Índices de refracción de la quitina, el quitosano y el ácido úrico con aplicación en análisis de color estructural

Refractive indices of chitin, chitosan, and uric acid with application to structural color analysis

William E. Vargas^(*), Daniel E. Azofeifa, Humberto J. Arguedas

Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales y Escuela de Física, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

^(*) Email: william.vargascastro@ucr.ac.cr

Recibido / Received: 04/09/2012. Revisado / Revised: 09/11/2012. Aceptado / Accepted: 10/11/2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.7149/OPA.46.1.55>

RESUMEN:

Las propiedades ópticas de los polímeros naturales quitina y quitosano, así como las del ácido úrico, han sido consideradas para longitudes de onda entre 0.25 y 0.75 μm . En primer lugar, mediante la inversión de datos publicados del índice de refracción para polímeros compuestos tanto de quitosano como de quitina, se ha podido obtener la dependencia espectral de los índices de refracción de ambos materiales. En segundo lugar, se llevaron a cabo mediciones de reflexión y transmisión de luz no polarizada a muestras obtenidas de camarones frescos. A partir de estas mediciones espectrofotométricas se ha obtenido el índice de refracción del medio compuesto por quitina y ácido úrico, y su correspondiente coeficiente de extinción para el intervalo espectral antes mencionado. La absorción de luz por la quitina es despreciable para las longitudes de onda consideradas. El coeficiente de extinción del ácido úrico muestra bandas de absorción en el ultravioleta cercano. Las mediciones de absorbancia confirman la presencia de ácido úrico en las muestras de quitina obtenidas de camarones frescos. A manera de ejemplo ilustrativo, las constantes ópticas de la quitina se utilizan para modelar el color estructural de un chinche asiático: el *Poecilocoris lewisi*.

Palabras clave: Biopolímeros, Índice de Refracción, Coeficiente de Extinción, Color Estructural, Multicapas.

ABSTRACT:

The optical properties of chitin and chitosan natural polymers, as well as uric acid, have been considered for wavelengths between 0.25 and 0.75 μm . First, by inverting refractive index data published for chitin-chitosan composite samples, it was possible to obtain the spectral dependence of the refractive indices of both materials. Reflection and transmission measurements of non-polarized light were carried out from samples of fresh shrimp shells. From these spectrophotometric measurements we obtained the refractive index of the composite medium chitin-uric acid as well as the corresponding extinction coefficient through the mentioned spectral wavelength range. The absorption of light by the chitin is negligible for the wavelengths considered. The extinction coefficient of uric acid shows absorption bands in the near ultraviolet. Absorbance measurements confirm the presence of uric acid in the chitin samples obtained from fresh shrimps. By way of illustrative example, the optical constants of chitin are used to model the structural color of a shield bug from Asia: the *Poecilocoris lewisi*.

Key words: Biopolymers, Refractive Index, Extinction Coefficient, Structural Color, Multilayers.

REFERENCIAS Y ENLACES / REFERENCES AND LINKS

- [1]. P. K. Dutta, J. Dutta, V. S. Tripathi, "Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications", *J. Sci. Industrial Res.* **63**, 20-31 (2004).
- [2]. E. A. Plisko, L. A. Nud'ga, S. N. Danilov, "Chitin and its chemical transformation", *Rus. Chem. Rev.* **46**, 764-774 (1977). [DOI](#)
- [3]. T. S. Trung, W. W. Thein-Han, N. T. Qui, C. H. Ng, W. F. Stevens, "Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation", *Bioresource Technol.* **97**, 659-663 (2006). [DOI](#)
- [4]. A. Sugunan, C. Thanachayanont, J. Dutta, J. G. Hilborn, "Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles", *Sci. Technol. Adv. Mat.* **6**, 335-340 (2005). [DOI](#)
- [5]. J. P. Vigneron, M. Rassart, P. Simonis, J. F. Colomer, A. Bay, "Possible used of the layered structure found in the scales of *Hoplia coerulea* (Coleoptera)", *Proc. SPIE* **7401**, 74010B (2009). [DOI](#)
- [6]. C. Campos-Fernández, D. E. Azofeifa, M. Hernández-Jiménez, A. Ruiz-Ruiz, W. E. Vargas, "Visible light reflection spectra from cuticle layered materials", *Opt. Mater. Express* **1**, 85-100 (2011). [DOI](#)
- [7]. J. P. Vigneron, J. F. Colomer, N. Vigneron, V. Lousse, "Natural layer-by-layer photonic structure in the squamae of *Hoplia coerulea* (Coleoptera)", *Phys. Rev. E* **72**, 061904 (2005). [DOI](#)
- [8]. H. L. Leertouwer, B. D. Wilts, D. G. Stavenga, "Refractive index and dispersion of butterfly chitin and bird keratin measured by polarizing interference microscopy", *Opt. Express* **19**, 24061-24066 (2011). [DOI](#)
- [9]. S. Caveney "Cuticle reflectivity and optical activity in scarab beetles: the role of uric acid", *Proc. Roy. Soc. London B* **178**, 205-225 (1971). [DOI](#)
- [10]. R. E. Sours, J. A. Swift "The relationship between uric acid crystals and kidney stone disease", *Am. Crystallographic Assoc. Trans.* **39**, 83-89 (2004).
- [11]. J. Majtán, K. Bílikova, O. Markovic, J. Gróf, G. Kogan, J. Simúth, "Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)", *Int. J. Biol. Macromol.* **40**, 237-241 (2007). [DOI](#)
- [12]. F. Gagné, C. Blaise, "Shell protein characteristics and vitellogenin-like proteins in brine shrimp *Artemia franciscana* exposed to municipal effluent and 20-hydroxyecdysone", *Comp. Biochem. Phys. C* **138**, 515-522 (2004).
- [13]. M. Koralewski, K. H. Bodek, K. Marczevska, "Optical properties of chitosan in aqueous solution", *Polish Chitin Society XI*, 29-39 (2006).
- [14]. I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, "Functional characterization of chitin and chitosan", *Curr. Chem. Biol.* **3**, 203-230 (2009).
- [15]. B. Nuntakumjorn, W. Khumsalud, T. Vetsavas Sujjaviriyasup, E. Phalakornkule, "Comparison of sludge granule and UASB performance by adding chitosan in different forms", *Chiang Mai J. Sci.* **35**, 95-102 (2008).
- [16]. K. M. Picker-Freyer, D. Brink, "Evaluation of powder and tableting properties of chitosan", *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **7**, 75 (2006). [DOI](#)
- [17]. W. C. Hsieh, C. P. Chang, S. M. Lin "Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering", *Colloid. Surface. B* **57**, 250-255 (2007). [DOI](#)
- [18]. D. Raabe, A. Al-Sawalmih, S. B. Yi, H. Fabritius, "Preferred crystallographic texture of α -chitin as a microscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*", *Acta Biomater.* **3**, 882-895 (2007). [DOI](#)
- [19]. A. C. Wali, B. V. K. Naidu, N. N. Mallikarjuna, S. R. Sainkar, S. B. Halligudi, T. M. Aminabhavi, "Miscibility of chitosan-hydroxyethylcellulose blends in aqueous acetic acid solutions at 35°C", *J. Appl. Polymer Sci.* **96**, 1996-1998 (2005). [DOI](#)
- [20]. H. W. Jaffe, "Application of the rule of Gladstone and Dale to minerals", *Am. Mineral.* **41**, 757-777 (1956).
- [21]. M. Quinten, *Optical Properties of Nanoparticle Systems*, Wiley-VCH, Singapore (2011). [DOI](#)
- [22]. M. Lavertu, Z. Xia, A. N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M. D. Buschmann, A. Gupta, "A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan", *J. Pharmaceut. Biomed.* **32**, 1149-1158 (2003). [DOI](#)

