

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

BIOPLÁSTICO DE QUITINA

Formación de películas de quitina a partir de desechos de camarón por métodos ecológicos

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. RONNY ADRIÁN FLORES ORTEGA



TUTOR: Dra. en Ing. María del Carmen
Durán Domínguez de Bazúa

AÑO: 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

JURADO DESIGNADO

Presidente	Dr. Ricardo Vera Graziano
Vocal	Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua
Secretario	Dr. Rafael Herrera Nájera
Primer suplente	Dra. Laura Patricia Martínez Padilla
Segundo suplente	Dr. Jesús Gracia Fadrique

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN:

Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental
Laboratorio 301, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, México D.F.

TUTOR

Dra. Ing. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUSTENTANTE

Q. Ronny Adrián Flores Ortega

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesora de tesis: Dra. Carmen Durán de Bazúa por su apoyo y dirección.

Al Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos.

*A los miembros del Jurado: Dr. Ricardo Vera Graziano,
Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua, Dr. Rafael Herrera Nájera,
Dra. Laura Patricia Martínez Padilla y Dr. Jesús Gracia Fadrique.*

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado por su apoyo económico.

*A los Maestros, Compañeros y Personal del Programa de Ingeniería Química Ambiental
y Química Ambiental de la Facultad de Química.*

*A Susana por su invaluable ayuda
y a Angélica y Anilú por ser.*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: _____

Rocío y Ezequiel

FECHA: _____

9 Julio 2004

FIRMA: _____

[Firma manuscrita]

RESUMEN

La quitina, un biopolímero con variadas aplicaciones, se puede extraer del cefalotórax de camarón utilizando técnicas de bajo impacto ambiental. El cefalotórax de camarón, un residuo de la industria camaronera, está formado básicamente de quitina, proteínas, carbonatos, grasas y pigmentos. El cefalotórax de camarón una vez seco y molido se convierte en harina de camarón. Para extraer la quitina y formar con ella películas poliméricas primero se eliminan las proteínas de la harina de camarón. Se utilizaron dos surfactantes para la desproteinización: el dodecilsulfato de sodio, así como aceite vegetal de maíz saponificado. Para ambos se usaron dos procesos de digestión: reflujo abierto y radiación de microondas con reflujo cerrado. Se determinó que la mejor manera de realizar la desproteinización de harina de camarón y obtener quitina calcárea es un reflujo abierto durante dos horas y 2% de aceite vegetal saponificado. El uso de radiación de microondas acorta el tiempo de digestión pero destruye el surfactante lo que reduce su eficacia. El segundo paso es extraer la quitina de la quitina calcárea disolviéndola en un disolvente seguro formado por una solución saturada de cloruro de calcio en metanol. Finalmente, la quitina en solución se precipita y se recupera en forma de película con la adición de agua. Se determinó que la película de quitina se biodegrada más rápidamente (treinta días) que una lámina de plástico sintético comercial (poliestireno) en un suelo de composta. Se encontró que en la película de quitina el porcentaje de acetilación, utilizando un método espectrofotométrico infrarrojo, tiene valores cercanos al cien por ciento. El método desarrollado permite obtener quitina directamente de la harina de camarón sin necesidad de utilizar soluciones concentradas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio como en el procedimiento habitual. Además tiene la ventaja de que no se disminuye su peso molecular ni afecta el grado de acetilación de las moléculas de quitina y el disolvente utilizado, cloruro de calcio disuelto en metanol, se puede recuperar.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

CTBA	Bromuro de cetiltrimetilamonio por sus siglas en inglés (<i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i>)
DA	Grado de acetilación por sus siglas en inglés (<i>Degree of acetylation</i>)
EtOH	Etanol
HC	Harina de camarón
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
MW	Radiación de microondas por sus siglas en inglés (<i>Microwave</i>)
PS	Poliestireno por sus siglas en inglés (<i>Polystyrene</i>)
Q	Quitina
Q-Ca	Quitina calcárea
SAP	Aceite vegetal saponificado
SCM	Solución saturada de cloruro de calcio en metanol
SDS	Dodecilsulfato de sodio por sus siglas en inglés (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>). Hay otro compuesto también usado como detergente, el dodecibencensulfonato de sodio (DBSS), pero no se degrada con facilidad

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	<i>iv</i>
<i>Abreviaturas utilizadas</i>	<i>v</i>
<i>Listado de Tablas</i>	<i>viii</i>
<i>Listado de Figuras</i>	<i>ix</i>
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1 Problemática	1
I.2 Propuesta de solución	2
I.3 Corroboración de la hipótesis propuesta	4
I.4 Objetivos	5
I.4.1 Objetivo general	5
I.4.2 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS	6
II.1 El complejo quitina-proteína	6
II.2 Disolución de quitina	10
II.3 Degradación de quitina	11
II.4 Disolución de proteínas	12
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	14
III.1 Preparación de harina de camarón	14
III.2 Producción de quitina calcárea	15
III.2.1 Desproteínización a reflujo abierto	16
III.2.2 Desproteínización con reflujo cerrado y radiación de microondas	17
III.2.3 Determinación del porcentaje de desproteínización de la harina de cabeza de camarón	19
III.3 Disolución de quitina	19
III.3.1 Selección del disolvente	20
III.3.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción de quitina	20
III.3.3 Determinación gravimétrica de quitina extraída	20
III.4 Formación de la matriz de quitina calcárea	21
III.5 Estudio de degradabilidad	22
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
IV.1 Obtención de quitina calcárea	24
IV.1.1 Uso de dodecilsulfato de sodio	24
IV.1.2 Uso de aceite vegetal saponificado	28
IV.2 Disolución de quitina	37
IV.2.1 Selección del disolvente	37
IV.2.2 Tiempo óptimo de extracción	38
IV.3 Determinación del grado de acetilación	39
IV.4 Degradación de películas de quitina	42
IV.4.1 Intemperismo	42

IV.4.2	Biodegradación	43
CAPÍTULO V:	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
V.1	Conclusiones	45
V.2	Recomendaciones	47
ANEXOS		48
ANEXO A		48
	Preparación de reactivos	48
	Solución saturada de cloruro de calcio	48
	Elaboración de aceite vegetal saponificado	48
ANEXO B		49
	Soluciones digestoras	49
	Digestión con horno de microondas	49
ANEXO C		51
	ASTM D 1435 – 85 Standard practice for outdoor weathering of plastics	51
ANEXO D		53
	Determinación del grado de acetilación	53
ANEXO E		55
	Los doce principios de la Química Verde	55
ANEXO F		56
	Recuperación del disolvente	56
ANEXO G		61
	Datos experimentales	61
BIBLIOGRAFÍA		69

Listado de Tablas

Tabla II-1. Aminoácidos provenientes de proteínas presentes en desechos de camarón	9
Tabla II-2. Solubilidad de quitina de cáscara de cangrejo.....	10
Tabla III-1. Diseño factorial para la desproteínización con dodecilsulfato de sodio a reflujo abierto	16
Tabla III-2. Diseño factorial para la desproteínización con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto	16
Tabla III-3. Diseño factorial para la desproteínización con dodecilsulfato de sodio con radiación de microondas.....	17
Tabla III-4. Diseño experimental para la desproteínización con aceite vegetal saponificado y radiación de microondas.....	18
Tabla III-5. Desproteínización con radiación de microondas y aceite vegetal saponificado a alta concentración.....	18
Tabla III-6. Diseño factorial de segundo orden para la desproteínización con radiación de microondas con SDS	18
Tabla IV-1. Digestión de harina de camarón a reflujo abierto en función del tiempo y concentración de SDS y carbonato de sodio	24
Tabla IV-2. Desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas y SDS y carbonato en función del tiempo	26
Tabla IV-3. Desproteínización de harina de camarón con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto	28
Tabla IV-4. Pendiente máxima para la desproteínización de harina de camarón con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto.....	29
Tabla IV-5. Desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas y SAP, a baja concentración, en función del tiempo	31
Tabla IV-6. Desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas y SAP a alta concentración con y sin lavado con MeOH.....	32
Tabla IV-7. Porcentaje de desproteínización y de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por digestión con agua y microondas	34
Tabla IV-8. Contenido de nitrógeno en harina de camarón y quitina	34
Tabla IV-9. Extracción de quitina con solución saturada de cloruro de calcio en metanol y etanol	37
Tabla IV-10. Extracción de quitina con solución saturada de cloruro de calcio en metanol en función del tiempo	38
Tabla IV-11. Rendimientos durante el proceso de obtención de quitina y reactivos utilizados.....	39
Tabla IV-12. Cálculo del porcentaje de acetilación en quitina utilizando el método infrarrojo.....	42
Tabla IV-13. Porcentaje de acetilación en quitina determinado por el método infrarrojo ...	42
Tabla IV-14. Peso de las láminas de quitina y poliestireno sometidas a intemperismo durante cuatro semanas.....	43
Tabla IV-15. Ensayo de biodegradación de películas de quitina y poliestireno.....	44
Tabla B-1. Preparación de 10 mL de solución digestora de aceite vegetal saponificado y de dodecilsulfato de sodio	49
Tabla B-2. Programas de digestión para el horno de microondas.....	50

Listado de Figuras

Figura I-1. Composición de harina de camarón	1
Figura II-1. Molécula de quitina: Poli(<i>N</i> -acetil-D-glucosamina)	7
Figura II-2. Cutícula de artrópodo.....	8
Figura II-3. Disolución de proteínas con SDS.....	12
Figura III-1. Obtención de quitina de desechos de camarón	22
Figura IV-1. Superficie de respuesta de la desproteínización de harina de camarón con SDS y carbonato a reflujo abierto durante una hora	25
Figura IV-2. Superficie de respuesta de la desproteínización de harina de camarón con SDS y carbonato a reflujo abierto durante dos horas.....	26
Figura IV-3. Superficie de respuesta para la desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas por diez minutos y SDS y carbonato	27
Figura IV-4. Superficie de respuesta para la desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas por treinta minutos y SDS y carbonato	28
Figura IV-5. Superficie de respuesta de la desproteínización de harina de camarón con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto en función del tiempo	29
Figura IV-6. Pendiente máxima para de desproteínización a reflujo abierto con SAP	30
Figura IV-7. Superficie de respuesta para la digestión con radiación de microondas de harina de camarón con SAP a baja concentración en función del tiempo.....	32
Figura IV-8. Porcentaje de desproteínización de harina de camarón con y sin lavado con MeOH en función de SAP a alta concentración y radiación de microondas.....	33
Figura IV-9. Relación entre el porcentaje de desproteínización y porcentaje de nitrógeno en función del tiempo en quitina calcárea obtenida por digestión con MW y agua	35
Figura IV-10. Superficie de respuesta de contenido de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por reflujo abierto con SDS	36
Figura IV-11. Superficie de respuesta de contenido de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por reflujo abierto con SAP	37
Figura IV-12. Espectros infrarrojos de harina de camarón, quitina calcárea, quitina y quitina comercial	40
Figura IV-13. Espectro infrarrojo de quitina precipitada y quitina comercial	41
Figura IV-14. Espectro infrarrojo de quitina precipitada, 24 horas de extracción y 31% de desproteínización y quitina precipitada, 24 horas de extracción y 40% de desproteínización	41
Figura IV-15. Pérdida de peso de las láminas de quitina y poliestireno sometidas a intemperismo	43
Figura IV-16. Proceso de biodegradación de una película de quitina en composta.....	44
Figura D-1. Espectro infrarrojo de quitina.	54
Diagrama V-1. Comparación entre el método tradicional de obtención de películas de quitina y el método ecológico.....	46

*Es vano hacer con más
lo que se puede hacer con menos*
William de Occam
1285-1347?

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática

La producción mundial de camarón por captura y cultivo alcanzó 4 millones de toneladas en 1999 (FAO, 1999). De manera tradicional en los camarones sólo la parte abdominal es aprovechada. Lo que implica un desperdicio de aproximadamente un 30% a 50% del peso de cada organismo. Los cuerpos receptores, especialmente los acuícolas, en los que se descargan tales desechos se caracterizan por presentar una gran cantidad de sólidos en suspensión y, sobre todo, un contenido de material disuelto, medido como demanda bioquímica de oxígeno muy elevado. Esto significa que, para poder degradar esta materia orgánica, los microorganismos presentes en ese cuerpo receptor requieren una gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua y, por lo tanto, la fauna existente en ese ecosistema puede morir por asfixia. Debido a la cantidad de camarón que se descabeza durante los viajes en alta mar y en granjas camaroneras, son significativas las cantidades de cabeza que se tiran al mar o que se descomponen en tierra por no darles un uso adecuado. En el caso de la captura en alta mar, este desperdicio se devuelve al mar y, en el caso de aguas protegidas y la acuicultura, es tirada en los alrededores de los centros de producción y por su volumen, causa un impacto ecológico que puede alterar el ambiente (Cañipa y col., 1994).

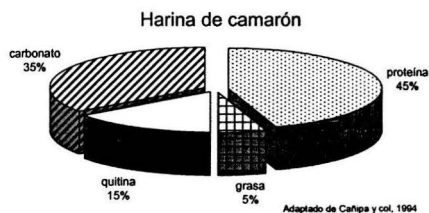


Figura I-1. Composición de harina de camarón

El cefalotórax de camarón, considerado desperdicio, está compuesto aproximadamente de 44.7% de proteína, 26.3% de cenizas, 20.7% de fibra cruda, 5.2% de grasa y 3.1% de otros carbohidratos. Destacan tres componentes potencialmente útiles: quitina, pigmentos y proteínas (Ver Figura I-1). Se calcula que el cefalotórax de camarón contiene alrededor de 14 a 27% de quitina (Cañipa y col, 1994; Gerhertz, 1986), un biopolímero con diversas aplicaciones (Muzzarelli, 1977; Ravi Kumar, 2000). La quitina no es ampliamente utilizada en aplicaciones industriales por ser insoluble en muchos disolventes, relativamente difícil de aislar de sus fuentes naturales en forma pura y de prepararle bajo buenas condiciones económicas por métodos no contaminantes. Actualmente, los procedimientos tradicionales de extracción degradan a las moléculas de quitina.

1.2 Propuesta de solución

Se propone desarrollar nuevas aplicaciones para la quitina que desecha actualmente la industria camaronera en forma de cefalotórax de camarón. La investigación irá dirigida a la utilización de la quitina o sus derivados como sustitutos de plásticos sintéticos, que es un área relativamente poco explotada. La quitina, como bioplástico, tiene la gran ventaja frente a los plásticos sintéticos de que es más fácilmente biodegradable.

Actualmente, volúmenes significativos de camarón son cultivados en sólo dos regiones del mundo: Asia, que produce aproximadamente el 80%, y Latinoamérica que contabiliza el 20 por ciento restante. En 1994, los mayores productores de camarón cultivado fueron Tailandia, Indonesia, Ecuador, Filipinas, India, China, Vietnam, Bangladesh y México. Estos países suministran aproximadamente el 93 por ciento del camarón cultivado e importado por los principales mercados: Japón y los Estados Unidos de América (Tobey y col, 1998). Los principales productores de camarón son países con economías emergentes, por lo que desarrollar usos alternativos de la quitina contenida en el cefalotórax de camarón ayudará a mejorar sus economías. Además, el aprovechamiento del cefalotórax ayuda a reducir la generación de desechos contaminantes.

Un grupo de artículos de plástico que puede ser sustituido por quitina o sus derivados son los envases desechables de comida rápida elaborados a partir de poliestireno, PS, puesto que presentan características estructurales similares a las que se pueden obtener de

la quitina. Por ejemplo, Khor y col. (2003), han producido películas de quitina delgadas, transparentes, flexibles y fuertes que no se ablandan cuando se humedecen y Kifune y col. (1986) obtuvieron quitina porosa con una alta fuerza mecánica aún en condiciones húmedas.

Se producen al año aproximadamente 2.3×10^9 kilogramos de PS en los Estados Unidos de América y el 25% se utiliza como espuma de PS en los envases de comida rápida en forma de “concha de almeja”, platos, bandejas para carne y tazas. También como cubiertos para comida y vasos transparentes para beber (Tchobanoglous y col., 1994). Por tanto, el mercado potencial para los artículos elaborados de bioplástico de quitina son las empresas de comida rápida, donde todos los alimentos que comercializan lo hacen en contenedores desechables de plástico. Los artículos elaborados con quitina tienen la ventaja de ser más biodegradables que sus contrapartes sintéticas. Pueden tener un costo de producción más elevado que los artículos de PS, pero será por un valor agregado que apreciarán los consumidores al estar conscientes que están contribuyendo a disminuir la contaminación del medio.

La meta última es conseguir que todos los artículos de plástico, conocidos como desechables, sean elaborados con quitina biodegradable. Según la industria del plástico, el PS constituye el 1% del volumen de los residuos sólidos urbanos (Tchobanoglous y col., 1994), por lo que su reducción ayudará con el tiempo de vida útil de un vertedero. Adicionalmente, la quitina al ser más fácilmente biodegradable, por su origen natural, no contamina como los plásticos sintéticos. Con investigaciones posteriores se puede ampliar el uso de los bioplásticos de quitina para llegar a sustituir otros tipos de plásticos sintéticos.

Tradicionalmente, los compuestos químicos industriales y farmacéuticos se habían producido por cualquier proceso, mientras fuese económicamente el más barato (Baird, 2001). En la mayoría de los casos, ello significaba un proceso que implicaba el uso libre de disolventes tóxicos y la generación de subproductos tóxicos que se debían eliminar. Recientemente, se ha iniciado un movimiento entre los químicos que promueve la idea de la llamada *química verde*, que es una aproximación a la síntesis, procesamiento y utilización de los compuestos químicos, que reducen los riesgos a los seres humanos y al ambiente (Ver Anexo E). En general, esta aproximación se consigue por medio de la minimización o in-

cluso eliminación de la generación de residuos. La estrategia, consiste en la reformulación de las rutas sintéticas de tal manera que los subproductos no se produzcan en primera instancia, por ejemplo, reemplazar disolventes orgánicos por agua, como medio en el que se formen los productos deseados, promoviendo así la eliminación de un disolvente orgánico potencialmente tóxico y el diseño de productos para hacerlos reciclables o que puedan depositarse con seguridad.

La “Ecología Industrial” (Manahan, 1999) es una aproximación basada en sistemas de ingeniería y principios ecológicos que integran en la producción y el consumo aspectos de diseño, producción, uso y terminación o disposición de productos y servicios de manera que minimizan el impacto ambiental mientras optimizan las fuentes de materias primas, energía y capital. La práctica de la ecología industrial representa un medio sustentable, aceptable ambientalmente, para proveer bienes y servicios. Un sistema ideal de ecología industrial sigue el flujo de la energía y los materiales a través de varios niveles, usa los desechos de una parte del ecosistema industrial como materia prima para otra parte del proceso o para otro proceso y maximiza la eficiencia de la utilización de la energía. Mientras que desechos, efluentes y productos usados son considerados como sobras o partes indeseables en un sistema industrial en el sitio donde el producto o servicio fue vendido a un consumidor, la ecología industrial juzga a tales materiales como parte de un gran sistema que deben ser considerados o tomados en cuenta hasta que un ciclo completo de manufactura, uso y disposición se completa.

En la presente investigación se toma en cuenta esta nueva manera de proceder, de tal forma que donde sea aplicable, se procura reducir el uso de solventes o su cambio por otros menos tóxicos y minimizar la utilización de reactivos. También se seleccionan métodos analíticos sencillos, que no requieran del uso de cantidades importantes de reactivos. Se busca que el producto final pueda degradarse con facilidad. En suma, todo el proceso desarrollado debe tener un bajo impacto ambiental.

