



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

*Obtención de Quitina y Quitosano a partir
de desperdicio de camarón por medio de
desproteínización enzimática*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MAYRÉN GUTIÉRREZ ALFONSO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI
MATSUMOTO

ASESOR DE TESIS

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD

MÉXICO D.F., A 27 DE FEBRERO DE 2013



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. de Proyecto PICSA 11-69).

El H. Jurado designado por la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza aprobó la idónea comunicación de resultados que presentó:

C. Alfonso Mayrén Gutiérrez

El día 27 de febrero de 2013.

Presidente:

Maestro Víctor A. Corvera Pillado _____
Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

***Vocal:**

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto _____
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología.

Secretario:

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad _____
Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Suplente:

Q.F.B. Graciela Rojas Vázquez _____
Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Suplente:

M. en C. Elizabeth Guadalupe Sánchez González _____
Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Agradecimientos

A nuestra Universidad Nacional Autónoma de México por ser motor de justicia y equidad social y por la oportunidad de construir un mejor futuro.

A mi Universidad Autónoma Metropolitana por abrirme las puertas de su Casa abierta al Tiempo.

A la Benemérita Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la formación académica y personal.

A la Doctora Keiko por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la paciencia, la beca y el ejemplo de constancia.

Al Doctor Abad y la Maestra Elizabeth por las clases, la invitación al Consejo Universitario y por todo el apoyo recibido al final de éste camino.

A mis compañeros de laboratorio: Andrés, Facundo, Lupita, Alberto, Itzel, Monse, Polo, Ariana, Fabi, y Ulises de quienes he aprendido mucho, gracias. A Carmen por todo el apoyo que me brindó a lo largo de este proyecto. A Zay.

A los constantes: Luis Ángel, Misael, Juan Carlos, Lalo, Monse, Diana y Gerardo. A los recién adquiridos: Rugerio y Ramón. Al buen Alejandro por sembrar en mí la semilla del saber. A la familia Ortega Huerta por abrirme las puertas de su hogar y hacerme sentir siempre como en casa. A Martha y Don Rafa por el apoyo.

A toda mi familia por creer siempre en mi tanto como yo creo en ustedes, en especial a mi abuela la Señora Celia Correa Villafuerte pues sin su apoyo económico pero sobre todo moral, la realización de este proyecto hubiera resultado poco menos que imposible.

A mis hermanos: Beto, Paty, Alessandro, Katy, Raquelita, Manuel, Paola y Andrea. En especial a Daniel por ser símbolo de fortaleza y perseverancia, cuando sea grande quiero ser como tú.

A la Música por poner mis alas en el cielo y a la Química por poner mis pies sobre la tierra.

A Alfonso porque la necesidad parió contigo, a papá por estar presente desde ese lejos que se siente tan cerca y a mamá por serlo todo.

Dedicatorias

A la persona que más quiero y admiro. Gracias Ma por creer siempre en mí aún cuando he caído, por ser la mejor administradora, licenciada, doctora, enfermera y psicóloga, por abrazarme en los días difíciles y hacerme ver que nada es imposible.

Gracias por tu fortaleza, tu paciencia, sensibilidad y sabiduría. Siempre has estado ahí para mí y sabes que siempre estaré ahí para ti.

Gracias porque fuimos, somos y seremos siempre uno.

Gracias por abrir mis alas y soplar.

Gracias por vivir en mí. Te quiero.

Índice

1. Introducción.....	14
2. Marco teórico	
2.1 El camarón.....	15
2.2 Producción nacional de camarón.....	15
2.3 Desperdicio de camarón.....	16
2.4 Quitina.....	17
2.5 Quitosano.....	17
2.6 Tipos de proteína presentes en el camarón.....	18
2.7 Fuentes de obtención.....	18
2.8 Aplicaciones de la Quitina y el Quitosano.....	19
2.8.1 Medicina.....	19
2.8.2 Ingeniería de tejidos.....	19
2.8.3 Farmacéutica.....	19
2.8.4 Alimentos.....	20
2.8.5 Cosmética.....	20
2.8.6 Agricultura.....	21
2.8.7 Tratamiento de aguas.....	21
2.9 Métodos de obtención de quitina.....	21
2.9.1 Desproteínización.....	21
2.9.2 Desmineralización.....	24
2.9.3 Despigmentación.....	25
2.10 Métodos enzimáticos para la obtención de quitina.....	25
2.11 Método de obtención de quitosano.....	27

3. Justificación.....	28
4. Objetivos.....	30
5. Hipótesis.....	31
6. Materiales y métodos.....	32
6.1 Desperdicio de camarón.....	32
6.2 Enzimas proteolíticas comerciales.....	32
6.3 Soluciones para la remoción de proteína soluble y soluciones amortiguadoras para la desproteización enzimática.....	33
6.4 Obtención de Quitina.....	34
6.4.1 Remoción de proteína soluble (sarcoplásmica).....	34
6.4.2 Remoción de proteína soluble (miofibrilar).....	34
6.4.3 Remoción de proteína estromal.....	35
6.5 Desmineralización.....	35
6.6 Desproteización enzimática.....	35
6.6.1 Determinación de enzima con mayor porcentaje de desproteización.....	36
6.6.2 Determinación de pH óptimo de desproteización enzimática.....	36
6.6.3 Determinación de la temperatura óptima de desproteización enzimática.....	37
6.6.4 Determinación de concentración de enzima en la desproteización enzimática.....	38
6.6.5 Cinética de desproteización enzimática con las condiciones óptimas experimentales.....	39
6.7 Obtención de Quitosano.....	41

7. Análisis de muestras	
7.1 Determinación de contenido de humedad.....	42
7.2 Determinación de contenido de cenizas.....	42
7.3 Determinación de contenido de grasa.....	42
7.4 Determinación de contenido de nitrógeno total y proteína residual.....	43
7.5 Determinación de proteína soluble.....	43
7.6 Determinación de contenido de solubles de Quitina.....	43
7.7 Determinación de contenido de solubles de Quitosano.....	44
7.8 Determinación del grado de acetilación (DA).....	44
7.9 Determinación de peso molecular por viscosimetría [η].....	44
7.10 Espectrofotometría infrarroja (FTIR - ATR).....	45
7.11 Resonancia Magnética Nuclear para Quitosano (RMN ¹ H).....	45
7.12 Análisis estadístico.....	45
8. Resultados y discusión.....	46
8.1 Caracterización del desperdicio de camarón.....	46
8.2 Cinética de desproteínización con Protamex® sobre desperdicio de camarón.....	47
8.3 Protocolo de remoción de proteína soluble.....	48
8.4 Desmineralización.....	50
8.5 Cinética de desproteínización empleando Protamex®.....	52
8.6 Determinación de enzima con mayor porcentaje de desproteínización.....	53
8.7 Determinación de pH óptimo para la desproteínización enzimática con Deterzyme® L – 660.....	54
8.8 Determinación de temperatura óptima de desproteínización enzimática con Deterzyme® L – 660.....	55
8.9 Determinación de la concentración de enzima – sustrato para la desproteínización enzimática sobre el sustrato ABDM con Deterzyme® L – 660.....	56

8.10 Cinética de desproteínización sobre ABDM con Deterzyme® L – 660.....	57
8.11 Disminución de proteína y cenizas a lo largo del proceso de obtención de Quitina.....	58
8.12 Rendimientos en la obtención de Quitina, Quitosano, porcentajes de desproteínización y desmineralización.....	59
8.13 Caracterización de Quitina.....	61
8.14 Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR de Quitina.....	62
8.15 Caracterización de Quitosano.....	63
8.16 Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR Quitosano.....	64
8.17 Resonancia Magnética Nuclear para Quitosano.....	65
9. Conclusiones.....	66
10. Perspectivas.....	67
11. Referencias.....	68
12. Anexos.....	72
12.1 Curva patrón de Seroalbúmina bovina realizada por el método de Lowry-Peterson.....	72