- [23]. Y. Zhang, X. Zhang, R. Ding, J. Zhang, J. Liu, "Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment", *Carbohydr. Polym.* **83**, 813-817 (2011). [DOI](#)
- [24]. W. H. Nosal, D. W. Thompson, S. Sarkar, A. Subramanian, J. A. Woollam, L. Yan, "UV-vis-infrared optical and AFM study of spin-cast chitosan films", *Colloid. Surface. B* **43**, 131-137 (2005). [DOI](#)
- [25]. M. Rassart, J. F. Colomer, T. Tabarrant, J. P. Vigneron, "Diffractive hygrochromic effect in the cuticle of the Hercules beetle *Dynastes Hercules*", *New J. Phys.* **10**, 033014 (2008). [DOI](#)
- [26]. S. Lowrey, L. De Silva, I. Hodgkinson, J. Leader, "Observation and modeling of polarized light from scarab beetles", *J. Opt. Soc. Am. A* **24**, 2418-2425 (2007). [DOI](#)
- [27]. J. P. Vigneron, J. M. Pasteels, D. M. Windsor, Z. Vértessy, M. Rassart, T. Seldrum, J. Dumont, O. Deparis, V. Lousse, L. P. Biró, D. Ertz, V. Welch, "Switchable reflector in the Panamanian tortoise beetle *Charidotella egregia* (Chrysomelidae: Cassidinae)", *Phys. Rev. E* **76**, 031907 (2007). [DOI](#)
- [28]. C. W. Mason, "Structural colors in insects. I", *J. Phys. Chem.* **30**, 383-395 (1916). [DOI](#)
- [29]. C. W. Mason, "Structural colors in insects. II", *J. Phys. Chem.* **31**, 321-354 (1927). [DOI](#)
- [30]. C. W. Mason, "Structural colors in insects. III", *J. Phys. Chem.* **31**, 1856-1872 (1927). [DOI](#)
- [31]. A. G. Richards, *The Integument of Arthropods*, University of Minnesota Press, Minneapolis (1951).
- [32]. J. H. Willis, "Cuticular proteins in insects and crustaceans", *Amer. Zool.* **39**, 600-609 (1999).
- [33]. B. J. S. C. Olson, J. Markwell, "Assays for determination of protein concentration", pp.3.4.1-3.4.29 in: J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, P.T. Wingfield, Edts., *Currents Protocols in Proteins Science*, John Wiley & Sons, US (2007).
- [34]. G. H. Meeten, A. N. North, F. M. Willmouth, "Errors in critical-angle measurements of refractive index of optically absorbing materials", *J. Phys. E - Sci. Instrum.* **17**, 642-643 (1984). [DOI](#)
- [35]. P. R. Jarvis, G. H. Meeten, "Critical-angle measurements of refractive index of absorbing materials: an experimental study", *J. Phys. E - Sci. Instrum.* **19**, 296-298 (1986). [DOI](#)
- [36]. G. H. Meeten, "Refractive index errors in the critical-angle and the Brewster-angle methods applied to absorbing and heterogenous materials", *Meas. Sci. Technol.* **8**, 728-733 (1997). [DOI](#)
- [37]. E. Nichelatti, "Complex refractive index of a slab from reflectance and transmittance: analytical solution", *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **4**, 400-403 (2002). [DOI](#)
- [38]. R. C. McPhedran, L. C. Botten, D. R. McKenzie, R. P. Netterfield, "Unambiguous determination of optical constants of absorbing films by reflectance and transmittance measurements", *Appl. Opt.* **23**, 1197-1205 (1984). [DOI](#)
- [39]. F. C. Smith "The ultra-violet absorption spectra of uric acid and of the ultra-filtrate of serum" *Biochem. J.* **22**, 1499-1503 (1928).
- [40]. S. N. Kasarova, N. G. Sultanova, C. D. Ivanov, I. D. Nikolov, "Analysis of the dispersion of optical plastic materials", *Opt. Mater.* **29**, 1481-1490 (2007). [DOI](#)
- [41]. W. E. Vargas, G. A. Niklasson, "Pigment mass density and refractive index determination from optical measurements", *J. Phys. - Condens. Mat.* **9**, 1661-1670 (1997). [DOI](#)
- [42]. H. A. Macleod, *Thin Film Optical Filters*, CRC Press, New York (2010).
- [43]. Y. Zhao, Z. Xie, H. Gu, C. Zhu, Z. Gu, "Bio-inspired variable structural color materials", *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3297-3317 (2012). [DOI](#)
- [44]. H. Arwin, R. Magnusson, J. Landin, and K. Järrendahl, "Chirality-induced polarization effects in the cuticle of scarab beetles: 100 years after Michelson", *Philos. Mag.* **92**, 1583-1599 (2012). [DOI](#)
- [45]. K. Miyamoto, A. Kosaku, "Structural color of shield bug (Insecta, Heteroptera) in Japan", pp. 177-191 in S. Kinoshita, S. Yoshioka, Edts., *Structural Colors in Biological Systems*, Osaka University Press, Osaka, Japan (2005).
- [46]. S. Kinoshita, *Structural Colors in the Realm of Nature*, World Scientific, New Jersey (2008).
- [47]. K. Miyamoto, A. Kosaku, "Cuticular microstructures and their relationship to structural color in the shieldbug *Poecilocoris lewisi* Distant", *Forma* **17**, 155-167 (2002).
- [48]. D. Segelstein, *The Complex Refractive Index of Water*, M.Sc. thesis, University of Missouri, Kansas City (1981).

- [49]. J. W. Ryde, "The scattering of light by turbid media. Part I", *Proc. Roy. Soc. London A* **131**, 451-464 (1931). [DOI](#)
- [50]. D. E. Azofeifa, H. J. Arguedas, W. E. Vargas, "Optical properties of chitin and chitosan biopolymers with application to structural color analysis", *Opt. Mater.* **35**, 175-183 (2012). [DOI](#)

1. Introducción

La quitina es mencionada en la literatura especializada como el segundo biopolímero, después de la celulosa, en términos de su abundancia en el medio ambiente. Es considerada como un polisacárido natural encontrado en el exoesqueleto de los invertebrados, así como en algunas de sus estructuras internas [1]; y consiste de microfibras de quitina ordenadas que también pueden ser encontradas en ciertos hongos y levaduras. El quitosano es obtenido a partir de la quitina mediante remoción de grupos acetilos [2]. Uno de los parámetros físicos que caracteriza muestras específicas de quitosano es el factor de de-acetilación el cual especifica en qué medida grupos acetilos han sido removidos. Las propiedades físicas y químicas del quitosano dependen del grado de de-acetilación [3]. Tanto la quitina como el quitosano han sido usados como componentes en diferentes productos (cosméticos, textiles, baterías de estado sólido, antibióticos, etc.) y procesos (industria del papel, procesamiento de alimentos, tratamientos biomédicos, purificación de agua, técnicas cromatográficas, etc.). El desarrollo de todas estas aplicaciones ha requerido de un detallado análisis de las propiedades físico-químicas del quitosano y de la quitina.

Aplicaciones basadas en las propiedades ópticas de la quitina y del quitosano están emergiendo. Por ejemplo, el desarrollo de sensores para detectar iones metálicos en estructuras biológicas, basados en la excitación resonante de oscilaciones superficiales de electrones libres, están siendo considerados [4]. En el análisis de la coloración estructural relacionada con la apariencia metálica e iridiscente de varios tipos de animales (pájaros, mariposas, abejones, arañas, peces), las propiedades ópticas de la quitina han sido tomadas en cuenta solamente a través del índice de refracción promedio para longitudes de onda en el rango visible, $\bar{n}_q^{(v)}$ [5]. La dispersión en el índice de refracción de la quitina no ha sido

considerada debido a la escasa información al respecto, hasta donde los autores han podido constatar. Al suponer un valor real para el índice de refracción se ignora la absorción de luz por parte de la quitina [6]. El valor $\bar{n}_q^{(v)} = 1.56$ ha sido usado en recientes publicaciones, en el contexto de modelos diseñados para correlacionar espectros de reflexión medidos con aquellos que son calculados suponiendo arreglos específicos de capas de quitina sugeridos de imágenes aportadas por microscopía electrónica [7]. A partir de mediciones con escamas de alas de mariposas *Graphium sarpedon*, que se sumergen en diferentes fluidos cuyos índices de refracción son conocidos, se ha reportado una relación de Cauchy para el índice de refracción de la quitina en el rango visible [8]. Al calcular el valor medio del índice de refracción de la quitina en el visible a partir de la mencionada relación de Cauchy se obtiene 1.52. Ciertos análisis realizados en el contexto de la coloración estructural han involucrado quitina con índices de refracción promedios en el visible cercanos a 1.70 [9], lo cual ha sido justificado por la presencia de cristales de ácido úrico a través de la estructura de la quitina. El índice de refracción promedio del ácido úrico en el visible $\bar{n}_{au}^{(v)} = 1.74$ [10]. La presencia de este ácido úrico podría atribuirse a que el mismo fuese un producto del metabolismo de proteínas que también se encuentran distribuidas a través de la quitina. Todos los valores medios a que nos referiremos a través de este artículo suponen promediar sobre longitudes de onda en el rango visible. Debido al carácter no isotrópico de la quitina, del quitosano y del ácido úrico los valores medios también suponen implícitamente promediar sobre las tres orientaciones principales para cada longitud de onda considerada.

