema FIA-EAA fue obtenida con la base de Schiff de quitosano con vainillina (BSQ-V) en un rango de concentraciones entre 50-150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

- Se verificó la aplicabilidad de la preconcentración en línea de plomo empleando como material sorbente tres derivados de quitosano obtenidos (bases de Schiff) mediante un método económico, simple, rápido y confiable que permite obtener una alta sensibilidad, bajos límites de detección y una buena exactitud.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar condiciones de reacción a fin de completar la modificación sintética de partida que permita obtener derivados de quitosano con una mayor cantidad de sitios activos y con buenas propiedades mecánicas para ser evaluados como material sorbente en sistemas FIA-EAA.
- Se sugiere un estudio más detallado de las propiedades tanto mecánicas como estructurales del quitosano y sus derivados a fin de entender mejor su interacción con otros compuestos, y el posible efecto que estos tienen sobre su capacidad de adsorción y la preconcentración de metales pesados.
- Evaluar la cantidad de material empleado en las minicolumnas a fin de estudiar la posibilidad de proporcionar límites de detección más bajos que permitan medir concentraciones de iones metálicos más bajas.
- Evaluar los derivados de quitosano en el sistema de flujo sin APDC como agente acomplejante de plomo.
- Evaluar la reacción de copulación de la base de Schiff de quitosano con 8-Hidroxiquinolina a fin de obtener un material que pueda emplearse como empaque de minicolumnas analíticas.

9. REFERENCIAS

1. **Díaz de Apocada E., Villarán V.M., Río F., Ramirez C.A.** Vol.1, 2004, Revista Iberoamericana de Polímeros, Vol. 8, págs. 20-37.
2. **Chen D., Hu B., Huang C.** 2009, Talanta, Vol. 78, págs. 491-497.
3. **Inglezeakis V.J., Loizidou M.D., Grigoropoulou H.P.** 2003, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 261, págs. 49-54.
4. **Farajzadeh M. A., Monji A.B.** 2004, Separation and Purification Technology, Vol. 38, págs. 197-207.
5. **Karadas C., Kara D.** 2013, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 32, págs. 90-98.
6. **Miró M., Hartwell S.K., Jakmunee J., Grudpan K., Hansen E. H.,** 2008, Trends Anal. Chem., Vol. 27, pág. 749.
7. **Dai B., Cao M., Fan G., Liu B., Dong Xv, Pan M., Wan S.** 103-110, 2012, Vol. 219.
8. **Farajzadeh M. A., Bahram M., Zorita S., Mehr B. G.** 2009, Journals of Hazardous Materials, Vol. 161, págs. 1535-1543.
9. **Dong L., Yan x., Li Y., Jiang Y., Wang C., Wang Z.** 119-125, 2004, Journal of Chromatography A, Vol. 1036.
10. **Bishop E. J., Mitra S.** 2004, Vol. 1046, págs. 11-47.
11. **Yang X., Zhang S., Wang C., Wang Z.** 12, 2013, Chinese Journal of Analytical Chemistry, Vol. 41, págs. 1930-1946.
12. **Motellier S., Pitsh M.** 1996, Journal of Chromatography A, Vol. 739, págs. 119-130.

13. **Gil R. A., Salonia J., Olivieri A., Olsina R., Martinez L.** 2010, *Microchemical Journal* , Vol. 95, págs. 306-310.
14. *Journal of Hazardous Materials* . **Carletto J., Cravo K., Maltez H.F., Carasek E., Martendal E.** 2008, Vol. 157, págs. 88-93.
15. **V., Cérda.** s.l. : Ed. Sciware., 2006, *Introducción a los métodos de análisis en flujo.* Departamento de Química. Universitat de Illes Balears. E-07122 Palma de Mallorca.
16. **V., Cerdá.** 2000, *Evolutions of flow methodologies*, 8th International Conference on Flow Analysis. Warsaw, Poland. International Union of Pure and Applied Chemistry, págs. 25-29.
17. **Ruzicka J., Hansen E. H.** 1975, *Anal. Chim. Acta*, Vol. 78, pág. 145.
18. **Martins A. O., Da Silva E.L., Carasek E., Goncalves N.S., Larenjeira M., De Fávere V.** 2004, *Anal. Chim. Acta* , Vol. 521, págs. 157-162.
19. **Goswami A., Singh A.K.** 2002, *Anal. Chim. Acta* , Vol. 454 (2), págs. 229-240.
20. **Cerutti S., Moyano S., Gásquez J., Stripiekis J., Olsina R., Martinez L.** 2003, *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*, Vol. 58 (11), págs. 2015-2021.
21. **Prasada Rao T., Karthikeyan S., Vijayalekshmy B., Iyer C.S.P.** 1998, *Anal. Chim. Acta* , Vol. 369, pág. 69.
22. **De Peña Petit Y., López W., Burguera J., Burguera M, Galignami M., Brunetto R., Carrero P.** 2000, *Anal. Chim. Acta*, Vols. 403(1-2), págs. 249-258.
23. **Felse A., Panda T.** 1999, *Bioprocess Eng.*, Vol. 20, págs. 505-515.
24. **Martins A., Da Silva E., Carasek E., Larenjeira M., De Fávere V.** 2004, *Talanta* , Vol. 63, págs. 397-403.
25. **E., Guibal.** 2004, *Separation and Purification Technology*, Vol. 38, págs. 43-74.

26. **Hosoba M., Oschita K., Katarina R., Takayanagi T., Oschima M., Motomizu S.** 2009, Anal. Chim. Acta, Vol. 369, págs. 51-56.
27. **Petit de Peña Y., Rondón W.** 2013, American Journal Analytical Chemistry, Vol. 4, págs. 387-397.
28. **Peña E., Palacios M., Ospina N.** 2005, Algas como indicadores de contaminación. Primera Edición, Universidad del Valle., pág. 164.
29. **W., Rondón.** 2004, Tesis de Maestría. Departamento de Química. Universidad de Los Andes. Venezuela.
30. **G., Kiley.** Ingeniería Ambiental. Primer Volumen. McGraw-Hill, Interamericana de España S. A., Madrid.
31. **M.A., Barakat.** 2011, Arabian Journal of Chemistry , Vol. 4, págs. 361-377.
32. **Tarley G.R.T., Ferreira C.S.L., Arruda M.A.Z.** 2004, Microchemical Journal , Vol. 77, págs. 163-175.
33. **N.I., Schinitman.** Metales pesados, ambiente y salud. Disponible en: <http://www.ecoportel.net>. Consulta Agosto 2014. .
34. **Pauza N.L., Pérez Cotti M.L., Goday M.L., Sopena Y., Sancovich H.A.** Revista Argent Dermatol, Vol. 88, págs. 28-37.
35. **Assadollah B., Saeed B., Mina R.** 2012, Microchemical Journal, Vol. 100, págs. 66-71.
36. **Liu B., LV X., Meng X., Yu G., Wang D.** Chemical Engineering Journal , Vol. 220, págs. 412-419.
37. **Ladrón de Guevara J., Moya Pueyo V.** Toxicología Médica, Clinica Laboral, Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
38. **Pounds J.G., Long G. J., Rosen J.F.** Enviroment Health Perspect, Vol. 9, págs. 17-39.

39. *Diciembre 1995. 5201, Decreto 833: Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. Gaceta Oficial Extraordinaria.*
40. 2014., [http://www.who.int/watersanitation health/dwq/guidelines/es/](http://www.who.int/watersanitation_health/dwq/guidelines/es/). Consulta Septiembre.
- 41 Fen Y., Mahmood W., Talib Z. A. 2013, *Optik.*, págs. 123-133.
42. Sun D., Waters J. K., Mawhinney T.P. 2000, *Journal of AOAC International.*, Vol. 83.
43. Prasada Rao T., Metilda P., Mary Gladis J. 2006, *Talanta*, Vol. 68, págs. 1047-1064.
44. Quatrocci O.A., Abelaira de A.S., Laba R.F. 1992, *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica.* Artes Gráficas Farro S.A.
45. Burguera J.L., Burguera M. 2001, *J. Flow Injection Anal.* , Vol. 18, pág. 5.
46. Z., Fan. 2005, *Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry.* John Wiley and Sons, Chichester. New York.Brisbane.Toronto.Singapore.
47. Ruzicka J., Hansen E.H. [http:// www.flowinjectiontutorial.com](http://www.flowinjectiontutorial.com). Consulta Abril 2016.
48. Petit de Peña Y., Gallego M., Valcárcel M. 1994, *J.Anal.At. Spectrom.*, Vol. 9, pág. 691.
49. Ruzicka J., Hansen E.H. 1988, *Flow Injection Analysis.* 2nd Edition.
50. Karlberg B., Pacey G.E. 1989, *Análisis por inyección en flujo: Una guía práctica.* El Sevier.
51. Fang Z., Zhu Z., Zhan S., Xu S., Guo L., Sun L. *Anal.Chim.Acta*, Vol. 214, pág. 41.

52. **M., Cañizales.** 2000, J. of the Mexican Chemical Society, Vol. 46(2), págs. 167-174.
53. **J.L., Burguera.** 1989, Flow Injection Atomic Spectroscopy. Edited by Edward G., J. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel.
54. **Valcárcel M., Luque de Castro M.D.** 1984, Análisis por Inyección en Flujo. Departamento de Química. Universidad de Córdoba. Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, España.
55. **Sperling M., Yin X., Wekz B.** 1991, J. Anal.At.Spectrom., Vol. 6, pág. 295.
56. **Ferreira S., Dos Santos W., Lamos V.** 2001, Anal. Chim. Acta, Vol. 445, pág. 145.
57. **Tony K., Kartikeyan S., Vijayalakshmy B., Rao T.P.** 1999, Analyst, Vol. 124, pág. 191.
58. **Casella R.J., Salim V.A., Jesuino L.S., Santelli R.E., Ferreira S.L.C., De Carvalho M.S.** 2001, Talanta, Vol. 54, pág. 61.
59. **Everaerts F.M., Verheggen P.E.M., Mikkers F.E.P.** 1979, J. Chromatography, Vol. 169, pág. 21.
60. **Ye Y., Ali A., Yin X.** 2002, Talanta, Vol. 57, pág. 945.
61. **Shuyu C., Zhifen Z., Huaming Y.** 2002, Anal. Chim. Acta , Vol. 451, pág. 305.
62. **Lima R., Leandro K.C., Santelli R.E.** 1996, Talanta, Vol. 43, pág. 977.
63. **Quinaia S.P., Da Silva J.B.B., Rollemberg M.C.E., Curtius A.J.** 2001, Talanta, Vol. 54, pág. 687.
64. **Knaul J.Z., Kassai M.R., Bui T., Creber K.A.M.** 1998, Can.J.Chem., Vol. 76, págs. 1699-1706.
65. **Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A.** 2003, Polymer, Vol. 44, págs. 7939-7952.