III. Lista de Tablas

Tabla 1. Condiciones empleadas en la desproteización en el proceso de obtención de quitina.....	23
Tabla 2. Condiciones empleadas en la etapa de desmineralización para la obtención de quitina.....	24
Tabla 3. Reportes sobre desproteización enzimática sobre desperdicio de camarón.....	26
Tabla 4. Características de los métodos termoquímico y enzimático en la obtención de quitina.....	27
Tabla 5. Condiciones óptimas de empleo de las enzimas comerciales estudiadas reportadas por el fabricante.....	33
Tabla 6. Soluciones para la remoción de proteína soluble y soluciones amortiguadoras para la desproteización enzimática.....	34
Tabla 7. Diseño experimental para la determinación de pH óptimo de desproteización enzimática con Deterzyme® L – 660.....	36
Tabla 8. Diseño experimental del ensayo para la determinación de la temperatura óptima de desproteización enzimática.....	38
Tabla 9. Diseño experimental del ensayo para la determinación de la concentración enzima - sustrato óptima en la desproteización enzimática.....	39
Tabla 10. Diseño experimental para la cinética de desproteización enzimática con Deterzyme® L – 660 a pH de reacción 7.5, 40 °C de temperatura y concentración de enzima – sustrato 0.5%.....	40
Tabla 11. Caracterización del desperdicio de camarón.....	46
Tabla 12. Desmineralización del sustrato (AB).....	51
Tabla 13. Desmineralización sobre (AB) variando la temperatura.....	51
Tabla 14. Rendimientos en la obtención de Quitina, porcentaje de desmineralización, porcentajes de desproteización enzimático, global y rendimiento de Quitosano..	60
Tabla 15. Caracterización de la Quitina obtenida enzimáticamente.....	62
Tabla 16. Caracterización del Quitosano obtenido por el método heterogéneo.....	63

IV. Lista de figuras

Figura 1. Producción nacional de camarón.....	16
Figura 2. Estructura de la Quitina.....	17
Figura 3. Estructura del Quitosano.....	18
Figura 4. Proceso termoquímico para obtención de quitina y quitosano a partir de desperdicios de crustáceos.....	22
Figura 5. Proceso de obtención de quitosano a través del método de desacetilación heterogénea.....	27
Figura 6. Proceso de obtención de Quitina.....	41
Figura 7. Cinética de desproteización empleando Protamex® a concentración de 0.1% sobre desperdicio de camarón.....	48
Figura 8. Proteína Removida del desperdicio de camarón con soluciones iónicas e Hidróxido de Sodio.....	50
Figura 9. Cinética de desproteización enzimática con Protamex ® 0.1% sobre sustrato desproteizado con NaOH 0.1 M	52
Figura 10. Evaluación de las proteasas comerciales en el contenido de proteína del sustrato ABDM.....	53
Figura 11. Efecto del pH en la desproteización enzimática del sustrato ABDM empleando Deterzyme a 1.2%.....	54
Figura 12. Efecto de la temperatura en la desproteización enzimática del sustrato ABDM empleando Deterzyme a 1.2%.....	55
Figura 13. Efecto de la concentración de enzima en la desproteización enzimática del sustrato ABDM empleando Deterzyme® L – 660.....	56
Figura 14. Cinética de desproteización (en proteína residual del sólido) sobre el sustrato ABDM empleando Deterzyme a pH 7.5, temperatura 40 °C y concentración de enzima - sustrato 0.5%.....	57

Figura 15. Cinética de desproteinización (en proteína soluble) sobre el sustrato ABDM empleando Deterzyme a pH 7.5, temperatura 40°C y concentración de enzima – sustrato 0.5%.....	58
Figura 16. Disminución de proteína y cenizas a lo largo del proceso de obtención de Quitina.....	59
Figura 17. Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR de Quitina.....	63
Figura 18. Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR del Quitosano.....	64
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H del Quitosano.....	65

1. Introducción

El desperdicio de camarón está constituido por compuestos de alto valor agregado como quitina, proteínas, pigmentos y minerales. La quitina es obtenida por métodos químicos y biológicos en etapas de desmineralización (DM) y desproteínización (DP) en las que se emplean altas concentraciones de ácidos y bases. La cantidad de proteína residual en la quitina es importante debido a que puede causar reacciones alérgicas. En el presente trabajo se evaluó la desproteínización del desperdicio de camarón con enzimas comerciales (proteasas). El desperdicio fue previamente tratado con solución amortiguadora de fosfatos y solución de cloruro de potasio para remover la proteína sarcoplásmica y miofibrilar, posteriormente se desmineralizó con solución de ácido clorhídrico. Durante el tratamiento de remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar se obtuvo un 82% de desproteínización. El efecto de las enzimas comerciales Protamex (Novozymes), Proteinase N (Sigma), HT Proteolytic y Deterzyme (Enmex) sobre este sustrato fue evaluado en las condiciones óptimas reportadas por el fabricante. Deterzyme fue la enzima que presentó un mayor DP sobre el sustrato. Con base en este resultado, Deterzyme fue seleccionada para la evaluación del efecto de la temperatura, el pH y la concentración de enzima. El DP más alto fue determinado a 40 °C, pH 7.5 y 0.5% de enzima. Las condiciones seleccionadas fueron empleadas en un estudio de cinética con Deterzyme obteniendo 96.38% de desproteínización global. El presente trabajo concluye que el proceso enzimático empleando Deterzyme promueve la hidrólisis protéica en el desperdicio de camarón.

2. Marco teórico

2.1 El camarón

El camarón (*Litopenaeus monodon*, *Pandalus borealis*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylostris*, *Litopenaeus setiferus*, *Xiphopenaeus kroyeri*, etc) es un crustáceo del orden de los decápodos, vive tanto en aguas dulces como saladas, así como en regiones templadas, tropicales, frías y gélidas. Estos animales suelen ser transparentes, de color rosado o castaño. Son omnívoros que ingieren materia orgánica derivada de cadáveres y plantas en descomposición, aprovechando la proteína proveniente de los artrópodos y las bacterias que colonizan las hojas. Se alimentan de peces, organismos del fondo y de la epifauna (organismos que viven en la superficie) entre los que destacan invertebrados pequeños e inclusive otros camarones, estos últimos bajo condiciones de alta densidad o cuando se encuentran heridos o mudando a lo que se unen los arrastres del litoral y la materia orgánica¹.

El camarón es uno de los productos marinos más populares y forma parte de la alimentación tradicional de muchas naciones. Es un producto rico en proteína, calcio y varios compuestos extraíbles, ha sido empleado como un importante ingrediente en diversos platillos, esto debido a su importante aporte de proteínas y minerales al cuerpo humano mientras que es bajo en calorías y grasa².

2.2 Producción nacional de camarón

En la Figura 1 se muestra la producción nacional de camarón de los últimos años, con una participación en volumen de 149 000 toneladas, equivalente al 6.46% de la producción total pesquera³; anualmente en México se producen 36 mil toneladas de camarón de alta mar (19%), 22 mil toneladas de la pesca ribereña (12%) y 129 mil toneladas de la acuicultura (69%)⁴.

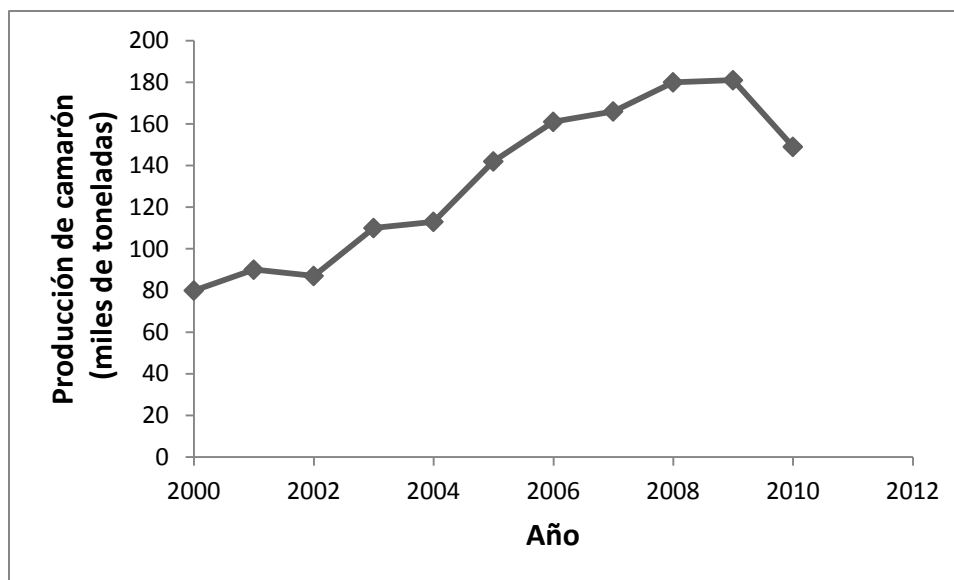


Figura 1. Producción nacional de camarón³

En la Figura 1 se muestra el incremento que ha presentado en los últimos años la producción nacional de camarón, con lo que ha aumentado la cantidad de desperdicios pesqueros ya que la principal fuente de exoesqueletos proviene de los desechos de la industria camaronera, los cuales representan millones de toneladas de basura a nivel mundial⁵.

2.3 Desperdicio de camarón

En las últimas décadas la producción de camarón ha incrementado en pesca ribereña y acuicultura en 30% y 80% respectivamente. La cantidad de desecho generado puede llegar hasta el 65% del peso inicial del camarón constituyendo un problema medioambiental⁶.