En este artículo reportamos las constantes ópticas de la quitina, el quitosano y el ácido úrico en el rango espectral de 0.25 a 0.75 μm . La Sección 2 contiene un resumen del método de preparación de las muestras y una breve

descripción de las mediciones de reflexión y transmisión llevadas a cabo con muestras iluminadas en forma normal con luz no polarizada. En la Sección 3, a partir de dos conjuntos de constantes ópticas reportadas en la literatura para muestras de quitosano-quitina, y suponiendo que estas constantes ópticas corresponden a medios efectivos, se obtiene la dependencia espectral del índice de refracción del quitosano y de la quitina. En la Sección 4, a partir de mediciones propias de reflexión y transmisión de luz al considerar muestras de quitina tomadas de una especie de camarones frescos, se realiza una inversión numérica para obtener tanto el índice de refracción de la quitina como su coeficiente de extinción. El análisis óptico muestra una banda estructurada de absorción en el ultravioleta cercano, lo cual sugiere la presencia de ácido úrico en estas muestras de quitina. Se provee la dependencia espectral del índice de refracción complejo de la quitina y del ácido úrico, esperando que esta información sea valiosa para aquellos que, por ejemplo, elaboran modelos de coloración estructural en animales, así como en otras aplicaciones que requieran de un mejor conocimiento de las propiedades ópticas de la quitina, del quitosano y del ácido úrico. El contar con la dependencia espectral de las constantes ópticas de la quitina y del ácido úrico abre la posibilidad de obtener, a través de modelos de medio efectivo, el índice de refracción y el coeficiente de extinción para medios compuestos, esto es, medios conformados por quitina con diferentes grados de ácido úrico distribuido a través de éstos. Finalmente, en la Sección 5 utilizamos las constantes ópticas de la quitina para modelar, mediante cálculos de transferencia radiativa a través de sistemas estructurados de multicapas, el color estructural de una variedad específica de chinche: el *Poecilocoris lewisi*.

2. Preparación de muestras y mediciones ópticas

La quitina de los crustáceos ha mostrado ser muy similar a la de los insectos [11]. Con el propósito de determinar las constantes ópticas de la quitina en función de la longitud de onda, se ha escogido una estructura conocida

conformada principalmente de α -quitina que posee las condiciones de espesor y transparencia adecuadas para aplicar un procedimiento de inversión numérica en el cual se obtiene el índice de refracción (n) y el coeficiente de extinción (k), a partir de mediciones experimentales de R (reflexión) y T (transmisión) de luz (ver Sección 4). Segmentos del exoesqueleto de camarones blancos frescos (*Penaeus vannamei*) fueron utilizados para medir sus espectros de reflexión y transmisión. Las medidas fueron llevadas a cabo para longitudes de onda entre 0.25 y 0.75 μm , usando un espectrofotómetro de fibra óptica (Avantes, AvaSpec-2048) y como fuente de luz una lámpara de halógeno-deuterio (AvaLight-DHc). Los camarones fueron mantenidos en un contenedor con hielo previamente al corte de segmentos planos tomados de sus exoesqueletos. Los segmentos cortados fueron lavados abundantemente con agua para remover tejidos remanentes y luego secados con papel para ser mantenidos a temperatura ambiente durante unos 40 minutos. Este periodo de tiempo es aproximadamente el doble del requerido para remover el agua de la superficie y así obtener mediciones ópticamente estables.

Durante el proceso, pequeñas secciones de las muestras se tornaron blanquecinas en la medida en que se secaban, en particular aquellas que originalmente estaban curvadas; estas áreas blanquecinas fueron evitadas al realizar mediciones de reflexión y transmisión de luz. El espesor de las muestras fue medido con un calibrador digital. Los espesores varían significativamente al considerar diferentes secciones de cada muestra y entre muestras. Se tuvo el cuidado de medir los espesores en aquellas secciones en las que se realizaron las mediciones ópticas. Para la extracción de las proteínas y el ácido úrico contenidas en las muestras del exoesqueleto de los camarones se siguió el procedimiento modificado pH-dependiente descrito por Gagné y Blaise [12]. En cuanto a las mediciones de absorbancia, varias secciones del exoesqueleto de los camarones fueron mantenidas en 100 mL de un buffer a base de fosfato, con pH 7.0 (EMD Chemicals Inc., code 34170-130), con agitación continua mientras la temperatura se mantuvo entre 90 y 100°C durante una hora. Luego la solución fue

enfriada hasta temperatura ambiente y filtrada. Espectros de absorbancia fueron tomados a las soluciones resultantes, para longitudes de onda de 0.20 a 0.40 μm mediante un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 1700. Finalmente, la densidad de las muestras fue calculada usando una balanza analítica estándar y midiendo las dimensiones de varias secciones rectangulares de las muestras. El valor promedio de la densidad encontrada es $\rho = 0.910 \pm 0.003 \text{ g/cm}^3$. Este valor medio será utilizado en los procedimientos de inversión que se describen a continuación.

3. Índices de refracción del quitosano y de la quitina obtenidos a partir de la inversión de datos reportados en la literatura

Como se indicó previamente, utilizamos dos conjuntos de datos reportados en la literatura, los cuales incluyen información sobre el índice de refracción de muestras de quitosano-quitina en función de la longitud de onda en el visible, con extrapolaciones hacia el ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano al tratarse del primer conjunto de datos considerados. Nuestro punto de partida es considerar estas constantes ópticas reportadas como características de medios efectivos que contienen proporciones bajas de quitina y altas de quitosano. Estas proporciones son estimadas a partir de los factores de de-acetilación reportados en sendas referencias a las que nos referiremos a continuación, y de las densidades de masa de la quitina y del quitosano.

3.1. Partículas de quitosano-quitina en suspensión

El índice de refracción de partículas de quitosano-quitina en soluciones acuosas al 1% de ácido acético ha sido reportado en la Fig. 2 de la Ref. [13], para ocho concentraciones entre 0.2 y 2.0 g/dL y seis longitudes de onda en el rango visible. Las mediciones fueron llevadas a cabo mediante un refractómetro de ángulo crítico. Esta técnica de medición provee valores del índice de refracción con seis cifras significativas. Los valores de índice de refracción reportados en la mencionada figura deben ser interpretados como valores efectivos ($\bar{n}(\lambda)$) que dependen de

las fracciones de volumen de las partículas de quitosano-quitina y del solvente: f_v y $1 - f_v$ respectivamente. Esto es,

$$\bar{n}(\lambda) = f_v \cdot n_{\text{quitosano-quitina}} + (1 - f_v) \cdot n_{\text{solvente}}, \quad (1)$$

donde $n_{\text{quitosano-quitina}} \equiv n_{qq}$ es el índice de refracción de las partículas de quitosano-quitina y $n_{\text{solvente}} \equiv n_s$ es el índice de refracción del solvente: ácido acético al 1% en solución acuosa, el cual también es reportado en el mencionado trabajo de investigación. En este caso las partículas de quitosano-quitina se caracterizan por un alto grado de de-acetilación (96.3%), lo que significa que la contribución de la quitina al índice de refracción efectivo es muy pequeña, pero no vamos a ignorar tal contribución a priori. Al considerar la ecuación previa, multiplicada por la densidad media de masa de las partículas de quitosano-quitina ($\bar{\rho}$), para las concentraciones más baja (c_1) y más alta (c_2) consideradas por Koralewski y colaboradores [13] se obtiene:

$$\bar{\rho} \bar{n}_1 = c_1 n_{qq} + (\bar{\rho} - c_1) n_s, \quad (2a)$$

$$\bar{\rho} \bar{n}_2 = c_2 n_{qq} + (\bar{\rho} - c_2) n_s, \quad (2b)$$

donde $c_1 = 0.002 \text{ g/cm}^3$, $c_2 = 0.02 \text{ g/cm}^3$ como se mencionó previamente en unidades de g/dL. La Fig. 1 muestra la dispersión en los índices de refracción correspondientes al solvente, y a las

Fig. 1: Índice de refracción efectivo de partículas de quitosano-quitina dispersas en una solución acuosa con ácido acético al 1% y para dos concentraciones de las partículas, como se indica en la figura. El índice de refracción del solvente (n_s) es también desplegado en la figura. El factor de de-acetilación de las partículas es de 96.3%.

muestras con las concentraciones más baja y más alta de partículas de quitosano-quitina dispersas en solución acuosa con ácido acético al 1%. Los autores de la Ref. [13] muy amablemente han compartido con nosotros sus datos.

Como lo indica Aranaz *et al.* “debido a su origen natural, tanto la quitina como el quitosano no pueden ser definidos en términos de una sola estructura química sino como una familia de polímeros que presentan una alta variabilidad en sus propiedades químicas y físicas” [14]. Este hecho, y los distintos procesos asociados a la producción del quitosano a partir de la quitina, hacen difícil tener un único y bien establecido valor para la densidad de masa de muestras de quitosano-quitina. Por ejemplo, Nuntakumjorn *et al.* reportan un valor de 0.531 g/cm³ para partículas de quitosano-quitina de tamaño micrométrico [15], mientras que Picker-Freyer y Brink reportan valores entre 0.373 y 0.500 g/cm³ dependiendo del factor de de-acetilación y del tamaño medio de las partículas [16]. Hsieh *et al.* reportan una densidad de 1.34 g/cm³ para el quitosano [17] y Raabe *et al.* indican una densidad de 1.41 g/cm³ para la quitina [18]. Este último dato podría considerarse el valor más alto que puede tomar la densidad de masa de la quitina, dado que el mismo ha sido determinado a partir de mediciones de parámetros cristalográficos mediante técnicas de rayos X. Todos estos datos reflejan un grado de dispersión significativo en cuanto a las densidades del quitosano y de la quitina, lo que a su vez implica distintos grados de porosidad entre unas muestras y otras consideradas en los diferentes estudios.