1.3 Corroboración de la hipótesis propuesta

Si se observa el exoesqueleto del camarón o los élitros de los coleópteros, constituidos principalmente de quitina, es posible darse cuenta que poseen propiedades similares a los plásticos: Son duros, flexibles, ligeros y resistentes, por lo que puede pensarse que es

posible emular esas características de manera artificial y elaborar con la quitina o sus derivados artículos que posean las propiedades de los polímeros sintéticos, pero que sean biodegradables o menos persistentes.

Para la fabricación de bioplásticos de quitina, la quitina debe primero convertirse a un estado que permita elaborar con ella artículos con formas variadas. Esto se consigue disolviendo la quitina en solventes específicos y precipitándola luego en la forma deseada.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar un bioplástico de quitina que sustituya a los plásticos sintéticos a partir de desechos de camarón con procedimientos ecológicos.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Utilizar los conceptos de Química Verde y Ecología Industrial en la extracción de quitina y en la elaboración del bioplástico.
2. Encontrar las condiciones más favorables para producir quitina calcárea de la harina de camarón.
3. Obtener matrices de quitina (bioplástico) a partir de quitina en solución.
4. Determinar el grado de acetilación de la quitina obtenida mediante espectrometría infrarroja.
5. Comparar la degradabilidad de la matriz de quitina con la de un plástico sintético.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS

II.1 El complejo quitina-proteína

Las cadenas de quitina pueden ser consideradas como una hélice de poli(*N*-acetil-D-glucosamina) (Ver Figura II-1). La quitina se presenta en tres formas polimórficas que difieren en el arreglo de las cadenas moleculares en la celda cristalina. La α -quitina, la forma polimórfica más cristalina y altamente compacta, tiene las cadenas arregladas de una manera anti-paralela; la β -quitina es la forma donde las cadenas están paralelas y la γ -quitina es la forma donde dos cadenas van hacia “arriba” y una hacia “abajo”. Por mucho, la forma polimórfica más abundante es la α -quitina que se encuentra en la cutícula de los artrópodos y en ciertos hongos. La β -quitina, que existe como un hidrato cristalino, se caracteriza por su baja estabilidad ya que el agua puede penetrar entre las cadenas del enrejado. La β -quitina se ha encontrado en el calamar y la γ -quitina en los capullos de los escarabajos. En la estructura de la α -quitina (Fig. II-1) está presente los siguientes enlaces, que son muy importantes desde el punto de vista químico y tecnológico, pues ellos confieren las peculiares características fisicoquímicas macroscópicas como la alta insolubilidad: O–H · · · O entre el O^{3'} y el O⁵ de las dos unidades de glucosamina ligadas (en la Figura II-1 están marcados con los números 3' y 5); este enlace de hidrógeno es característico de un cuerpo rígido y el enlace N–H · · · O entre los átomos de N e H del grupo acetilamino de una unidad y el grupo carbonilo de una unidad en la cadena trasladada a lo largo del eje. Las cadenas de quitina están ligadas en forma de hojas a través de los enlaces de hidrógeno y constituyen una es-

estructura que fácilmente se hincha en la dirección perpendicular de las hojas (Muzarelli, 1977).

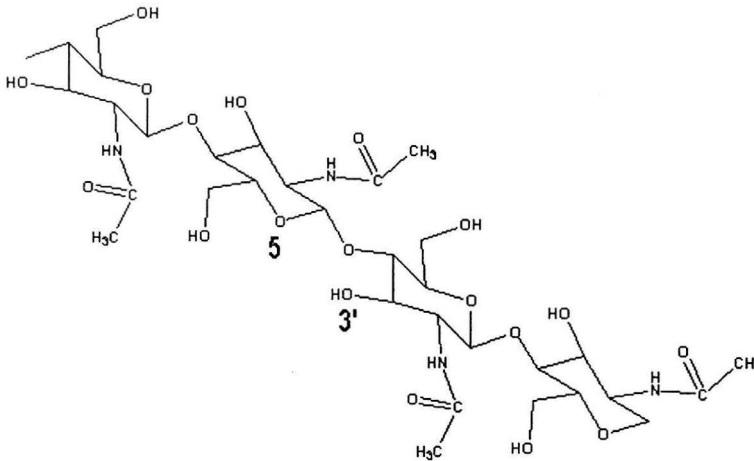


Figura II-1. Molécula de quitina: Poli(*N*-acetil-D-glucosamina) (Ravi Kumar, 2000)

En la quitina, el grupo amino está acetilado y así, la quitina es una amida del ácido acético; en la quitosana, el grupo amino está libre y, por lo tanto, la quitosana es una amina primaria. El término quitina actualmente se refiere a un polímero de *N*-acetilglucosamina donde prácticamente ningún grupo acetilo ha sido removido, mientras que el término quitosana se refiere a un producto desacetilado obtenido de la quitina, donde la mayor parte de los grupos acetilo han sido removidos. El peso molecular de la quitina y la quitosana son muy diferentes debido a que ocurre una severa degradación de las cadenas durante el proceso de producción de la quitosana. Esto sucede durante el paso de descalcificación, cuando el cefalotórax de camarón se somete a la acción de soluciones ácidas a alta concentración y temperatura ambiente o durante el paso de desacetilación que involucra tratamientos agresivos con álcali a alta concentración y alta temperatura. Las muestras de α -quitina con valores promedio más altos de peso molecular se obtienen cuando la descalcificación se lleva a cabo en frío con ácido clorhídrico diluido y la desproteinización con NaOH a 100°C por 24 horas, para evitar la degradación. El tratamiento alcalino usado para realizar la desacetilación degrada las cadenas de polímero –el peso molecular para quitosana decrece con el in-

crecimiento del tiempo de desacetilación, aún bajo atmósfera de nitrógeno (Muzarelli, 1977). El peso molecular promedio de la quitina es de 1.03×10^6 a 2.5×10^6 , pero la *N*-desacetilación lo reduce hasta 1×10^5 a 5×10^5 (Ravi Kumar, 2000). Experimentalmente, la quitosana puede distinguirse de la quitina por su solubilidad en ácido acético o fórmico diluido; la quitina además es un producto que contiene menos del 7% de nitrógeno¹, mientras que la quitosana contiene 7% o más de nitrógeno (Cañipa y col., 1994). Es importante analizar el grado de *N*-acetilación de la quitina. Es decir, la relación de la unidad 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa y la unidad 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa. Esta relación tiene un importante efecto en la solubilidad de la quitina y en las propiedades de la solución. En la quitina, el grado de acetilación típico es de 90%, mientras que la quitosana está total o parcialmente desacetilada con 35% o menos de acetilación (Ravi Kumar, 2000).

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Al menos 10 gigatoneladas de quitina son sintetizadas y degradadas cada año en la biosfera (Euchis, 2002). La quitina se encuentra en mayor o menor extensión en el exoesqueleto de todos los artrópodos (Fig. II-2). La quitina de origen animal está asociada con proteínas de manera covalente lo cual le da considerable estabilidad y le confiere a la estructura dureza, rigidez y resistencia a la hidrólisis. El segundo componente más abundante en el exoesqueleto lo constituyen las sales minerales que se encuentran asociadas a la quitina y las proteínas dando la rigidez (Cañipa y col., 1994).

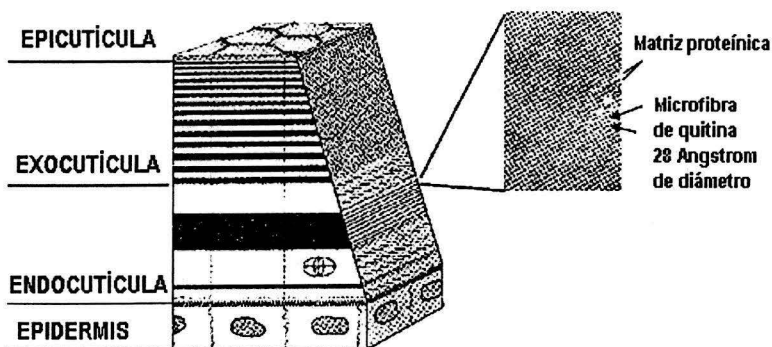


Figura II- 2. Cutícula de artrópodo (Euchis, 2002)

¹ El contenido de nitrógeno en la quitina varía de 5 a 8% dependiendo del grado de acetilación (Ravi Kumar, 2000)

Las estructuras quitinosas, con la posible excepción de aquellas hechas por mohos y hongos, son construidas sobre una estructura glicoproteínica, en la que la quitina está unida covalentemente a las proteínas (Tabla II-1). A este nivel de organización, las estructuras quitinosas exhiben alta resistencia a la tensión, pero son esencialmente manejables y flexibles, permitiendo movimiento y expansión limitados. Después de la esclerotización de las proteínas, el complejo resultante proteína curtida-quitina gana considerable estabilidad y confiere a la estructura dureza, rigidez y resistencia para la hidrólisis enzimática. La *N*-acetilglucosamida y la quitina pueden reaccionar con α -aminoácidos, especialmente tirosina, péptidos y proteína cuticular, para dar complejos estables, pero, sin embargo, disociables a cambios de pH alto. El complejo quitina-proteína se completa por la deposición de otras sustancias, tales como ceras y lipoproteínas, dando a la estructura la propiedad de impermeabilidad. La estructura quitina-proteína provee un soporte conveniente para la calcificación y la “silicificación” (para el silicio). Como resultado de este proceso de mineralización de la estructura quitinosa, parece que los organismos realizan una economía del material proteico, como hacen muchos crustáceos o una economía de quitina y proteína, como en el caso de los moluscos. Además, la calcificación del exoesqueleto provee una estructura rígida asegurando la estabilidad de las colonias como en la *Hydrozoa*. El complejo quitina-proteína en su forma curtida más estable permite la formación de planos rígidos a expensas de un peso mínimo de material. En los sistemas vivos, la quitina ocurre en la forma de microfibrillas también llamadas cristalitas. La cutícula de los artrópodos es un material como fibra de vidrio, con microfibrillas de quitina dispersas en la matriz de proteínas con un diámetro promedio de 2.8 nm (Muzarelli, 1977).

Tabla II-1. Aminoácidos provenientes de proteínas presentes en desechos de camarón (Adaptado de Toma y Meyers, 1975)

Esenciales	No esenciales
Isoleucina	Alanina
Leucina	Arginina
Lisina	Ác. Aspártico
Metionina	Ác. Glutámico
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Histidina
Triptófano	Prolina
Valina	Serina
	Tirosina

II.2 Disolución de quitina

La quitina es altamente hidrofóbica, insoluble en agua, en ácidos y álcalis diluidos y en la mayoría de solventes orgánicos. Posee grupos acetamida e hidroxilo con fuertes enlaces de hidrógeno que la hacen difícilmente soluble. Es soluble en dimetilacetamida que contiene 5% de cloruro de litio (Ravi Kumar, 2000), en sistemas de ácido fórmico-ácido dicloroacético, en hexafluoroisopropanol y en sesquihidrato de hexafluoroacetona (Ver Tabla II-2). La disolución de la quitina se dificulta con un grado de desacetilación de 30% o menos. Los cloroalcoholes, en conjunto con soluciones acuosas de ácidos minerales o con ciertos ácidos orgánicos, son sistemas efectivos para disolver quitina en cualquier forma, tales como nativa, polvos reprecipitados o conformaciones cristalinas. Estos sistemas de solventes dan soluciones de quitina de relativamente baja viscosidad, disuelven quitina rápidamente a temperatura ambiente o a temperaturas moderadas y la degradación hidrolítica procede relativamente lenta (Muzarelli, 1977). El inconveniente es el peligro para la salud por inhalación o contacto.

Tabla II-2. Solubilidad de quitina de cáscara de cangrejo (Adaptado de Muzarelli, 1977)

Solvente	Efecto
Hexafluoroisopropanol	disuelve
Hexafluoroacetona	disuelve
1,2-cloroalcoholes	disuelve completamente
88% ácido fórmico	blanquea, como caucho
98-100% ácido fórmico	blanquea, separa en capas
Polietilenimina	"dispersión" coloreada
oxima ciclohexanona	"dispersión" coloreada

La quitina también puede disolverse en soluciones saturadas de sales metálicas (Reeves y Li-Fu Chen, 2003; Mitsunori y Toshihisa, 1995). Las moléculas de quitina son insolubles en agua debido al fuerte enlace interno del hidrógeno entre los sustituyentes del alcohol en los monómeros. El proceso de disolución se fundamenta en la destrucción del enlace interno del hidrógeno de la quitina a través de la complejación de la sal en solución con la quitina para formar un complejo sal-quitina. La disolución se produce cuando se altera el arreglo de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de la quitina una vez en solución.

Se utilizan sales metálicas con suficiente baja acidez de Hammett² como los iones de zinc o calcio. Se desea que la sal tenga una acidez de Hammett de aproximadamente +2 a -3. La ventaja de estos disolventes es ser poco contaminantes y degradantes. No disminuyen el peso molecular ni el grado de acetilación de las moléculas de quitina. Se requiere que las moléculas tengan peso molecular alto para que las películas de quitina posean características similares a los plásticos sintéticos.

La quitina coloidal ha sido preparada desde hace mucho tiempo disolviendo o dispersando quitina en ácido clorhídrico concentrado. Esta suspensión altamente viscosa se filtra y se recoge en agua destilada. En medio acuoso, la quitina puede precipitar como una suspensión coloidal o como gel dependiendo de la forma de adicionar el agua. La quitina coloidal se reconvierte a la forma sólida por un secado al vacío (Muzarelli, 1977). Cuando al gel de quitina se le extrae el agua por evaporación se obtiene una película de quitina; si el agua se extrae por un proceso de liofilización se consigue la formación de una esponja de quitina que mantiene la forma original (Mitsunori y Toshihisa, 1995; Reeves y Li-Fu Chen, 2003).

En la solución de quitina se puede añadir un tercer componente, como agentes plastificantes, pigmentos, etc., para mejorar las propiedades de la matriz de quitina que se va a obtener.

II.3 Degradación de quitina

La quitina por ser un polímero natural puede ser fácilmente degradado por los microorganismos. La hidrólisis enzimática de la quitina a acetilglucosamina se realiza por el sistema consistente de dos hidrolasas: quitinasa y quitobiasa. Las quitinasas son enzimas ampliamente distribuidas, sintetizadas por bacterias, hongos, mohos, protozoos y glándulas digestivas de animales en donde su dieta incluye quitina. El sistema enzimático que degrada quitina es muy importante porque permite que muchas plantas y animales ejecuten varias funciones vitales, incluyendo digestión, crecimiento, ataque químico y otras actividades metabólicas.

² La acidez de Hammett es una medida usada para solventes ácidos de alta constante dieléctrica, la constante dieléctrica es una medida de la capacidad de solvatación iónica del solvente

En las bacterias, el sistema de quitinasas es amplio, se ha encontrado en organismos desde el suelo hasta el agua fresca y en fango marino. Los actinomicetos y hongos filamentosos también poseen enzimas quitolíticas (Muzarelli, 1977).

Cualquier artículo elaborado con quitina, deberá ser rápidamente biodegradado una vez que sea depositado en un vertedero.³

II.4 Disolución de proteínas

Virtualmente todas las proteínas pueden disolverse con un detergente iónico como el dodecilsulfato de sodio, (SDS, por sus siglas en inglés) o bromuro de cetiltrimetilamonio (CTBA, por sus siglas en inglés). Ellos principalmente desnaturalizan irreversiblemente a las proteínas (Scopes, 1994). Aproximadamente se requiere 1 mg de detergente por cada miligramo de proteína. La extracción con detergentes resulta en una mezcla de lípidos disueltos, proteína libre, proteína fuertemente asociada con el detergente y detergente libre, como moléculas simples y en forma micelar. La desnaturalización implica la destrucción de la estructura terciaria de la molécula de proteína y formación al azar de cadenas de polipéptidos.

Por ejemplo, la extracción de proteínas de membranas y fracciones celulares insolubles usa detergente, primero para disolver la estructura membranosa y segundo para estabilizar la proteína una vez extraída. Los detergentes más eficientes son los sulfatos fuertemente iónicos, como el SDS. Los detergentes son capaces de desplazar el fuerte enlace membrana-proteína al disolver la membrana y luego reemplazar la membrana con cadenas aromáticas o alifáticas, las cuales forman la parte lipofílica del detergente. La disolución de las proteínas no es un procedimiento de rutina. Encontrar el mejor agente para una situación particular depende de ensayo y error. Conocer las propiedades fisicoquímicas de los detergentes hace el proceso de selección del detergente más fácil (Rosenberg, 1996).

La extracción de la proteína de la membrana por detergentes ocurre en tres pasos (Fig. II-3):

1. la unión del detergente a la membrana y la lisis,
2. la membrana se disuelve en forma de un complejo detergente-lípido-proteína, y

³ La EPA considera que la quitina no presenta ningún riesgo para los seres humanos y el ambiente y la quitosana está aprobada como aditivo de alimentos por la FDA (EPA, 2004)

3. el complejo detergente-lípido-proteína se disuelve para dar complejos detergente-proteína y detergente-lípido.

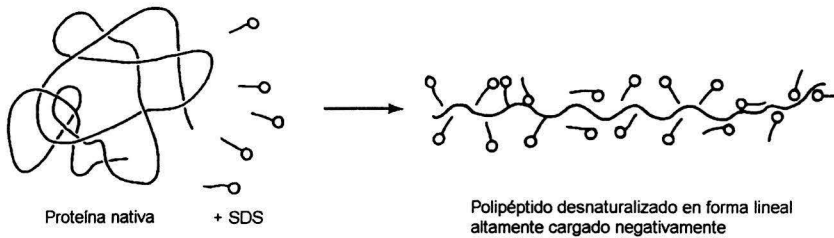


Figura II- 3. Disolución de proteínas con SDS

Muchas proteínas que son disueltas por detergentes tienen una relación detergente-proteína bien definida que resulta en una solubilidad óptima. La disolución de la proteína ocurre en o cerca de la concentración micelar crítica para la mayoría de los detergentes.

Numerosos animales contienen mucha grasa que hace difícil la homogenización y complica los siguientes pasos de purificación de proteínas. Hay dos maneras de vencer este inconveniente. Primero, es el uso de una gran cantidad de detergente para disolver la grasa y, al mismo tiempo, liberar las proteínas asociadas. Se requiere 1 mg de detergente por cada miligramo de lípidos. El mayor problema es la necesidad de la gran cantidad de detergente y la dificultad de removerlo del extracto acuoso. La segunda manera es precipitar la proteína en acetona. Las proteínas pueden, también, precipitar en presencia de altas concentraciones de una sal, por ejemplo, de sulfato de amonio. La temperatura, de igual forma, afecta la solubilidad de las proteínas, en una alta concentración de sal una solución clara en frío puede rápidamente convertirse en turbia con la precipitación de proteína amorfa cuando se calienta (Scopes, 1994).

Durante la obtención de quitina, las proteínas presentes en el cefalotórax de camarón pueden disolverse y extraerse utilizando un surfactante (Akira, 1993) y calor. Éste es un método más limpio que la desproteinización tradicional con hidróxido de sodio. Además, no produce cambios en el peso molecular y en el grado de acetilación de las moléculas de quitina.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

El cefalotórax de camarón se convierte en harina mediante un proceso de secado, molienda y tamizado. La harina de camarón, HC, obtenida se desproteiniza térmicamente en medio acuoso para obtener quitina calcárea. La quitina presente en la quitina calcárea se extrae mediante una solución alcohólica de cloruro de calcio. Se regenera la quitina en solución precipitándola con agua y se extrae el agua por evaporación para obtener una película. En la película se determina el grado de acetilación y se realizan pruebas comparativas de degradabilidad frente a un plástico comercial.