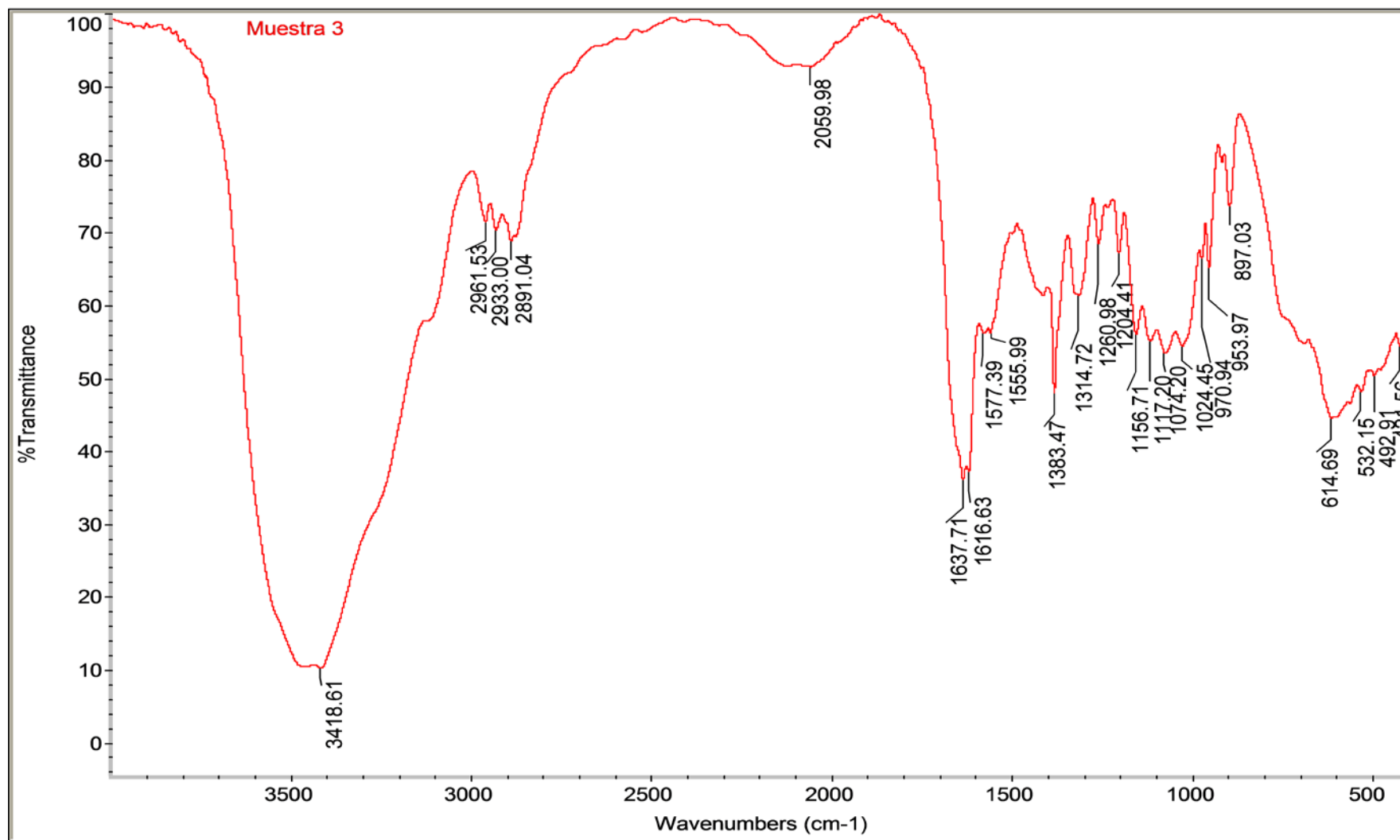
66. **M., Kumar.** 2000, *React. Funct. Polym.*, Vol. 46, págs. 1-27.
67. **B., Krajewska.** 2004, *Enzyme and Microbial Technology* , Vol. 35, págs. 126-139.
68. **K., Kurita.** 2006, *Mar. Biotechnol.*, Vol. 8, págs. 203-226.
69. **Kurita K., Tada T., Ishi S., Nishimura S., Shimodo K.** 1993, *J. Polym. Sci.*, Vol. 31, págs. 486-491.
70. **Perentena L., González C., Celis B.** 2015, *Revista Iberoamericana de Polimeros*, Vol. 16(1), págs. 1-27.
71. **Chaussard, Domard.** 2004, *Biomacromolecules*, Vol. 5, págs. 559-564.
72. **C., Velázquez.** 2003, *Revista Iberoamericana de Polimeros*, Vol. 4(2), págs. 91-109.
73. **M., Rinaudo.** 2006, *Prog. Polym.Sci.*, Vol. 31, págs. 603-632.
74. **Jaworska M., Sakurai K., Gaudon P., Guibal E.** 2003, *Polym. Int.*, Vol. 52, págs. 198-205.
75. **Focher B., Beltrame L.P., Najji A., Torri G.** 1990, *Carbohydr. Res.*, Vol. 12, págs. 405-418.
76. **Philippova O.E., Volkov E.V., Sitnikova N.L., Desbrieres J., Rinaudo M.** 2001, *Biomacromolecules*, Vol. 1(2), págs. 483-490.
77. **S., Dumitriu.** 2005, *Polysacharides. Structural diversity and functional versality*, 2nd ed. New York Marcel Dekker., págs. 625-642.
78. **Tsaih M.L., Chen R.H.** 1999, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 71, págs. 1905-1913.
79. **Arguelles W., Heras A.C., Acosta N., Galed G.** *Caracterización de Quitina y Quitosano*. 1era. Lima : Fondo Editorial Pontificia. Universidad Católica del Perú, 2004. pág. 312.

80. **Jung J., Zhao Y.** 2011, Carbohydrate Research, Vol. 346, págs. 1876-1884.
81. **G., Crini.** 2005, Prog. Polym. Sci., Vol. 30, págs. 38-70.
82. **Baroni P., Viera R., Meneghetti E., Da Silva M., Beppu M.** 2008, Journal of Hazardous Materials, Vol. 152, págs. 1155-1163.
83. **Lorenzo C., Coronilla R., Concheiro A.** 2005, Tecn. Farm. , Vol. 303, págs. 14-27.
84. **Feng Jiao T., Zhou J., Zhou J.X., Li Hua G.** 2011, Iranian Polymer Journal , Vol. 20(2), págs. 123-136.
85. **Fessenden R., Fessenden J.S.** 1983, Quimica Organica . Editorial Iberoamericana.
86. **Dos Santos J.E., Dockal E., Cavalheiro T.G.** 2005, Carbohydrate Polymers, Vol. 60, págs. 277-282.
87. **Simionatto L., Gomes Calvaheiro E.** 2006, Carbohydrate Polymers, Vol. 65, págs. 557-561.
88. **Wang J., Wang H.** 2011, International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 48, págs. 523-529.
89. **Sing R.K., Kukrety A., Chatterjee A.L.** 2014, Ind. Eng. Chem. Res.
90. **M., Kassai.** 2008, Carbohydrate Polymers, Vol. 71, págs. 497-508.
91. **Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Rinaudo M.** 2001, Polymer, Vol. 42, págs. 3569-3580.
92. **Tao W., Svetlana Z.** 2008, Vol. 73, págs. 248-253.
93. **Sabarudin A., Umemura T., Motomizu S.** 2011, Microchem. Journal, Vol. 99, págs. 34-39.

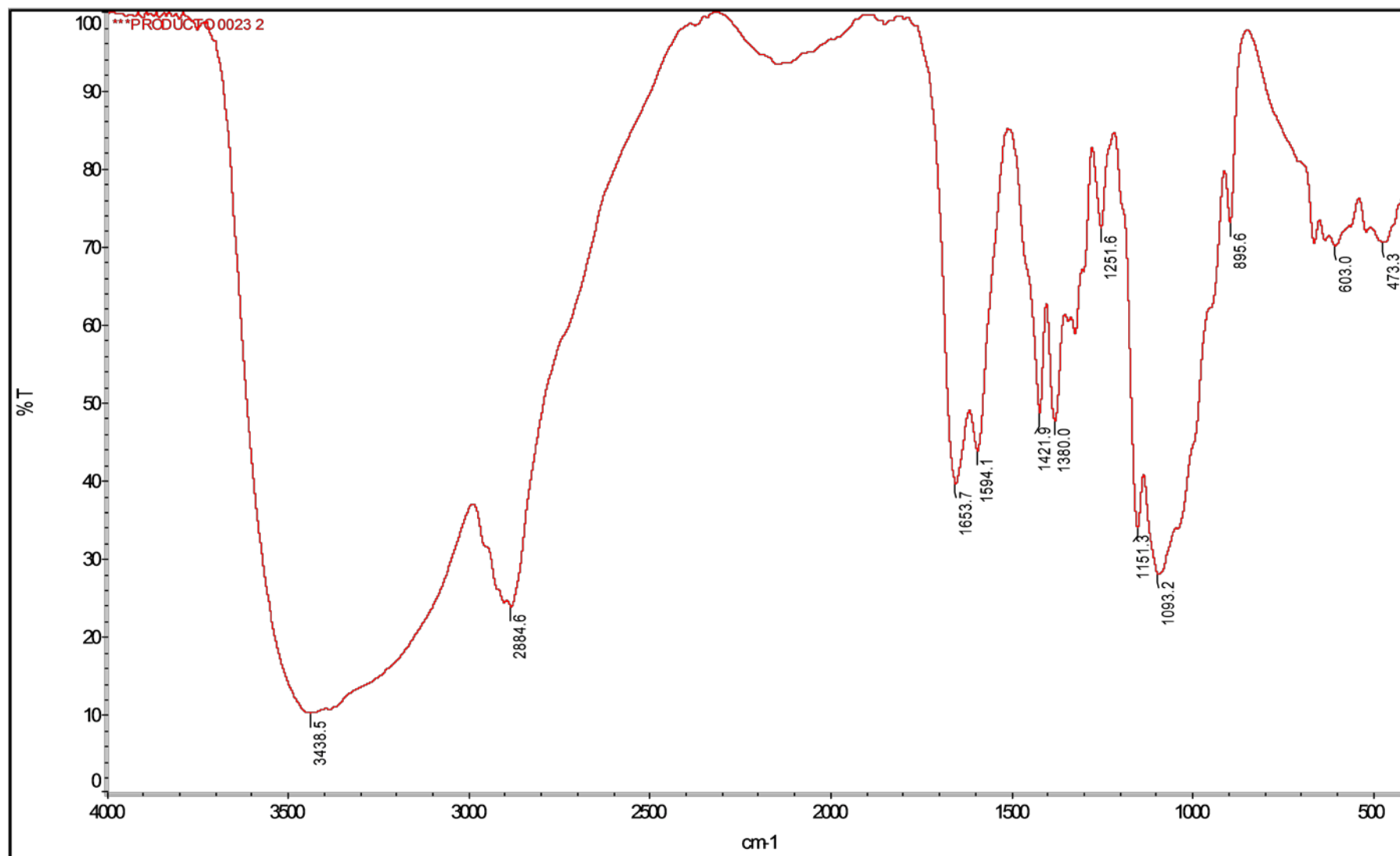
94. **Sabarudin A., Noguchi O., Oshima M., Higuchi K.** 2007, *Microchim. Acta*, Vol. 159, págs. 341-348.
95. **Marquez M., Martinez G., Santoni N., Matos M., Arnal M.** *Potencial uso de quitina y quitosano en materiales compuestos y nanocompuestos para aplicaciones biomédicas. Biomateriales, Polímeros Petroquímicos y sus Mezclas: Características y Nuevos Hallazgos.* . [ed.] CD-CHT-ULA. ISBN:980-11-1003-1 Marvelis Ramirez. Mérida : s.n., 2006. págs. 227-263.
96. **A.C., Valvuená.** *Obtención de Derivados de Quitosano con posibles propiedades fungicidas y bactericidas.* Maracaibo : Tesis de Maestría. Universidad Del Zulia. , 2013. pág. 89.
97. **Aslam S., Calandrelli L., Laurenzo P., Malinconico M.** 2000, *J. Mater. Sci.*, Vol. 35.
98. **Stephen J., Frank R.** *Química Orgánica.* Barcelona : Editorial Reverté , 1988. págs. 437-438.
99. **Fesseden R., Fesseden J.** *Química Orgánica* . .: Grupo Editorial Iberoamericana, 1983. págs. 536-537.