A partir de las Ecs. (2) el índice de refracción de las partículas de quitosano-quitina puede ser obtenido:

$$n_{qq} = n_s \left[1 + \frac{\bar{\rho}(\gamma - 1)}{c_2 - \gamma c_1} \right], \quad (3)$$

donde $\gamma = \bar{n}_2/\bar{n}_1$. Esta ecuación previa involucra la densidad de masa promedio de las partículas de quitosano-quitina, la cual depende de las densidades de masa del quitosano, de la quitina, y de las fracciones de volumen de ambos componentes: $\bar{\rho} = F\rho + (1 - F)\rho'$, donde ρ es la densidad de masa del quitosano, y F es la fracción de volumen ocupada por el quitosano.

Esta fracción es determinada a partir del factor de de-acetilación y de las densidades de masa del quitosano y de la quitina, como se explica en detalle más adelante. Debido al alto grado del factor de de-acetilación (96.3%) de las muestras consideradas por Koralewski y colaboradores, la densidad de masa de las partículas ($\bar{\rho}$) debería ser muy similar a la densidad de masa del quitosano puro. Utilizando el valor de ρ' determinado en la sección previa, y suponiendo un cociente de masas $\rho/\rho' = 1.16$, la densidad media de masa de las partículas de quitosano-quitina consideradas llega a ser $\bar{\rho} = 1.05$ g/cm³, valor muy cercano al reportado en la Ref. [19] para partículas de quitosano puro en soluciones acuosas con ácido acético al 2%. En dicho estudio la densidad de masa de las soluciones conteniendo partículas de quitosano puro ha sido determinada para soluciones con concentraciones crecientes de partículas. Aunque la concentración de estas fue incrementada por un factor de 5, la densidad de masa efectiva de la solución se incrementó solo en un 0.06%, con valores muy cercanos a 1.0 g/cm³. Al aplicar la Ec. (3), variaciones de hasta un 25% en la densidad de masa de las partículas de quitosano-quitina lleva a incertidumbres menores al 3% en los valores del índice de refracción, cuando se les compara con los valores obtenidos al suponer una densidad media para las partículas de $\bar{\rho} = 1.05$ g/cm³. Se debe indicar que el valor $\rho/\rho' = 1.16$ en realidad proviene de un proceso de optimización que lleva a obtener una dependencia espectral en el índice de refracción de la quitina para la cual $\bar{n}_q^{(v)} = 1.56$, como se mostrará en lo sucesivo.

A partir de la inversión basada en la Ec. (3), ha sido posible obtener una relación de Sellmeier para el índice de refracción de las partículas de quitosano-quitina dada por $n_{qq}^2 = 1 + S_0\lambda^2/(\lambda^2 - \lambda_0^2)$. La dependencia espectral del índice de refracción de estas partículas es mostrada en la Fig. 2, en la cual la línea sólida corresponde a la ecuación:

$$n_{qq}^2 = 1 + 1.295 \frac{\lambda^2}{\lambda^2 - (0.1058)^2}, \quad (4)$$

con la longitud de onda λ en μm . En la Fig. 2 los puntos corresponden a datos del índice de refracción de las partículas de quitosano-quitina cuyos valores han sido calculados a partir de la

Ec. (3). Los valores en el ultravioleta cercano y en el infrarrojo cercano han sido obtenidos mediante extrapolación de la Ec. (4) hacia estas regiones espectrales. A continuación denotaremos al índice de refracción especificado por la Ec. (4) como $n_{qq} = \bar{n}_{ef}^{(1)}$ (un índice de refracción efectivo) pues sus valores para distintas longitudes de onda son determinados por contribuciones del quitosano y de la quitina. Explícitamente:

$$\bar{n}_{ef}^{(1)} = F n_{quitosano} + (1 - F) n_{quitina}, \quad (5)$$

donde F es la fracción del volumen ocupado por el quitosano para $D_f = 96.3\%$ según el factor de de-acetilación reportado en la Ref. [13]. Las Ecs. (2) y (5) corresponden a aplicación de la aproximación de Gladstone y Dale la cual es válida para medios compuestos de materiales ópticamente suaves [20,21].

Varios métodos son actualmente aplicados para determinar el grado de de-acetilación del quitosano, incluyendo la espectroscopía de resonancia magnética nuclear [22,23]. Una de las técnicas más empleadas se basa en mediciones de absorbancia en el infrarrojo por parte de muestras de quitosano-quitina, para longitudes de onda de 6.042 (1655 cm^{-1}) y 2.898 μm (3450 cm^{-1}). La primera longitud de onda corresponde a la absorción en resonancia debido a los grupos acetilos que caracterizan la presencia de la quitina, y para la segunda longitud de onda la absorción es debida a bandas asociadas a grupos hidroxilos comunes tanto a la quitina como al quitosano. El grado de acetilación es obtenido a partir de la razón entre estas dos absorbancias y a partir de éste se evalúa el grado respectivo de de-acetilación. La absorbancia es proporcional a la concentración lo que significa que el factor de de-acetilación es una razón entre la masa del quitosano y la masa de la quitina más la masa del quitosano. Esto es, $D_f = m_{quitosano} / (m_{quitosano} + m_{quitina})$. Por tanto, la relación entre fracción de volumen del quitosano y factor de de-acetilación es dada por:

$$F = \frac{1}{1 + \frac{(1 - D_f)\rho}{D_f\rho'}} \quad (6)$$

donde las densidades de masa del quitosano puro (ρ) y de la quitina pura (ρ') están

Fig. 2: Índice de refracción efectivo de partículas de quitosano-quitina con un factor de de-acetilación de 96.3%. Los puntos corresponden a valores obtenidos a partir de la Ec. (3) y utilizando los valores de índices de refracción reportados en la figura previa para dos concentraciones de partículas en solución acuosa con ácido acético al 1%, y la línea sólida despliega los valores obtenidos mediante la relación de Sellmeier indicada en la Ec. (4).

involucradas. Como se mencionó antes, suponemos $\rho = 1.06 \text{ g/cm}^3$ como la densidad de masa del quitosano y $\rho' = 0.91 \text{ g/cm}^3$ para la quitina. Por tanto $F = 95.7\%$.

3.2. Películas de quitosano-quitina

Películas de quitosano-quitina, obtenidas mediante técnicas de deposición giratoria, han sido objeto de mediciones elipsométricas para determinar su grado de anisotropía óptica. La dispersión en sus índices de refracción ordinario ($n_o = n_{xy}$) y extraordinario ($n_e = n_z$) ha sido reportada por Nosal *et al.*, según se muestra en la Fig. 2 de la Ref. [24]. A partir de los datos amablemente suplidos por estos autores, datos que poseen cinco cifras significativas, el promedio espacial del índice de refracción de estas películas de quitosano-quitina ha sido evaluado: $\bar{n}_{ef}^{(2)} = (2n_o + n_e)/3$. La línea sólida en la Fig. 3 despliega la dispersión normal de este índice de refracción promedio. De hecho, estos valores deben ser considerados también como valores efectivos pues las películas de quitosano-quitina consideradas en este trabajo tienen porcentajes significativos de quitina, con un factor de de-acetilación $d_f = 82.1\%$. Esto es:

$$\bar{n}_{ef}^{(2)} = f n_{quitosano} + (1 - f) n_{quitina}, \quad (7)$$

Fig. 3: Índice de refracción efectivo de películas de quitosano-quitina con espesor de 293 nm y un factor de de-acetilación reportado como 82.1%.

Fig. 4: Dispersión en el índice de refracción promedio de la quitina y del quitosano para longitudes de onda del ultravioleta cercano, el visible y el infrarrojo cercano, según inversión de las Ecs. (5) y (7).

con la fracción de volumen ocupado por el quitosano dada explícitamente por $f = 1/[1 + (1 - d_f)\rho/(d_f\rho')] = 79.8\%$.