III.1 Preparación de harina de camarón (HC)

La obtención de la harina de camarón se realiza siguiendo el procedimiento descrito en Cañipa y col. (1994).

- a) **Obtención de la muestra.** Las cabezas de camarón (el cefalotórax de camarón) se obtiene en la zona de pescados y mariscos de la Central de Abastos de la Viga, en México, D.F. Las cabezas son proporcionadas gratuitamente por los comerciantes pues ellos acostumbran arrojarlas a la basura. Predominan en los desechos cefalotórax de camarón café (*Penaeus aztecus*) y blanco (*P. setiferus*) (Cañipa y col., 1994).
- b) **Lavado.** Las cabezas de camarón se colocan en bolsas de malla de plástico para lavarlas bajo un chorro de agua corriente hasta que ésta se observe limpia. Se deja escurrir por 15 minutos.
- c) **Secado.** Las cabezas ya lavadas se distribuyen en capas delgadas sobre bandejas de aluminio y se secan a 80°C en un secador eléctrico marca Felisa durante ocho horas.

- d) **Molienda.** Una vez secas las cabezas de camarón se muelen en un molino para cereales marca CeCoCo tipo S, modelo 1245.
- e) **Tamizado.** Se tamiza la harina de camarón en un tamizador mecánico Steve-Shaker Portable, marca W.S. Tyler con un tamiz No. 100. Puesto que sólo se va a trabajar con harina de tamaño de partícula igual o menor a 149 micras y para no obtener sobranes de diferente tamaño de malla, toda la harina con tamaño de partícula mayor a 149 micras nuevamente se muele para reducir su tamaño y se tamiza; esta operación se repite hasta que casi la totalidad (80%) de la harina pasa por malla 100.
- f) **Conservación.** La harina así obtenida se conserva en un cuarto frío a 4°C dentro de un envase de vidrio perfectamente sellado.
- g) **Desecado.** Para eliminar la humedad de la harina de camarón antes de ser utilizada en las pruebas, se pesan 50 gramos de la harina descrita en f) y se extienden sobre una bandeja, se secan en una estufa a 100°C durante dos horas. La pérdida de peso es de 4 a 6%. Esta harina desecada se guarda en un envase de vidrio hermético a 4°C. El envase debe permanecer siempre cerrado para evitar que la harina absorba humedad del ambiente.

III.2 Producción de quitina calcárea (Q-Ca)

Se investiga la posibilidad de llevar a cabo la extracción de las proteínas de la harina de camarón (HC) sin la necesidad de utilizar altas concentraciones de hidróxido de sodio como en el método habitual. Para esto, se prueba un reflujo abierto con un surfactante en función del tiempo. También, se examina la posibilidad de acortar los tiempos de reacción de horas a minutos utilizando radiación de microondas (Guang Jin Choi, 2001) en reflujo cerrado en un horno marca Berghof MWS-1. Se trabaja con dos surfactantes diferentes: dodecilsulfato de sodio, (SDS, por sus siglas en inglés) y aceite vegetal saponificado (SAP). El SDS utiliza carbonato de sodio para que la digestión se realice en condiciones alcalinas (Akira, 1993). Se comienza con un diseño factorial de primer orden 2^3 con dos puntos centrales para observar la reproducibilidad del proceso. La respuesta es el porcentaje en peso que pierde la muestra que se considera debido a la desproteínización. De acuerdo al análisis de superficie de respuesta se procede, posteriormente, a determinar la pendiente máxima o a elaborar un diseño factorial de segundo orden (Box y col., 1999).

III.2.1 Desproteización a reflujo abierto

Para la digestión con SDS se pesan 0.5 gramos de harina de camarón desecada dentro de un balón de destilación de 250 mL, se adicionan 10 mL de solución digestora⁴ de acuerdo con las concentraciones especificadas en la Tabla III-1. Se realiza el reflujo en el tiempo indicado en la misma tabla. Se recoge el producto obtenido y se determina el porcentaje de desproteización como en III.2.1.3.

Tabla III-1. Diseño factorial para la desproteización con dodecilsulfato de sodio a reflujo abierto (Box y col., 1999)

Variables en unidades originales			Variables en unidades codificadas		
tiempo (horas)	% (p/p) SDS	% (p/p)* carbonato de sodio	tiempo	SDS	Carbonato de sodio
1	0	0	-1	-1	-1
1	0	0.1	-1	-1	1
1	2	0	-1	1	-1
1	2	0.1	-1	1	1
1	1	0.05	-1	0	0
1	1	0.05	-1	0	0
2	0	0	1	-1	-1
2	0	0.1	1	-1	1
2	2	0	1	1	-1
2	2	0.1	1	1	1
2	1	0.05	1	0	0
2	1	0.05	1	0	0

*con respecto al peso total seco

Para la digestión con SAP⁵, se sigue el mismo procedimiento, pero se utilizan las concentraciones y los tiempos de la Tabla III-2.

Tabla III-2. Diseño factorial para la desproteización con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto (Box y col., 1999)

Variables en unidades originales		Variables en unidades codificadas	
tiempo (horas)	% (p/p) SAP*	Tiempo	SAP
1	0	-1	-1
1	2	-1	1
2	0	1	-1
2	2	1	1
1.5	1	0	0
1.5	1	0	0

*con respecto al peso total seco

⁴ Ver el Anexo B para la preparación de soluciones digestoras

⁵ Ver el Anexo A para la preparación de SAP

III.2.2 Desproteínización con reflujo cerrado y radiación de microondas (MW)

Para la digestión con SDS se pesan 0.5 gramos de harina de camarón desecada dentro de la probeta de 30 mL del digestor de microondas, se adicionan 10 mL de la solución de digestión⁶ como indica la Tabla III-3 y se realiza la digestión en el horno de microondas de acuerdo al programa establecido.⁷ El horno de microondas con el que se trabaja puede digerir un máximo de seis muestras a la vez, bajo las mismas condiciones de operación.

Tabla III-3. Diseño factorial para la desproteínización con dodecilsulfato de sodio con radiación de microondas (Box y col., 1999)

Variables en unidades originales				Variables en unidades codificadas		
Temperatura °C	tiempo (minutos)	% (p/p) SDS*	% (p/p)* carbonato de sodio	tiempo	SDS	Carbonato de sodio
180	10	0	0	-1	-1	-1
180	10	0	0.1	-1	-1	1
180	10	2	0	-1	1	-1
180	10	2	0.1	-1	1	1
180	10	1	0.05	-1	0	0
180	10	1	0.05	-1	0	0
180	30	0	0	1	-1	-1
180	30	0	0.1	1	-1	1
180	30	2	0	1	1	-1
180	30	2	0.1	1	1	1
180	30	1	0.05	1	0	0
180	30	1	0.05	1	0	0

*con respecto al peso total seco

Se recupera el producto y se determina el porcentaje de desproteínización como en III.2.1.3. Con los datos obtenidos se construye la superficie de respuesta y se traza, de ser necesario, la pendiente máxima para encontrar la zona de mayor desproteínización o se pasa a trabajar con un diseño factorial de segundo orden (Tabla III-6).

Con el SAP se procede de manera similar, pero de acuerdo con las condiciones especificadas en la Tabla III-4.

⁶ Cuando se trabaja en el horno de microondas con un volumen de 5 mL de solución digestora, se observa que después de la digestión cierta cantidad de harina se encuentra pegada a las paredes de la probeta, para evitar este inconveniente es mejor trabajar con 10 mL de solución digestora. No se aprecia una diferencia significativa en el porcentaje de desproteínización al trabajar con 5 o 10 mL (con la misma concentración de tensoactivo en base seca). Al momento de realizar una comparación hay que tomar en cuenta que las soluciones de mayor volumen requieren mayor tiempo de digestión bajo las mismas condiciones de radiación (Ver el Anexo G)

⁷ Ver el manual del equipo (Berghof Microwave Digester MWS-1) y el Anexo B para la programación del horno de microondas

Para determinar el comportamiento del SAP a altas concentraciones se realiza la digestión como indica la Tabla III-5 y se determina el porcentaje de desproteización como en III.2.1.3.

Tabla III-4. Diseño experimental para la desproteización con aceite vegetal saponificado y radiación de microondas (Box y col., 1999)

Variables en unidades originales			Variables en unidades codificadas	
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	% (p/p) SAP*	Tiempo	SAP
180	10	0	-1	0
180	10	0.2	-1	1
180	10	0.4	-1	2
180	10	0.6	-1	3
180	10	0.8	-1	4
180	10	1	-1	5
180	15	0	1	0
180	15	0.2	1	1
180	15	0.4	1	2
180	15	0.6	1	3
180	15	0.8	1	4
180	15	1	1	5

*con respecto al peso total seco

Tabla III-5. Desproteización con radiación de microondas y aceite vegetal saponificado a alta concentración

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	% (p/p)* SAP
180	15	0
180	15	1.96
180	15	3.85
180	15	5.66
180	15	7.41
180	15	9.09

* con respecto al peso total seco

Tabla III-6. Diseño factorial de segundo orden para la desproteización con radiación de microondas con SDS (Box y col., 1999)

SDS	Variables en unidades codificadas			
	Carbonato de sodio		SDS	Carbonato de sodio
-1	-1	-1	$-\sqrt{2}$	0
1	-1	-1	0	$-\sqrt{2}$
-1	1	-1	0	0
1	1	-1	0	0
$\sqrt{2}$	0	-1	0	0
0	$\sqrt{2}$	-1	0	0

III.2.3 Determinación del porcentaje de desproteización de la harina de cabeza de camarón

El producto que se obtiene después de la digestión a reflujo abierto o cerrado está formado de proteína libre, proteína asociada con surfactante, lípidos emulsionados (Scopes, 1994) y harina que no reaccionó. Para el reflujo abierto, luego de la digestión, se dejan decantar los sólidos en el balón durante cinco minutos. Se trasvasa sólo el líquido sobre un filtro de microfibras de vidrio⁸ previamente pesado y se filtra al vacío. Se adicionan al balón 5 mL de metanol y se hierve por cinco minutos tapando la boca del balón con un vidrio de reloj.⁹ Inmediatamente después se filtra en caliente sobre el filtro de microfibras de vidrio y se lava con 100 mL de agua destilada en porciones de 20 mL. Para la desproteización con MW, después de la digestión se enfrían las probetas durante diez minutos, se filtra al vacío todo el producto por un filtro de microfibras de vidrio y se lava con 100 mL de agua destilada.¹⁰ Se secan el filtro y su contenido en una estufa a 100°C durante dos horas.¹¹ Se pesa y se calcula el porcentaje de pérdida de peso con respecto a la muestra original.

III.3 Disolución de quitina

La quitina calcárea que se obtuvo en el apartado anterior es adecuada para la extracción de quitina.¹² En primer lugar, se mezcla la quitina calcárea con una solución saturada de cloruro de calcio en metanol o etanol para disolver la quitina; luego, se filtra para separar toda el material sólido que no pudo disolverse y en el filtrado se precipita la quitina con agua como agente coagulante para obtener una película de quitina una vez que se extrae el agua.

⁸ Se compararon diferentes clases de filtros y se determinó que el filtro de microfibras de vidrio (Whatman GF/A) es el que permite el filtrado más rápido

⁹ Luego de la desproteización, en las paredes del balón de destilación quedan adheridas partículas sólidas de producto; para recuperarlas y poder pesarlas es necesario el lavado con metanol caliente (Ver la hoja de seguridad del metanol en el Anexo F)

¹⁰ En la digestión con MW no existe el problema de partículas sólidas adheridas a las paredes de teflón de la probeta y no es necesario el lavado con metanol

¹¹ Originalmente, las muestras se desecaban a 80°C por seis horas, pero se determinó que las muestras secan mejor a 100°C durante dos horas, además de que se acorta el tiempo de análisis (Ver el Anexo G)

¹² Se probó extraer quitina de la HC directamente por disolución con solución saturada de cloruro de calcio en metanol pero no se obtuvieron resultados tan satisfactorios como cuando primero se extrae la mayor cantidad de proteínas

III.3.1 Selección del disolvente

Se preparan soluciones saturadas de cloruro de calcio¹³ en metanol (Ver la hoja de seguridad del metanol en el Anexo F) y cloruro de calcio en etanol¹⁴ y se compara cuál sistema extrae mayor cantidad de quitina de la quitina calcárea en el mismo lapso.

Se pesan 0.4 g de quitina calcárea¹⁵ en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se adicionan 10 mL del disolvente metanólico.¹⁶ La boca del matraz Erlenmeyer se tapa herméticamente con *Parafilm*, para evitar que el disolvente se evapore y que el sistema absorba humedad. Se mantiene el sistema con agitación magnética durante cinco horas. Luego, al producto obtenido se le determina gravimétricamente (III.3.3) el contenido de quitina. La extracción se hace por duplicado. Se repite el mismo procedimiento pero utilizando el disolvente etanólico. Se comparan los porcentajes obtenidos con los dos disolventes y se selecciona el que produce mayor extracción de quitina.

III.3.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción de quitina

Se analiza el mejor tiempo de extracción de quitina de la quitina calcárea con el disolvente determinado en III.3.1.

Se pesan 0.4 g de quitina calcárea en matraces Erlenmeyer de 125 mL y se adicionan 10 mL del disolvente seleccionado en III.3.1, se tapan herméticamente con *Parafilm* y se agitan magnéticamente, a temperatura ambiente, en función del tiempo. La agitación se realiza por 5, 10 y 24 horas. La prueba se hace por duplicado. Posteriormente, en el producto obtenido se determina gravimétricamente la cantidad de quitina extraída. (III.3.3.) Se realiza el gráfico de porcentaje de quitina extraída en función del tiempo y se localiza el mejor tiempo de extracción.

III.3.3 Determinación gravimétrica de quitina extraída

Luego del proceso de extracción de la quitina, lo que se obtiene es un sistema viscoso formado por el disolvente, la quitina disuelta y la quitina calcárea que no se disolvió.

¹³ Ver el Anexo A para la preparación de soluciones saturadas de cloruro de calcio

¹⁴ La sal de calcio debe ser dihidratada, pues la sal anhidra tiene poca solubilidad en estos alcoholes

¹⁵ 0.4 g de quitina calcárea con un 40% de desproteínización contienen aproximadamente 0.1 g de quitina

¹⁶ La relación de Q-Ca y disolvente es de 1:25 pues así se obtienen soluciones con una viscosidad adecuada para la filtración posterior

Para determinar la cantidad de quitina que se encuentra en solución se filtra al vacío el producto de la extracción utilizando como medio filtrante una membrana polimérica.¹⁷ Se recoge el filtrado que contiene la quitina disuelta y se pesa. Para que precipite la quitina se vierte el filtrado en 50 mL de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se agita. Se filtra el precipitado, utilizando un filtro de microfibra de vidrio previamente pesado y se lava con 50 mL de agua destilada. Se seca el filtro con la quitina a 100°C durante dos horas y se pesa. Se calcula el porcentaje de quitina presente en la solución.

III.4 Formación de la matriz de quitina calcárea

Una vez determinado el mejor procedimiento de extracción de quitina (III.3.1 y III.3.2) se procede a la elaboración de películas de quitina a partir de quitina en solución.¹⁸

La disolución de quitina se vierte sobre un vidrio de reloj de 10 cm de diámetro hasta formar una película de unos 8 cm de diámetro. Para provocar la precipitación de la quitina, se sumerge el vidrio de reloj en agua destilada a temperatura ambiente, cuidando de no perturbar la capa de quitina. Se saca el vidrio de reloj del agua luego de una hora y se procede a lavar con agua destilada la película de quitina formada, con mucho cuidado, hasta extraer todo el cloruro de calcio. Se seca la quitina precipitada en un desecador al vacío durante toda la noche.

También se puede precipitar la quitina si el vidrio de reloj, con la solución de quitina, se deja a la intemperie durante toda la noche para que la sal de cloruro de calcio, que es higroscópica, absorba agua del ambiente y se produzca la precipitación. Al día siguiente se extrae todo el licor formado y se lava la película de quitina creada con agua destilada hasta que todo el exceso de cloruro desaparece. El licor se guarda para recuperar el cloruro de calcio (Ver Anexo F).

La quitina que se obtiene no está completamente pura debido a que el medio filtrante no es capaz de retener a las partículas muy pequeñas de HC (harina de camarón) por lo

¹⁷ Se realizaron ensayos con diferentes medios filtrantes y la membrana polimérica formada de fibras compuestas de 50% de rayón y 50% de poliéster (Magitel, Colgate-Palmolive) es la que permite la filtración más adecuada. Se probó hacer la separación de los sólidos utilizando centrifugación en lugar de filtración, pero debido al pequeño tamaño de partícula de la Q-Ca y la alta viscosidad del sistema no se consiguió una separación adecuada a 3000 rpm

¹⁸ La solución de quitina se obtiene disolviendo 2 g de Q-Ca en 80 mL de solución saturada de cloruro de calcio en metanol y filtrando al vacío con la fibra polimérica. La solución filtrada se guarda en un recipiente hermético

que puede considerarse también como quitina calcárea pero de mayor pureza. Esto es, con un contenido menor de proteínas y carbonatos.

En las películas de quitina se estudia la degradabilidad (III.5) y se determina el porcentaje de acetilación utilizando el método espectrofotométrico IR (Brugnerotto y col., 2001; Muzzarelli y Peter, 1997), que se discute en el Anexo D.

La Figura III-1 presenta, de forma esquemática porcentual, el proceso de extracción de quitina que se origina con el camarón entero y finaliza con la obtención de quitina.

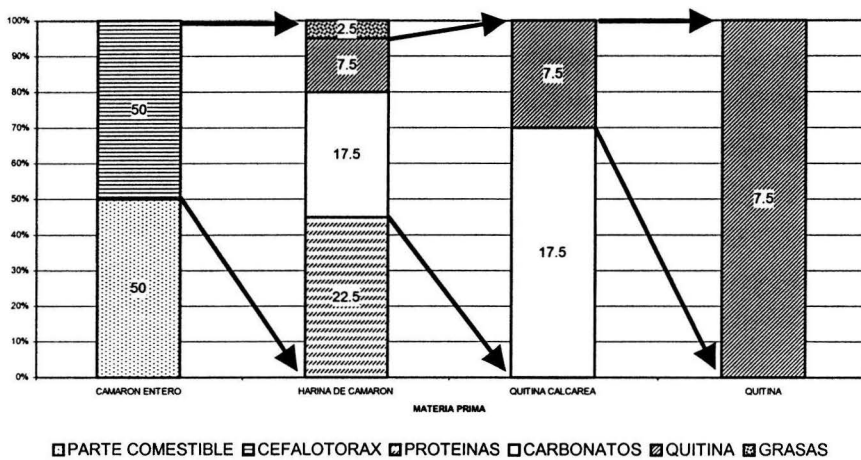


Figura III-1. Obtención de quitina de desechos de camarón

III.5 Estudio de degradabilidad

Para estudiar el efecto del intemperismo sobre una película de quitina se utiliza el Método ASTM D 1435-85 modificado.¹⁹ Se recorta una lámina delgada de poliestireno de 3 cm de diámetro y se pesa. Se elabora una matriz de quitina como en III.4 con la misma geometría de la lámina de PS y se pesa. Los dos materiales deben tener la densidad lo más semejante posible. Se varía la cantidad de disolvente SCM (solución saturada de cloruro de calcio en metanol) en la solución de quitina hasta obtener la matriz con la densidad desea-

¹⁹ Ver Anexo C (ASTM, 1991)

da. Las dos láminas son montadas sobre una plancha plástica y aseguradas con tachuelas. La plancha plástica se coloca horizontalmente sobre una superficie firme y se expone a la intemperie. Se pesan las muestras dos veces por semana durante un mes. Se calcula el porcentaje de pérdida de peso en ambas láminas y se grafica en función del tiempo. Se guarda un blanco de los dos materiales dentro de un desecador para comparar el cambio de peso al final del ensayo. Periódicamente se anota la temperatura ambiente y el estado del clima.