El desperdicio de camarón es rico en proteína, pigmentos, lípidos y quitina, productos que pueden ser recuperados⁷ y debido a la dificultad para remover las proteínas asociadas a la quitina (proteínas estromales) distintos autores han reportado

metodologías con el empleo de tratamientos enzimáticos, siendo la enzima comercial Alcalasa una de las más estudiadas.

2.4 Quitina y quitosano

La quitina y el quitosano son polisacáridos estructurales que se encuentran presentes en numerosos organismos⁸. La quitina se produce en una amplia gama de organismos (como hongos e insectos), pero es particularmente importante como constituyente de artrópodos⁹. La quitina es un polisacárido de *N*-acetil glucosamina unido por enlaces β (1-4) (Figura 2), se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y después de la celulosa es el polímero natural más abundante. Las ventajas del uso de la quitina y su derivado el quitosano se deben a que son polímeros naturales, no tóxicos y biodegradables¹⁰.

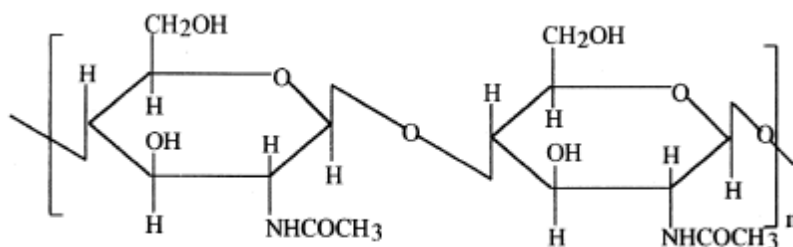


Figura 2. Estructura de la Quitina¹¹

2.5 Quitosano

El quitosano (Figura 3) es un polisacárido constituido por unidades *D*-glucosamina unido por enlaces β (1-4) y se obtiene por desacetilación de quitina con altas concentraciones de álcali y altas temperaturas; frecuentemente se comercializa en forma de polvo u hojuelas¹². La quitina es extremadamente insoluble en disolventes comunes mientras que el quitosano es soluble en soluciones ácidas diluidas llegando a ser un material mucho más maleable, con una amplia variedad de aplicaciones en

alimentos, medicamentos, productos farmacéuticos, tratamiento de aguas residuales, así como en las industrias textil y cosmética^{13, 14}.

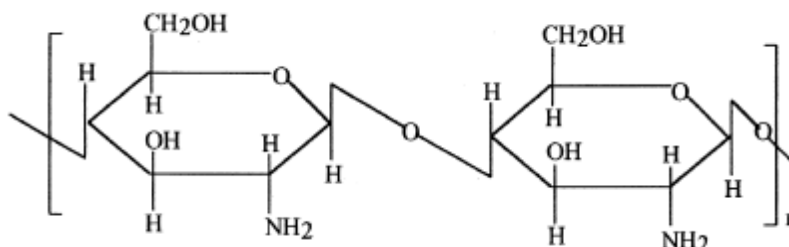


Figura 3. Estructura del Quitosano¹¹

2.6 Tipos de proteína presentes en el camarón

La proteína del músculo de camarón puede ser dividida en tres grupos: sarcoplásmica (localizada en la región intersticial entre las fibras individuales del músculo), miofibrilar (mayormente encontrada en la fibra muscular) y estromal (asociada a tejido conectivo)¹⁵.

Las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares son solubles en soluciones iónicas mientras que las estromales son solubles en soluciones de hidróxido de sodio, siendo estas últimas las más difíciles de remover aún con varios ciclos de álcali obteniendo quitina con proteína residual.

2.7 Fuentes de obtención

Actualmente, la quitina y el quitosano obtenidos a partir de distintas fuentes animales se encuentran disponibles comercialmente. Los caparazones de cangrejos, camarones, langostinos y langostas procedentes de las máquinas de pelar en las fábricas de conservas se utilizan para la preparación industrial de quitina⁸. La principal fuente de quitina son exoesqueletos de crustáceos; particularmente los exoesqueletos de camarón contienen una alta concentración de quitina, de la cual es posible obtener quitosano a través de un proceso químico de *N* desacetilación⁵.

2.8 Aplicaciones de la Quitina y el Quitosano

2.8.1 Medicina: Propiedades importantes del quitosano, como su biocompatibilidad, ausencia de toxicidad, capacidad para absorber líquidos, formación de películas y unión selectiva a ciertos lípidos como el colesterol, le han permitido tener grandes aplicaciones en el área de la medicina. Presenta características como cicatrizante, hemostático, antiolesterolémico y formador de sistemas para la liberación controlada de fármacos¹⁶.

2.8.2 Ingeniería de tejidos: Las personas que han sufrido pérdidas extensas de piel, generalmente en incendios, se encuentran en peligro de sucumbir a la infección o la pérdida severa de líquidos. Los pacientes a menudo deben hacer frente a los problemas de rehabilitación derivados de profundas cicatrices deformantes y contracturas incapacitantes. Se ha estudiado el efecto del tratamiento con quitosano y solución salina en la curación de las heridas y la fibroplasia realizada por inserciones de bisturí en la piel y del tejido subcutáneo en la superficie abdominal de perros. También se ha empleado en el diseño de piel artificial de uso crónico aplicable a largo plazo, centrándose en una membrana no antigénica, que actúa como una plantilla para la síntesis biodegradable de tejido neodérmico. El quitosano, con características estructurales similares a la glucosamina, es considerado para el desarrollo de sustrato para reemplazar la piel¹¹.

2.8.3 Farmacéutica: El quitosano es un polímero natural, candidato ideal para formulaciones de liberación controlada de fármacos¹¹. Fármacos covalentemente unidos a polímeros biodegradables o dispersos en una matriz polimérica de macromoléculas pueden ser liberados por la degradación/erosión del polímero. Moléculas terapéuticas y complejos formados por polímeros también pueden ser liberados a partir de geles por difusión. El quitosano no es tóxico y es fácilmente bioabsorbible y tiene la capacidad de formar geles a bajos niveles de pH. Por otra

parte, el quitosano tiene actividad antiácida y antiulcerosa, esto impide o debilita la irritación en el estómago provocada por fármacos.

Formulaciones con quitosano como matriz parecen flotar y gradualmente se hinchan en un medio ácido.

2.8.4 Alimentos: Gran parte del empleo de la quitina, el quitosano y sus derivados, proviene de la actividad antimicrobiana que presentan y se emplean de diversas formas; la quitina ha sido estudiada como agente antimicrobiano en productos agrícolas y productos alimenticios; la quitina y el quitosano han sido estudiados para la clarificación y la desacidificación de los jugos de frutas (agente clarificante), para la recuperación de materiales sólidos a partir de desechos de procesamiento de alimentos y el agua, en la coagulación y floculación de sustancias en las aguas residuales de procesamiento de alimentos. El quitosano se ha aplicado para la recuperación de la proteína y la grasa de suero de queso y por sus propiedades antioxidantes, se ha empleado como aditivo en distintos tipos de alimentos.

En los inicios del año 1983, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el quitosano como aditivo para aplicaciones en los alimentos y la preparación de oligómeros de quitina y quitosano para la salud humana¹⁷.

2.8.5 Cosmética: Usualmente los ácidos orgánicos son empleados como disolventes en aplicaciones cosméticas. El quitosano es catiónico y llega a ser viscoso al ser neutralizado con ácido, esto facilita su interacción con agentes comunes de la piel y el cabello. La quitina y el quitosano son fungistáticos y fungicidas naturales. El quitosano es biológicamente compatible con componentes biológicos activos incorporados en la composición de productos cosméticos. Composiciones de quitosano o quitosano-alginato en el intervalo de 1-10 μm pueden formar microcápsulas que pueden almacenar compuestos hidrofóbicos encontrados ampliamente en aplicaciones cosméticas. La quitina, el quitosano y sus derivados pueden ser empleados en áreas

de la industria cosmética tales como cuidado de la piel, cuidado del cabello y cuidado bucal¹⁸.

2.8.6 Agricultura: La quitina y el quitosano son efectivos en el control de enfermedades y plagas vegetales. Sus mecanismos de acción están vinculados a su estructura química. Pueden actuar sobre el microorganismo patógeno o inducir mecanismos defensivos en las plantas contra varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha. La adición de quitina y sus derivados al suelo favorece el crecimiento y la actividad de muchos microorganismos quitinolíticos por un efecto sinérgico. Estos constituyen controles biológicos al ser enemigos naturales de muchos agentes causales de enfermedades y plagas vegetales¹⁹.