Al resolver el sistema de ecuaciones lineales (5) y (7) se obtiene la dependencia espectral de los índices de refracción del quitosano y de la quitina. La Fig. 4 muestra los resultados a partir de los cuales se pueden obtener relaciones de Sellmeier para ambos materiales, válidas para longitudes de onda en el visible:

$$n_{quitosano}^2 = 1.0 + \frac{1.2908\lambda^2}{\lambda^2 - (0.1063)^2}, \quad (8a)$$

$$n_{quitina}^2 = 1.0 + \frac{1.3793\lambda^2}{\lambda^2 - (0.1076)^2}, \quad (8b)$$

con λ en μm . Ambas relaciones fueron obtenidas mediante ajustes cuyos coeficientes de correlación son mayores a 0.994. El quitosano despliega una dispersión normal sobre todo el rango de longitudes de onda consideradas, mientras que la quitina muestra dispersión anómala para longitudes de onda menores a los 0.30 μm . Una incertidumbre de 25% en la densidad de masa del quitosano (ρ) lleva a resultados con tres cifras significativas en la determinación de los índices de refracción del quitosano y de la quitina. Esta es una incertidumbre similar a la alcanzada al obtener índices de refracción a partir de mediciones espectrofotométricas, esto es, a partir de mediciones de espectros de reflexión y transmisión cuyas incertidumbres sean del orden del 1%. Con los datos desplegados en la Fig. 4 se obtiene el valor medio del índice de refracción de la quitina en el rango de longitudes de onda del visible. Esto es:

$$\bar{n}_q^{(v)} = \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} n_{quitina}(\lambda) d\lambda = 1.56, \quad (9)$$

con $\lambda_1 = 0.4 \mu\text{m}$ y $\lambda_2 = 0.7 \mu\text{m}$. Este valor medio es el que con frecuencia se utiliza en el contexto de modelos de coloración estructural [25-27]. Como se mencionó antes, el valor del cociente entre densidades de masa del quitosano y de la quitina se utilizó como parámetro de ajuste, de modo que al cabo del procedimiento de inversión obtuviésemos un valor promedio de 1.56 para el índice de refracción de la quitina en el visible. Para el quitosano el valor correspondiente es $\bar{n}_{quitosano}^{(v)} = 1.53$. Desde tiempo atrás el índice de refracción promedio de la quitina ha sido establecido entre 1.5 y 1.6, como lo muestra la serie de artículos publicados por Mason [28-30]. Según nuestros resultados mostrados en la Fig. 4, a través del rango visible la dependencia espectral del índice de refracción de la quitina muestra una dispersión normal, esto es, el índice de refracción decrece al aumentar la longitud de onda.

Para longitudes de onda menores a los 0.3 μm el índice de refracción de la quitina decrece

en el ultravioleta cercano. Esa es una región de dispersión anómala y ello podría indicar la presencia de una banda de absorción no despreciable a longitudes de onda en el ultravioleta cercano menores a las consideradas. Para materiales tomados de cutículas una banda de absorción centrada en cerca de $0.28\ \mu\text{m}$ ha sido reportada en la literatura y atribuida inicialmente a la presencia de proteínas [artropodinas] distribuidas a través de la cutícula [31]. Como lo menciona Willis: la gran multiplicidad de proteínas en la cutícula provoca el abandono del término *artropodina* al referirse a los constituyentes de la cutícula [32]. Esta banda de absorción, que es debida a la absorción de luz por aminoácidos, ha sido usada para diseñar protocolos para la medida de concentración de proteínas que absorben radiación en longitudes de onda cercanas a los $0.28\ \mu\text{m}$ (ver por ejemplo la Ref. [33]). El tratamiento térmico aplicado para obtener partículas de quitosano-quitina a partir de quitina podría descomponer las proteínas distribuidas a través de la cutícula. Así, la presencia de una banda de absorción para longitudes de onda menores a los $0.3\ \mu\text{m}$ puede estar asociada a mecanismos intrínsecos de excitaciones electrónicas, en vez de absorción por proteínas distribuidas a través de la cutícula. El índice de refracción del quitosano muestra dispersión normal sobre todo el rango de longitudes de onda consideradas, como se muestra en la curva inferior de la Fig. 4. El proceso químico seguido para obtener quitosano a partir de quitina usualmente implica tratamiento térmico lo cual resulta en descomposición de las proteínas y por tanto el quitosano no despliega absorción de luz en el ultravioleta cercano en donde la quitina sí absorbe.

Una pregunta que surge es la siguiente: ¿Qué tan confiable son los valores del índice de refracción del quitosano-quitina que hemos utilizado en el método de inversión para longitudes de onda en el ultravioleta cercano donde algún grado de absorción de luz está presente? Esta pregunta es particularmente relevante para aquellos datos obtenidos mediante la técnica de refractómetro de ángulo crítico cuyos resultados son interpretados suponiendo que no hay absorción de luz del

todo. De acuerdo con Meeten y colaboradores [34-36], el error en la determinación del índice de refracción mediante técnicas de ángulo crítico es muy pequeño (del orden de 10^{-5}) cuando el coeficiente de extinción es menor que 10^{-3} . Como mostraremos en la siguiente sección, el coeficiente de extinción de la quitina es del orden de 3.0×10^{-4} en el rango espectral del visible. Este hecho da validez al análisis de esta sección, el cual se ha basado en utilizar mediciones reportadas en la literatura acerca del índice de refracción de muestras de quitosano-quitina a través de un rango espectral que incluye parte del ultravioleta cercano y el visible.

4. Índice de refracción complejo de la quitina y del ácido úrico

Espectros de reflexión y transmisión fueron obtenidos iluminando las muestras de secciones del exoesqueleto de camarones descritas en la Sección 2 con luz no polarizada a incidencia normal. La incertidumbre en la intensidad de luz asociada a estas medidas es del orden del 1%. La Fig. 5 muestra el comportamiento característico de los espectros de reflexión y transmisión para una muestra de espesor medio $h = 130\ \mu\text{m}$. Se utilizarán estas mediciones espectrofotométricas para obtener tanto el índice de refracción (n) como el coeficiente de extinción (k) efectivos de capas del exoesqueleto. Para una capa gruesa no soportada de espesor h , esto es, sin sustrato alguno, al sumar intensidades e ignorando las diferencias de fase entre los rayos internamente reflejados, la reflexión y transmisión llegan a estar expresadas respectivamente por las relaciones:

$$R = r + \frac{r(1-r)^2 e^{-2\alpha h}}{1 - r^2 e^{-2\alpha h}}, \quad (10a)$$

$$T = \frac{(1-r)^2 e^{-\alpha h}}{1 - r^2 e^{-2\alpha h}}, \quad (10b)$$

donde $\alpha = 4\pi k/\lambda$ es el coeficiente de absorción, λ es la longitud de onda de la luz incidente, $r = |(1-m)/(1+m)|^2$ es el coeficiente de reflexión en las interfaces de la capa, y $m = n - ik$ es el índice de refracción complejo de ésta. Las Ecs. (10) pueden ser invertidas para obtener secuencialmente r , k y n a partir de R y T [37,38]:

$$r = \frac{T^2 + 2 - (R - 1)^2}{2(2 - R)} - \sqrt{\left(\frac{T^2 + 2 - (R - 1)^2}{2(2 - R)}\right)^2 - \frac{R}{2 - R}} \quad (11a)$$

$$k = -\lambda \frac{\ln((R - r)/rT)}{4\pi h}, \quad (11b)$$

$$n = \frac{1 + r}{1 - r} \left\{ 1 + \sqrt{1 - \left(\frac{1 - r}{1 + r}\right)^2 (1 + k^2)} \right\} \quad (11c)$$

Los valores de R y T requeridos en las ecuaciones previas corresponden a R_{exp} y T_{exp} respectivamente. Normalmente los métodos de inversión a partir de espectros de reflexión y transmisión dan resultados con tres cifras significativas en los valores n y k . La Fig. 6 muestra los resultados obtenidos para las constantes ópticas de una capa del exoesqueleto con espesor de $130 \mu\text{m}$. El índice de refracción muestra dispersión anómala para longitudes de onda menores a los $0.4 \mu\text{m}$. El coeficiente de extinción muestra dos picos de absorción en el ultravioleta cercano, en 0.280 y $0.325 \mu\text{m}$. A través del rango visible el coeficiente de extinción es pequeño, con valores menores a 3.5×10^{-4} . Como se mencionó antes, esta banda de absorción puede ser atribuida a la presencia de proteínas en estas capas del exoesqueleto y a productos del metabolismo de esas proteínas, como el ácido úrico por ejemplo.

Fig. 5: Espectros de reflexión y transmisión medidos experimentalmente a partir de una muestra del exoesqueleto del camarón *Penaeus vannamei*, de $130 \mu\text{m}$ de espesor iluminada con luz no polarizada a incidencia normal.

Con el propósito de examinar adicionalmente esta banda de absorción de luz ultravioleta, el contenido proteínico de algunas de las muestras aquí consideradas fue aislado en solución acuosa para medir su absorbancia, como se describió en la Sección 2, y los resultados son mostrados en la Fig. 7. Los dos picos de absorción desplegados en el espectro de k son también mostrados en la curva de absorbancia, con correspondientes bandas de absorción corridas hacia menores longitudes de onda. Un tercer pico es desplegado en el espectro de absorbancia, centrado en los $0.232 \mu\text{m}$. Este no es claramente observado en el espectro de k pero quizá se encuentre superpuesto con el pico mayor, a longitudes de onda cortas. La presencia de los picos en 0.232 y

Fig. 6: Dependencia espectral de los valores efectivos del: (a) índice de refracción y (b) el coeficiente de extinción de una capa del exoesqueleto del camarón *Penaeus vannamei*.