El ensayo de biodegradabilidad (Nishiyama y col., 1994) se realiza enterrando las láminas de quitina y de PS, preparadas como en el párrafo anterior, en composta de origen doméstico durante un mes. Las dos láminas se introducen hasta una profundidad de 5 cm dentro de la composta a la que previamente se determinó el porcentaje de humedad. El recipiente que contiene la composta se tapa con papel aluminio y se lo mantiene dentro del laboratorio. Periódicamente se mide la temperatura de la composta. Transcurridas las cuatro semanas se extraen las muestras y se pesan. Se compara el peso de las muestras con los blancos guardados en el desecador y se calcula el porcentaje de pérdida de peso. Para apreciar gráficamente el proceso de biodegradación, paralelamente al ensayo, otra lámina de quitina se introduce en la composta y se desentierra una vez por semana para tomarle una fotografía.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Obtención de quitina calcárea (Q-Ca)

IV.1.1 Uso de dodecilsulfato de sodio (SDS)

La digestión a reflujo abierto de la harina de cefalotórax de camarón dio los resultados que se presentan en la Tabla IV-1 (Ver Anexo G).

Tabla IV-1. Digestión de harina de camarón a reflujo abierto en función del tiempo y concentración de dodecilsulfato de sodio y carbonato de sodio

Variables en unidades originales			Variables en unidades codificadas			
tiempo (horas)	% (p/p)* SDS	% (p/p)* carbonato de sodio	tiempo	SDS	Carbonato de sodio	% (p/p) Desprtn. [%N]
1	0	0	-1	-1	-1	40.88
1	0	0.1	-1	-1	1	41.13
1	2	0	-1	1	-1	38.55
1	2	0.1	-1	1	1	38.54
1	1	0.05	-1	0	0	40.34
1	1	0.05	-1	0	0	41.24
						40.79 ± 0.45
2	0	0	1	-1	-1	42.55 [7.34]
2	0	0.1	1	-1	1	44.18 [7.36]
2	2	0	1	1	-1	42.46 [7.30]
2	2	0.1	1	1	1	41.98 [7.84]
2	1	0.05	1	0	0	41.48
2	1	0.05	1	0	0	41.45
						41.46 ± 0.02

volumen total: 10 mL

*con respecto al peso total seco

La superficie de respuesta para una hora de digestión a reflujo abierto (Figura IV-1) indica que se puede obtener una mayor desproteínización cuando la concentración de dodecilsulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés) se aproxima a cero y que hay un ligero aumento en la extracción cuando se incrementa la concentración de carbonato de sodio. Los círculos pequeños dentro de la figura corresponden a los datos experimentales. Cuando la digestión se efectúa durante dos horas se aprecia un comportamiento similar (Figura IV-2), pero el efecto negativo del SDS en la extracción de proteínas es menor y el positivo del carbonato de sodio es más importante.

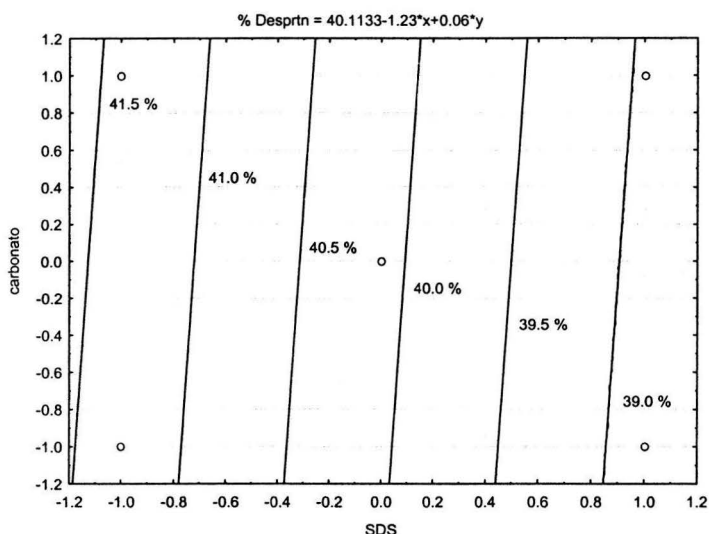


Figura IV-1. Superficie de respuesta de la desproteínización de harina de camarón con SDS y carbonato a reflujo abierto durante una hora

Cuando se realiza la digestión con la ayuda de radiación de microondas, MW, (Tabla IV-2), el comportamiento del SDS es similar al del reflujo abierto, como indican los gráficos de superficie de respuesta de las Figuras IV-3 y IV-4.

Con MW, el efecto positivo del carbonato sobre la desproteínización es tan importante como en el reflujo abierto por dos horas. Esto es cierto, tanto para la digestión a diez minutos como a treinta minutos, donde la diferencia radica en que la desproteínización au-

menta en función del tiempo. El carbonato de sodio, una sal de ácido débil con base fuerte, ayuda a que la digestión se realice en condiciones alcalinas.

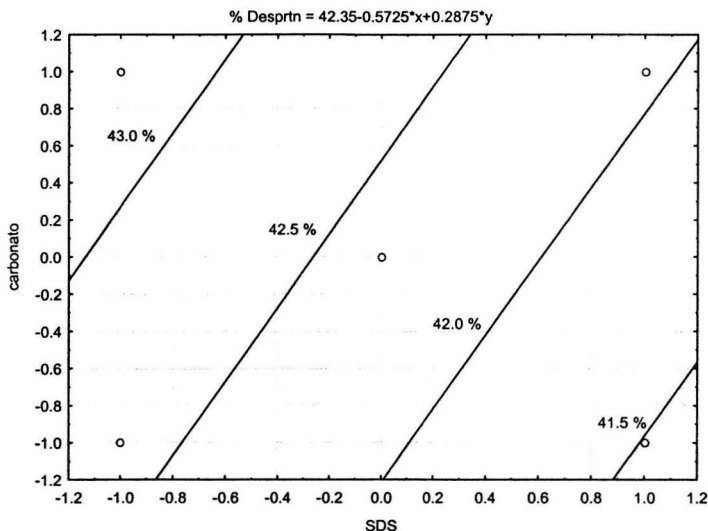


Figura IV-2. Superficie de respuesta de la desproteínización de harina de camarón con SDS y carbonato a reflujo abierto durante dos horas

Tabla IV-2. Desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas y SDS y carbonato en función del tiempo

Variables en unidades originales				Variables en unidades codificadas			
Temperatura °C	tiempo (minutos)	% (p/p)* SDS	% (p/p)* carbonato de sodio	tiempo	SDS	Carbonato de sodio	% (p/p) Desproteínización
180	10	0	0	-1	-1	-1	36.29
180	10	0	0.1	-1	-1	1	37.91
180	10	2	0	-1	1	-1	34.11
180	10	2	0.1	-1	1	1	34.80
180	10	1	0.05	-1	0	0	35.07
180	10	1	0.05	-1	0	0	35.34
							35.20 ± 0.14
180	30	0	0	1	-1	-1	38.78
180	30	0	0.1	1	-1	1	40.09
180	30	2	0	1	1	-1	37.39
180	30	2	0.1	1	1	1	37.30
180	30	1	0.05	1	0	0	38.25
180	30	1	0.05	1	0	0	35.72
							36.98 ± 1.26

volumen total: 5 mL

*con respecto al peso total seco

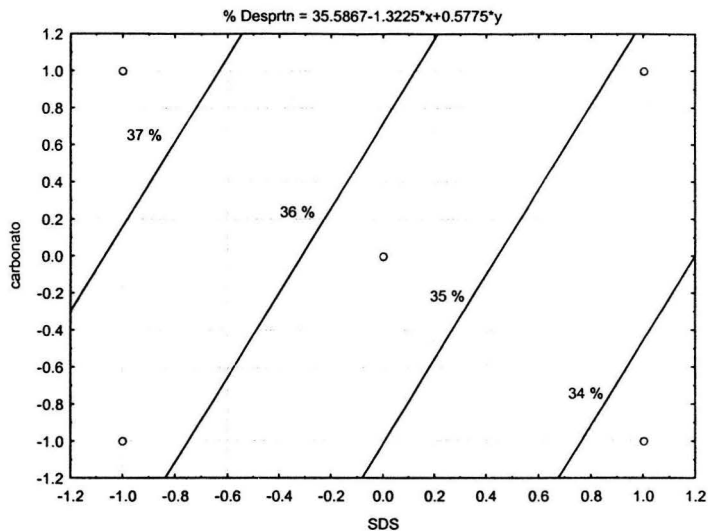


Figura IV-3. Superficie de respuesta para la desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas por diez minutos y SDS y carbonato

El surfactante SDS no es adecuado para usar en la desproteínización de harina de camarón posiblemente porque sufre reacciones secundarias durante la digestión que disminuyen su eficacia. La alta temperatura que se produce al trabajar con MW en recipientes cerrados genera grandes presiones que pueden conducir a la descomposición de los reactivos o a la formación de otros productos (Hall, 2000).

Comparativamente, el porcentaje de desproteínización a reflujo abierto es mayor al que se obtiene usando MW pero esto se debe principalmente a que en el reflujo abierto se utilizó un paso adicional al momento de cuantificar la pérdida de peso (Sección III.2.3), que consistió en lavar el producto de la digestión con metanol caliente para recuperar los sólidos adheridos a la pared del reactor, eliminar el tensoactivo de calcio precipitado y además extraer los lípidos. Una vez que se realiza esta extracción adicional con metanol a la quitina calcárea obtenida con MW, el porcentaje de desproteínización aumenta, en promedio, tres unidades (Ver Anexo G), con lo que los porcentajes de desproteínización con MW alcanzan las mismas magnitudes que las de reflujo abierto. El beneficio de usar radiación de microondas para la digestión es que acorta los tiempos de reacción.

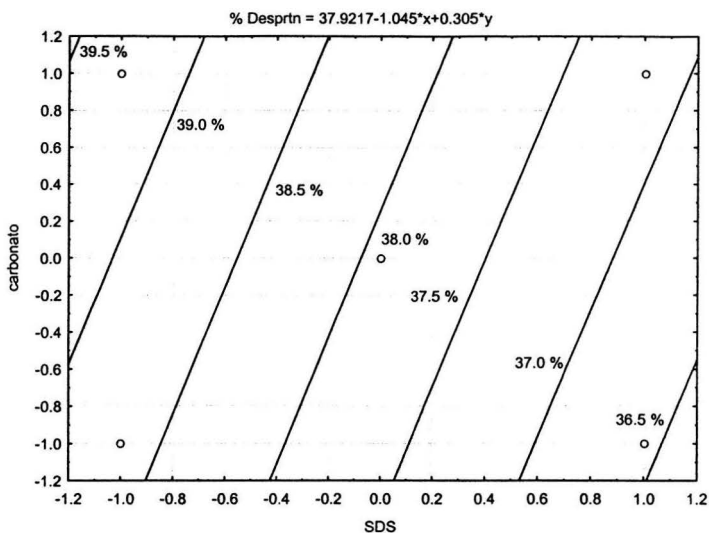


Figura IV- 4. Superficie de respuesta para la desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas por treinta minutos y SDS y carbonato

Emplear dodecilsulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés) en una digestión a reflujo abierto o cerrado con MW (radiación de microondas) tiene un efecto negativo para la desproteínización de la HC (harina de camarón) debido a la formación de sales de calcio poco solubles y a que la molécula de surfactante puede alterarse con la radiación de MW.

IV.1.2. Uso de aceite vegetal saponificado (SAP)

La digestión de harina de camarón con aceite vegetal saponificado, SAP, a reflujo abierto en función del tiempo dio los resultados que se presentan en la Tabla IV-3 (Ver Anexo G).

La superficie de respuesta de la Figura IV-5 tiene un comportamiento diferente a los analizados con anterioridad. Aquí, el incremento de SAP ayuda a la desproteínización cuando se realiza a reflujo abierto. Se procedió, entonces, a trazar una pendiente máxima (Ver Anexo B) para estudiar la conducta del sistema durante la digestión cuando aumenta el tiempo de reacción y la concentración de SAP (Tabla IV-4 y Figura IV-6).

Tabla IV-3. Desproteización de harina de camarón con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto

Variables en unidades originales		Variables en unidades codificadas		
tiempo (horas)	% (p/p)* SAP	Tiempo	SAP	% (p/p) Desprtn. [%N]
1	0	-1	-1	40.88 [7.33]
1	2	-1	1	42.21 [6.65]
2	0	1	-1	42.55 [7.34]
2	2	1	1	44.29 [7.81]
1.5	1	0	0	43.90
1.5	1	0	0	44.25

volumen total: 10 mL

*con respecto al peso total seco

44.08 ± 0.18

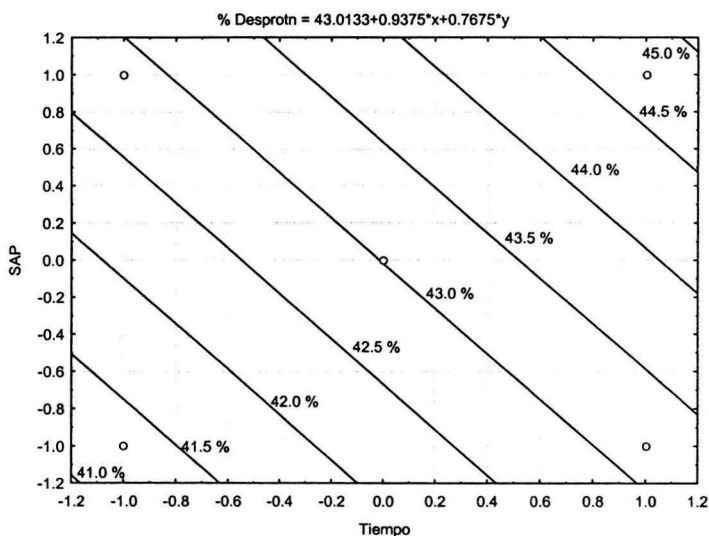


Figura IV-5. Superficie de respuesta de la desproteización de harina de camarón con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto en función del tiempo

Tabla IV-4. Pendiente máxima para la desproteización de harina de camarón con aceite vegetal saponificado a reflujo abierto

Variables en unidades originales		Variables en unidades codificadas		
tiempo (horas)	% (p/p)* SAP	Tiempo	SAP	% (p/p) Desproteización
3	3.8	3	2.8	46.50
4	5.7	5	4.7	48.06
5	7.4	7	6.4	50.05
5	0	7	-1	45.09
3.5	2.9	4	1.9	44.30

volumen total: 10 mL

*con respecto al peso total seco

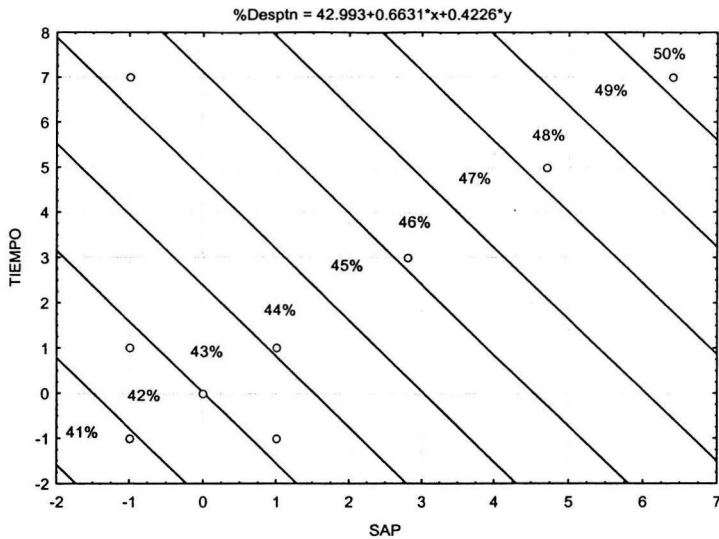


Figura IV-6. Pendiente máxima para de desproteinización a reflujo abierto con SAP

El comportamiento presente en la superficie de respuesta de la Fig. IV-5 se mantiene en la superficie de respuesta de la Figura IV-6. Los círculos pequeños en la figura representan datos experimentales. La extracción de proteínas mejora con el aumento de concentración de SAP y el tiempo de digestión a reflujo abierto. Adicionalmente, se realizó una digestión sólo con agua durante cinco horas, punto -1,7 en la Figura IV-6 (Tabla IV-4) para investigar únicamente el efecto del tiempo. El porcentaje de desproteinización que se obtuvo (45%) indica que sí es necesaria la presencia de SAP en la digestión para obtener una mejor extracción de proteínas. Para comprobar la bondad de la superficie de respuesta obtenida se desproteinizó una muestra con 2.9% de SAP durante 3.5 horas a reflujo abierto (Tabla IV-4) y se comparó con la ecuación del ajuste (Fig. IV-6).

$$\% \text{ Desptn} = 42.99 + 0.66 \text{ SAP} + 0.42 \text{ T}$$

$$\% \text{ Desptn} = 42.99 + 0.66 \times 1.9 + 0.42 \times 4 = 45.92\%$$

el dato experimental es de 44.30%, una diferencia de sólo 1.62 puntos porcentuales.

Se considera encontrar un punto de equilibrio en la digestión donde se pueda obtener la máxima desproteinización en el menor tiempo y con la menor cantidad de reactivos.

Ese punto es 2% de SAP (aceite vegetal saponificado) y dos horas de digestión (punto 1,1 en la Fig. IV-6) con un porcentaje de desproteínización calculado de 44%. No se justifica una mayor extracción de proteínas con el uso de más reactivo y más tiempo de digestión pues el siguiente paso, la disolución de quitina, perfectamente puede llevarse a cabo con una harina que no esté totalmente desproteínizada.

Los datos de desproteínización de la harina de camarón con MW y SAP se presentan en la Tabla IV-5.

Tabla IV-5. Desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas y aceite vegetal saponificado, a baja concentración, en función del tiempo

Variables en unidades originales			Variables en unidades codificadas		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	% (p/p) SAP*	Tiempo	SAP	%(p/p) Desproteínización
180	10	0	-1	0	37.70
180	10	0.2	-1	1	37.50
180	10	0.4	-1	2	36.73
180	10	0.6	-1	3	36.32
180	10	0.8	-1	4	35.61
180	10	1	-1	5	34.48
180	15	0	1	0	38.43
180	15	0.2	1	1	36.85
180	15	0.4	1	2	35.68
180	15	0.6	1	3	37.57
180	15	0.8	1	4	36.29
180	15	1	1	5	37.48

volumen total: 10 mL

*con respecto al peso total seco

En la extracción de proteínas con SAP pero utilizando MW se vuelve a evidenciar el poco efecto que tiene el agente tensoactivo en la digestión y el efecto positivo que tiene el tiempo de reacción (Figura IV-7). De acuerdo con la ecuación del ajuste, el efecto negativo en la desproteínización por parte del SAP (0.38) es un poco mayor que el efecto positivo del tiempo (0.33).

Para la desproteínización con SAP a alta concentración utilizando MW se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla IV-6.

La Figura IV-8 de porcentaje de desproteínización en función de la concentración de SAP indica que la alta concentración de SAP no ayuda a la extracción de las proteínas y que se obtienen mejores porcentajes de extracción cuando el % SAP tiende a cero, cuando la extracción se realiza con MW.