2.8.7 Tratamiento de aguas: Entre los principales usos de la quitina y el quitosano en esta área se encuentran: coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites. Captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas²⁰.

A pesar de las potenciales aplicaciones de la quitina y el quitosano en distintos campos como la ingeniería de tejidos, aún en procesos de obtención con varios ciclos de álcali suelen obtenerse biopolímeros con proteína residual, por lo que el empleo de estos materiales se encuentra restringido en distintos países debido a posibles reacciones alérgicas.

2.9 Métodos de obtención de quitina

La producción industrial de quitina a partir de desperdicio de camarón está basada en tratamientos químicos sucesivos con altas concentraciones de álcali y soluciones ácidas, esto involucra un alto consumo de energía, generación de productos corrosivos y el empleo de grandes volúmenes de agua⁶ además se suele dañar la estructura del polímero.

El proceso tradicional de obtención de quitina se puede dividir en dos etapas fundamentales: la desproteínización y la desmineralización. Éstas se pueden llevar a cabo en el orden que se desee, sin embargo cuando se requiere obtener la proteína se recomienda iniciar con la desproteínización; en algunas ocasiones se realiza una etapa de despigmentación con la finalidad de obtener quitina de color blanco y se pueden recuperar componentes como las astaxantinas. En la Figura 4 se muestra el proceso general de obtención de quitina y quitosano a partir de desperdicios de crustáceos.

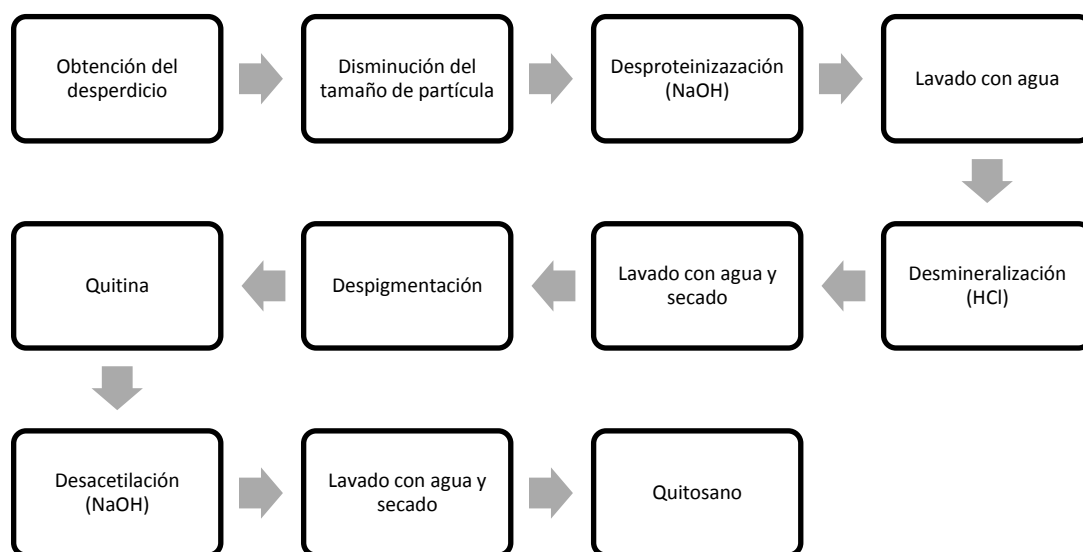


Figura 4. Proceso termoquímico para obtención de quitina y quitosano a partir de desperdicios de crustáceos⁸

2.9.1 Desproteínización

Como se indica en la Figura 5 una de las principales etapas en el proceso de obtención de quitina es la desproteínización. En la Tabla 1 se muestran las variantes que se pueden encontrar en esta etapa, donde la constante es el empleo de grandes cantidades de álcali y altas temperaturas lo que conlleva un alto consumo de agua para neutralizar.

Tabla 1. Condiciones empleadas en la desproteización en el proceso de obtención de quitina²⁰

<i>Fuente</i>	<i>Álcali</i>	<i>Concentración (N)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (h)</i>	<i>Relación (p:v)</i>
Langosta	NaOH	0.25	100	12x5	1:5.5
		1.25	80-85	0.5x2	-
		2.5	100	72 ^a	-
		2.5	20 a 25	2.5	1:50
Krill	NaOH	0.75	95	2	1:10
	NaOH	0.88	25		-
	KOH	0.63	90-95	-	1:10
Camarón	NaOH	0.125	100	0.5	2:3
		0.25	65	1	1:10
		0.75	100	1	-
		1	100	1	-
		1.25	100	0.5	1:1
	1.25	Reflujo	2	1:15-20	
KOH	0.18	90	2	1:20	
Cangrejo	NaOH	1.0	80	3x2	-
		1.0	50	6	-
		1.25	90	2	-
	KOH	0.36	90	2	1:20
Calamar	NaOH	1.0	100	10-12	-
		2.0	20 a 25°C	Toda la noche	1:10
		2.0	100	4 ^{**}	1:10

* Tiempo de repetición del tratamiento alcalino; ** Segunda extracción; ^a Solución fresca de NaOH fue usada para remojar cada día.

2.9.2 Desmineralización

La siguiente etapa en el proceso de obtención de quitina es la desmineralización. En la Tabla 2 se muestran las variantes que se pueden encontrar en esta etapa donde resalta el empleo de grandes cantidades de ácido por lo que nuevamente hay un gasto importante de agua para neutralizar.

Tabla 2. Condiciones empleadas en la etapa de desmineralización para la obtención de quitina²⁰

<i>Fuente</i>	<i>Concentración de HCl (N)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (h)</i>	<i>Relación (p/v)</i>
Langosta	1.4	70	2x2*	-
	2	20 a 25	5	1:9
	2	0	48	1:5.5
	10	-20	4	-
	90% (fórmico)	20 a 25	18	1:10
Krill	0.6	20 a 25	2	1:22
	1	20	1.5	1:4
	6	20 a 25	2	1:10
Camarón	0.5	20 a 25	-	1:11
	0.5	20	1	1:10
	1.0	20 a 25	0.5	3x***
	1.4	20 a 25	-	-
	2.2	30	8	1:10
Cangrejo	0.7	20	1	1:10
	1	20 a 25	12x2	-
	1	20	3	-
	1.4	20 a 25	24	-
Calamar	1	20 a 25	Toda la noche	1:10
	2	10	12	exceso

* Tiempo de repetición del tratamiento. ** Segunda extracción. *** Tres veces exceso para la cantidad estequiométrica de carbonato de calcio en las cáscaras secas.

2.9.3 Despigmntación

De manera opcional se puede llevar a cabo una etapa de despigmntación donde generalmente se emplean disolventes orgánicos como la acetona y el metanol con la finalidad de obtener un material blanquecino²⁰.

2.10 Métodos enzimáticos para la obtención de quitina

Distintos autores han reportado metodologías para remover la proteína sarcoplásmica y miofibrilar con soluciones: se ha contribuido a la reacción enzimática con Tritón x-100 (0.01 g/Kg) y sulfito de sodio a 200 mM/L incrementando la extracción de proteína de 45.1 a 65.1% de desecho de camarón (*P. semisulcatus*)²¹; sin el empleo de un protocolo de remoción de proteína soluble se obtuvo un porcentaje de proteína residual de 9.06%, removiendo 65% de proteína en desecho de camarón (*Xiphopenaeus kroyeri*)²² también con la enzima comercial Alcalasa, este porcentaje proteico es alto por lo que no resulta un método viable para la obtención de quitina.

Aún empleando soluciones alcalinas de Hidróxido de Sodio se llegan a obtener porcentajes de proteína residual de 2 a 2.5%; se han obtenido desproteinizaciones enzimáticas de 72.5% con la enzima comercial Alcalasa²³.

En la Tabla 3, se muestra el trabajo de distintos autores que emplearon enzimas comerciales para la remoción de proteína sobre desperdicio de camarón, algunos aplicaron tratamientos previos para disminuir la cantidad de proteína sarcoplásmica y miofibrilar, facilitando el acceso de la enzima a la proteína estromal, la más difícil de remover ya que se encuentra unida de manera covalente a la quitina.

Tabla 3. Reportes sobre desproteínización enzimática sobre desperdicio de camarón

<i>Sustrato</i>	<i>Tratamiento previo</i>	<i>Enzima</i>	<i>Concentración de enzima (%)</i>	<i>PD (%)</i>	<i>Referencia</i>
Desperdicio de camarón	Enjuague con Tritón x-100	Alcalasa	3.0	65.0	21
Desperdicio de camarón	ST	Alcalasa	3.0	65.1	14
Desperdicio de camarón	Enjuague con agua corriente	Protamex	0.1	36.6	24
Desperdicio de camarón	ST	Alcalasa	0.5	61.0	23
Desperdicio de camarón	ST	Alcalasa	1.8	33.1	25

ST: Sin tratamiento previo.