0.286 μm sugieren la presencia de ácido úrico en estas muestras tomadas de camarones frescos. Bandas de absorción en el ultravioleta se han reportado para el ácido úrico disuelto en agua o en un buffer de fosfato, centradas en 0.292 y 0.235 μm [39]. Por tanto, el índice de refracción y coeficiente de extinción reportados en la Fig. 6 deben también ser considerados como parámetros efectivos y serán denotados como $\bar{n}_{qau}$ y $\bar{k}_{qau}$ respectivamente, con contribuciones tanto de la quitina como del ácido úrico.

El valor promedio del índice de refracción de la quitina-ácido úrico que conforman estas muestras, cuyo espectro se despliega en la Fig. 6(a), para longitudes de onda entre 0.4 y 0.7 μm , es $\bar{n}_{qau}^{(v)} = 1.62$ lo cual es un tanto mayor al valor $\bar{n}_q^{(v)} = 1.56$ a menudo mencionado en la literatura para la quitina. Esta diferencia también puede ser atribuida a la presencia del ácido úrico pues el índice de refracción promedio de éste para longitudes de onda en el visible es $\bar{n}_{qu}^{(v)} = 1.74$ [10]. Al promediar sobre longitudes de onda en el visible se tiene que $\bar{n}_{qau}^{(v)} = f_a \bar{n}_{qu}^{(v)} + (1 - f_a) \bar{n}_q^{(v)}$ siendo f_a la fracción de volumen ocupada por el ácido úrico en las muestras de quitina tomadas de los camarones frescos. Al invertir la ecuación previa para evaluar dicha fracción de volumen se obtiene que $f_a = 0.33$. Este valor es utilizado para obtener el índice de refracción (n_{au}) y el coeficiente de extinción (k_{au}) del ácido úrico a partir de las relaciones $n_{qau} = f_a n_{au} +$

$(1 - f_a) n_q$ y $k_{qau} = f_a k_{au} + (1 - f_a) k_q$, siendo n_q el índice de refracción de la quitina especificado por la Ec. (8(b)) para longitudes de onda en el visible, y mostrado en la Fig. 4 para un rango espectral mayor. Antes de proceder a la inversión de ambas expresiones previas para desplegar la dependencia espectral del índice de refracción y el coeficiente de extinción del ácido úrico, se llevó a cabo una descomposición espectral del coeficiente de extinción de la quitina - ácido úrico desplegado en la Fig. 6(b). Mediante esta descomposición fue posible sustraer la absorción de fondo y asignarla como absorción debida a la quitina, aislando así también la contribución de los dos picos de absorción atribuidos a la presencia del ácido úrico. De esta forma se obtuvo la dependencia espectral del coeficiente de extinción de la quitina, k_q , cuyo valor medio en el rango de longitudes de onda considerados en la Fig. 6 es $\bar{k}_q^{(v)} = 3.2 \times 10^{-4}$. La Fig. 8 muestra el comportamiento espectral de las constantes ópticas del ácido úrico, y la Tabla I contiene valores de las constantes ópticas para la quitina y el ácido úrico. Estos datos pueden ser utilizados, interpolando cuando sea requerido, para cálculos como los realizados en las evaluaciones de coloración estructural. Ejemplo de este tipo de aplicación se presenta en la siguiente sección.

Las constantes ópticas que se han obtenido para la quitina han supuesto una densidad de masa cercana a los 0.90 g/cm³ para ésta, lo cual

Fig. 7: Curva de absorbancia del ácido úrico y las proteínas aislados a partir de las muestras del exoesqueleto tomadas de camarones frescos.

Fig. 8: Dependencia espectral del índice de refracción y del coeficiente de extinción del ácido úrico.

Tabla I
Índices de refracción y coeficientes de extinción de la quitina (n_q y k_q) y del ácido úrico (n_{au} y k_{au}).

λ (μm)	n_q	$k_q \times 10^4$	n_{au}	$k_{au} \times 10^4$	λ (μm)	n_q	$k_q \times 10^4$	n_{au}	$k_{au} \times 10^4$
0.255	1.575	2.750	0.916	11.884	0.500	1.565	3.180	1.735	3.215
0.260	1.577	2.760	0.875	12.772	0.505	1.564	3.189	1.733	3.228
0.265	1.579	2.760	0.855	13.775	0.510	1.564	3.197	1.731	3.239
0.270	1.580	2.770	0.830	13.822	0.515	1.563	3.206	1.729	3.256
0.275	1.581	2.783	0.834	14.606	0.520	1.563	3.215	1.728	3.270
0.280	1.582	2.791	0.836	15.108	0.525	1.563	3.224	1.726	3.293
0.285	1.583	2.800	0.841	14.171	0.530	1.562	3.233	1.725	3.310
0.290	1.583	2.810	0.862	12.345	0.535	1.562	3.242	1.724	3.324
0.295	1.583	2.818	0.888	9.430	0.540	1.561	3.250	1.722	3.336
0.300	1.584	2.827	0.912	7.707	0.545	1.561	3.259	1.720	3.345
0.305	1.584	2.835	0.938	6.962	0.550	1.561	3.268	1.719	3.348
0.310	1.584	2.844	0.966	6.713	0.555	1.560	3.277	1.719	3.346
0.315	1.584	2.853	0.985	6.569	0.560	1.560	3.286	1.717	3.347
0.320	1.583	2.862	1.028	6.450	0.565	1.560	3.295	1.715	3.346
0.325	1.583	2.871	1.061	6.660	0.570	1.559	3.303	1.714	3.336
0.330	1.583	2.880	1.111	6.619	0.575	1.559	3.312	1.713	3.329
0.335	1.582	2.888	1.167	6.215	0.580	1.559	3.321	1.712	3.327
0.340	1.582	2.897	1.233	5.876	0.585	1.558	3.330	1.710	3.340
0.345	1.582	2.906	1.301	5.221	0.590	1.558	3.334	1.710	3.361
0.350	1.581	2.915	1.378	4.513	0.595	1.558	3.348	1.709	3.382
0.355	1.581	2.924	1.453	3.942	0.600	1.557	3.356	1.708	3.396
0.360	1.580	2.933	1.516	3.569	0.605	1.557	3.365	1.707	3.414
0.365	1.579	2.941	1.571	3.207	0.610	1.557	3.374	1.706	3.431
0.370	1.579	2.950	1.621	3.033	0.615	1.557	3.383	1.705	3.453
0.375	1.578	2.960	1.660	3.004	0.620	1.556	3.392	1.705	3.467
0.380	1.578	2.968	1.690	2.938	0.625	1.556	3.401	1.703	3.482
0.385	1.577	2.977	1.722	2.920	0.630	1.556	3.410	1.703	3.506
0.390	1.577	2.986	1.738	2.878	0.635	1.555	3.418	1.702	3.518
0.395	1.576	2.994	1.753	2.917	0.640	1.555	3.427	1.701	3.540
0.400	1.575	3.003	1.765	2.926	0.645	1.555	3.436	1.700	3.545
0.405	1.575	3.012	1.771	2.955	0.650	1.555	3.445	1.700	3.547
0.410	1.574	3.021	1.775	2.976	0.655	1.554	3.454	1.700	3.548
0.415	1.574	3.030	1.780	2.910	0.660	1.554	3.462	1.699	3.547
0.420	1.573	3.039	1.778	2.969	0.665	1.554	3.471	1.698	3.543
0.425	1.573	3.047	1.774	2.990	0.670	1.554	3.480	1.697	3.539
0.430	1.572	3.056	1.770	3.000	0.675	1.554	3.489	1.696	3.534
0.435	1.571	3.065	1.768	3.016	0.680	1.553	3.498	1.696	3.526
0.440	1.571	3.074	1.764	3.028	0.685	1.553	3.506	1.695	3.518
0.445	1.570	3.083	1.761	3.038	0.690	1.553	3.515	1.695	3.509
0.450	1.570	3.091	1.758	3.054	0.695	1.553	3.524	1.694	3.498
0.455	1.569	3.100	1.754	3.072	0.700	1.552	3.533	1.693	3.488
0.460	1.569	3.109	1.753	3.083	0.705	1.552	3.542	1.693	3.477
0.465	1.568	3.118	1.750	3.092	0.710	1.552	3.551	1.693	3.465
0.470	1.568	3.127	1.748	3.111	0.715	1.552	3.559	1.692	3.453
0.475	1.567	3.136	1.745	3.126	0.720	1.552	3.568	1.691	3.440
0.480	1.567	3.145	1.743	3.147	0.725	1.551	3.577	1.691	3.426
0.485	1.566	3.153	1.741	3.162	0.730	1.551	3.586	1.691	3.413
0.490	1.566	3.162	1.738	3.175	0.735	1.551	3.595	1.690	3.398
0.495	1.565	3.171	1.737	3.191	0.740	1.551	3.604	1.690	3.383

lleva a un valor medio en el visible de 1.56 para el índice de refracción de la quitina. Al considerar quitina con mayor o menor densidad de masa que ésta, se puede hacer uso de la relación de Clausius-Mossotti o de Lorentz-Lorenz, y de su ligamen con la refracción molar, para obtener las constantes ópticas de la quitina correspondiente a la densidad de masa específica considerada [40,41]. Al considerar el valor más grande reportado para la densidad de masa de la quitina, 1.41 g/cm^3 [18], se llega a obtener como valor medio del índice de refracción en el visible $\bar{n}_q^{(v)}(\rho' = 1.41 \text{ g/cm}^3) = 2.00$, mientras que $\bar{n}_q^{(v)}(\rho' = 0.91 \text{ g/cm}^3) = 1.56$, como se ha mencionado. Al considerar valores crecientes de densidad de la quitina, se ha establecido mediante ajuste lineal una dependencia del valor medio de su índice de refracción en el visible en función de su densidad $\bar{n}_q^{(v)} = 1.0595 + \rho'(0.3367 + 0.23509\rho')$, con un coeficiente de correlación muy cercano a 1.0 y para valores de $\rho' \in [0.60, 1.41] \text{ g/cm}^3$.