ANEXOS

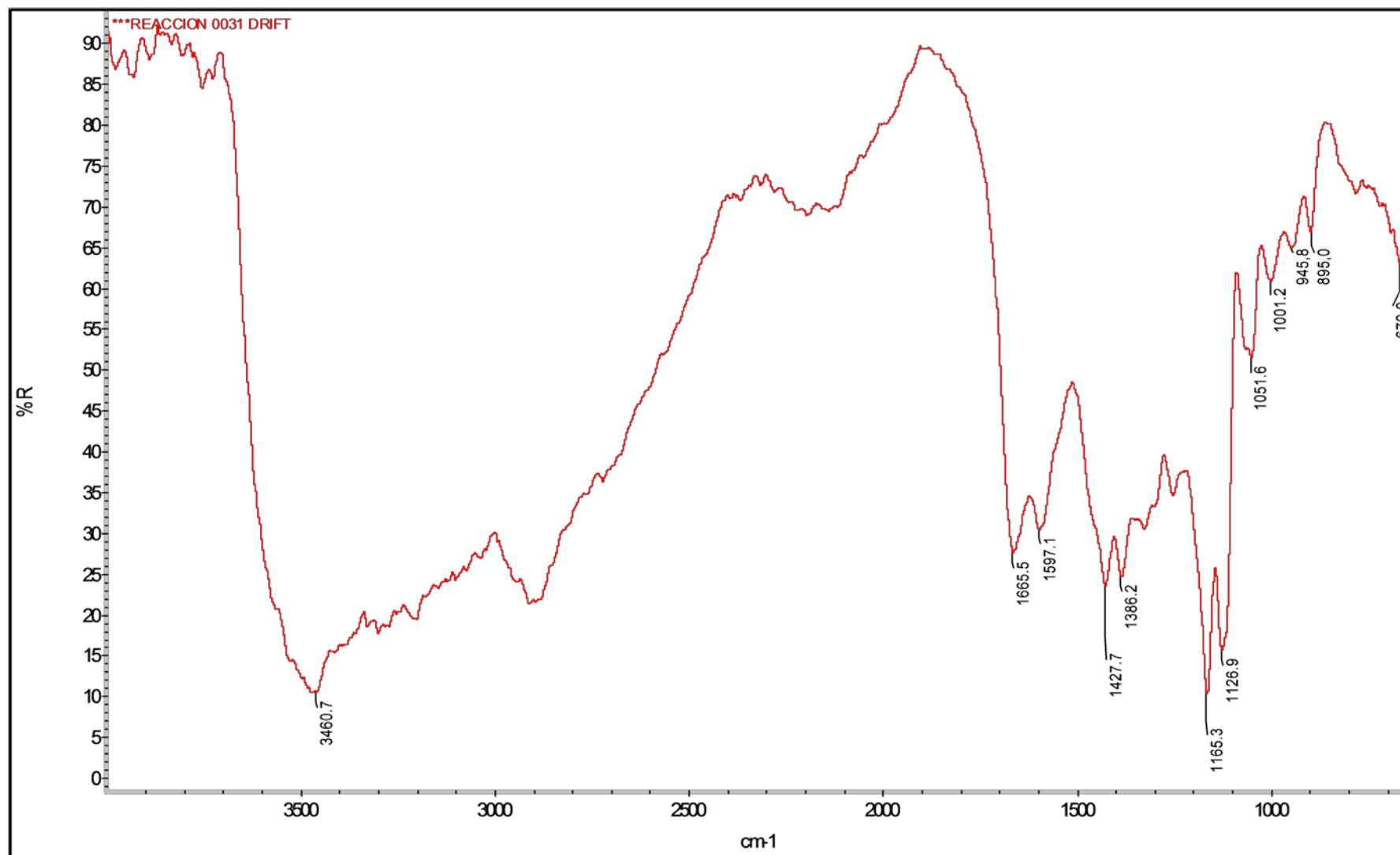
ANEXOS 1



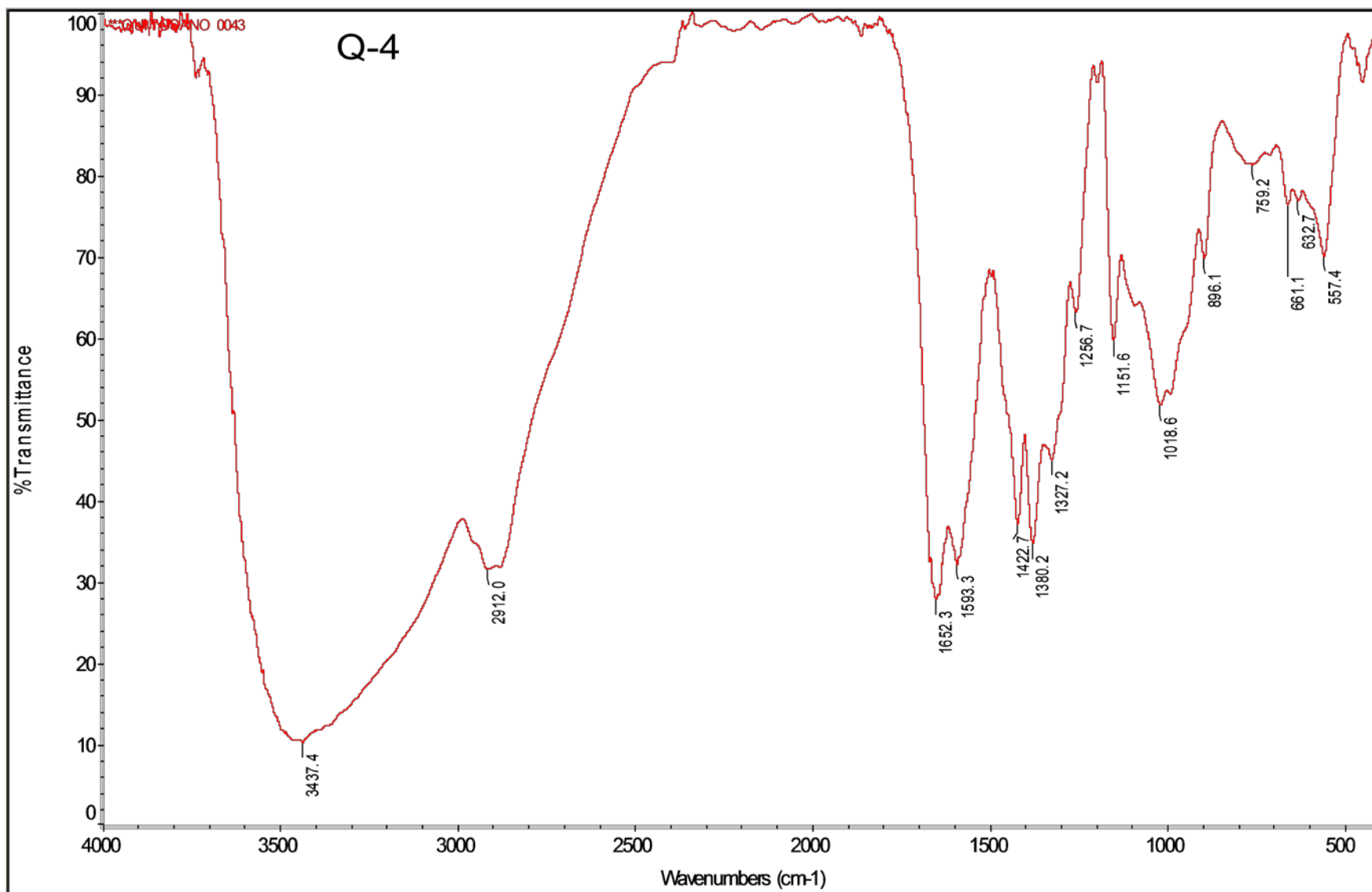
ANEXOS 2



ANEXOS 3



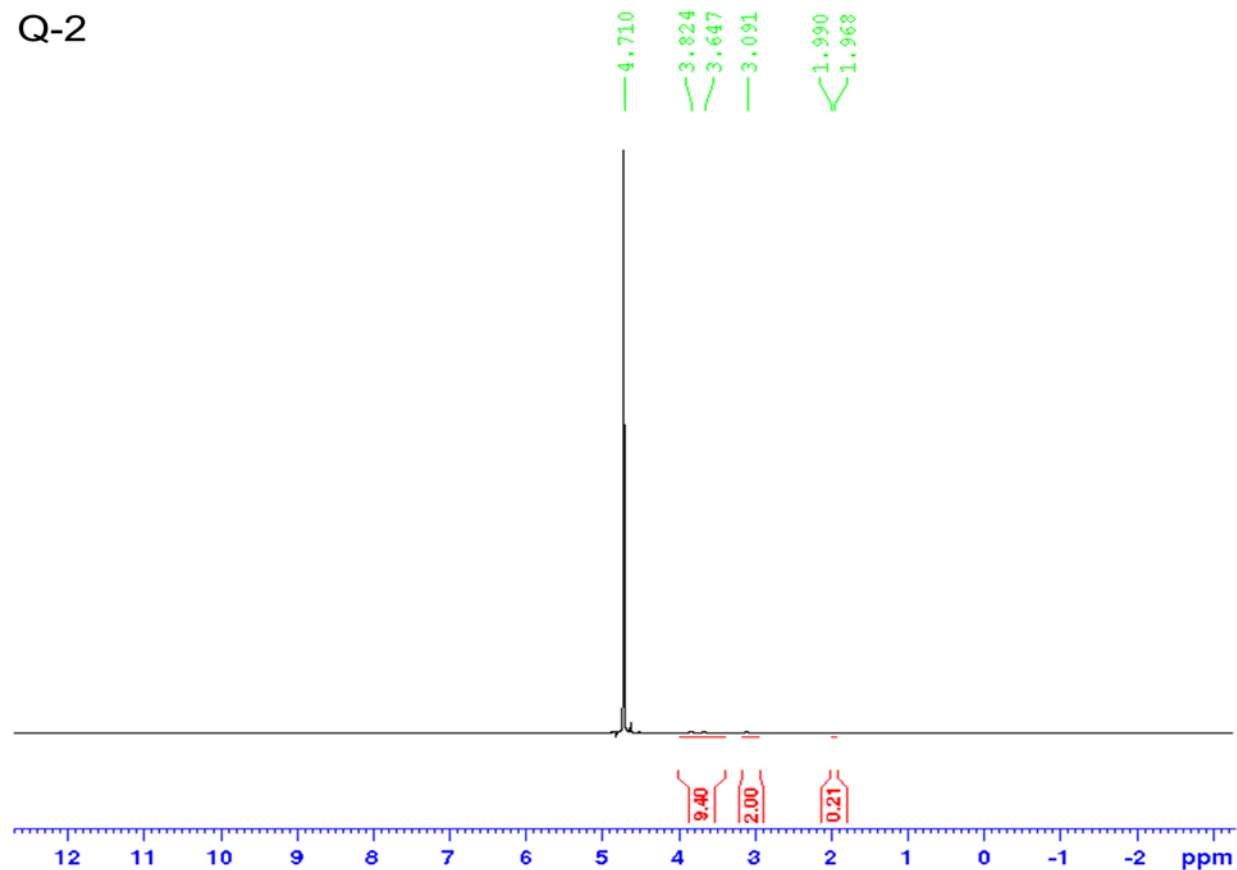
ANEXOS 4



ANEXOS 5

W. Rondon / 0021 / HCl D2O 1% / Protones

Q-2



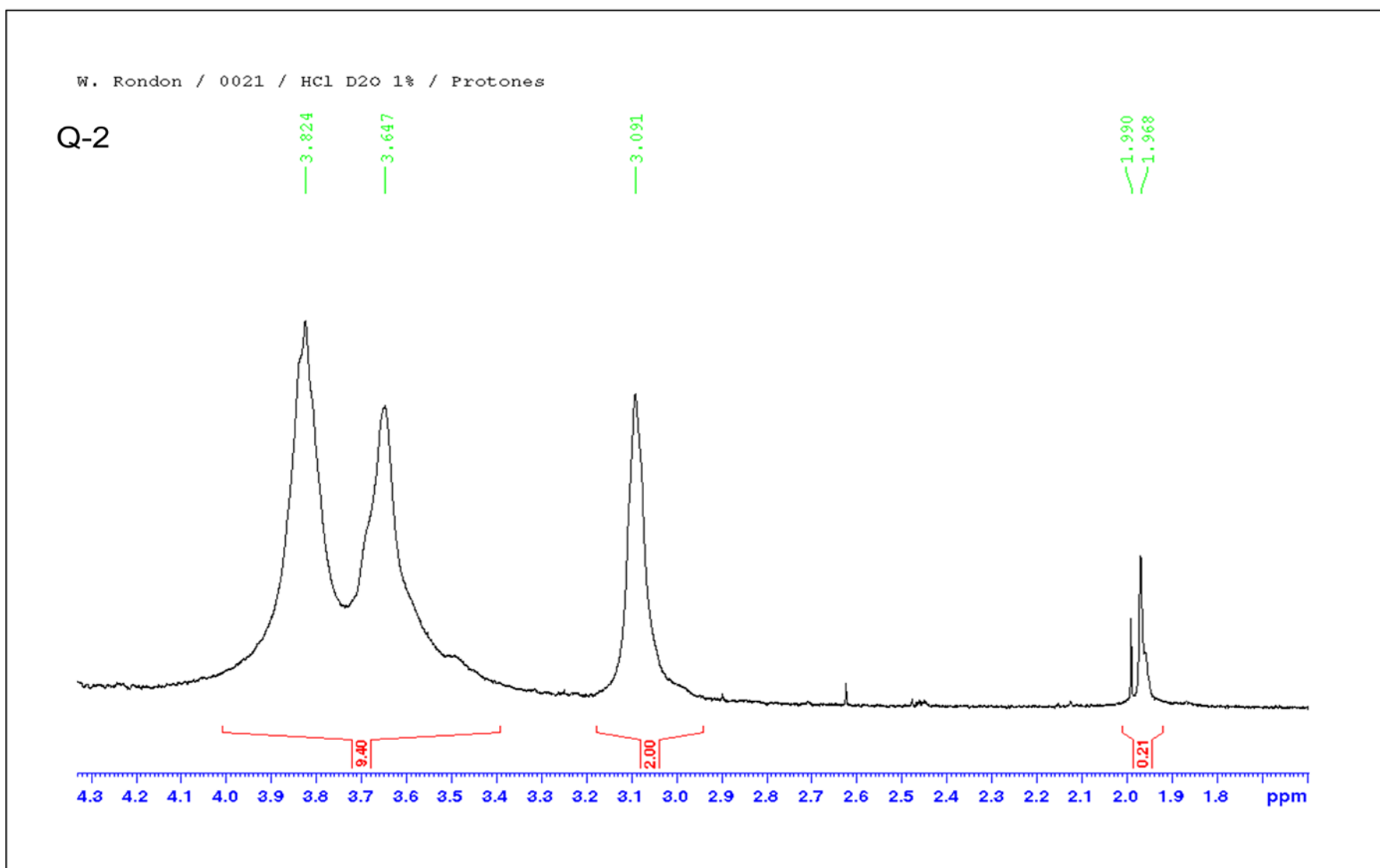
Current Data Parameters
 NAME vr-0021
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20150429
 Time 12.53
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PATXI 1H/