El empleo de métodos enzimáticos presenta grandes ventajas en comparación con el método termoquímico. En la Tabla 4 se muestran las características de ambos métodos, destacando la disminución de consumo energético y el consumo de agua.

Tabla 4. Características de los métodos termoquímico y enzimático en la obtención de quitina²⁴

<i>Característica</i>	<i>Método Termoquímico</i>	<i>Método Enzimático</i>
Costo	Elevado	Bajo
Reactivos empleados	Gran cantidad de ácido y álcali	Enzimas comerciales
Consumo energético	Alto	Bajo
Daño a la estructura polimérica	Considerable	Bajo
Consumo de agua	Alto	Bajo (en comparación con el método termoquímico)
Trato al medio ambiente	Agresivo	Amigable

2.11 Método de obtención de quitosano

El quitosano se obtiene por medio de *N*-desacetilación de quitina; en la Figura 5 se muestra el proceso general de obtención de quitosano, principal derivado de la quitina. En el proceso de desacetilación suelen emplearse concentraciones de Hidróxido de Sodio de hasta 65%²⁶ lo que involucra un importante consumo de agua para la neutralización del material.

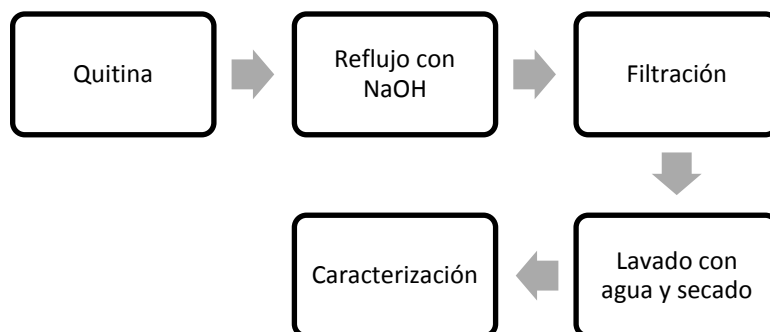


Figura 5. Proceso de obtención de quitosano a través del método de desacetilación heterogénea

3. Justificación

En décadas recientes se ha incrementado el interés por el desarrollo de nuevos procesos en los que se reutilice el material de desecho generado por la industria pesquera con la potencial comercialización de productos de valor agregado²⁷.

Los residuos de camarón provenientes de la limpieza del mismo suelen ser desechados, ocasionando un problema medioambiental; se ha estimado que esta industria puede generar hasta 60 mil toneladas de desechos²⁸.

La industrialización del camarón provoca grandes cantidades de residuos, calculándose que constituyen cerca del 45% del camarón capturado y debido a su fácil degradación son considerados una fuente potencial de contaminación²⁹; actualmente solo el 5% del desperdicio de camarón es empleado en algún proceso, mayoritariamente en alimentación animal, el resto es desechado¹.

El desperdicio de camarón ha sido empleado para la obtención de quitina, tradicionalmente por medio de un método termoquímico, el cual resulta costoso, dañino para el medio ambiente y agresivo con la estructura del polímero; distintos autores han reportado la viabilidad de los métodos enzimáticos para la desproteínización del desecho de camarón.

En los últimos años, ciertas enzimas proteolíticas tales como Alcalasa, Quimotripsina y Papaína se han utilizado en la separación de proteínas y quitina de los residuos de camarón y por lo tanto ha sido posible obtener hidrolizado de proteínas y también quitina con deseables propiedades físico-químicas y con bajas cantidades de contaminantes químicos²¹.

El método tradicional para la obtención de quitina a partir de desperdicio de camarón se puede dividir en dos etapas fundamentales: la desmineralización y la desproteínización, siendo ésta última la más compleja pues suelen permanecer restos de proteína en la quitina obtenida.

Las características del quitosano dependen en gran medida no solo de la fuente, sino también del método de obtención. Los requerimientos de desacetilación y peso molecular (M_v) del quitosano pueden variar en función de la aplicación deseada, un ejemplo es su actividad antimicrobiana, la cual está en función del número de grupos amino disponibles²⁶.

Debido a la dificultad de remover totalmente la proteína estromal de la quitina y al empleo de sustancias contaminantes en el método tradicional de obtención, se propone desarrollar un método enzimático coadyuvado por un protocolo de remoción de proteína soluble para llevar a cabo la desproteínización del desecho de camarón para la obtención de quitina y quitosano.

La obtención de quitina y quitosano libres de proteína a través de procesos amigables con los materiales resulta fundamental para conseguir su libre empleo en distintos países en áreas como alimentos, medicamentos, productos farmacéuticos y cosméticos pues al ser un recurso biológico no tóxico, presenta potenciales aplicaciones en el desarrollo de productos de uso cotidiano.

4. Objetivos

Objetivo General

- Establecer condiciones de desproteínización enzimática de desperdicio de camarón con enzimas comerciales para la obtención de quitina y su desacetilación a quitosano.

Objetivos particulares

- Establecer un protocolo de remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar de desperdicio de camarón.
- Seleccionar la enzima comercial que produzca el mayor porcentaje de desproteínización.
- Obtener y caracterizar quitina mediante un método enzimático.
- Obtener y caracterizar quitosano.

5. Hipótesis

Aplicando un protocolo de remoción de proteína soluble y el empleo de enzimas comerciales será posible obtener quitina (y posteriormente quitosano) a partir de desperdicios de camarón.

6. Materiales y métodos

6.1 Desperdicio de camarón

El desperdicio de camarón grande (principalmente cabezas y exoesqueletos) fue obtenido por acopio de distintos géneros y especies (*Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylostris*, *Litopenaeus setiferus*, etc), en el mercado de pescados y mariscos “La Nueva Viga” México, D.F. El desperdicio se molió en un molino de carne (Torrey 32-3, México) a un tamaño de partícula de 0.3 cm y se congeló (-20 °C) para su posterior tratamiento. El desperdicio fue descongelado, secado a 40 °C y molido hasta obtener polvo de desperdicio de camarón con tamaño de partícula de 0.59 µm.

6.2 Enzimas proteolíticas comerciales

- Deterzyme® L – 660. Enzima proteolítica alcalina en presentación líquida obtenida de *Bacillus licheniformis* empleada en la formulación de detergentes biológicos líquidos.
- HT Proteolitic ® 200. Enzima proteolítica neutra grado alimenticio en presentación sólida obtenida de *Bacillus subtilis variant*.
- Proteinasa N. Enzima proteolítica neutra en presentación sólida obtenida de *Bacillus subtilis*.
- Protamex ®. Mezcla de enzimas proteolíticas grado alimenticio en presentación solida obtenidas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

En la Tabla 5, se muestran las condiciones óptimas de empleo de las proteasas estudiadas.

Tabla 5. Condiciones óptimas de empleo (reportadas por el fabricante) de las enzimas estudiadas

<i>Enzima</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Origen</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
Deterzyme® L – 660	ENMEX	<i>Bacillus licheniformis</i>	7.0-10.0	Hasta 70
HT Proteolitic ® 200	ENMEX	<i>Bacillus subtilis variant</i>	5.5-9.0	40-55
Proteinasa N	Sigma Aldrich	<i>Bacillus subtilis</i>	ND	ND
Protamex ®	Novozymes	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6.0-7.5	35-45

Información reportada por el fabricante en las respectivas fichas técnicas. ND: No determinado.
 Todas las enzimas estudiadas son proteolíticas de origen bacteriano.

6.3 Soluciones para la remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar

En la Tabla 6, se muestran las distintas soluciones empleadas para la remoción de proteína soluble sarcoplásmica y miofibrilar para la desproteinización enzimática.

Tabla 6. Soluciones para la remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar

<i>Solución</i>	<i>Reactivos</i>
Buffer A	Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄ 15 mM
Buffer B	Buffer A + KCl 0.45 M
Solución de Hidróxido de Sodio	NaOH 0.1 N

Las soluciones amortiguadoras para la desproteización enzimática fueron a pH 3, 5, y 6 de citrato de sodio / K₂HPO₄ 50 mM; pH 7.5 y 8 H₃PO₄ / K₂HPO₄ 50 mM y pH 9 y 11 con NaHCO₃ / Na₂CO₃ 50 mM.

6.4 Obtención de Quitina

6.4.1 Remoción de proteína sarcoplásmica

Se mezcló el polvo de desperdicio de camarón con la primera solución iónica (buffer A) en proporción sólido-líquido 1:10 con agitación mecánica durante 10 minutos a 25 °C¹⁵; para separar las fases fue centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente se decantó. Las fracciones líquidas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis.