5. Análisis de coloración estructural

Una vez obtenida la dependencia espectral de las constantes ópticas de la quitina, i.e. $n_q = n_q(\lambda)$ y $k_q = k_q(\lambda)$, y para mostrar su utilidad, los utilizaremos en el contexto de cálculos de transferencia radiativa a través de sistemas de multicapas [42], para evaluar espectros de reflexión tomados en el chinche *Poecilocoris lewisi* (Heteroptera: Scutelleridae). Esta es una aplicación en el campo del análisis de color estructural, un campo de investigación cuyo interés ha venido creciendo rápidamente debido al potencial desarrollo de instrumentos y materiales cuyas propiedades ópticas sean muy influenciadas por su microestructura. Evaluaciones como las que se reportan aquí, consisten en calcular el efecto producido cuando luz no polarizada [43] o polarizada [44] incide sobre estructuras periódicas que contienen quitina como uno de sus constituyentes, y está enmarcada en el área de los bio-materiales. El *Poecilocoris lewisi* es un pequeño insecto (de unos 15 mm de longitud) que puede ser encontrado en localidades de Japón y China [45]. La superficie dorsal de este insecto es caracterizada por dos regiones bien definidas

con coloraciones distintas: la sección más grande es de color verde-amarillento y la más pequeña consiste de bandas anchas de color marrón-rojizo distribuidas de forma simétrica a lo largo de su superficie dorsal.

Las zonas verde-amarillentas también despliegan un brillo metálico con coloración que cambia del verde al amarillo cuando el ángulo de visión es variado. La coloración de las zonas marrón-rojizas no muestra cambio al variar el ángulo de visión (ver la Fig. 9). La coloración de las regiones verde-amarillentas ha sido correlacionada, a partir de análisis de información provista por microscopios electrónicos de transmisión al considerar muestras ultra-delgadas de secciones de la cutícula, con una estructura de multicapas consistente en cerca de 20 bicapas sucesivas [47]. Cada bicapa consiste de una capa de quitina de unos $0.11 \mu\text{m}$ de espesor seguida de una capa líquida de unos $0.08 \mu\text{m}$ de espesor. Esta capa líquida consiste principalmente de contenido acuoso. Una capa de pigmentos negros se encuentra bajo esta estructura de multicapas. El análisis hecho a las zonas marrón-rojizas muestra una estructura de multicapas más delgada, con cerca de 5 bicapas sucesivas, siendo el espesor de las capas de quitina de unos $0.075 \mu\text{m}$ con un espesor análogo para las capas acuosas.

Fig. 9: Fotografía de un espécimen de chinche *Poecilocoris lewisi* mostrando sus coloraciones verde-amarillenta y marrón-rojiza en diferentes secciones de su superficie dorsal (reproducido con permiso de la Ref. [46]).

Primero se considerará la sección de la cutícula que contiene la estructura de multicapas más gruesa. Para un cierto ángulo de incidencia el espectro de reflexión ha sido evaluado considerando las constantes ópticas de la quitina reportadas en la Tabla I, así como el índice de refracción y el coeficiente de extinción del agua tomados de la literatura [48]. El espectro de reflexión medido, reportado por Miyamoto y Kosaku, muestra una banda ancha de reflexión cuyo pico está centrado en cerca de los $0.535 \mu\text{m}$ de longitud de onda, con un mínimo en las longitudes de onda corta, cerca de los $0.40 \mu\text{m}$ [47]. Ha sido posible reproducir estas características espectrales suponiendo un barrido en el ángulo de incidencia $[\theta \in [\theta_1, \theta_2]]$, con $\theta_1 = 0$ para incidencia normal], con el mínimo del espectro de reflexión mostrando ser sensible al valor máximo del ángulo de incidencia considerado, θ_2 . Se ha usado θ_2 como un parámetro de ajuste con el propósito de obtener la correcta posición en el mínimo observado para el espectro de reflexión a longitudes de onda corta. El ángulo $\theta_2 = 70^\circ$ da los mejores resultados cuando el valor medio del espectro de reflexión es evaluado a partir de [49]:

$$\bar{R}(\lambda) = \frac{\int_{\theta_1}^{\theta_2} R(\lambda, \theta) \sin \theta \cos \theta d\theta}{\int_{\theta_1}^{\theta_2} \sin \theta \cos \theta d\theta}, \quad (12)$$

donde la reflexión a cada longitud de onda y para cada ángulo de incidencia, $R(\lambda, \theta)$, es evaluada mediante aplicación de un modelo de transferencia radiativa que considera la propagación de radiación electromagnética a través de estructuras de multicapas. Explícitamente, la reflexión $R(\lambda, \theta)$ es evaluada a partir de [42]:

$$R(\lambda, \theta) = \left| \frac{\eta_0 B - C}{\eta_0 B + C} \right|^2, \quad (13)$$

donde $\eta_0 = N_0 \cos \theta$ para luz incidente con polarización s y $\eta_0 = N_0 / \cos \theta$ para luz incidente con polarización p ; N_0 es el índice de refracción real para el medio por el cual la luz incidente se propaga ($N_0 = 1$ en este caso). Los valores de B y C son evaluados mediante la formulación matricial:

$$\begin{pmatrix} B \\ C \end{pmatrix} = \left\{ \prod_{j=1}^N \begin{pmatrix} \cos \delta_j & i \frac{\sin \delta_j}{\eta_j} \\ i \eta_j \sin \delta_j & \cos \delta_j \end{pmatrix} \right\} \begin{pmatrix} 1 \\ \eta_{N+1} \end{pmatrix}, \quad (14)$$

con $\delta_j = 2\pi m_j d_j \cos \theta_j / \lambda$, $m_j = n_j - ik_j$ es el índice de refracción complejo de la j -ésima capa de espesor d_j ; $\eta_j = N_j \cos \theta_j$ para luz incidente con polarización s , $\eta_j = N_j / \cos \theta_j$ para luz incidente con polarización p ; N es el número de capas consideradas, y donde los valores de θ_j (con $j = 1, 2, \dots, N+1$) son obtenidos mediante aplicación de la ley de Snell. Para radiación incidente no polarizada la reflexión es dada por $R = (R_s + R_p)/2$, donde R_s y R_p son evaluados a partir del formalismo previamente indicado, para polarización s y polarización p respectivamente. Para tomar en cuenta la curvatura del área dorsal del chinche se calcula un valor medio de la reflexión variando el ángulo de incidencia, con un ángulo de elevación a partir del plano horizontal entre 0 y 27° como lo indican Miyamoto y Kosaku [47]. La Fig. 10(a) muestra los resultados junto con el valor medio de la reflexión calculada suponiendo un valor real de 1.56 para el índice de refracción de la quitina, esto es, $n_q = \bar{n}_q^{(v)}$. Incidencia de luz no polarizada ha sido considerada.

El efecto de utilizar los valores de $n_q(\lambda)$ y $k_q(\lambda)$ reportados en la Tabla I es claro: muy pequeñas diferencias en los espectros de reflexión son desplegadas en el rango visible y ultravioleta de longitudes de onda. En ambos casos un segundo pico es desplegado en el ultravioleta cercano (en $0.275 \mu\text{m}$). Este pico no es suprimido cuando se incorpora la dependencia del índice de refracción de la quitina con la longitud de onda. Esto es, ni la leve absorción de luz por parte de la quitina ni la dispersión anómala a longitudes de onda cortas suprimen la presencia de este segundo pico de reflexión. Si se considerase la presencia de ácido úrico en la quitina, ello si suprimiría la presencia de un pico secundario de reflexión en el ultravioleta, como se ha mostrado con anterioridad [50].