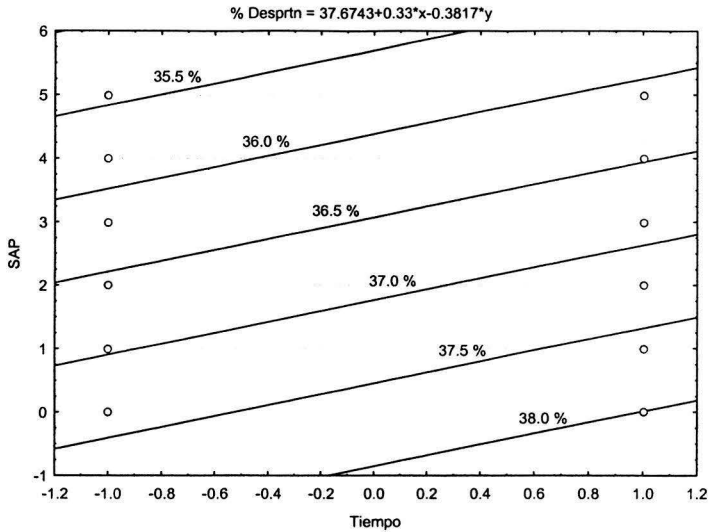


Figura IV-7. Superficie de respuesta para la digestión con radiación de microondas de harina de camarón con SAP a baja concentración en función del tiempo

Tabla IV-6. Desproteínización de harina de camarón con radiación de microondas y SAP a alta concentración con y sin lavado con MeOH

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	% (p/p)* SAP	%(p/p) Desprtn	Lavado MeOH (%)
180	15	0	36.61	39.24
180	15	1.96	35.85	-
180	15	3.85	34.04	38.12
180	15	5.66	31.78	-
180	15	7.41	30.82	-
180	15	9.09	30.78	36.33

volumen total: 10 mL

* con respecto al peso total seco

A diferencia de la extracción a reflujo abierto, con MW no se presenta el inconveniente de los sólidos adheridos a la pared de la probeta y no es necesario el lavado con metanol caliente. Al lavar con metanol caliente se disuelve el jabón de calcio precipitado y las grasas presentes por lo que el porcentaje de desproteínización de una extracción a reflujo abierto presenta valores más altos que una hecha con MW, similar a lo observado con SDS. Cuando a las muestras provenientes de la extracción con MW se les lava con metanol sus porcentajes aumentan en tres unidades, en promedio (Ver Anexo G), alcanzando magnitudes similares al reflujo abierto.

La Figura IV-8 presenta el efecto del lavado con metanol en la digestión con MW. El porcentaje aumenta pero el efecto negativo del SAP permanece. La distancia entre las dos curvas se incrementa conforme aumenta el SAP, pues mientras mayor es la cantidad de SAP utilizado mayor es la cantidad de jabón de calcio que precipita.

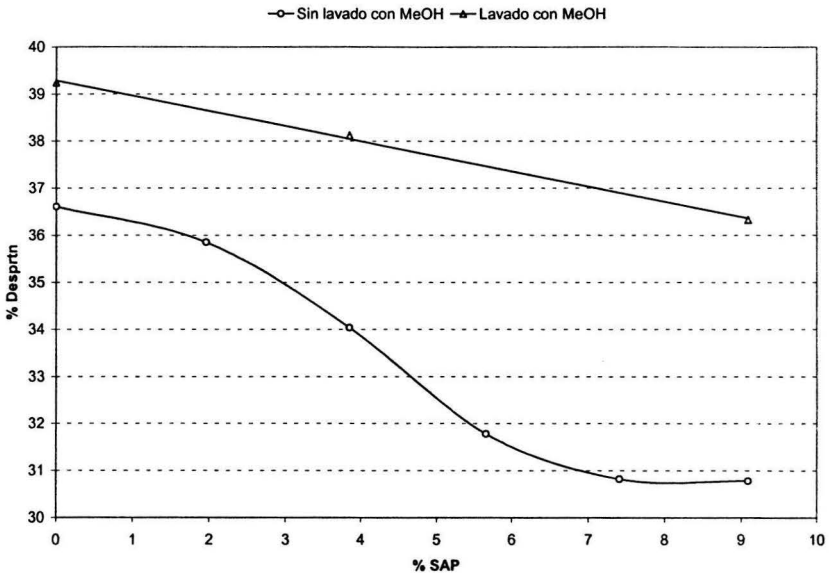


Figura IV-8. Porcentaje de desproteización de harina de camarón con y sin lavado con MeOH en función de SAP a alta concentración y radiación de microondas

El SAP ayuda a la desproteización de la harina de camarón solamente cuando se utiliza a reflujo abierto. Cuando se realiza la digestión a reflujo cerrado y con MW, el SAP ya no es eficiente, seguramente porque con la radiación de microondas se destruye y se producen reacciones secundarias que interfieren con la desproteización, como en el caso del SDS.²⁰

En las muestras de quitina calcárea (Q-Ca) se determinó el contenido de nitrógeno. (Ver Anexo G). Se utilizó un analizador elemental EA 1110 CHNS-O marca CE Instru-

²⁰ La desproteización de la HC también se produce empleando ultrasonido. Se realizó una prueba de extracción aplicando una frecuencia de 47 kHz y 9.09% de SAP durante una hora. Se obtuvo 32.57% de desproteización (Ver Anexo G), un rendimiento ligeramente mayor al que se obtuvo con MW durante 15 minutos (30.78%, Tabla IV-6). No se encontró una mejora significativa en la desproteización con ultrasonido pues el SAP a alta concentración formó jabones insolubles de calcio

ments. Como indica la Figura IV-9 (Tabla IV-7) existe una relación inversa entre el porcentaje de desproteínezación y el porcentaje de nitrógeno. Existen dos fuentes de nitrógeno en la HC: el nitrógeno de las proteínas y el nitrógeno propio de la quitina. Al realizar la desproteínezación se elimina la mayor parte del nitrógeno proteínico permaneciendo en la Q-Ca sólo el nitrógeno de la quitina, es decir, mientras mayor es la extracción de proteínas menor es el contenido de nitrógeno. La Figura IV-9 también muestra que, dentro del intervalo en estudio, existe una relación lineal directa entre la extracción de proteínas y el tiempo de reacción (lineal inversa para %N) cuando se digiere sólo con agua.

Tabla IV-7. Porcentaje de desproteínezación y de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por digestión con agua y microondas

Tiempo digestión (min.)	Temp. digestión (°C)	Volumen agua (mL)	% Desproteínezación	% Nitrógeno
5	180	5	33.63	5.93
10	180	5	36.29	4.95
15	180	5	38.91	4.14

Las Figuras IV-10 y IV-11 (Tabla IV-1 y IV-3) son superficies de respuesta de contenido de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por reflujo abierto con SDS y SAP respectivamente. Se observa un comportamiento similar a las superficies de respuesta de porcentaje de desproteínezación (Ver Figuras IV-2 y IV-5). Se consigue un menor porcentaje de nitrógeno (mayor eliminación de proteínas) cuando la concentración de SDS tiende a cero y para el SAP el contenido de nitrógeno disminuye al aumentar la concentración de surfactante.

El porcentaje de nitrógeno en harina de camarón sin tratamiento, en quitina comercial (Sigma, CAS No. 1398-61-4) y quitina precipitada se presentan en la Tabla IV-8.

Tabla IV-8. Contenido de nitrógeno en harina de camarón y quitina

Muestra	% Nitrógeno			% N, Media
Harina de camarón	11.31	12.00	10.89	11.40 ± 0.56
Quitina sigma	9.08	10.08	9.96	9.62 ± 0.44
	9.12	9.59	9.92	
Quitina 5 h 31 % Desp.	9.63			9.45 ± 0.18
Quitina 24 h 31 % desp.	9.27			

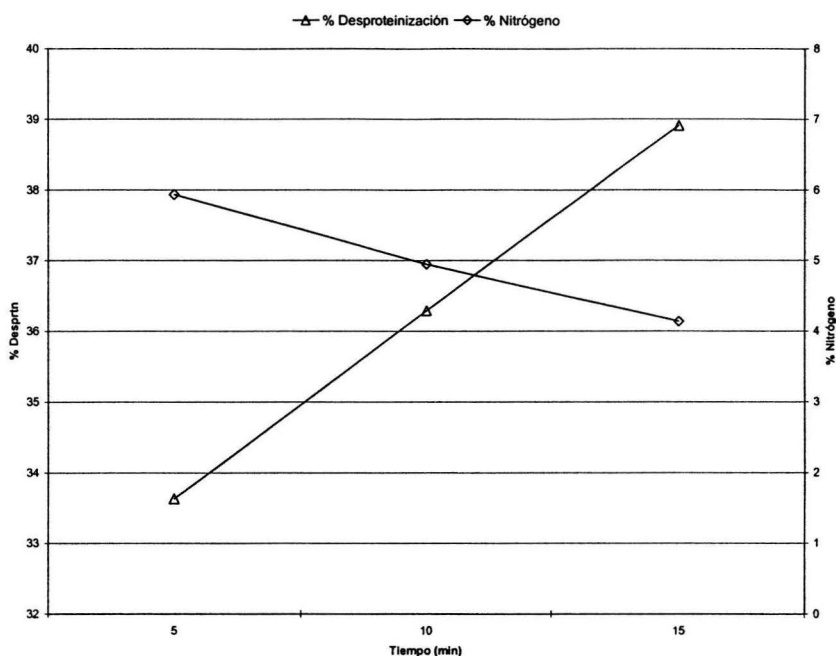


Figura IV-9. Relación entre % de desproteinización y % de nitrógeno en función del tiempo en quitina calcárea obtenida por digestión con MW y agua

El contenido de nitrógeno ayuda a evaluar cualitativamente el proceso de desproteinización. Una HC tiene un valor aproximado de 8% N y la quitina pura un valor cercano a siete (Cañipa, 1994), pero no puede ser usado como un dato cuantitativo para calcular el porcentaje de proteína pues sus valores difieren de los datos teóricos, seguramente porque la presencia de carbonato de calcio interfiere en el análisis (Percot y col., 2003).

Un cálculo aproximado del contenido de proteínas en la quitina obtenida es:

$$\% \text{ Proteínas} = (9.45 - 6.9) \times 6.25 = 16\%$$

donde 9.45 es el % N en la quitina precipitada obtenido por análisis elemental, 6.9 corresponde al porcentaje teórico de nitrógeno en quitina totalmente acetilada y 6.25 es el porcentaje teórico de nitrógeno en las proteínas. El valor alto de nitrógeno para la quitina comercial (Tabla IV-8) se debe probablemente a la presencia de impurezas pues es de grado práctico.

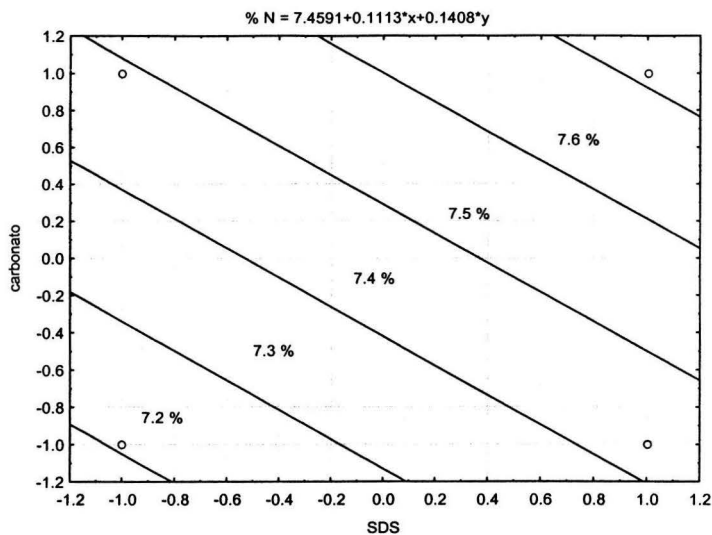


Figura IV-10. Superficie de respuesta de contenido de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por reflujo abierto durante dos horas con SDS

La forma más adecuada para la extracción de proteínas de la harina de camarón es mediante reflujo abierto con 2% de aceite vegetal saponificado (SAP) durante dos horas. La desproteización no se favorece con SAP y radiación de microondas (MW) o con SDS (dodecilsulfato de sodio) y reflujo abierto o cerrado con MW. El pequeño efecto positivo en la extracción cuando se usa carbonato de sodio no justifica su empleo. La energía de MW tiene el efecto de acortar el tiempo de digestión pero puede alterar a los surfactantes. Para evaluar cualitativamente el proceso de desproteización de la harina de camarón se pueden utilizar los valores de contenido de nitrógeno que proporciona el analizador elemental.

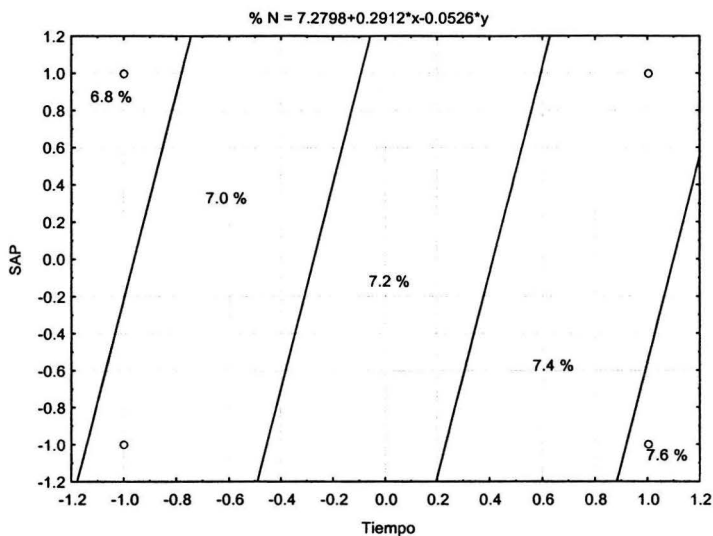


Figura IV-11. Superficie de respuesta de contenido de nitrógeno en quitina calcárea obtenida por reflujo abierto con SAP

IV.2 Disolución de quitina

IV.2.1 Selección del disolvente

El porcentaje de quitina extraída de la quitina calcárea²¹ utilizando soluciones saturadas de cloruro de calcio en metanol y etanol se presentan en la Tabla IV-9.

Tabla IV-9. Extracción de quitina con solución saturada de cloruro de calcio en metanol y etanol

Tiempo de extracción: 5 horas	
CaCl ₂ /MeOH % Quitina extraída (g Q/100 g solución)	CaCl ₂ /EtOH % Quitina extraída (g Q/100 g solución)
0.30	0.15
0.36	0.21
0.33 ± 0.03	0.18 ± 0.03

²¹ La Q-Ca se obtuvo después de un reflujo de una hora de 5 gramos de HC en 100 mL de agua destilada, la desproteinización fue del 34%

La cantidad de quitina extraída de la HC es casi el doble cuando se utiliza la solución saturada de cloruro de calcio en metanol (SCM) en lugar de la solución saturada de cloruro de calcio en etanol. El metanol tiene una constante dieléctrica más alta que el etanol²² y puede disolver más eficientemente al cloruro de calcio para que consiga ingresar en el complejo de quitina y destruir los enlaces de hidrógeno entre moléculas para formar el complejo soluble sal-quitina.

IV.2.2 Tiempo óptimo de extracción

Los resultados de extracción de quitina de la Q-Ca (34% de desproteínización) en función del tiempo utilizando SCM se presentan en la Tabla IV-10. No se observa un aumento significativo en la cantidad de quitina obtenida cuando la extracción se prolonga por más tiempo. En la metodología, III.3.2, se indica que el tiempo a probar era de 5, 10 y 24 horas, pero ya que no se aprecia una mejora en la extracción a 24 horas, no se realizó la de 10 horas ni se hizo necesaria la representación gráfica de los resultados.

Tabla IV-10. Extracción de quitina con solución saturada de cloruro de calcio en metanol en función del tiempo

CaCl ₂ /MeOH	
5 horas % Quitina extraída (g Q/100 g solución)	24 horas % Quitina extraída (g Q/100 g solución)
0.30	0.30
0.36	0.37
0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.04

Con los datos de porcentaje de desproteínización de Q-Ca (34%) después de una hora de reflujo abierto con agua, la densidad de la SCM (1.213 ± 0.003 g/mL) y el porcentaje de extracción de quitina con SMC después de cinco horas, se calcula la cantidad de quitina que se obtiene de la harina de camarón, HC. Se tiene que con el método de obtención de quitina desarrollado, de cada 100 gramos de HC se producen 7 ± 1 g de quitina.²³

La Tabla IV-11 presenta el rendimiento en la obtención de quitina a partir de cabezas frescas de camarón así como la cantidad de reactivos utilizados. Destacan los tiempos

²² El metanol es un líquido polar que disuelve con facilidad sales inorgánicas. A 25°C la constante dieléctrica o *permitividad relativa* del metanol es 32.66 y del etanol 24.3 (Lide, 1994)

²³ Cañipa y col. (1994) reportaron un rendimiento del 12% en la obtención de quitina a partir de cabezas de camarón secas utilizando el método tradicional de extracción

cortos utilizados durante el proceso, la posibilidad de reutilización del disolvente y la pequeña cantidad de surfactante empleado.

Tabla IV-11. Rendimientos durante el proceso de obtención de quitina y reactivos utilizados

	Peso inicial gramos	Rendimiento %	Proceso	Reactivo
Cabeza fresca	476		Lavado	Agua potable: 2.5 L
Cabeza seca*	100	21	Secado 80°C/8 h	
Harina de camarón desecada	75	75	Molienda Tamizado 100°C/2h	
Quitina calcárea	45	60	Digestión 2 h	Aceite vegetal: 0.8 g NaOH: 0.1 g Agua destilada: 0.9 L
Quitina	5.4	12	Extracción 5 h	**Cloruro de calcio: 0.7 kg **Metanol: 0.8 L

*Según Cañipa y col., 1994

**Se pueden recuperar

La mejor forma de extracción de quitina de la quitina calcárea (Q-Ca) es emplear una solución saturada de cloruro de calcio en metanol (SCM) durante cinco horas. La ventaja de este disolvente es que sus ingredientes se pueden recuperar para volver a utilizarlos (Ver Anexo F). El rendimiento del método de extracción de quitina desarrollado es de 7g de quitina por cada 100 g de harina de camarón.

IV.3 Determinación del grado de acetilación (DA)

En la Figura IV-12 se comparan los espectros IR de harina de camarón, quitina calcárea con un 50% de desproteínización, quitina obtenida luego de 24 horas de extracción y quitina comercial (Sigma, CAS No. 1398-61-4). Se observa que conforme avanza el proceso de extracción, se van definiendo los picos característicos de una quitina pura. Se aprecia al final que el espectro de quitina de 24 horas de extracción y el de quitina comercial son similares, comprobándose que el producto obtenido es quitina.

Con los espectros IR de diferentes muestras de quitina, que se muestran a continuación (Figuras IV-13 y IV-14) y las ecuaciones desarrolladas en el Anexo D se calcula el %DA (Tabla IV-12).