6.4.2 Remoción de proteína miofibrilar

Se mezcló el sustrato obtenido de la remoción de proteína sarcoplásmica con la segunda solución iónica (buffer B) en proporción sólido-líquido 1:10 con agitación mecánica durante 10 minutos a 25 °C¹⁵; para separar las fases fue centrifugado a

10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente se decantó y dejó secar a 40 °C durante 24 h. Al sólido obtenido se le denominó (AB).

Las fracciones líquidas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis.

6.4.3 Remoción de proteína estromal

Se mezcló el sustrato obtenido de la remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar con una solución de NaOH 0.1 N en proporción sólido – líquido 1:10 con agitación mecánica durante 24 horas a 25 °C¹⁵; fue centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente se decantó y el sólido fue neutralizado con agua corriente. Las fracciones líquidas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis.

6.5 Desmineralización

El sólido obtenido de la etapa de remoción de proteína (AB) fue mezclado con ácido clorhídrico 0.4 N y 1.0 N en proporción sólido-líquido 1:15 y 1:25 durante una hora con agitación mecánica a 25 °C y 100 °C. El sustrato obtenido fue neutralizado con agua corriente y se dejó secar a 40 °C durante 24 h. La fracción sólida se denominó (ABDM).

6.6 Desproteínización enzimática

Se mezcló el sustrato (ABDM) en relación 1:12 con solución amortiguadora de reacción que contenía la enzima a estudiar. Se llevó a cabo la reacción durante 8 h a las distintas condiciones de pH, temperatura y concentración de enzima. Se detuvo la reacción a 100 °C durante 10 minutos. El sólido se filtró y lavó con agua desionizada para posteriormente ser secado a 40 °C durante 24 h. Las fracciones líquidas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis.

6.6.1 Determinación de enzima con mayor porcentaje de desproteínización.

Se mezcló el sustrato (ABDM) en relación 1:12 con el buffer de reacción que ya contenía la enzima a estudiar a dos concentraciones de enzima 0.1 y 1.2% (p/v). Se permitió la reacción durante 8 h a 40 °C de temperatura.

El pH de reacción fue establecido de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Tabla 5), 6.0 para HT Proteolitic® 200 y Protamex®, mientras que para Deterzyme® L – 660 y Proteinasa N fue de 7.5. El pH de reacción fue ajustado con NaOH y HCl 0.1 N. Se detuvo la reacción a 100 °C durante 10 minutos. El sólido se filtró y lavó con agua desionizada para posteriormente ser secado a 40 °C durante 24 h.

A la par de los tratamientos se corrieron los respectivos controles.

6.6.2 Determinación de pH óptimo de desproteínización enzimática.

Se mezcló el sustrato (ABDM) en relación 1:12 con el buffer de reacción que contenía la enzima Deterzyme® L – 660 en concentración enzima de 1.2% (p/v). Se permitió la reacción durante 8 h a las distintas condiciones de pH (3, 5, 6, 7.5, 8, 9 y 11) y la temperatura se mantuvo constante a 40 °C. Se detuvo la reacción a 100 °C durante 10 minutos. El sólido se filtró y lavó con agua desionizada para posteriormente ser secado a 40 °C durante 24 h.

En la Tabla 7 se muestra el diseño experimental del ensayo descrito anteriormente.

Tabla 7. Diseño experimental para la determinación de pH óptimo de desproteínezación enzimática con Deterzyme® L – 660

<i>Enzima</i>	<i>Concentración de enzima – sustrato (%)</i>	<i>pH</i>
		3
		5
		6
Deterzyme	1.2%	7.5
® L - 660		8
		9
		11

Ensayo realizado a 40 °C durante 8 horas a 140 rpm y relación sustrato - volumen 1:12

6.6.3 Determinación de la temperatura óptima de desproteínezación enzimática.

Se mezcló el sustrato (ABDM) en relación 1:12 con el buffer de reacción que contenía la enzima Deterzyme® L – 660 a concentración de enzima 1.2% y pH de reacción 7.5. Se permitió la reacción durante 8 h a las distintas temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C). Se detuvo la reacción a 100 °C durante 10 minutos. El sólido se filtró y lavó con agua desionizada para posteriormente ser secado a 40 °C durante 24 h.

A la par de los tratamientos se corrieron los respectivos controles. En la Tabla 8 se muestra el diseño experimental del ensayo para la determinación de la temperatura óptima de desproteínezación enzimática.

Tabla 8. Diseño experimental del ensayo para la determinación de la temperatura óptima de desproteínización enzimática

<i>Enzima</i>	<i>Concentración de enzima – sustrato (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
			30
			40
Deterzyme® L - 660	1.2%	7.5	50
			60
			70

Ensayo realizado durante 8 horas a 140 rpm y relación sustrato - volumen 1:12

6.6.4 Determinación de concentración de enzima en la desproteínización enzimática.

Se mezcló el sustrato (ABDM) en relación 1:12 con el buffer de reacción que contenía la enzima Deterzyme® L – 660 a pH de reacción 7.5 y 40 °C de temperatura. Se permitió la reacción durante 8 h a las distintas concentraciones de enzima (0.1, 0.5, 1.2, 1.5 y 2.0% p/v). Se detuvo la reacción a 100 °C durante 10 minutos. El sólido se filtró y lavó con agua desionizada para posteriormente ser secado a 40 °C durante 24 h.

A la par de los tratamientos se corrieron los respectivos controles. En la Tabla 9 se muestra el diseño experimental del ensayo para la determinación de la concentración enzima - sustrato óptima en la desproteínización enzimática.

Tabla 9. Diseño experimental del ensayo para la determinación de la concentración enzima - sustrato óptima en la desproteínización enzimática.

<i>Enzima</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración de enzima – sustrato (%)</i>
			0.1
			0.5
Deterzyme® L - 660	7.5	40	1.2
			1.5
			2.0

Ensayo realizado durante 8 horas a 140 rpm y relación sustrato - volumen 1:12

6.6.5 Cinética de desproteínización enzimática con las condiciones óptimas experimentales.

Se mezcló el sustrato (ABDM) en relación 1:12 con el buffer de reacción que contenía la enzima Deterzyme® L – 660 a pH de reacción 7.5, 40 °C de temperatura y concentración de enzima – sustrato 0.5%. Se permitió la reacción durante 24 h. Se detuvo la reacción a 100 °C durante 10 minutos. El sólido se filtró y lavó con agua desionizada para posteriormente ser secado a 40 °C durante 24 h. A la par de los tratamientos se corrieron los respectivos controles. En la Tabla 10 se muestra el diseño experimental para la cinética de desproteínización enzimática con Deterzyme® L – 660 a pH de reacción 7.5, 40 °C de temperatura y concentración de enzima – sustrato 0.5%.

Tabla 10. Diseño experimental para la cinética de desproteínización enzimática con Deterzyme® L – 660 a pH de reacción 7.5, 40 °C de temperatura y concentración de enzima – sustrato 0.5%

<i>Enzima</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración de enzima – sustrato (%)</i>	<i>Tiempo (h)</i>
				0
				1
				2
				3
				4
Deterzyme®	7.5	40	0.5	5
L - 660				6
				8
				12
				18
				24

Ensayo realizado a 140 rpm y relación sustrato - volumen 1:12

En la Figura 6 se muestra el proceso mediante el cual se obtuvo quitina.