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 64
 DS 2
 SWH 12019.230 Hz
 FIDRES 0.183399 Hz
 AQ 2.7262976 sec
 RG 54.63
 DW 41.600 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

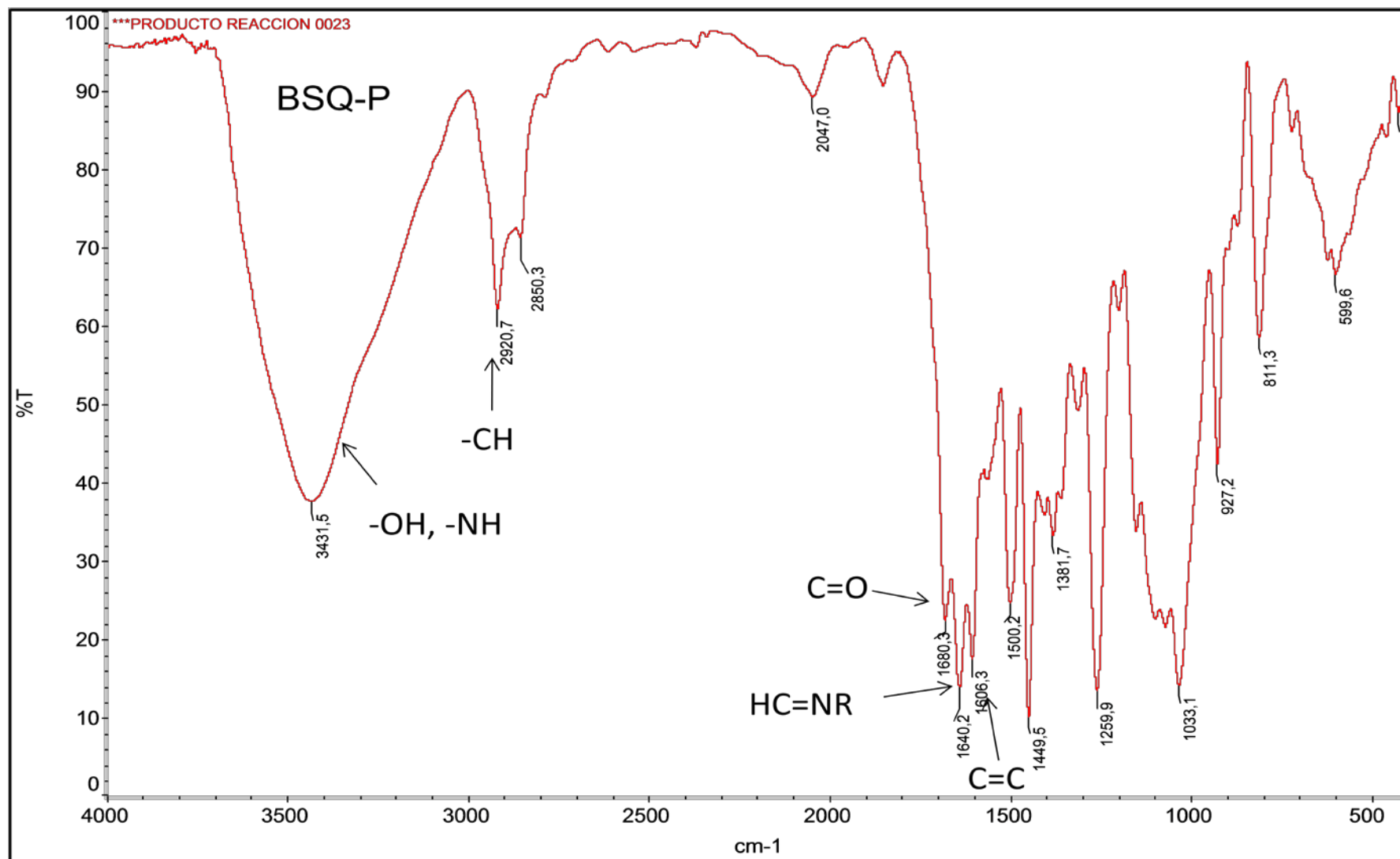
===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 600.1337060 MHz
 NUC1 1H
 P1 9.90 usec
 PLW1 9.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 600.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