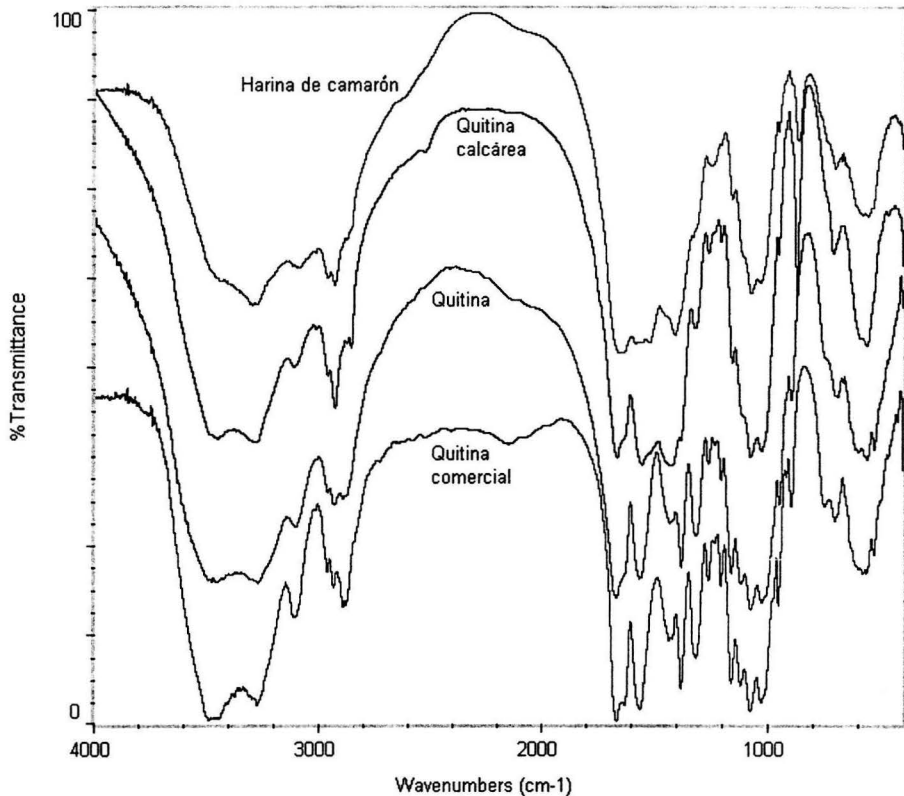


Figura IV-12. Espectros infrarrojos de harina de camarón, quitina calcárea (50% desproteización), quitina (31% desprtn. y 24 h de extracción) y quitina comercial (Sigma)

La Tabla IV-13 indica que el método de extracción desarrollado no es degradante pues el grado de acetilación (DA) que presentan las muestras de quitina es alto, alrededor del cien por ciento, mientras que la quitina comercial, producida por un método convencional, tiene un valor bajo de DA (77%).

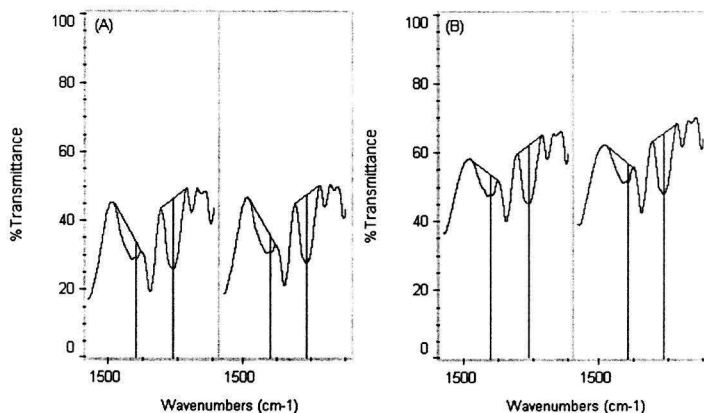


Figura IV-13. Espectro infrarrojo de (A) quitina precipitada, 5 h de extracción y 31% de desproteínización, (B) quitina comercial SIGMA. Se indica, por duplicado, la transmitancia a 1420 y 1320 cm⁻¹

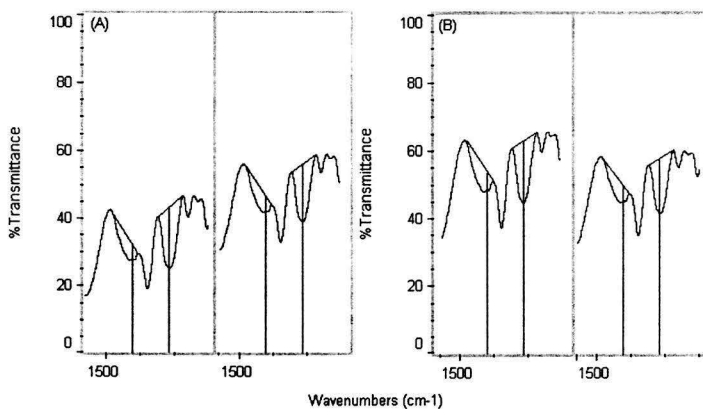


Figura IV-14. Espectro infrarrojo de (A) quitina precipitada, 24 horas de extracción y 31% de desproteínización, (B) quitina precipitada, 24 horas de extracción y 40% de desproteínización. Se indica, por duplicado, la transmitancia a 1420 y 1320 cm⁻¹

Tabla IV-12. Cálculo del porcentaje de acetilación en quitina utilizando el método infrarrojo

Segmento (%T)	AB	AC	DE	DF	A1320	A1420	%DA
Quitina Sigma	47.372	53.008	44.960	61.282	0.1345	0.0488	75.78
	51.095	56.865	47.953	64.794	0.1307	0.0465	77.52
Quitina 5 h, 31% Desptn.	30.383	35.256	27.697	46.140	0.2216	0.0646	97.30
	28.665	33.390	26.003	44.894	0.2372	0.0663	102.00
Quitina 24 h, 31% Desptn.	27.172	31.450	24.820	42.243	0.2310	0.0635	103.92
	39.921	43.712	37.145	53.190	0.1559	0.0394	114.10*
Quitina 24 h, 40% Desptn.	48.355	53.436	45.055	62.287	0.1406	0.0434	91.21
	44.954	49.815	41.447	57.477	0.1420	0.0446	89.43

*El valor alto de DA se debe a que la película fue elaborada a partir de una solución de quitina sin segunda filtración (Ver Anexo D) para ver el efecto de determinar el DA en una muestra de quitina contaminada con proteínas

Tabla IV-13. Porcentaje de acetilación en quitina determinado por el método infrarrojo

MUESTRA	% ACETILACIÓN
Quitina Sigma	76.65 ± 0.87
Quitina, 5 horas de extracción, 31% de desproteización	99.65 ± 2.35
Quitina 24 horas de extracción, 31% de desproteización	103.92
Quitina 24 horas de extracción, 40% de desproteización	90.32 ± 0.89

Los espectros infrarrojos de las películas indican que el producto que se obtiene al final del método de extracción desarrollado es quitina y que, además, el método no es tan degradante como el proceso habitual de extracción, pues el grado de acetilación (DA) de las películas está cercano al 100%.

IV.4 Degradación de películas de quitina

IV.4.1 Intemperismo

Las dos láminas, quitina (Ver su preparación en la Sección III.4) y PS, se montaron horizontalmente sobre una plancha de plástico y se ubicaron en la azotea del edificio E de la Facultad de Química (UNAM, D.F.). Durante el ensayo, que duró cuatro semanas, las muestras se expusieron a la radiación solar y a la lluvia. Dos veces por semana se pesaron (Ver Tabla IV-14), la Figura IV-15 muestra la pérdida de peso en función del tiempo y las condiciones del clima. Mientras que el PS a lo largo de todo el ensayo experimentó un pequeño cambio en el peso, la lámina de quitina, al principio, sufrió una disminución importante en el peso pero luego se estabilizó. Al final del ensayo, la lámina de quitina adquirió un color más oscuro que el original.

Tabla IV- 14. Peso de las láminas de quitina y poliestireno sometidas a intemperismo durante cuatro semanas

Día:	1	4	7	10	12	15	18	21	24	29
QUITINA, g	0.1979	0.1378	0.1677	0.1117	0.0873	0.0834	0.0776	0.0776	0.0783	0.0770
PS, g	0.1309	0.1310	0.1311	0.1311	0.1310	0.1313	0.1308	0.1308	0.1306	0.1307

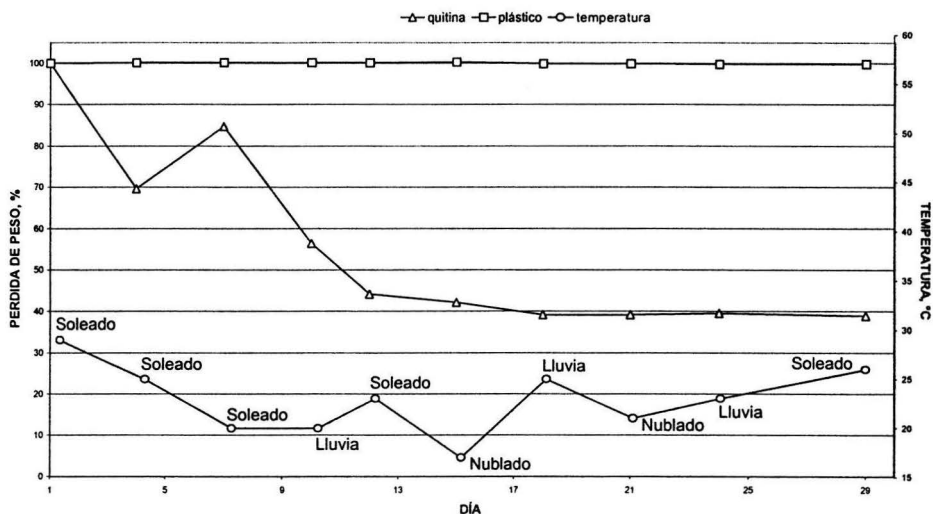


Figura IV- 15. Pérdida de peso de las láminas de quitina y poliestireno sometidas a intemperismo durante cuatro semanas y condiciones climáticas

IV.4.2 Biodegradación

La composta utilizada para la biodegradación es de origen doméstico, tiene una edad de 3 meses y 45% de humedad. Se tomaron mediciones de temperatura de la tierra cada semana. Se enterraron dos películas, una de poliestireno (PS) y otra de quitina. Al final de la cuarta semana se desenterraron las muestras pero sólo se halló la película de PS por lo que puede suponerse que la muestra de quitina fue totalmente degradada (Tabla IV-15). Se repitió el experimento, pero esta vez se extrajo la matriz de quitina una vez por semana para fotografiarla (Fig. IV-16). Al término de la sexta semana los pequeños fragmentos que quedaban de quitina desaparecieron corroborándose la degradación de la muestra de quitina.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

El poliestireno es muy estable ante procesos de intemperismo y biodegradación, en cambio, la quitina presenta una buena estabilidad frente al intemperismo, pero se degrada con facilidad cuando se deposita en el suelo. Este comportamiento de la quitina permite que un artículo que se elabore con ella tenga una vida larga de anaquel pero que cuando se deposite en un vertedero o relleno sanitario se degrade con facilidad.

Tabla IV-15. Ensayo de biodegradación de películas de quitina y poliestireno

Peso en gramos	Antes	Después	% Pérdida de peso	
Blanco de quitina	0.00789	0.00768	2.66	
Quitina en composta	0.0656	0.0	100	
Poliestireno en composta	0.0626	0.0623	0.48	
Temperatura:	Día 1: 18°C	Día 9: 21°C	Día: 16: 25°C	Día: 23: 20°C Día 30: 23°C

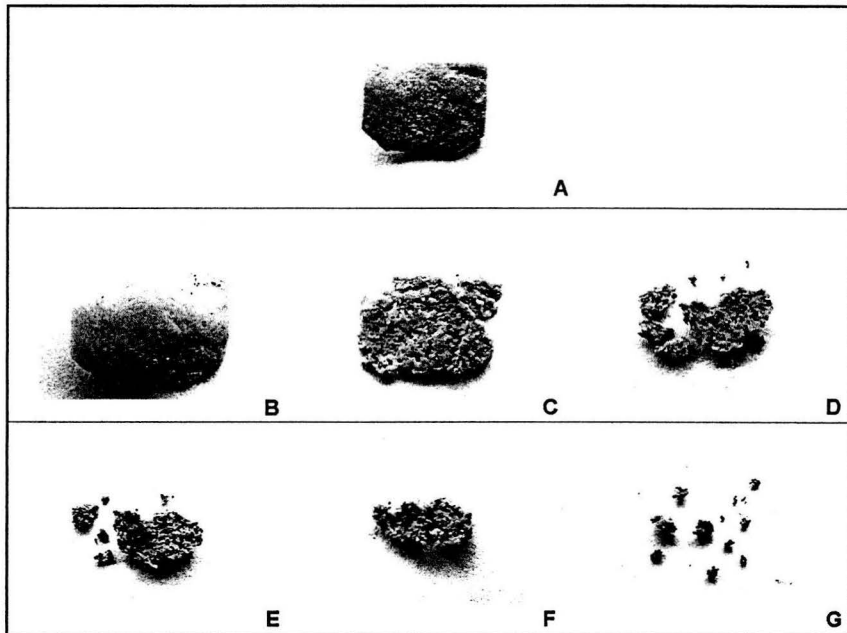


Figura IV- 16. PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE UNA PELÍCULA DE QUITINA EN TIERRA DE COMPOSTA. (A): Película de quitina antes de ser enterrada; (B): La película de quitina se hincha por la absorción de agua luego de 24 horas de estar enterrada; (C): La superficie de la película comienza a erosionarse luego de una semana de estar enterrada; (D), (E) y (F) la película continúa descomponiéndose después de dos, tres y cuatro semanas respectivamente; (G): En la quinta semana, de la película quedan sólo pequeños pedazos. Durante la sexta semana la película de quitina se degradó completamente

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 Conclusiones

1. Es posible obtener quitina de cefalotórax de camarón utilizando procedimientos ecológicos poco degradantes y poco contaminantes.
2. El procedimiento más adecuado para realizar la desproteización de harina de camarón es por reflujo abierto con 2% de SAP (aceite vegetal saponificado) durante dos horas. La utilización de SAP con MW (radiación de microondas) tiene un efecto negativo en la extracción de proteínas, al igual que la digestión con dodecilsulfato de sodio, (SDS por sus siglas en inglés) y reflujo abierto o MW. El pequeño beneficio que podría generar el trabajar con carbonato de sodio no justifica su uso.
3. La utilización de radiación de microondas para la extracción de proteínas tiene el efecto de acortar el tiempo de digestión, pues los porcentajes obtenidos son comparables a los de reflujo abierto, pero en el proceso se destruye el surfactante lo que disminuye su eficacia.
4. Un disolvente adecuado para disolver quitina que no es contaminante ni peligroso es el formado por una solución saturada de cloruro de calcio en metanol. Tiene la ventaja que puede ser recuperado luego de haber sido utilizado, reduciendo de esta manera la generación de residuos.
5. El método de elaboración de películas de quitina es seguro, no utiliza los disolventes convencionales tan peligrosos para la salud y el medio y no tiene efecto negativo sobre el peso molecular ni en el grado de acetilación de las moléculas de quitina

CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

6. Con la utilización de un surfactante biodegradable y un disolvente seguro para la obtención de quitina se ha podido prescindir del uso de hidróxido de sodio y de ácido clorhídrico para la desproteínización y desmineralización respectivamente, eliminándose el uso de sustancias corrosivas.
7. El único residuo que se forma es el agua de digestión durante la desproteínización. Contiene principalmente proteínas y pigmentos en solución y puede ser tratada adecuadamente en una planta de tratamiento o se puede enviar a proceso para recuperar las proteínas (Prentice y col., 2003; Toma y Meyers, 1975) y los pigmentos.
8. El proceso global de obtención de quitina desarrollado es, además de ecológico, más simple ya que para obtener la quitina soluble, que es la forma más apropiada para darle aplicación práctica, se lo hace directamente a partir de quitina calcárea, mientras que con el procedimiento habitual, es necesario la desmineralización y la desacetilación para formar la quitosana soluble (Ver Diagrama V-1).

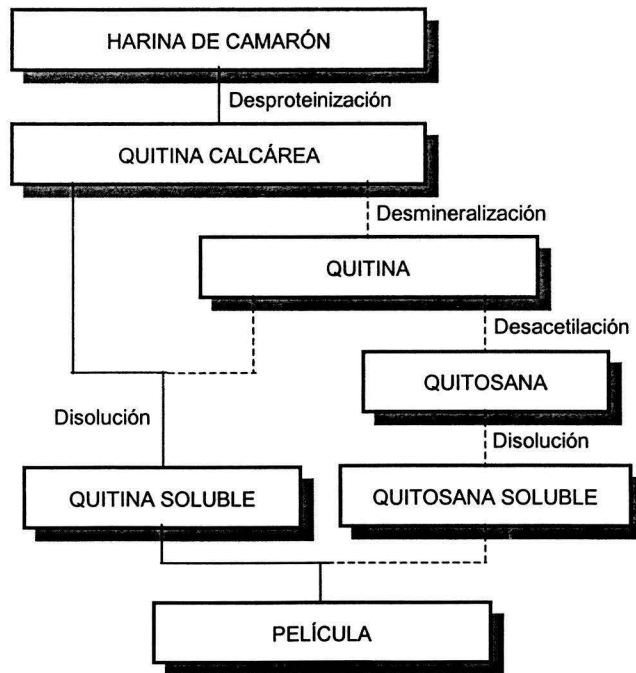


Diagrama V-1. Comparación entre el método tradicional de obtención de películas de quitina y el método ecológico

V.2 Recomendaciones

1. Se podría evitar la digestión de la harina de camarón si se utiliza un método novedoso para desproteínizar que consiste en licuar el cefalotórax cuando aún está fresco y luego lavar y secar. Esto enriquecería la harina en un 60% de quitina según Singer y Wooten (2003).
2. Se debe analizar si la extracción de quitina de la quitina calcárea con disolvente mejora cuando se realiza en diferentes condiciones de presión y temperatura.
3. Se deben realizar pruebas mecánicas a las películas de quitina pura y con plastificante para compararlas con las de un plástico comercial.
4. Se deben analizar las propiedades que presenta la quitina cuando la extracción del agua del gel se realiza por liofilización y se obtiene una esponja.
5. Se debe estudiar el comportamiento de la quitina en función de la cantidad de carbonato de calcio presente en la matriz.
6. Se debe investigar la posibilidad de determinar el peso molecular de la quitina en la solución de cloruro de calcio mediante mediciones de viscosidad.

ANEXOS

ANEXO A

Preparación de reactivos

Solución saturada de cloruro de calcio

En un balón de destilación de 500 mL se adicionan 100 mL de metanol (Ver la hoja de seguridad en el Anexo F) y se agregan lentamente 100 g de cloruro de calcio dihidratado (es una reacción exotérmica). Se coloca un refrigerante para reflujo y se somete a reflujo durante una hora hasta que toda la sal se ha disuelto. Se deja enfriar la solución durante toda la noche para que recristalice la sal en exceso y se filtra. Se guarda la solución en un recipiente hermético. Se recogen los cristales de la filtración para reutilizarlos en la preparación de más disolvente. Para la solución saturada de cloruro de calcio en etanol se repite el procedimiento pero se cambia el alcohol metílico por alcohol etílico.

Elaboración de aceite vegetal saponificado (SAP)

Un aceite comestible de maíz tiene un índice de saponificación promedio de 192 mg KOH/g aceite (NMX-F-030-1985). Para saponificar el aceite vegetal con NaOH se pesan 0.88 g de aceite de maíz en un balón de destilación de 250 mL. Aparte, se disuelven 0.12 g de NaOH en 5 mL de agua. Se trasvasa la solución de hidróxido al balón con el aceite y se realiza un reflujo durante dos horas. Se recoge el aceite saponificado en un balón aforado de 100 mL y se afora con agua destilada. Se obtiene una solución de concentración 1% (p/v) de aceite vegetal saponificado (SAP).

ANEXO B

Soluciones digestoras

Para disponer de 10 mL de solución digestora de SAP (aceite vegetal saponificado) o de dodecilsulfato de sodio, (SDS por sus siglas en inglés) a diferentes concentraciones se preparan, en primer lugar, soluciones madres al 1% (p/v) de SAP, 1% (p/v) de SDS y 0.25% (p/v) de carbonato de sodio. Y, como indica la Tabla B-1, utilizando una micropipeta se realizan las disoluciones correspondientes.