A partir del espectro de reflexión calculado con $n_q(\lambda)$ y $k_q(\lambda)$, el espectro de intensidad solar AM1.5 y los valores de los tri-estímulos especificados por la *International Commission on Illumination*, se han evaluado las coordenadas de cromaticidad (x, y) . Éstas, $x = 0.24$ e $y = 0.40$, están indicadas en la Fig. 10(b) mostrando la posición de un punto localizado en la sección verde-amarillenta del diagrama de cromaticidad,

según lo esperado. Estas coordenadas no cambian significativamente cuando son evaluadas a partir de un espectro de reflexión calculado tomando $n_q = \bar{n}_q^{(v)}$. Una vez que la luz incidente viaja a través de la estructura de multicapas, ésta es absorbida en la capa de pigmentos negros y por ello la apariencia de la superficie dorsal en las zonas verde-amarillentas

es principalmente determinada por la secuencia de capas de quitina con capas acuosas más delgadas entre ellas. El efecto de absorción de luz por parte de los pigmentos no ha sido considerado en nuestras evaluaciones.

Cálculos similares fueron llevados a cabo para las franjas marrón-rojizas de la superficie dorsal. La Fig. 11(a) muestra el promedio del

Fig. 10: (a) Espectro de reflexión evaluado para una estructura de multicapas que consiste de 40 capas alternadas: 20 capas de quitina de $0.11 \mu\text{m}$ de espesor cada una, y 20 capas de agua de $0.08 \mu\text{m}$ cada una. La línea sólida representa el promedio al variar el ángulo de incidencia entre 0 y 70° . Los círculos corresponden a una evaluación ignorando la dependencia espectral de las constantes ópticas de la quitina, y usando 1.56 como valor promedio del índice de refracción de la quitina. (b) Coordenadas de cromaticidad ($x = 0.24, y = 0.40$) correspondientes al espectro de reflexión desplegado en (a) por la línea sólida.

Fig. 11: (a) Espectro de reflexión calculado para una estructura de 10 multicapas alternadas: 5 capas de quitina de $0.075 \mu\text{m}$ de espesor, y 5 capas de agua del mismo espesor. La línea sólida representa el promedio al variar el ángulo de incidencia entre 0 y 70° . Los círculos corresponden a una evaluación en la que se supone un valor constante de 1.56 para el índice de refracción de la quitina. (b) Coordenadas de cromaticidad ($x = 0.25, y = 0.20$) correspondientes al espectro de reflexión desplegado en la figura (a) por la línea sólida.

espectro de reflexión correspondiente a la estructura de 10 capas. En este caso el uso de un valor constante para el índice de refracción de la quitina, $n_q = \bar{n}_q^{(v)} = 1.56$, lleva también a resultados muy semejantes a aquellos que se obtienen al incorporar la dependencia espectral del índice de refracción de la quitina. Las coordenadas de cromaticidad son $x = 0.25$ and $y = 0.20$, las cuales corresponden a un punto en el diagrama de cromaticidad localizado en la región púrpura, como se muestra en la Fig. 11(b). Este resultado indica que la sola presencia de una delgada estructura de multicapas bajo las zonas marrón-rojizas de la superficie dorsal no es suficiente para explicar del todo la coloración observada. El aspecto opaco de las franjas marrón-rojizas sugiere la presencia de pigmentos de melanina de tamaño sub-micrométrico distribuidos por debajo de la delgada estructura de multicapas [46]. Estos pigmentos absorben más efectivamente la luz a longitudes de onda cortas, removiendo parcialmente las componentes azuladas de la luz retro-dispersada. Adicionalmente, como lo reportan Miyamoto y Kosaku, cerca de un 25% de la superficie del élitro contiene pequeños conos redondeados de tamaño sub-micrométrico también, los cuales dispersan la luz incidente. Las longitudes de onda corta son dispersadas más eficientemente que las longitudes de onda larga disminuyendo la cantidad de luz azulada que ingresa a través de la estructura de multicapas. Estos dos efectos combinados podrían cambiar la posición de las coordenadas en el diagrama de cromaticidad moviendo el punto desde la región púrpura hacia regiones marrón-rojizas.

Con el propósito de evitar el enmascaramiento que podría producir el promediar los espectros de reflexión sobre un amplio rango de ángulos de incidencia, se ha incluido en la Fig. 12 el espectro de reflexión para las dos estructuras de multicapas previamente consideradas, suponiendo incidencia normal de luz no polarizada. Se concluye que la dispersión anómala por parte de la quitina a longitudes de onda corta, en el ultravioleta cercano, no suprime las franjas de interferencia de Fabry-Pérot en este rango espectral ni la presencia de una banda

Fig. 12: Espectros de reflexión para los dos sistemas de multicapas previamente considerados en las Figs. 10 y 11, bajo incidencia normal de luz no polarizada: (a) una estructura de multicapas que consiste de 40 capas alternadas: 20 capas de quitina de 0.11 μm de espesor cada una y 20 capas de agua de 0.08 μm de espesor cada una, y (b) una estructura de multicapas consistente de 10 capas: 5 capas de quitina de 0.075 μm de espesor y 5 capas de agua del mismo espesor. La línea discontinua supone cálculos considerando un valor constante de 1.56 como índice de refracción de la quitina.

secundaria de reflexión. Para longitudes de onda en los rangos ultravioleta y visible el uso de un valor promedio para el índice de refracción de la quitina parece ser una muy buena aproximación. La presencia de ácido úrico en la quitina sí suprimiría las franjas de interferencia de Fabry-Pérot en el ultravioleta cercano [50].

6. Resumen y conclusiones

Las constantes ópticas en el rango visible de longitudes de onda, esto es, los índices de refracción, de la quitina y del quitosano han sido obtenidas a partir de inversión de datos tomados de la literatura que se refieren a índices de refracción de muestras compuestas de quitosano-quitina. El índice de refracción de la quitina, obtenido a partir de constantes ópticas de muestras de quitosano-quitina térmicamente tratadas, muestra una dispersión anómala para longitudes de onda menores a los 0.30 μm , lo que sugiere la presencia de bandas de absorción en el ultravioleta, esto es, para longitudes de onda corta menores a las consideradas a través de este estudio. Estas bandas estarían probablemente asociadas a mecanismos de excitaciones electrónicas en la quitina. Con el propósito de analizar con más detalle la absorción de luz por parte de la quitina, mediciones de espectros de transmisión y reflexión de luz han sido llevadas a cabo a partir de muestras de exoesqueleto obtenidas de una especie de camarones blancos. De la inversión de estos espectros se ha obtenido la dependencia espectral del índice de refracción de las capas del exoesqueleto del *Penaeus vannamei*, y su valor medio en el visible. Al ser éste un tanto mayor a lo esperado, ello sugiere la presencia de ácido úrico a través de la quitina de estas muestras naturales. Para estas muestras naturales de quitina-ácido úrico, dispersión anómala es desplegada para longitudes de onda menores a los 0.40 μm . Medidas adicionales de absorbancia han sido llevadas a cabo en el ultravioleta cercano a soluciones con proteínas y ácido úrico extraídas de las muestras de quitina tomadas de los camarones frescos. A partir de los valores medios del índice de refracción de la quitina, del ácido úrico y de las muestras de quitina-ácido úrico, se ha establecido la fracción de volumen que ocupa el ácido úrico en las muestras naturales de quitina. Esta fracción ha sido utilizada para invertir el índice de refracción efectivo de las muestras compuestas de ácido úrico y quitina, a fin de obtener

explícitamente la dependencia espectral del índice de refracción complejo del ácido úrico.

Las constantes ópticas de la quitina han sido incorporadas en un formalismo de transferencia radiativa a través de estructuras de multicapas para modelar el color estructural del chinche *Poecilocoris lewisi*, ilustrando así la importancia de contar con la dependencia espectral del índice de refracción de la quitina y de su coeficiente de extinción, para validar el uso de un valor real constante para el índice de refracción de la quitina. Para longitudes de onda en el ultravioleta y visible, se concluye que el uso de un valor real constante para el índice de refracción de la quitina, igual al valor medio de su índice de refracción en el visible, es una muy buena aproximación. En el ultravioleta cercano, la absorción de luz por parte de la quitina y la dispersión anómala en su índice de refracción no suprimen las franjas de interferencia de Fabry-Pérot, ni la aparición de una banda de reflexión secundaria, lo que sí sucedería si se considerase presencia de ácido úrico a través de la quitina.

Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud a Mavis L. Montero, de la Escuela de Química en la Universidad de Costa Rica por su ayuda en el proceso de separación de proteínas-ácido úrico. Ellos también se muestran agradecidos con Marcell Koralewski, del Institute of Physics en la Adam Mickiewicz University, Polonia, quien muy amablemente compartió sus datos ópticos experimentales sobre el índice de refracción de partículas de quitosano-quitina en soluciones acuosas, y con Ingo Wehrmann de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, por valiosas discusiones y la identificación de la variedad de camarón considerada en este estudio. Los autores agradecen a J. A. Wollam y colaboradores por proveerlos de las constantes ópticas de muestras de quitosano-quitina también consideradas en este estudio. Finalmente, los autores agradecen a la Universidad de Costa Rica su apoyo para la realización de esta investigación.