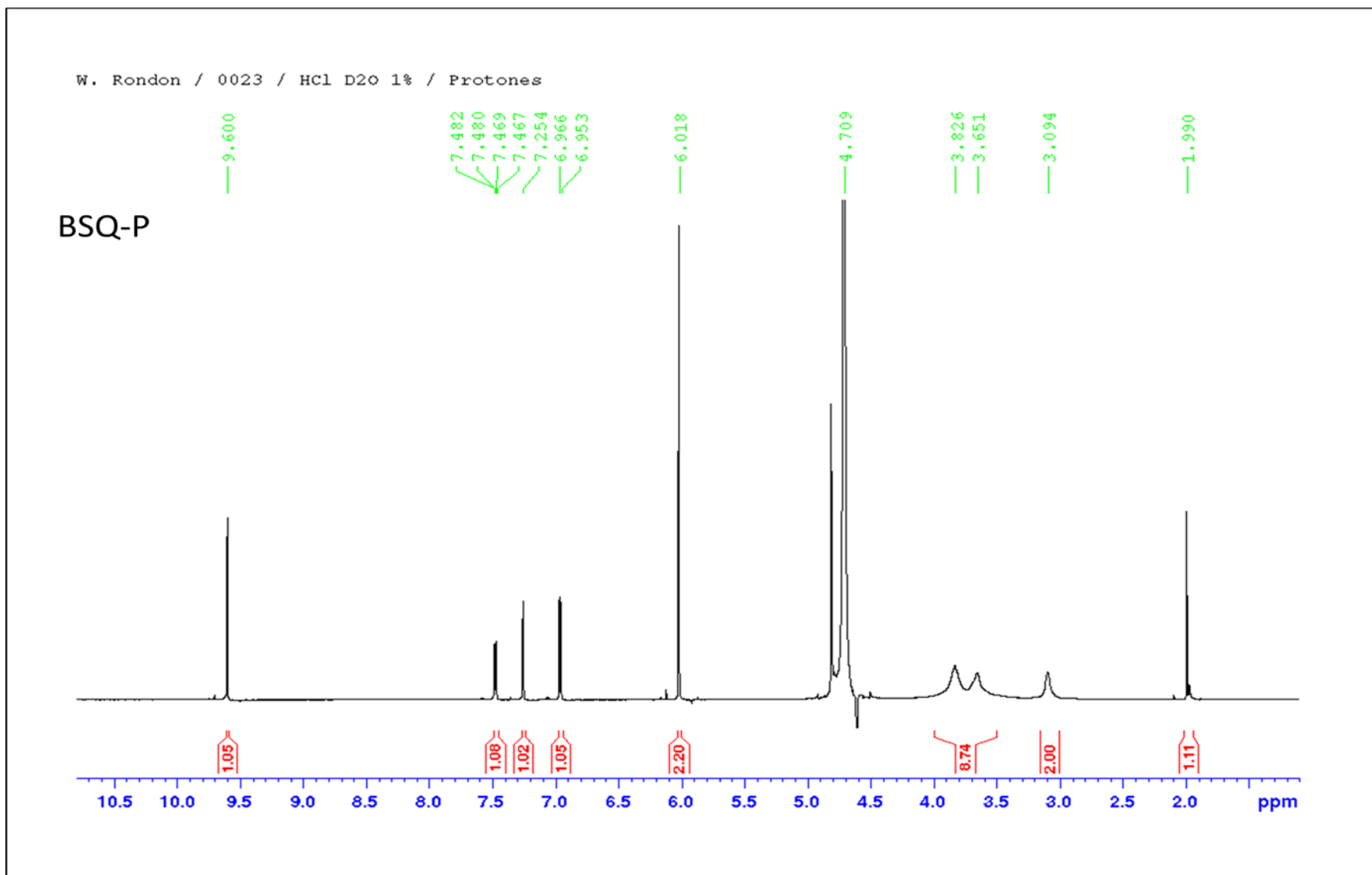
ANEXOS 6



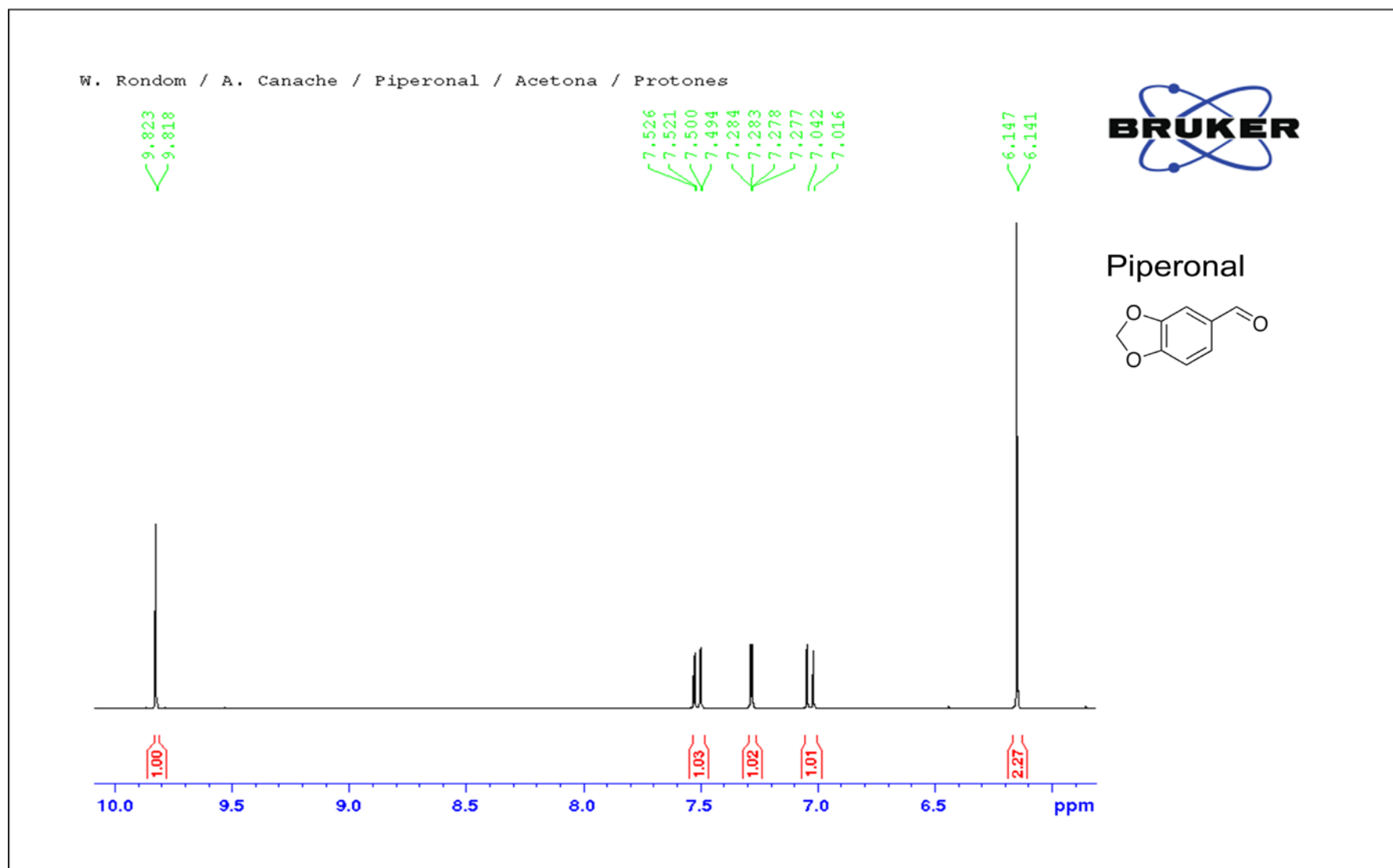
ANEXOS 7



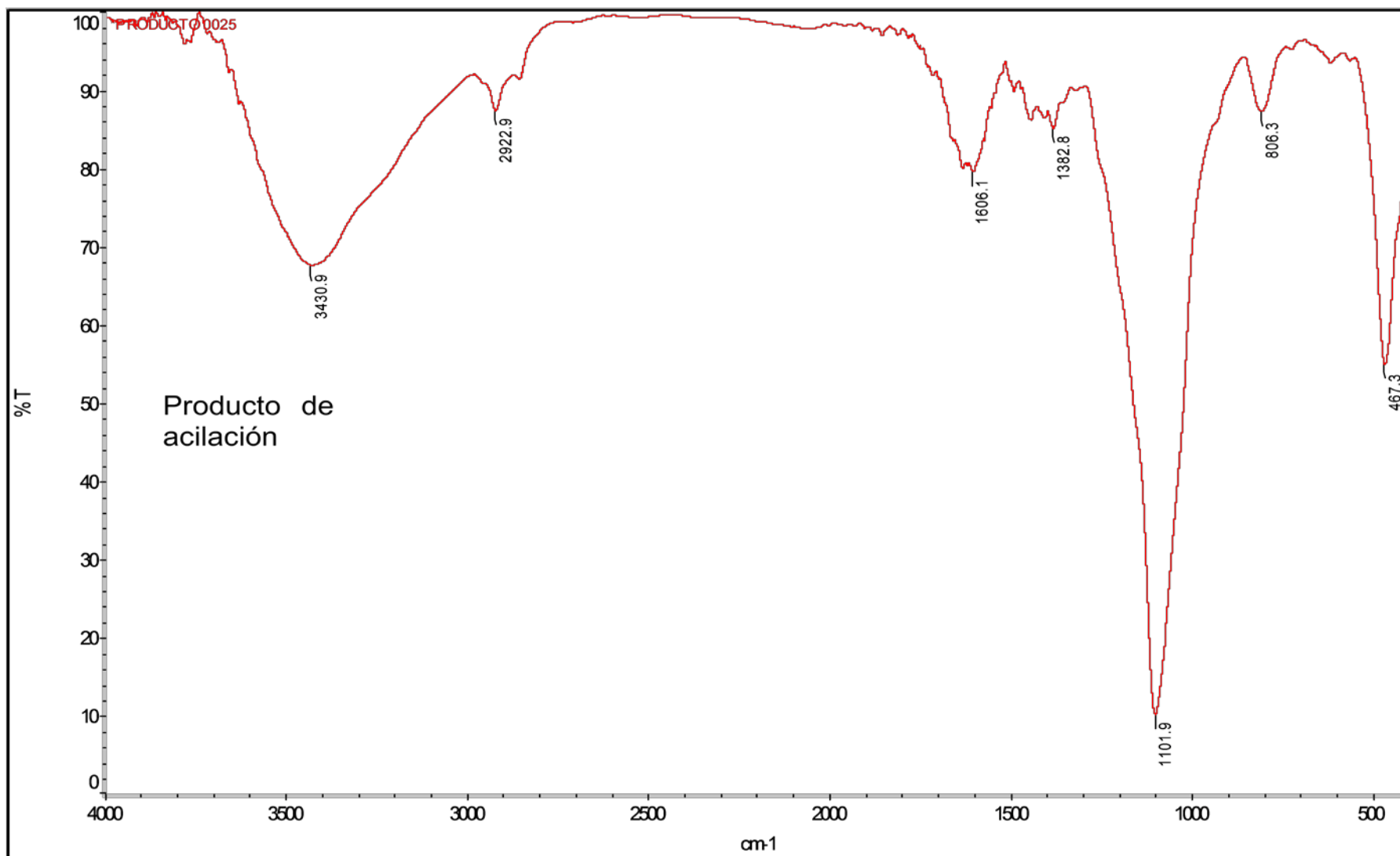
ANEXOS 8



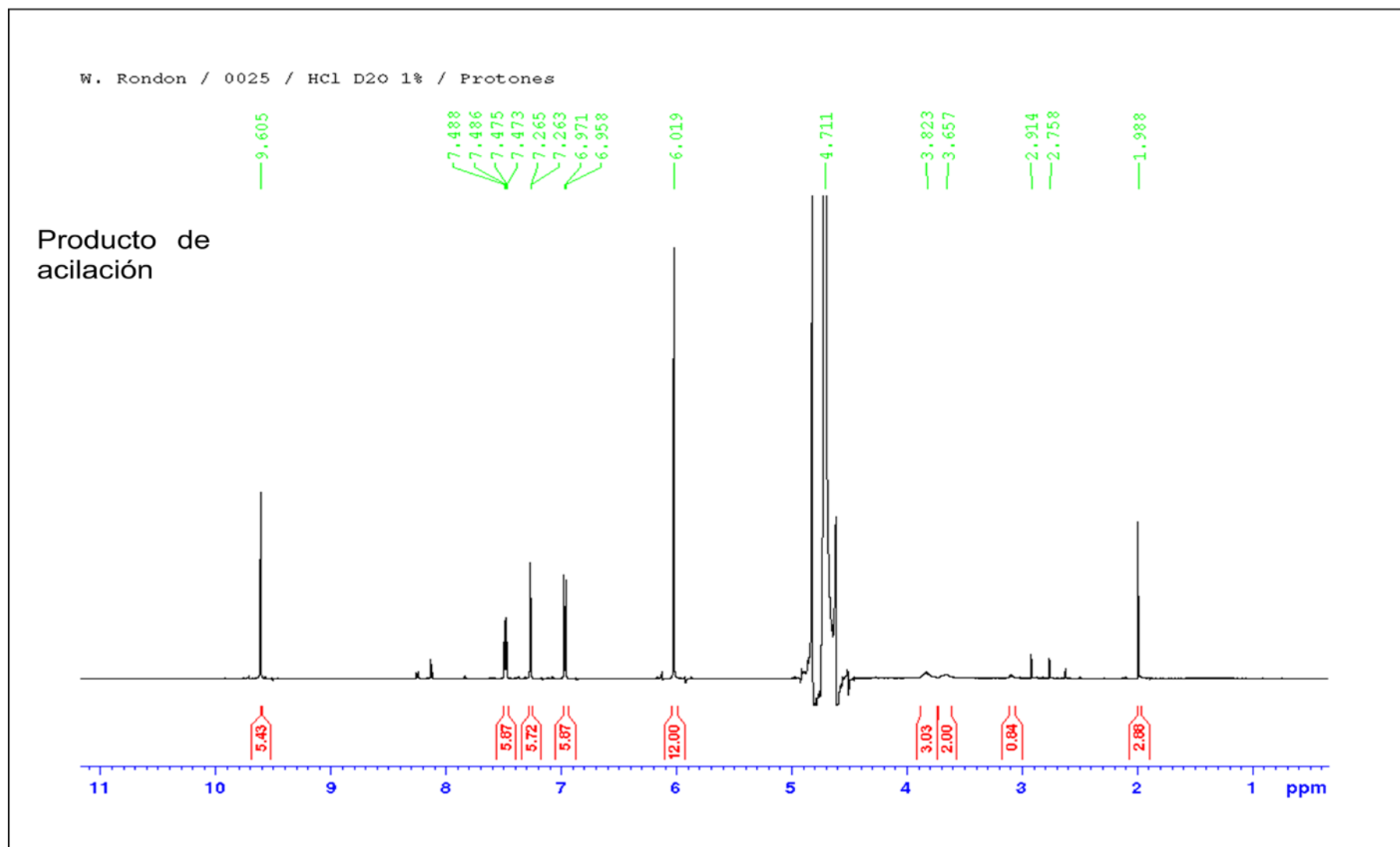