Tabla B-1. Preparación de 10 mL de solución digestora de aceite vegetal saponificado y de dodecilsulfato de sodio

% (p/p) SDS*	µL SDS 1%	% (p/p)* carbonato de sodio	µL carbonato de sodio 0.25 %	mL H ₂ O
0	0	0	0	10
0	0	0.1	200	9.8
2	1000	0	0	9.0
2	1000	0.1	200	8.8
1	500	0.05	100	9.4
% (p/p) SAP*	µL SAP 1%			
0	0			10
0.2	100			9.9
0.4	200			9.8
0.5	250			9.75
0.6	300			9.7
0.8	400			9.6
1.0	500			9.5
	mL			
1.96	1			9
3.85	2			8
5.66	3			7
7.41	4			6
9.09	5			5

*con respecto al peso total seco

Digestión con horno de microondas (MW)

Se pesan 0.5 gramos de harina de cefalotórax de camarón y se colocan dentro de la probeta de digestión a presión de teflón de 30 mL del digestor de microondas, se adicionan los 10 mL de la solución de digestión preparada como en la Tabla B-1, se tapa herméticamente la

probeta. Se repite el mismo procedimiento de llenado para todas las probetas del digestor²⁴ cambiando la concentración de las soluciones de digestión como en la Tabla B-1. Se colocan las seis probetas en el carrusel del equipo y se realiza la digestión de acuerdo al programa establecido. Luego de la digestión, se enfrían las probetas antes de ser abiertas y se determina el porcentaje de desproteínización como se indica en III.2.3.

El programa de digestión del horno de microondas consta de tres subprogramas: en el primero, en un tiempo menor a cinco minutos y con una potencia del 80% se lleva la muestra a una temperatura mayor a 100°C; en la segunda etapa, en un tiempo menor a 10 minutos y 80% de potencia se alcanza la temperatura de digestión deseada (menor a 240°C); la tercera etapa es de enfriamiento, en 10 minutos con una potencia del 10% se baja la temperatura a 100°C. La Tabla B-2 indica el nombre de cada subprograma, su función dentro del programa de digestión y las características de digestión: tiempo, temperatura y potencia.²⁵

Tabla B-2. Programas de digestión para el horno de microondas

Programa	Función	Tiempo digestión minutos	Temperatura de digestión °C	Potencia %
1	inicio	4	140	80
2	prueba	5	180	80
3	prueba	5	200	80
4	inicio 2	4	100	80
5	prueba	5	120	80
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	enfriamiento	10	100	10

²⁴ El equipo de microondas puede tratar seis muestras a la vez bajo las mismas condiciones de digestión

²⁵ Si se desea, por ejemplo, hacer una digestión a 180°C durante diez minutos, el programa completo para el horno sera: P1+P2+P2+P9

ANEXO C

Adaptación del método ASTM D 1435 – 85 STANDARD PRACTICE FOR OUTDOOR WEATHERING OF PLASTICS

Práctica estándar para intemperismo externo de plásticos

Alcance

- 1 Esta práctica tiene la intención de definir las condiciones de análisis para la exposición de materiales plásticos al ambiente.
2. La práctica está limitada al método por el cual el material será expuesto y el procedimiento general a seguir. Está destinado para usar artículos comerciales terminados como especímenes de análisis de todos los tamaños y formas.
3. Los medios de evaluación de los efectos del intemperismo dependen del uso de los materiales a analizar.

Aparatos

1. Percha: La percha donde irán colocadas las muestras deberá ser ubicada en un lugar donde no dé sombra una obstrucción vecina. Tendrá un ángulo de exposición de 0°, 45° ó 90° y la dirección de exposición dependerá de la latitud.
2. Sujeta-muestras: El diseño del sujeta-muestras deberá ser tal que el objeto o la hoja en el sujetador no pueda variar de su posición con la contracción. Esto es, que sea libre de expandir y contraer con cambios termales, de hincharse por la absorción de humedad o de encogerse por pérdida de agente plastificante.

Análisis de muestras

Las muestras para el análisis de exposición pueden ser de cualquier tamaño o forma que pueda ser montada en el sujeta-muestra o colocado directamente en la percha. Pueden ser especímenes apropiados para la medición de la evolución de los efectos del intemperismo en una propiedad física específica o pueden ser muestras más grandes, de las cuales se puede recortar las muestras para la evaluación. Las muestras para el análisis de exposición deben ser suficientemente grandes para que los filos de montaje puedan ser removidos si los resultados del análisis de evaluación se ven afectados.

Tiempo de exposición

1. Semanas: 1, 4, 16, 26, etc.
2. Años: 1, 1.5, 2, 3, 4.5, etc.

Procedimiento

1. Rotule las muestras para el análisis de exposición. Para la identificación use números, letras o símbolos que puedan ser identificados después de la exposición. El marcado deberá ser tal que no interfiera con la exposición o con el análisis.
2. Monte las muestras para el análisis en el sujeta-muestras.
3. Registre la fecha de instalación y la duración planeada de la exposición.
4. Registre la apariencia física y el dato apropiado de la propiedad física para el método de evaluación usado.
5. Establezca un procedimiento fijo de limpieza, examen visual, acondicionamiento y análisis de los especímenes. Este procedimiento varía con los materiales, pero debe ser uniforme en una serie de análisis de un material para proveer resultados comparativos.
6. Muestras de control sin exponer deben ser usadas para comparación con el espécimen expuesto a varios niveles de exposición.

Reporte

El reporte debe incluir:

1. El ángulo de exposición (horizontal, 45° ó 90°) y la dirección de la exposición.
2. Descripción del clima en cada sitio: Lluvia, porcentaje de posible luz solar, temperatura promedio y temperatura extrema.
3. Apariencia general y propiedades del espécimen sin exposición al sol sin envejecer y envejecido.
4. Apariencia general y propiedades de la muestra expuesta.

Precisión y tendencia

Informes de precisión y tendencia no son aplicables a esta práctica. Ellos dependen del método de análisis ASTM para la propiedad específica medida.

ANEXO D

Determinación del grado de acetilación (DA)

Existen varias metodologías para determinar el DA de una muestra de quitina (Muzzarelli y Peter, 1997). Se escogió el método espectrofotométrico infrarrojo porque, a diferencia de otros métodos, no presenta un rango limitado para la determinación del DA en el que puede ser aplicado; es rápido, no requiere de dilución de la muestra y pueden examinarse una amplia variedad de materias primas.

Para el análisis IR se preparan pastillas de KBr de 0.25 mm de espesor mezclando 1 mg de muestra, previamente desecada a 100°C por dos horas²⁶, en 100 mg de KBr. Se muele la mezcla en un mortero de ágata y se compacta en una prensa para obtener los discos de KBr. La quitina debe tener una alta pureza para obtener unos espectros bien definidos y poder cuantificar el DA.²⁷ Los espectros infrarrojos de las muestras se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet, modelo Impact 410, en un rango de frecuencia de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. Todos los espectros fueron recolectados por acumulación de 64 barridos con una resolución de 2 cm⁻¹. El software utilizado es un OMNIC. Se seleccionaron las líneas bases propuestas por Brugnerotto y col. (2001) por ser la relación que mejor concuerda entre los valores estimados y absolutos del DA. Se escogió la banda a 1320 cm⁻¹ para medir el grado de *N*-acetilación y como referencia interna la banda a 1420 cm⁻¹.

La ecuación para el cómputo del DA es:

$$\%DA = 31.92(A_{1320}/A_{1420}) - 12.20$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.990$, donde A_{1320} y A_{1420} son las absorbancias absolutas a 1320 cm⁻¹ y 1420 cm⁻¹ respectivamente. El valor de la absorbancia se calcula con las siguientes expresiones matemáticas (Ahmad y col., 2002) (Ver Figura D-1):

²⁶ Brugnerotto y col. (2001) no observaron una influencia significativa en los resultados de DA con respecto a la presencia del contenido de agua en las muestras

²⁷ Para esto, luego de filtrar la solución de quitina con la membrana polimérica (Ver III.3.3) se realiza una segunda filtración utilizando un filtro de microfibras de vidrio para retener las partículas más pequeñas de Q-Ca que no pudo detener el primer filtrado

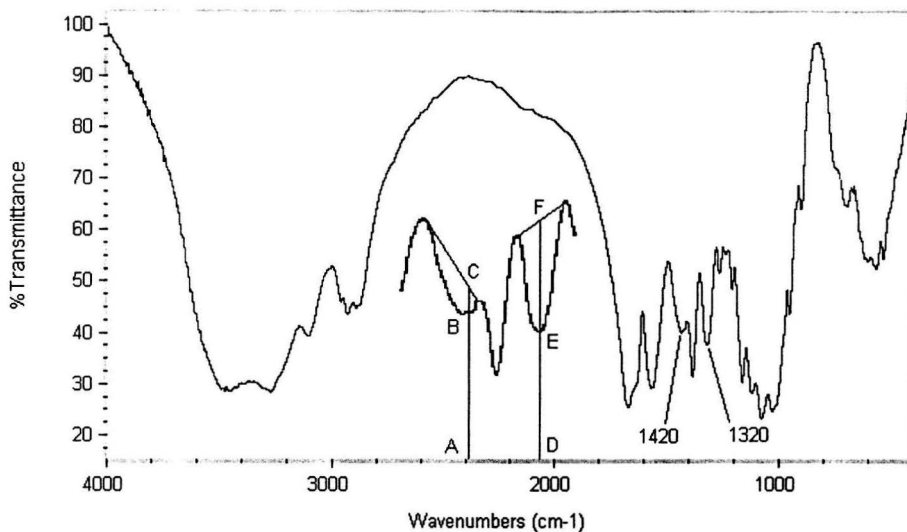


Figura D-1. Espectro infrarrojo de quitina. La zona ampliada muestra la línea base para los picos a 1420 y 1320 cm^{-1} y los segmentos para el cálculo de la absorbancia absoluta

$$\log (AC/AB) = A_{1420}$$

$$\log (DF/DE) = A_{1320}$$

Los segmentos AC, AB, DF y DE calculados en porcentaje de transmitancia se obtienen midiendo la altura de los picos a 1420 y 1320 cm^{-1} del espectro infrarrojo de la quitina.

El valor del DA se ve afectado por el método analítico empleado y cuando se reporte el DA se debe indicar el método de cuantificación utilizado, como propone Ahmad y col. (2002).

ANEXO E

Los doce principios de la Química Verde (Anastas y Warner, 1998)

1. Es mejor prevenir o evitar la formación de un desecho que tratarlo o limpiarlo después de formado.
2. Los métodos de síntesis deberían ser diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso dentro del producto final.
3. Donde sea posible, las metodologías de síntesis deberían ser diseñadas para usar y generar sustancias sin o con poca toxicidad para la salud humana y el ambiente.
4. Los productos químicos debería ser diseñados para preservar la eficacia de su función mientras reducen la toxicidad.
5. El uso de sustancias auxiliares (disolventes, agentes de separación, etc.) debería ser innecesario donde sea posible e inocuos cuando se usen.
6. Los requerimientos de energía deberían ser reconocidos por su impacto ambiental y económico y deberían ser minimizados. Los métodos de síntesis deberían ser conducidos a temperatura y presión ambiente.
7. La materia prima debería ser renovable mejor que no renovable si es práctico, técnica y económicamente.
8. La derivatización innecesaria (bloquear un grupo, protección/desprotección, modificación temporal de procesos físico/químicos) debería ser evitada, si es posible.
9. Los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los reactivos estequiométricos.
10. Los productos químicos deberían diseñarse para que al final de su función no persistan en el ambiente y se descompongan en productos de degradación inocuos.
11. Las metodologías analíticas necesitan ser desarrolladas, además, para que permitan el seguimiento y control en tiempo real antes de la formación de sustancias peligrosas.
12. Las sustancias y la forma de las sustancias usadas en un proceso químico debería ser escogidas para que minimicen un potencial accidente químico incluyendo su liberación, explosión y fuego.

ANEXO F

Recuperación del disolvente

La solución que se obtiene después de la precipitación de la quitina en solución (Ver Sección III.4) está constituida principalmente de cloruro de calcio, metanol y agua. Para recuperar el metanol y el cloruro se filtra el líquido para separar cualquier material particulado que pudiera estar presente y se destila el filtrado para recoger el metanol²⁸ (p. eb. 64.7°C). Se evapora el agua del producto que queda en el balón de destilación hasta aproximadamente un décimo de su volumen y obtener una solución sobresaturada de cloruro de calcio. Esta solución se deja en reposo toda la noche para que recristalice el cloruro de calcio. Los cristales de cloruro de calcio se filtran al vacío (rápidamente pues son higroscópicos) y se secan durante la noche en un desecador. El metanol y el cloruro de calcio recuperados se utilizan para producir más solución saturada de cloruro de calcio en metanol, SCM (ver Anexo A).

²⁸ Referirse a la hoja de seguridad del metanol para su manejo (Tomada del sitio web de la Facultad de Química: www.fquim.unam.mx/sitio/uploads/pdfs/hoja9.pdf)

HOJA DE SEGURIDAD IX METANOL

FÓRMULA: CH₄O, CH₃OH

PESO MOLECULAR: 32.04 g/mol

COMPOSICIÓN: C: 37.48 %, H: 12.58 % y O: 49.93 %

GENERALIDADES:

Es un líquido incoloro, venenoso, con olor a etanol y cuando está puro puede tener un olor repulsivo. Arde con flama no luminosa. Es utilizado industrialmente como disolvente y como materia prima en la obtención de formaldehído, metil-ter-butil éter, ésteres metílicos de ácidos orgánicos e inorgánicos. También es utilizado como anticongelante en radiadores automovilísticos; en gasolinas y diesel; en la extracción de aceites de animales y vegetales y agua de combustibles de automóviles y aviones; en la desnaturalización de etanol; como agente suavizante de plásticos de piroxilina y otros polímeros y como disolvente en la síntesis de fármacos, pinturas y plásticos.

Durante mucho tiempo se obtuvo por destilación destructiva de madera a altas temperaturas, en la actualidad se produce por hidrogenación catalítica de monóxido de carbono a presiones y temperaturas altas, con catalizadores de cobre-óxido de cinc; por oxidación de hidrocarburos y como subproducto en la síntesis de Fischer-Tropsch.

NÚMEROS DE IDENTIFICACIÓN:

CAS: 67-56-1

NIOSH: PC 1400000

NOAA: 3874

RTECS: PC1400000

HAZCHEM CODE: 2 PE

UN: 1230

RCRA: U154

STCC: 4909230

NFPA: Salud: 1 Reactividad: 0 Fuego: 3

El producto está incluido en: CERCLA, 313

MARCAJE: Líquido inflamable, venenoso.

SINÓNIMOS:

ALCOHOL METÍLICO
HIDRATO DE METILO
HIDRÓXIDO DE METILO
METILOL
CARBINOL
ALCOHOL DE MADERA

En inglés:

METHANOL
METHYL ALCOHOL
WOOD SPIRIT
BIELESKI'S SOLUTION
COLONIAL SPIRIT
COLUMBIAN SPIRIT
PYROXYLIC SPIRIT
WOOD NAPHTHA

Otros idiomas:

ALCOOL METHYLIQUE (FRANCÉS)
METHYLALKOHOL (ALEMÁN)
METYLOWY ALKOHOL (POLACO)
METANOLO (ITALIANO)
ALCOOL METILICO (ITALIANO)

PROPIEDADES FÍSICAS Y TERMODINÁMICAS:

Densidad (g/mL): 0.81 g/mL (0/4 °C), 0.7960 (15/4 °C), 0.7915 (20/4 °C), 0.7866 (25/4 °C)

Punto de fusión: -97.8 °C

Punto de ebullición (°C): 64.7 (760 mm de Hg), 34.8 (400 mm de Hg), 34.8 (200 mm de Hg), 21.2 (100 mm de Hg), 12.2 (60 mm de Hg), 5 (40 mm de Hg), -6 (20 mm de Hg), -16.2 (10 mm de Hg), -25.3 (5 mm de Hg), -44 (1 mm de Hg)

Índice de refracción a 20 °C: 1.3292

Densidad de vapor (aire = 1): 1.11

Punto de inflamación en copa cerrada (Flash point): 12 °C

Punto de congelación: -97.68 °C.

Temperatura de ignición: 470 °C

Límites de explosividad (% en volumen en el aire): 6-36.5

Temperatura crítica: 240 °C

Presión crítica: 78.5 atm

Volumen crítico: 118 mL/mol

Calor de formación (kJ/mol): -239.03 (líquido a 25 °C).

Energía libre de formación (kJ/mol): -166.81 (líquido a 25 °C)

Calor de fusión (J/g): 103

Calor de vaporización en el punto de ebullición (J/g): 1129
 Calor de combustión (J/g): 22 662 (a 25 °C)
 Temperatura de autoignición: 380 °C
 Tensión superficial (din/cm): 22.6
 Calor específico (J/g K): 1.37 (vapor a 25 °C) y 2.533 (líquido a 25 °C)
 Presión de vapor (mm de Hg): 127.2 (a 25 °C)
 Viscosidad (cP): 0.541 (líquido a 25 °C)
 Momento dipolar: 1.69
 Constante dieléctrica: 32.7 (a 25 °C)
 Conductividad térmica (W/m K): 0.202 (a 25 °C)
 Forma azeótropos con muchos compuestos

En la tabla a continuación se presentan algunos valores de propiedades físicas para mezclas metanol-agua.

MEZCLA % en v. de MeOH	DENSIDAD (g/mL) a 25 °C	PUNTO DE CONGELACIÓN (°C)	PUNTO DE EBULLICIÓN (°C)
10	0.9836	-5	92.8
20	0.9695	-12	87.8
30	0.9572	-21	84.0
40	0.9423	-33	80.9
50	0.9259	-47	78.3
60	0.9082	-57	75.9

Solubilidad: miscible con agua, etanol, éter, benceno, cetonas y muchos otros disolventes orgánicos.

Disuelve una gran variedad de sales inorgánicas por ejemplo 43 % de yoduro de sodio, 22 % de cloruro de calcio, 4 % de nitrato de plata, 3.2 % de cloruro de amonio y 1.4 % de cloruro de sodio.

PROPIEDADES QUÍMICAS:

Este producto reacciona violentamente con bromo, hipoclorito de sodio, dietil-cinc, disoluciones de compuestos de alquil-aluminio, trióxido de fósforo, cloruro cianúrico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, sodio, ter-butóxido de potasio y perclorato de plomo.

En general, es incompatible con ácidos, cloruros de ácido, anhídridos, agentes oxidantes, agentes reductores y metales alcalinos.

NIVELES DE TOXICIDAD:

RQ: 5000

IDLH: 25000 ppm

LDLo (oral en humanos): 4.28 mg/Kg

LD₅₀ (oral en ratas): 5628 mg/kg

LC₅₀ (inhalaado en ratas): 64000 ppm/4h

LD₅₀ (en piel con conejos): 15800 mg/kg

Niveles de irritación a piel de conejos: 500 mg/24 h, moderada.

Niveles de irritación a ojos de conejos: 40 mg, moderada.

México:

CPT (en piel): 260 mg/m³ (200 ppm)

CCT (en piel): 310 mg/m³ (250 ppm)

Estados Unidos:

TLV TWA: 260 mg/m³ (200 ppm)

TLV STEL: 310 mg/m³ (250 ppm)

Reino Unido:

Periodos largos: 260 mg/m³ (200 ppm)

Periodos cortos: 310 mg/m³ (250 ppm)

Francia:

VME: 260 mg/m³ (200 ppm)

VLE: 1300 mg/m³ (1000 ppm)

Alemania:

MAK: 260 mg/m³ (200 ppm)

Suecia:

Periodos cortos: 310 mg/m³ (250 ppm)

Periodos largos: 269 mg/m³ (200 ppm)

MANEJO:

Equipo de protección personal:

El manejo de este producto debe hacerse en un lugar bien ventilado, utilizando bata, lentes de seguridad y, si el uso es prolongado, guantes. No deben usarse lentes de contacto al utilizar este producto. Al trasvasar pequeñas cantidades con pipeta, utilizar propipetas, NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.