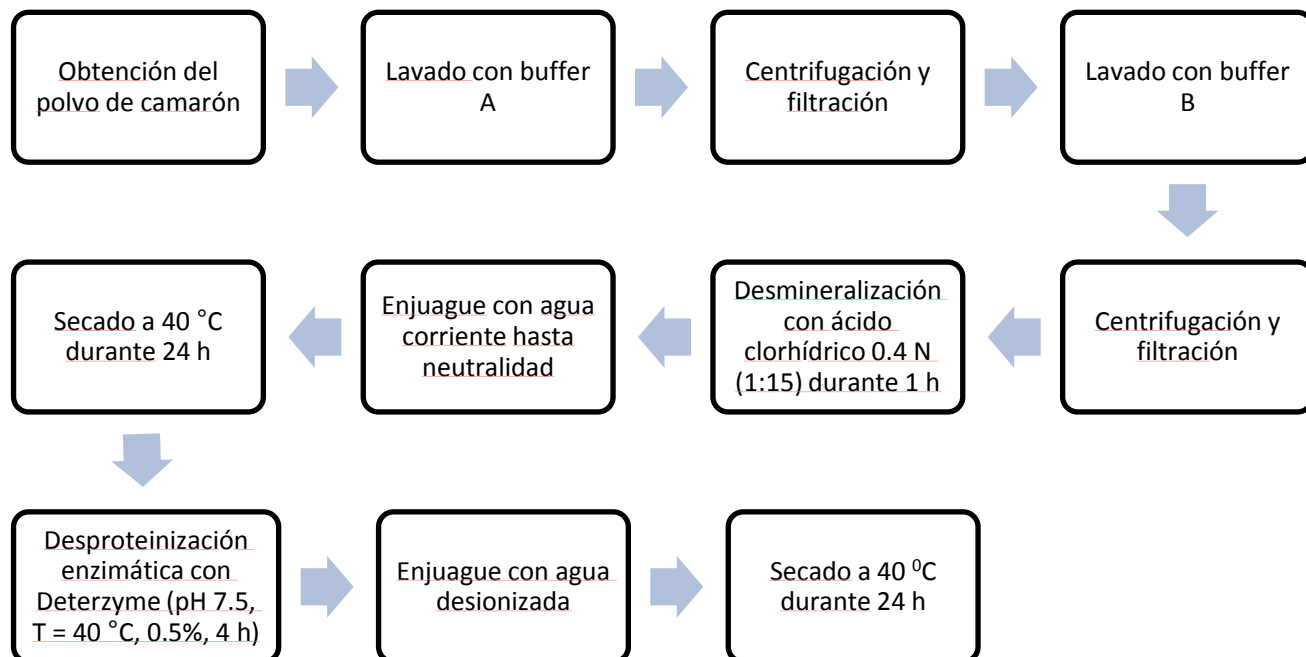


Figura 6. Proceso de obtención de Quitina

6.7 Obtención de Quitosano

Empleando el método heterogéneo se mezclaron en relación 1:15 la Quitina obtenida (tamaño de partícula de 0.5 mm) con una solución de Hidróxido de Sodio al 50% a reflujó con temperatura de 110 °C durante 3 h. El sustrato fue neutralizado con agua corriente²⁴.

7. Análisis de muestras

7.1 Determinación de contenido de humedad

El contenido de humedad fue determinado en las muestras sólidas considerando la diferencia de pesos y expresado como porcentaje con respecto al peso inicial de la muestra³⁰.

$$\%H = 100 - \left[\left(\frac{\text{Peso del crisol con muestra seca} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de muestra}} \right) * 100 \right] \dots \text{Ecuación 1}$$

7.2 Determinación de contenido de cenizas

El contenido de cenizas totales fue determinado en las muestras sólidas considerando la diferencia de pesos y expresado como porcentaje con respecto al peso inicial de la muestra³⁰. El porcentaje de desmineralización (DM) fue calculado considerando el contenido inicial de cenizas y el obtenido después de los tratamientos.

$$\%C = \left[\left(\frac{\text{Peso del crisol con muestra calcinada} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de muestra}} \right) * 100 \right] \dots \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ de Desmineralización} = \left[\left(\frac{\text{Porcentaje de cenizas inicial} - \text{Porcentaje de cenizas final}}{\text{Porcentaje de cenizas inicial}} \right) * 100 \right] \dots \text{Ecuación 3}$$

7.3 Determinación de contenido de grasa

El contenido de grasa fue determinado en las muestras sólidas empleando la técnica de Soxhlet (VELP Scientifica SER 148/6, Italia) cuantificando las sustancias extraíbles con éter de petróleo, considerando la diferencia de pesos y expresado como porcentaje con respecto al peso inicial de la muestra³⁰.

$$\%G = \left[\left(\frac{\text{peso del vaso con muestra con grasa} - \text{peso del vaso}}{\text{peso de muestra}} \right) * 100 \right] \dots \text{Ecuación 4}$$

7.4 Determinación de contenido de nitrógeno total y proteína residual

El contenido de nitrógeno total y proteína residual fue determinado a través del método de Kjeldahl (K- 435 BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) de acuerdo al método estándar³⁰. La determinación de proteína residual se realizó mediante la substracción del nitrógeno de quitina al nitrógeno total. El resultado fue multiplicado por el factor de corrección de 6.25³¹. El porcentaje de desproteínización (DP) fue calculado considerando el contenido inicial de proteínas de la muestra y el obtenido después de los tratamientos.

Nitrógeno total = Nitrógeno proteico + nitrógeno no proteico....Ecuación 5

El contenido de nitrógeno atribuido a la Quitina fue 5.9223.

$$\% \text{ de Desproteínización} = \left[\left(\frac{\text{Porcentaje de proteína inicial} - \text{Porcentaje de proteína final}}{\text{Porcentaje de proteína inicial}} \right) * 100 \right] \dots \text{Ecuación 6}$$

7.5 Determinación de proteína soluble

Empleando el método de Lowry-Peterson³² se diluyeron las muestras en agua destilada a un volumen total de 1 mL, se adicionó 1 mL del reactivo de Lowry y se agitó vigorosamente para ser incubado a 40 °C durante 10 minutos. Se adicionaron 0.5 mL de Fenol-Folin Ciocalteu previamente diluido con agua en relación 1:1 y se incubó durante 30 minutos a 40 °C. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm y se determinó la concentración con una curva patrón de Seroalbúmina bovina (Anexo 1).

7.6 Determinación de contenido de solubles de Quitina en Dimetilacetamida

El porcentaje de solubles en la quitina fue determinado disolviendo 0.1 g de la misma en 25 mL de una solución de *N, N*-dimetilacetamida (DMAc) con cloruro de litio (LiCl) al 5%³³, durante 72 h con agitación constante a 25 °C; posteriormente se filtró en

membrana de nailon y las muestras se secaron a 100 °C durante 24 h; la cantidad de quitina disuelta se calculó por diferencia de peso.

7.7 Determinación de contenido de solubles de Quitosano en ácido acético

El porcentaje de solubles del quitosano fue determinado disolviendo 0.1 g en 25 mL de una solución de ácido acético 0.1 M durante 72 h³⁴, con agitación constante a 25 °C; posteriormente se filtró en papel filtro de celulosa (0.45 µm) y las muestras se secaron a 100 °C durante 24 horas; la cantidad de quitosano disuelto se calculó por diferencia de peso.

7.8 Determinación del grado de acetilación (DA)

El grado de acetilación fue determinado mediante la relación carbono/nitrógeno (C/N) obtenido de análisis elemental³⁵.

$$DA = \left(\frac{C/N - 5.145}{6.861 - 5.145} \right) * 100 \dots \text{Ecuación 7}$$

7.9 Determinación de peso molecular por viscosimetría $[\eta]$

Para determinar el peso molecular se disolvieron 0.1 g de quitina en 25 mL de DMAc/LiCl 5% y 0.1 g de quitosano en solución de ácido acético al 2% con acetato de sodio 0.2 M; se realizaron 5 respectivas disoluciones para determinar las ordenadas al origen. El peso molecular se calculó mediante la ecuación de Mark – Houwink-Sakurada.

$$[\eta] = k \text{ PM } a \dots \text{Ecuación 8}$$

Para los distintos disolventes se emplearon las siguientes constantes⁶.

<i>Constante</i>	<i>Quitina</i>	<i>Quitosano</i>
K	2.4×10^{-4} L/g	1.38×10^{-5} L/g
a	0.69	0.85

7.10 Espectrofotometría de infrarrojo (FTIR - ATR)

Empleando un espectrofotómetro infrarrojo (Spectrum 100 ATR FTIR Perkin Elmer, USA) se obtuvieron los espectros de infrarrojo de las muestras secas con un tamaño de partícula $< 0.59 \mu\text{m}$ en el intervalo de $4\ 000$ a 650 cm^{-1} .

7.11 Resonancia Magnética Nuclear de Quitosano (RMN¹H)

Se disolvieron 5 mg de quitosano en $700 \mu\text{L}$ de D_2O y $25 \mu\text{L}$ de HCl; se filtró la muestra y se obtuvo el espectro de resonancia en un espectrómetro Bruker (AVANCE-III 500), empleando un probe BBID de 5 mm con z-gradiente de campo. El espectro se obtuvo a $298 \text{ }^\circ\text{K}$.

7.12 Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza empleando como fuentes de variación: tipo de enzima, concentraciones de enzima-sustrato, pH y temperatura de reacción ($\alpha \leq 0.05$). Se realizó un análisis múltiple de comparación de medias mediante prueba de Duncan empleando el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS, Inc., USA).

8. Resultados y discusión

8.1 Caracterización del desperdicio de camarón

Una vez que se disminuyó el tamaño de partícula del desperdicio de camarón a $0.59 \mu\text{m}$ fue caracterizado. En la Tabla 11 se muestran los resultados de dicha caracterización.