ANEXOS 9



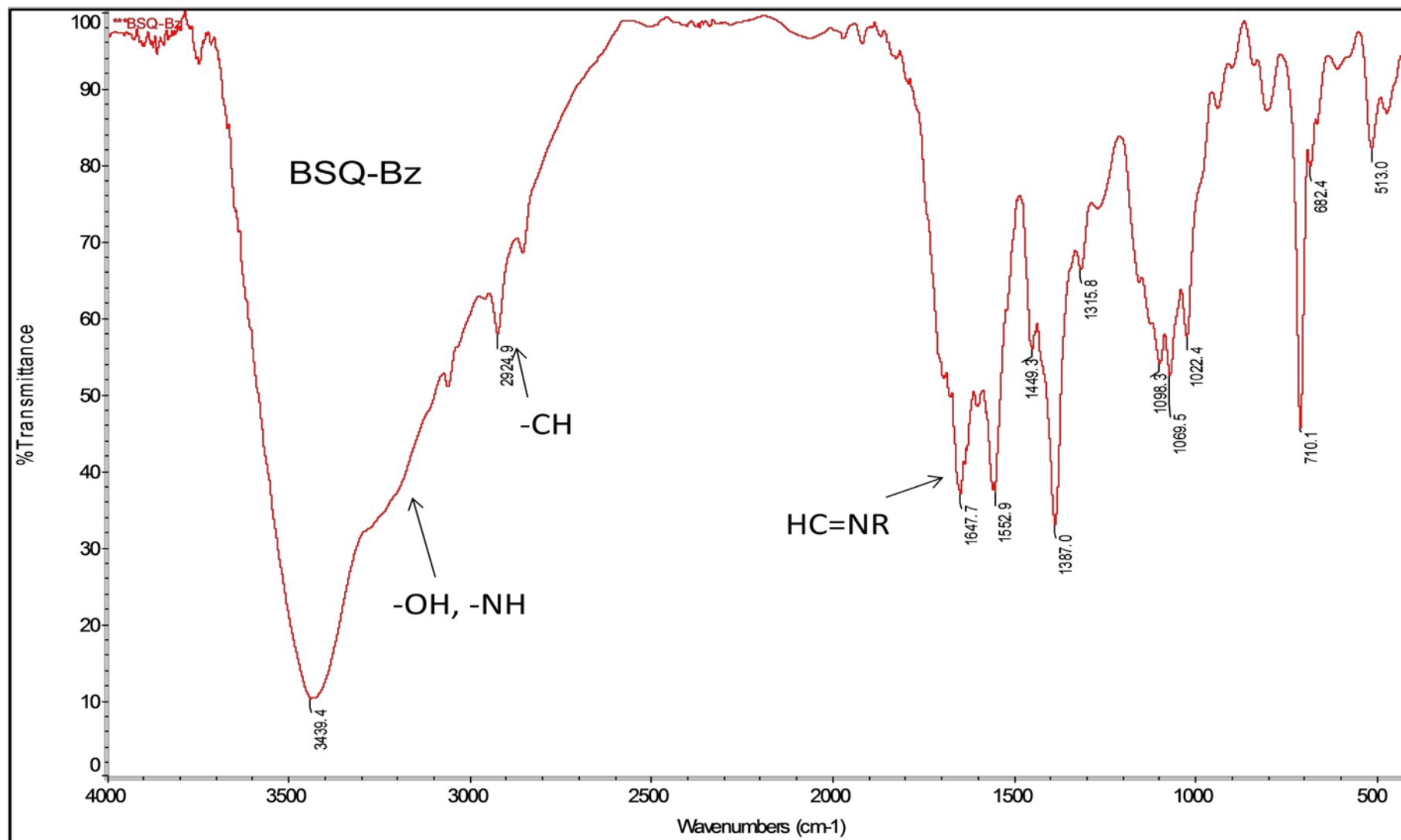
ANEXOS 10



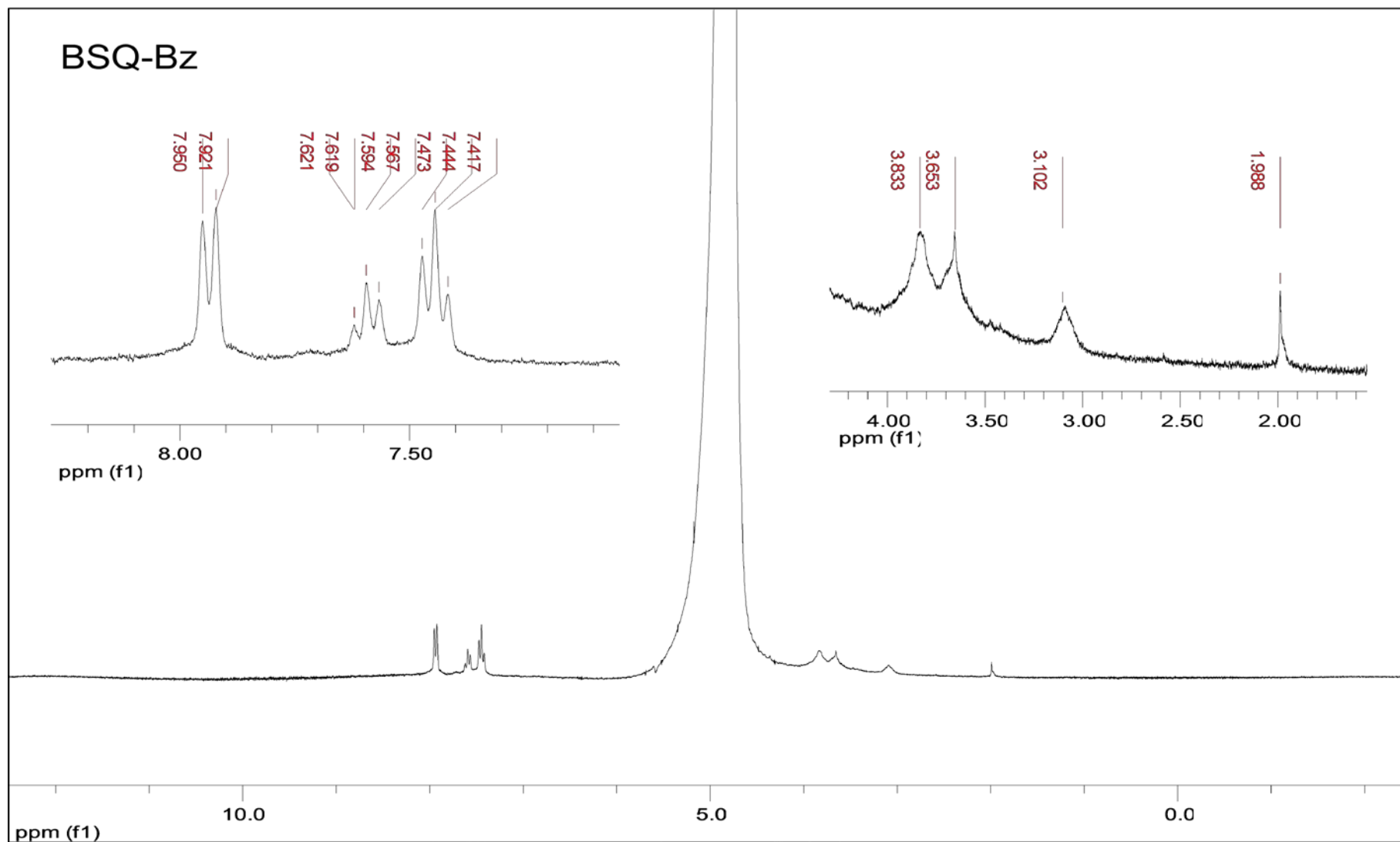
ANEXOS 11



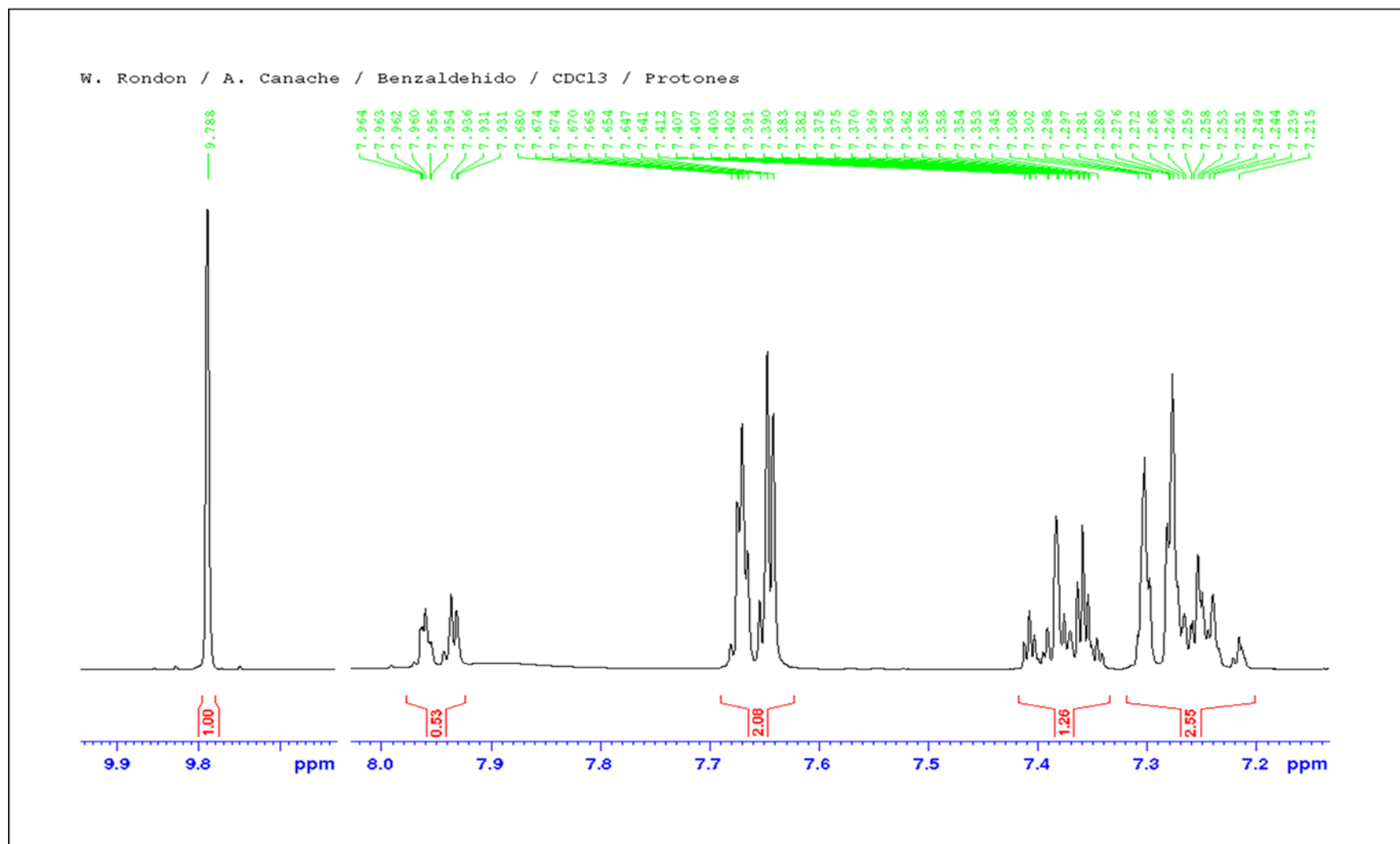
ANEXOS 12