RIESGOS:

Riesgos de fuego y explosión:

Es un producto inflamable. Sus vapores pueden explotar si se prenden en un área cerrada y pueden viajar a una fuente de ignición, prenderse y regresar al área donde se produjeron en forma de fuego. Los contenedores pueden explotar.

Riesgos a la salud:

El envenenamiento puede efectuarse por ingestión, inhalación o absorción cutánea. Y se debe, posiblemente, a su oxidación a ácido fórmico o formaldehído, esta oxidación se sabe que puede ser inhibida por etanol, pues el etanol es metabolizado de manera muy específica y desintoxica al organismo de metanol por medio de la respiración. Después de la muerte, el efecto más grave de este producto, es la ceguera permanente.

Inhalación: La exposición a una concentración mayor de 200 ppm produce dolor de cabeza, náusea, vómito e irritación de membranas mucosas. Concentraciones muy altas pueden dañar el sistema nervioso central y causar problemas en la visión. Los metabolitos de este producto (ácido fórmico y formaldehído) son metabolizados lentamente por el organismo, por lo que los efectos del metanol son acumulativos y una exposición constante aún a bajos niveles, puede causar muchos de los efectos mencionados arriba. Estos efectos varían con cada individuo.

Contacto con ojos: Tanto los vapores como el líquido son muy peligrosos, pues se ha observado que el metanol tiene un efecto específico sobre el nervio óptico y la retina.

Contacto con la piel: El contacto directo produce dermatitis y los efectos típicos (mencionados arriba) de los vapores de metanol que se absorben por la piel.

Ingestión: El envenenamiento por este medio se lleva a cabo frecuentemente por etanol adulterado y sus efectos dependen de la cantidad ingerida, pues, como se mencionó arriba, el etanol afecta el metabolismo del metanol. Generalmente una dosis de 25 a 100 mL resulta fatal. Al principio se produce una narcosis similar a la producida por el etanol, pero después de 10 a 15 horas se presentan daños más graves sobre el sistema nervioso central, específicamente sobre el nervio óptico y finalmente, se presentan los efectos agudos ya mencionados.

Carcinogenicidad: No se ha observado un incremento en los casos de cáncer en trabajadores expuestos a metanol, en estudios epidemiológicos.

Mutagenicidad: Resultó ser no mutagénico en estudios con *Salmonella typhimurium* y no indujo el intercambio de cromátida hermana.

Peligros reproductivos: En estudios con concentraciones altas de vapor (10000 ppm) se incrementan las malformaciones congénitas las cuales incluyen órganos urinarios y cardiovasculares. A concentraciones de 5000 ppm no se observaron estos efectos.

ACCIONES DE EMERGENCIA:

Primeros auxilios:

Inhalación: Mover a la víctima a un área bien ventilada y mantenerla abrigada. Si no respira, dar respiración artificial y oxígeno.

Ojos: Lavarlos con agua o disolución salina neutra en forma abundante, asegurándose de abrir los párpados con los dedos.

Piel: Lavar la zona dañada inmediatamente con agua y jabón. En caso necesario, quitar la ropa contaminada para evitar riesgos de inflamabilidad.

Ingestión: No inducir el vómito. Pueden utilizarse de 5 a 10 g de bicarbonato de sodio para contrarrestar la acidosis provocada por este producto y en algunos casos, se ha informado de hemodiálisis como método efectivo para este tipo de envenenamiento.

EN TODOS LOS CASOS DE EXPOSICIÓN, EL PACIENTE DEBE SER TRANSPORTADO AL HOSPITAL TAN PRONTO COMO SEA POSIBLE.

Control de fuego:

Usar agua en forma de neblina, pues los chorros de agua pueden ser inefectivos. Enfriar todos los contenedores involucrados con agua. El agua debe aplicarse desde distancias seguras.

En caso de fuegos pequeños puede utilizarse extinguidores de espuma, polvo químico seco y dióxido de carbono.

Fugas y derrames:

Utilizar el equipo de seguridad mínimo (bata, lentes de seguridad y guantes) y, dependiendo de la magnitud del siniestro, utilizar equipo de protección completa y de respiración autónoma.

Alejar cualquier fuente de ignición del derrame y evitar que llegue a fuentes de agua y drenajes. Para ello construir diques con tierra, bolsas de arena o espuma de poliuretano, o bien, construir una fosa

Para bajar los vapores generados, utilice agua en forma de rocío y almacene el líquido.

Si el derrame es al agua, airear y evitar el movimiento del agua mediante barreras naturales o bombas para controlar derrames y succionar el material contaminado. El material utilizado para absorber puede quemarse.

El material utilizado para absorber el derrame y el agua contaminada debe de almacenarse en lugares seguros y desecharlo posteriormente de manera adecuada.

En el caso de derrames pequeños, el líquido puede absorberse con papel y llevarse a un área segura para su incineración o evaporación, después lavar el área con agua.

Desechos:

En el caso de cantidades pequeñas, puede dejarse evaporar o incinerarse en áreas seguras. Para volúmenes grandes, se recomienda la incineración controlada junto con otros materiales inflamables.

ALMACENAMIENTO:

El metanol debe almacenarse en recipientes de acero al carbón, rodeado de un dique y con sistema de extinguidores de fuego a base de polvo químico seco o dióxido de carbono, cuando se trata de cantidades grandes. En el caso de cantidades pequeñas, puede manejarse en recipientes de vidrio.

En todos los casos debe mantenerse alejado de fuentes de ignición y protegido de la luz directa del sol.

REQUISITOS DE TRANSPORTE Y EMPAQUE:

Transportación terrestre:

Marcaje: 1230

Líquido inflamable

Código HAZCHEM: 2 PE

Transportación marítima:

Código IMDG: 3087

Clase: 3.2

Marcaje: Líquido Inflamable, Venenoso

Transportación aérea:

Código ICAO/IATA: 1230

Clase: 3 (6.1)

Cantidad máxima en vuelos comerciales: 1 L

Cantidad máxima en vuelos de carga: 60 L

ANEXO G
DATOS EXPERIMENTALES

% Desproteización con MW en un diseño factorial de primer orden para SDS en función del tiempo									
Volumen digestión (mL)	Temperatura digestión (°C)	Tiempo digestión (min)	Tensoactivo	Concentración (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	% Desprtn (%N)	Lavado 5 mL MeOH % Desprtn (%N)	Diferencia (%)
5	180	5	SDS	0	0	80/6	33.63 (5.93)	-	-
				0	0.1		34.83		
				2	0		32.33 (7.92)		
				2	0.1		34.09		
				1	0.05		33.05		
				1	0.05		35.40		
		10		0	0		36.29 (4.95)	39.37	3.08
				0	0.1		37.91	41.14	3.23
				2	0		34.11	37.26	3.15
				2	0.1		34.80 (6.12)	38.27	3.47
				1	0.05		35.07	-	-
				1	0.05		35.34	37.57	2.23
		15		0	0		38.91 (4.14)	-	-
				0	0.1		38.67		
				2	0		36.62		
				2	0.1		35.23 (4.25)		
				1	0.05		36.55		
				1	0.05		37.05		
		30		0	0		38.78	40.72 (5.51)	2.94
				0	0.1		40.09 (5.28)	-	-
				2	0		37.39	40.69 (6.31)	3.30
				2	0.1		37.30	40.18 (6.10)	2.88
				1	0.05		38.25	42.03	3.31
				1	0.05		35.72	-	-

Pendiente máxima, diseño factorial de segundo orden y nuevo diseño factorial de primer orden para la desproteinización con SDS y MW									
Volumen digestión (mL)	Temperatura digestión (°C)	Tiempo digestión (min)	Tensoactivo	Concentración (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	% Desprtn (%N)	Lavado 5 mL MeOH (% Desprtn)	Diferencia (%)
5	180	5	SDS	2	0.1225	80/6	35.64 (7.36)	-	-
				3	0.195		34.72		
				4	0.2675		33.52		
				5	0.3402		34.74		
				6	0.4127		32.47		
				7	0.4853		31.95		
				2	0.1225		80/5		
		3		0.195	36.08	39.13		3.05	
		4		0.2675	35.00	38.97		3.97	
		5		0.3402	36.05	39.80		3.75	
		6		0.4127	35.67	39.75		4.08	
		7		0.4853	33.05	37.31		4.26	
		0.6		0.1	80/6	34.93 (6.42)		-	-
		1		0.05		34.53 (4.99)			
		1		0.15		34.31			
		2		0.03		34.34			
		2		0.1		35.24			
		2		0.1		35.40			
		2		0.1		34.60			
		2		0.1		34.56			
		2		0.17		35.36			
3	0.05	32.82 (6.12)							
3	0.15	34.42							
3.4	0.1	33.00 (9.08)							
1.2	0.1	37.52							
2.8	0.1	36.91							
1.2	0.22	34.77							
2.8	0.22	35.70							
2	0.16	36.46							
2	0.16	36.39							

% Desproteínización con MW y SAP en función del volumen y el tiempo de digestión (por duplicado) y digestión en función del % SAP										
Volumen digestión (mL)	Temperatura digestión (°C)	Tiempo digestión (min)	Tensoactivo	Concentración (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	Desproteínización (%)	Lavado 5 mL MeOH (% Desprtn)	Diferencia (%)	
1	180	5	SAP	1	-	100/2	32.25	-	-	
							32.61			
5							34.16			
							35.57			
10							34.27			
							35.12			
1		10		10			1			31.45
										31.24
5										35.07
										36.99
10										38.64
										35.38
5		5		5			0			35.79
							0.2			35.29
							0.4			37.65
							0.6			34.34
							0.8			35.40
							1			35.37
	10	10	10	0	38.28					
				0.2	36.42					
				0.4	37.80					
				0.6	37.38					
				0.8	36.31					
				1	37.66					

% Desproteínización con MW y SAP en función del tiempo de digestión a baja y alta concentración de SAP									
Volumen digestión (mL)	Temperatura digestión (°C)	Tiempo digestión (min)	Tensoactivo	Concentración (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	% Desprtn	Lavado 5 mL MeOH % Desprtn (%N)	Diferencia (%)
10	180	10	SAP	0	-	100/2	37.70	40.47	2.77
				0.2			37.50	-	-
				0.4			36.73	40.04	3.31
				0.6			36.32	-	-
				0.8			35.61	-	-
				1			34.48	37.88 (7.02)	3.40
		15		0			38.43	-	-
				0.2			36.85	-	-
				0.4			35.68	-	-
				0.6			37.57	40.05 (7.23)	2.48
				0.8			36.29	-	-
				1			37.48	40.45 (6.68)	2.97
		10		0			35.43	38.53	3.10
				1.96			34.70	-	-
				3.85			32.22	36.25	4.03
				5.66			33.07	-	-
				7.41			29.07	-	-
				9.09			30.67	35.66	4.99
		15		0			36.61	39.24	2.63
				1.96			35.85	-	-
				3.85			34.04	38.12	4.08
				5.66			31.78	-	-
				7.41			30.82	-	-
				9.09			30.78	36.33 (5.74)	5.55

% Desproteínización con MW utilizando SAP y carbonato y digestión a baja temperatura con SAP y MW									
Volumen digestión (mL)	Temperatura digestión (°C)	Tiempo digestión (min)	Tensoactivo	Concentración (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	Desproteínización (%)	Lavado 5 mL MeOH (% Desprtn)	Diferencia (%)
10	180	10	SAP	0	0	100/2	35.74	-	-
				0	0.4		37.64		
				0.4	0		36.92		
				0.4	0.4		35.79		
				0.2	0.2		36.78		
				0.2	0.2		36.40		
	20	0		0	38.08				
		0		0.4	35.57				
		0.4		0	36.39				
		0.4		0.4	37.18				
		0.2		0.2	37.50				
	120	40		0.2	0.2		36.93		
				0			35.18		
				0.2			33.79		
				0.4	-		34.51		
0.6				33.91					
		0.8		33.53					
		1		33.78					
ULTRASONIDO									
10	Frecuencia 47 KHz	60	SAP	9.09	-	100/2	32.41 32.73	-	-

% Desproteínización con MW con carbonato de sodio o hidróxido de sodio en función del tiempo de digestión									
Volumen digestión (mL)	Temperatura digestión (°C)	Tiempo digestión (min)	NaOH (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	Desproteínización (%)	Lavado 5 mL MeOH (% Desprtn)	Diferencia (%)	
5	180	5	-	0	100/1	34.84	-	-	
				0.05		35.55			
				0.1		35.86			
				0.15		35.78			
				0.2		36.39			
				0.3		35.43			
10		10		0	-	100/2			38.27
				0.05					36.89
				0.1					36.09
				0.15					36.72
				0.2					35.86
				0.3					36.28
10	10	10	0	-	100/2	36.87			
			0.2			36.02			
			0.4			37.95			
			0.6			37.25			
			0.8			36.21			
			1			36.61			
	45	45	0	-	100/2	39.48			
			0.2			40.07			
			0.2			40.41			
			0.2			39.28			
			0.4			40.07			
			0.5			40.67			
			0.5			38.87			
			0.6			42.05			
			0.8			41.16			
			0.8			41.16			
			0.8			40.67			
			1			38.84			

% Desproteínización a reflujo abierto con SDS y con SAP en función del tiempo y pendiente máxima con SAP									
Volumen digestión (mL)	Tiempo digestión (horas)	Tensoactivo	Concentración (%)	Carbonato de sodio (%)	Secado (°C/h)	% Desprtn (%N) (lavado con 5 mL MeOH)			
10	1	SDS	0	0	100/2	40.88 (7.33)			
			0	0.1		41.13			
			2	0		38.55			
			2	0.1		38.54			
			1	0.05		40.34			
			1	0.05		41.24			
	2		0	0		42.55 (7.34)			
			0	0.1		44.18 (7.36)			
			2	0		42.46 (7.30)			
			2	0.1		41.98 (7.84)			
			1	0.05		41.48			
			1	0.05		41.45			
	1	SAP	0	-	40.88 (7.33)				
			1		42.21 (6.65)				
			2		42.55 (7.34)				
			2		44.29 (7.81)				
			1.5		43.90				
			1.5		44.25				
			3		46.50				
			4		48.06				
5			50.05						
5			45.09						
3.5	44.30								
3.8	5.7	7.4	0	2.9					
						0			
							2.9		

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, T., Khiang, K., Seng, H.** 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 205-212
- Akira, H.** 1993. Production of chitin, chitosan and calcium salt thereof. Patente No. JP5271303, Japón.
- Anastas, P., Warner, J.** 1998. *Green Chemistry Theory and Practice*, Oxford University Press, Nueva York, EEUUA.
- ASTM.** 1991. *Annual Book of ASTM Standards*. Vol. 08.01 Plastics, pp. 432-436, Filadelfia, EEUUA.
- Baird, C.** 2001. *Química Ambiental*, Ed. Reverté, p. 567, Barcelona, España.
- Box, G., Hunter, W., Hunter, J.** 1999. *Estadística para investigadores*, Ed. Reverté, Distrito Federal, México.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M.** 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569 – 3580.
- Cañipa, A., Durán, M., Escobedo, G., García, R.** 1994. *Aprovechamiento integral de cefalotórax de camarón*. Serie “Tecnologías más limpias”. Vol. 3, UNAM, PIQAyQA. ISBN 968-36-4104-0. México D. F., México.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- EPA.** 2004. U. S. Environmental Protection Agency (en línea). Chitin: Biopesticide fact sheet,
http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_128991.htm
última actualización abril 13 de 2004 (citado el 26 de abril de 2004).
- Euchis.** 2002. European chitin society (en línea). Chitin,
<http://www.euchis.org/sites/chitin/chitine.html> última actualización septiembre 10 de 2002
(citado el 26 de abril de 2004).
- FAO.** 1999. *Anuario*. Estadísticas de pesca: Capturas, Vol. 88/1 y Producción de acuicultura, Vol. 88/2. Roma, Italia.
- Gerhartz, W.** (Editor). 1986. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 5a ed. Vol. A6, VCH, p. 231, Weinheim, República Federal de Alemania.
- Guang Jin Choi,** 2001. Production of chitosan from crabshells using microwave. *Clean Technology*, 7(4), 281 – 290.
- Hall, N.** (Editor). 2000. *The new chemistry*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Khor, E., Muhammad, N., Lee Yong Lim.** 2003. Method of preparing chitin films. Patente No. US2003/0091851, EEUUA.
- Kifune, K., Tanae, H., Yamaguchi, Y., Motosugi, K.** 1986. Porous chitin shaped article and production thereof. Patente No. US4575519, EEUUA.
- Lide, D.** (Editor). 1994. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 74a ed. CRC Press, Florida, EEUUA.
- Manahan, S.** 1999. *Industrial Ecology: Environmental chemistry and hazardous waste*. Lewis Publishers, p. 23, Nueva York, EEUUA.
- Mitsunori, I., Toshihisa, K.** 1995. Preparation of chitin sponge, chitin paper, and chitin film. Patente No. JP 7316202, Japón.
- Muzzarelli, R.** 1977. *Chitin*. Pergamon Press, Londres, Reino Unido.
- Muzzarelli, R., Peter, M.** (Editores). 1997. *Chitin Handbook*, European Chitin Society, Atec, pp. 114 – 116, Grottoammare, Italia.
- Nishiyama, M., Hosokawa, J., Yoshihara, K., Kubo, T., Kansoka, K., Kondo, K., Maruyama, S., Tateishi, K., Ueda, A.** 1994. Biodegradable composition and shaped article obtained therefrom. Patente No. US5306550, EEUUA.

- NMX-F-030-1985. Norma Mexicana. Alimentos - Aceite comestible puro de maíz, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, México, D.F. México.
- Percot, A., Viton, Ch., Domard, A.** 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells, *Biomacromolecules*, 4, 12-18.
- Prentice, C., Costa, P., Fontana, A.** 2003. *Protein isolate from exoskeleton matrix of Brazilian pink shrimp (farfantepenaeus paulensis): Extraction and characterization*. Proceedings of the First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference, The Icelandic Fisheries Laboratories, p. 369, Reykjavik, Islandia.
- Ravi Kumar, M.N.V.** 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Reeves, W., Li-Fu Chen.** 2003. Regenerated carbohydrate foam composition, Patente No. US2003/0143388, EEUUA.
- Rosenberg, I.** 1996. *Protein Analysis and Purification*, Benchtop Techniques, Birkhäuser, p. 141, Boston, EEUUA.
- Scopes, R.** 1994. *Protein purification*. 3a ed. Springer, pp. 40 - 41, Nueva York, EEUUA.
- Singer, N., Wooten, J.** 2003. Method of extracting chitin from the shells of exoskeletal animals. Patente No. US20030060610, EEUUA.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S.** 1994. *Gestión integral de residuos sólidos*. Vol. II, McGraw Hill, p. 825. Madrid, España.
- Tobey, J., Clay, J., Vergne, P.** 1998. *Impactos económicos, ambientales y sociales del cultivo de camarón en Latinoamérica*. Centro de Recursos Costeros, Universidad de Rhode Island, Reporte de manejo costero # 2202 (junio), p. 8. EEUUA.
- Toma, R., Meyers, S.** 1975. Isolation and chemical evaluation of protein from shrimp canery effluent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 632-635.