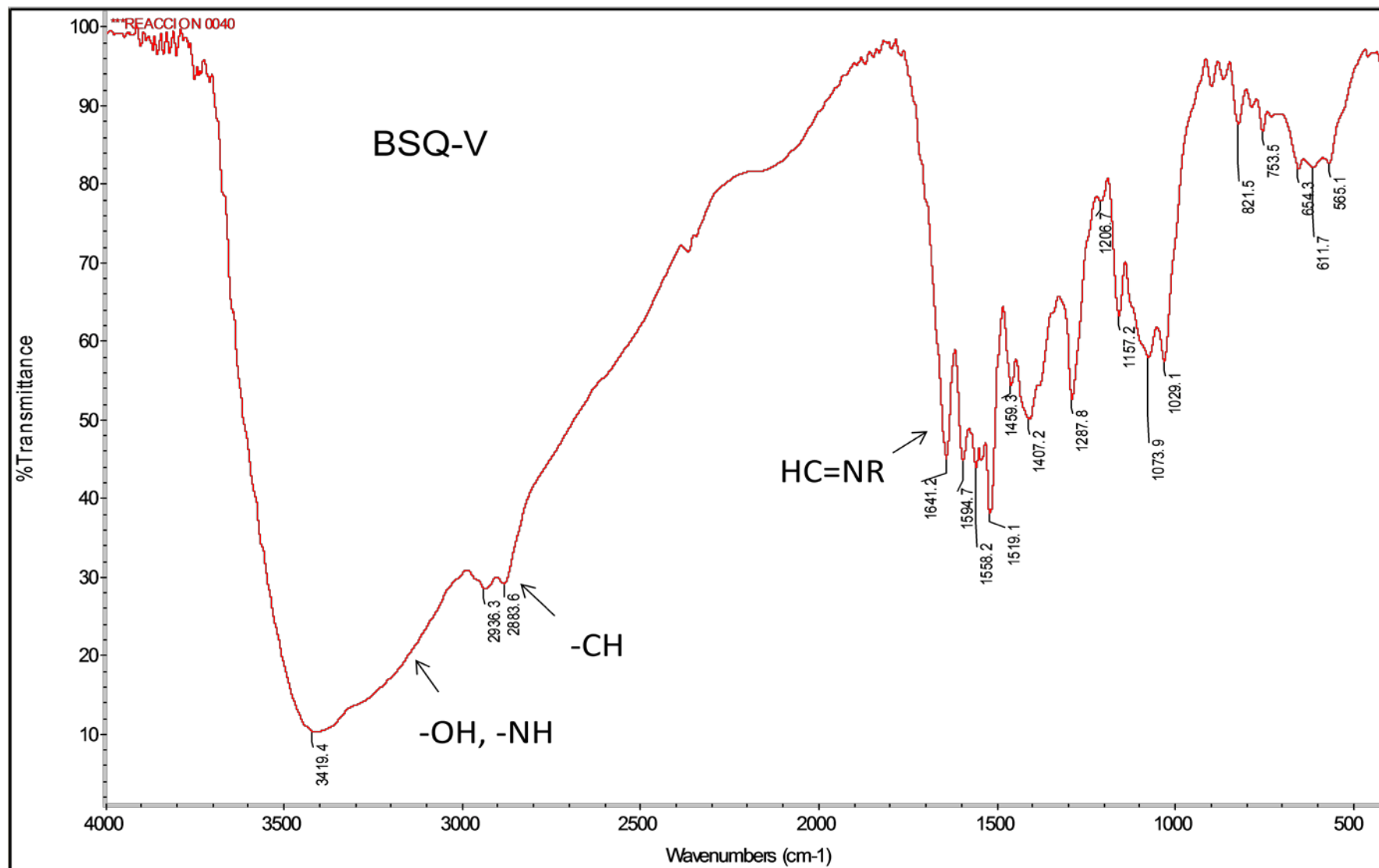
ANEXOS 13



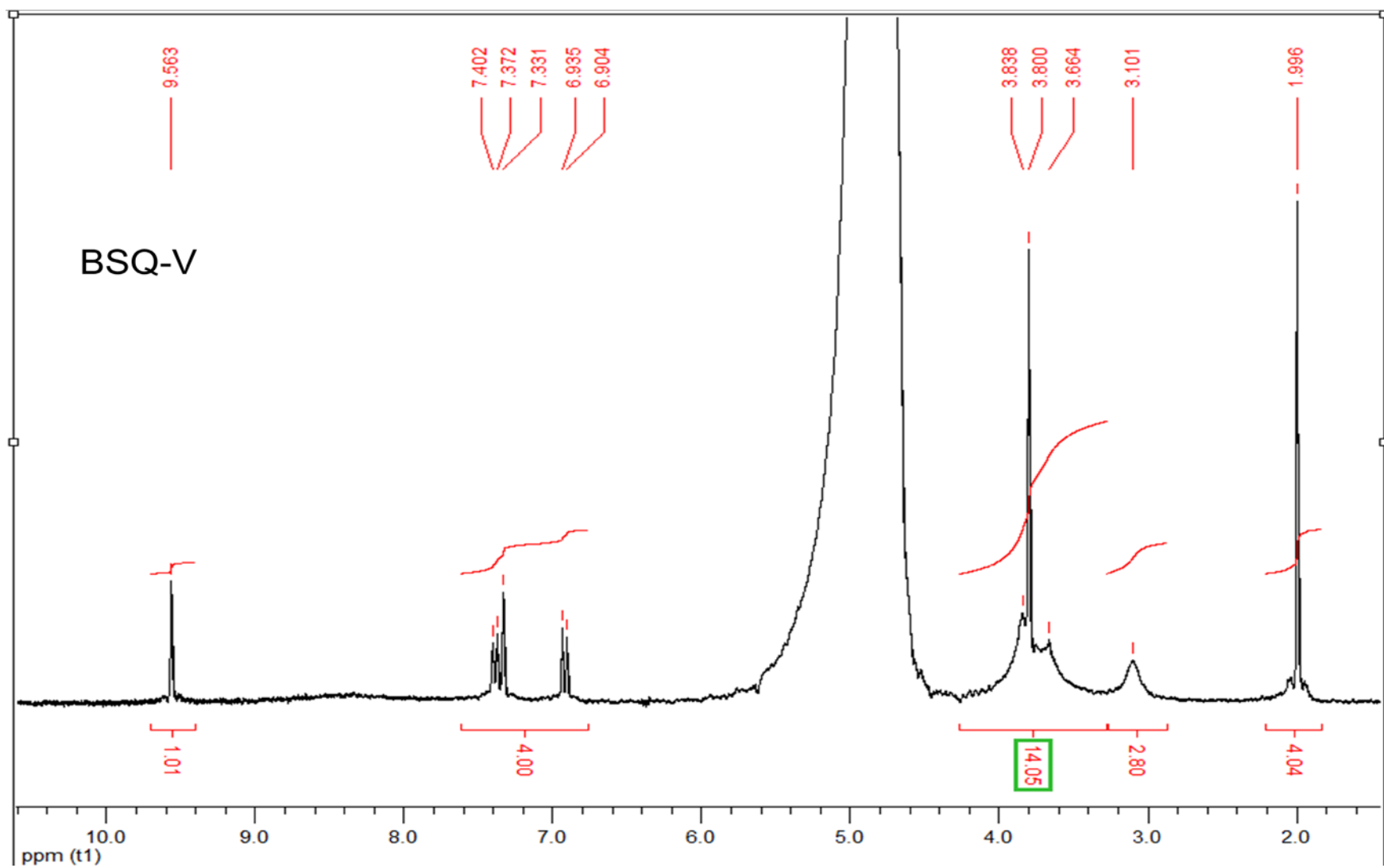
ANEXOS 14



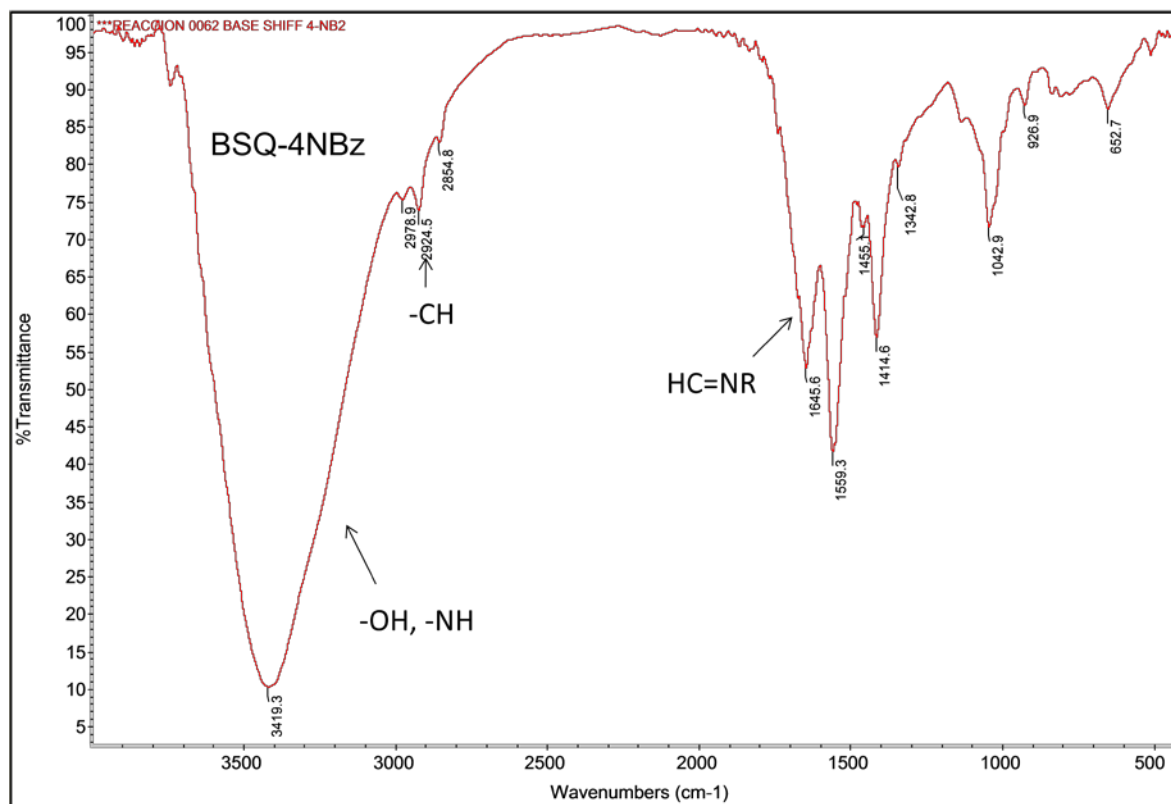
ANEXOS 15



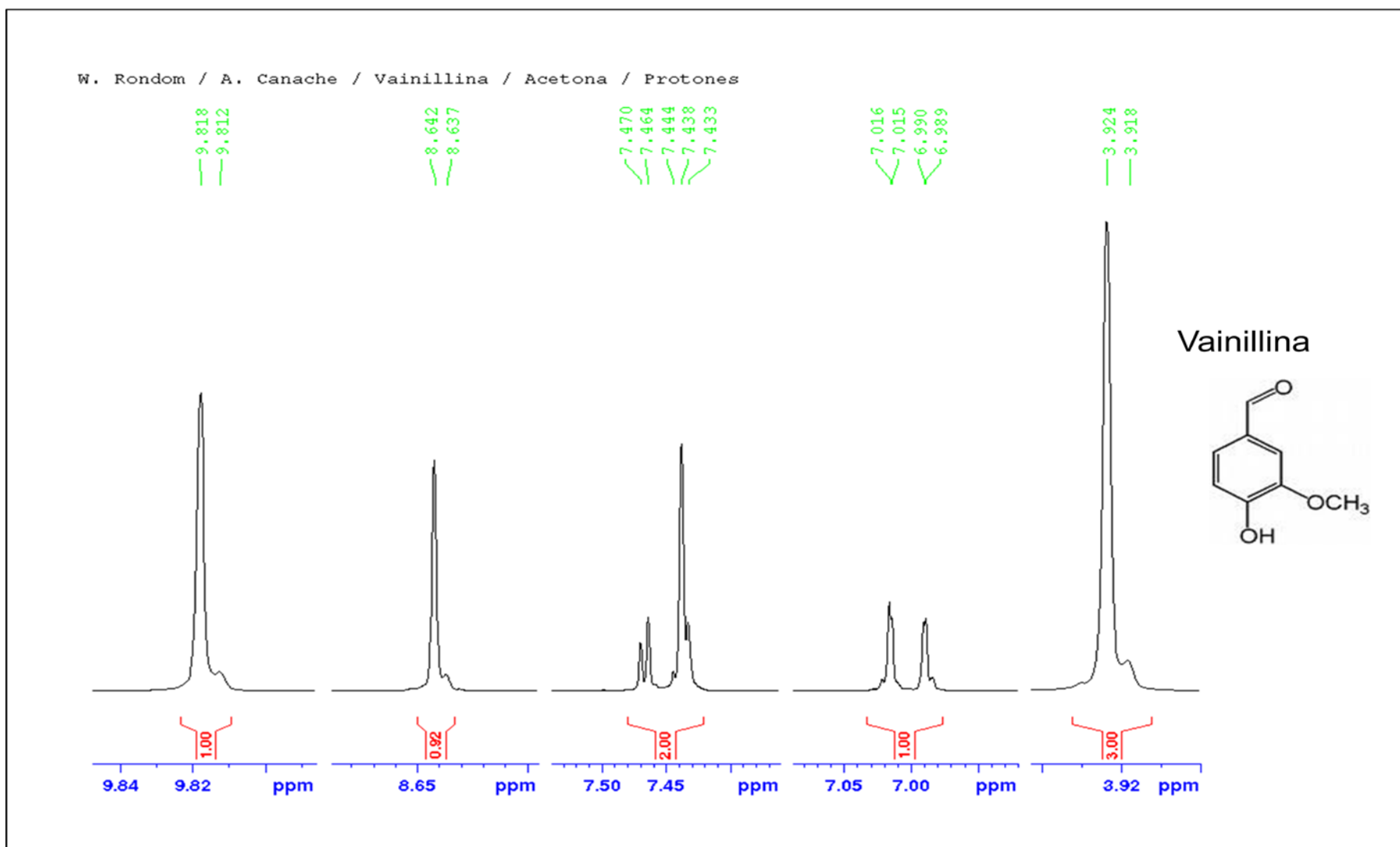
ANEXOS 16



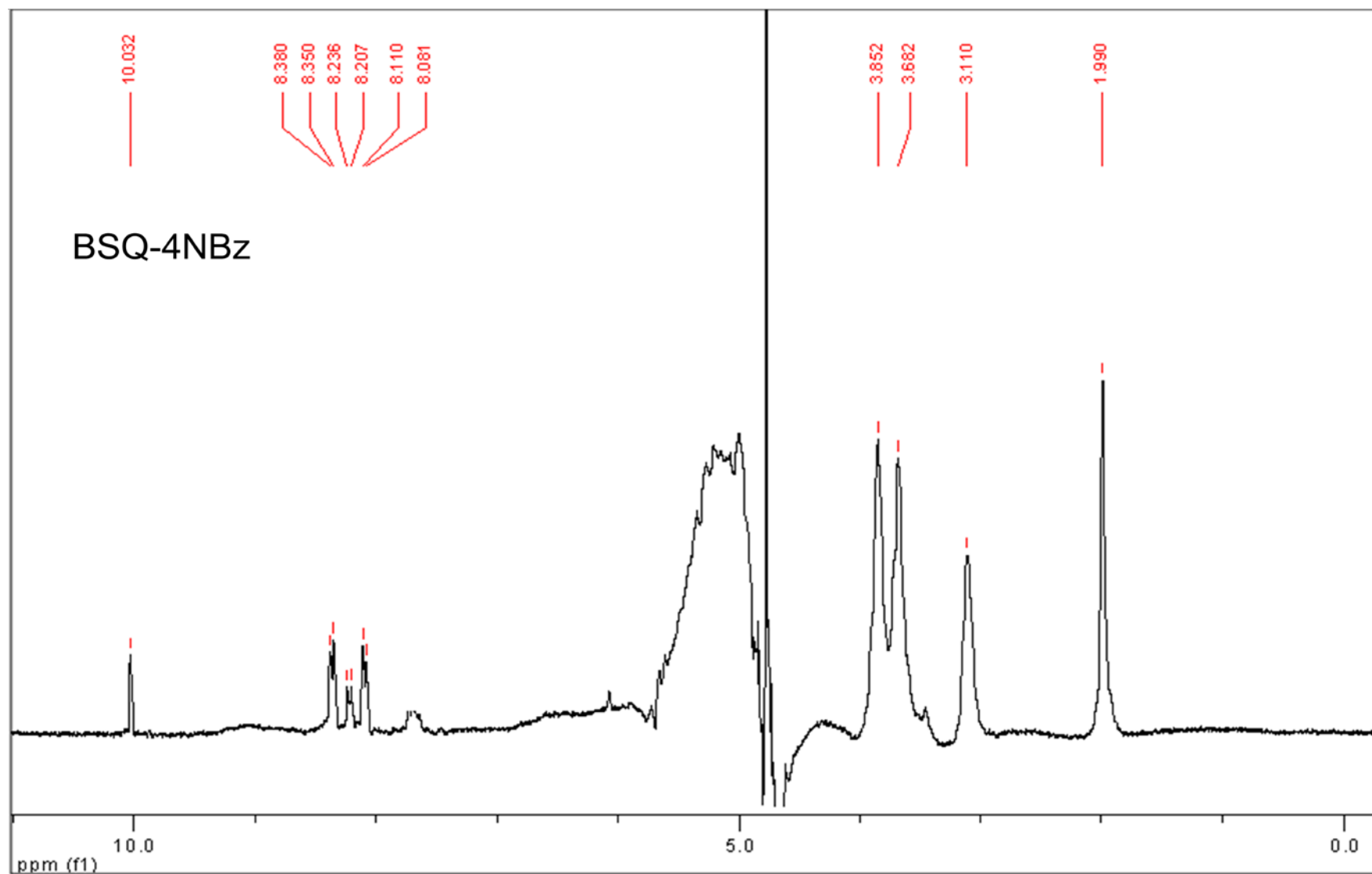
ANEXOS 18



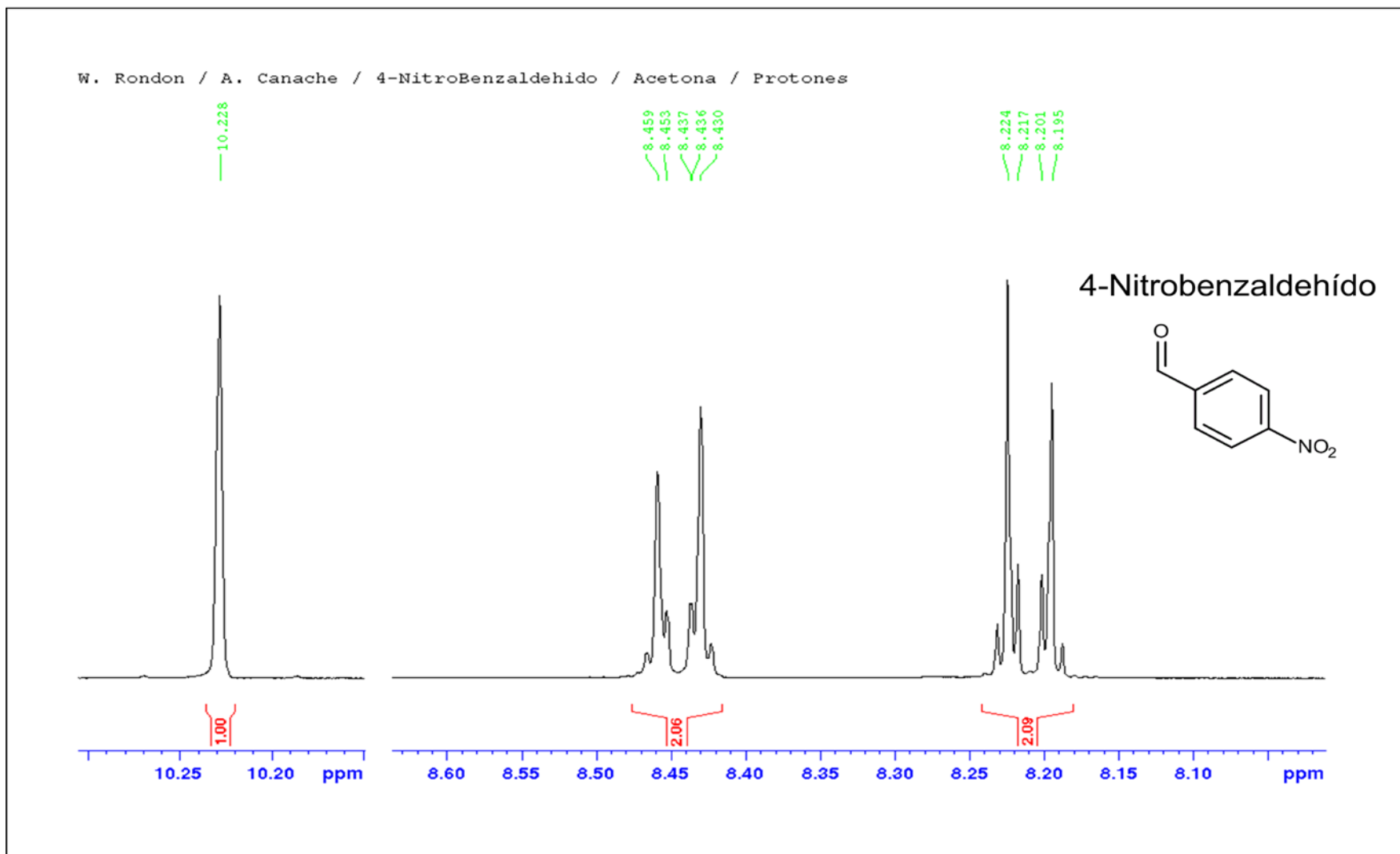
ANEXOS 17



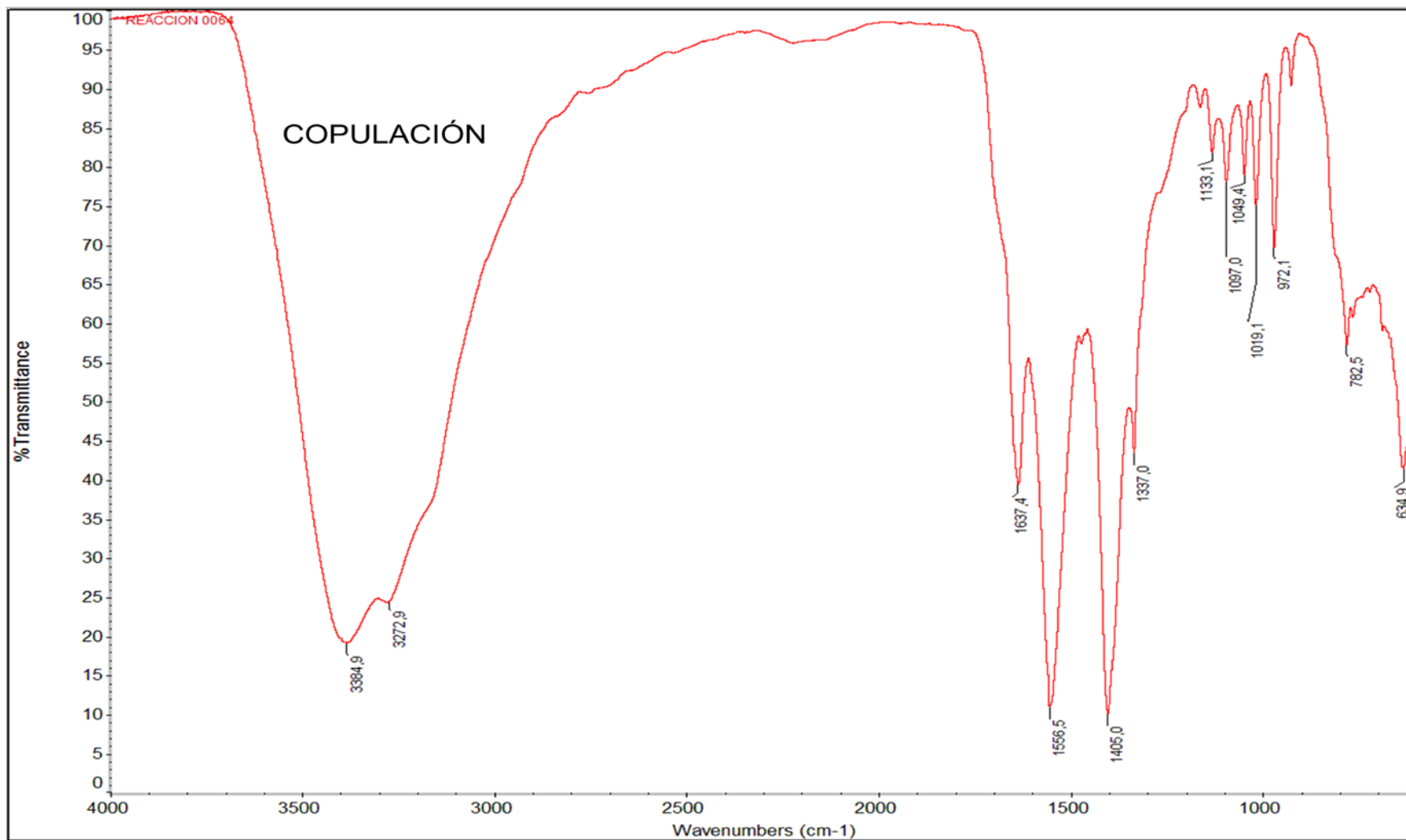
ANEXOS 19



ANEXOS 20



ANEXOS 21



ANEXOS 22