Tabla 11. Caracterización del desperdicio de camarón

<i>Parámetro</i>	<i>Contenido (%)</i>
Proteína	29.82 ± 0.98
Cenizas	16.99 ± 0.08
Grasa	20.47 ± 0.30
Quitina	32.72 ± 0.34

Resultados reportados en base seca

El contenido de proteína (29.82%) del desperdicio es bajo comparado con reportes de 40%²³. La composición del camarón varía significativamente en función de la temporada de captura y la dieta del organismo¹⁶.

El porcentaje de cenizas del desperdicio de camarón fue de 16.99% mientras que se han reportado porcentajes de cenizas de hasta 32%²²; las cenizas totales están constituidas por fosfatos y mayoritariamente por carbonato de calcio, el cual es un componente estructural del camarón.

En contraste con reportes previos donde el contenido de grasa en desperdicio de camarón es bajo (3.79%),²² el contenido de grasa en el desperdicio estudiado fue alto

(20.47%) lo que se atribuye a la dieta del organismo; se han reportado porcentajes de esta magnitud en lotes de camarón provenientes del estado de Sinaloa, México²⁴.

Al realizar el balance de materia se obtuvo un porcentaje de quitina cercano al 30%; este dato coincide con lo reportado por distintos autores³⁶.

8.2 Cinética de desproteización con Protamex® sobre desperdicio de camarón

En la primera etapa se agregó directamente la enzima proteolítica sobre el desperdicio de camarón (Figura 7) empleando la enzima comercial Protamex a una concentración de 0.1% enzima-sustrato a pH 7.5 y 40 °C.

La Figura 7 se muestra la proteína removida con el tratamiento enzimático menos la proteína de las muestras control. La proteína removida a causa de la hidrólisis enzimática es baja tomando en cuenta que el 30% del desperdicio es proteína. Se ha reportado que el camarón tiene tres tipos de proteína: sarcoplásmica, miofibrilar y estromal. Las primeras dos son solubles en soluciones iónicas y ambas representan el 90% de la proteína total ya que el 10% restante está constituida por proteína estromal¹⁵. Por lo anterior, las muestras tratadas y las muestras control presentan cantidades muy similares de proteína soluble ya que se hace evidente el efecto del poder iónico del buffer de reacción.

Los controles (sin enzima) presentaron un contenido de proteína soluble cercano a los tratamientos, esto pudo deberse a que las proteasas tienen una alta cantidad de proteína solubilizada por el medio de reacción (buffer de fosfato dibásico y monobásico de potasio pH 7.5) por lo que la enzima no hidrolizó la proteína de difícil acceso.

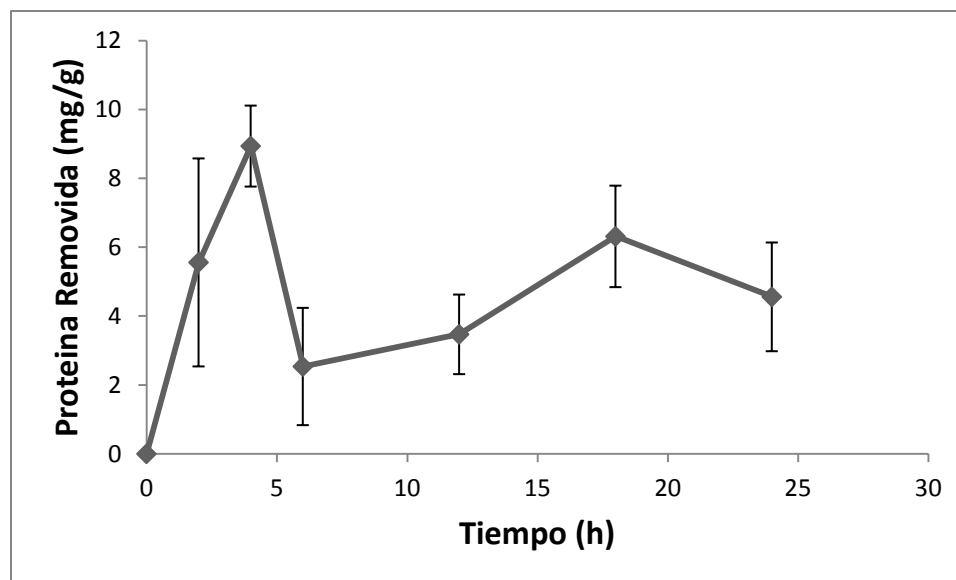


Figura 7. Cinética de desproteínización empleando Protamex® a concentración de 0.1% sobre desperdicio de camarón

8.3 Protocolo de remoción de proteína soluble

Con base en los resultados anteriores se estableció un protocolo de remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar siguiendo metodologías previamente reportadas¹⁵ con la finalidad de disminuir la cantidad de proteína soluble sobre el desperdicio de camarón facilitando así el acceso de la enzima a la proteína estromal.

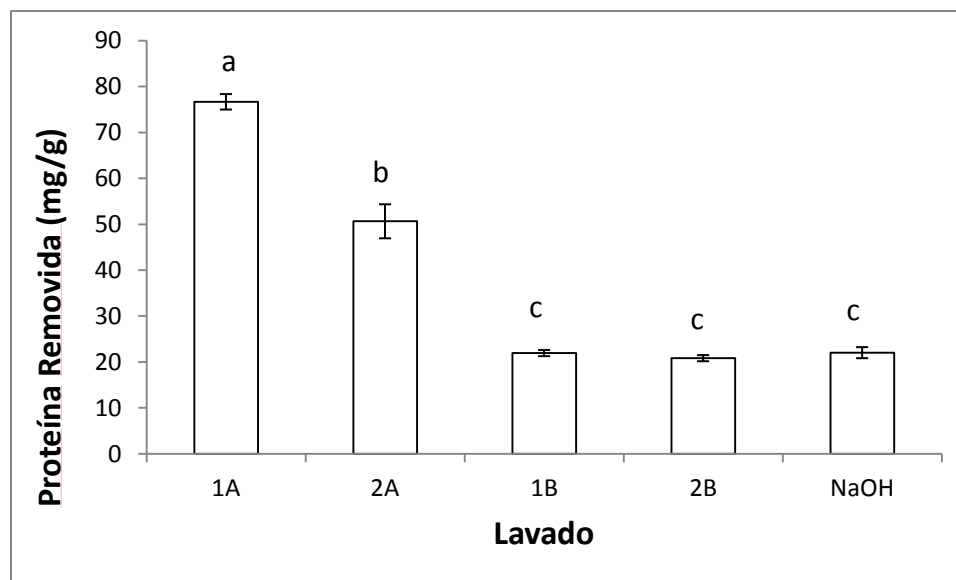
Se han reportado cambios en la composición proteica del camarón durante el calentamiento en soluciones salinas y lavados con NaOH 0.1 N (remoción de proteína estromal)¹⁵ con lo que es posible obtener quitina calcárea (quitina con fracción mineral). Sin embargo se ha reportado que aún con tratamientos alcalinos (1.0 y 1.25 N) se pueden obtener quitinas con porcentajes de proteína residual de hasta 2%³¹.

En la Figura 8 se aprecia que con el primer lavado se remueve una cantidad importante de proteína (sarcoplásmica) corroborando así lo encontrado en el ensayo anterior con

Protamex®, el buffer de reacción remueve cerca del 30% de la proteína total. El segundo lavado con buffer A continuó removiendo proteína soluble aunque en menor cantidad que el primer lavado. El siguiente tipo de proteína por remover fue la miofibrilar, esta es soluble en soluciones iónicas fuertes; se observó que hubo una menor remoción de proteína soluble (7.32%). Un segundo lavado con la misma solución remueve una cantidad similar (6.95%) a la removida con el primer lavado.

Finalmente se realizó un lavado con una solución de Hidróxido de Sodio 0.1 M durante 24 horas, encontrando aún proteína presente. Ésta debió ser proteína estromal que constituye cerca de el 10% de la proteína total.

Con la finalidad de evitar el empleo de la solución de Hidróxido de Sodio, el protocolo de remoción de proteína soluble quedó establecido como un lavado con buffer A y uno con B pues a pesar de que existe diferencia significativa entre el segundo lavado con buffer A y el primero con buffer B, este último remueve proteína de tipo miofibrilar y una porción de tipo sarcoplásmico, removiendo así poco más del 40% de la proteína total, facilitando el acceso de la proteasa a la proteína estromal, la más difícil de remover por estar asociada covalentemente con la quitina. El sustrato obtenido en esta etapa se denominó (AB).



Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 8. Proteína Removida del desperdicio de camarón con soluciones iónicas e Hidróxido de Sodio

8.4 Desmineralización

La desmineralización es una de las etapas cruciales en la obtención de quitina, sin embargo debido a que se realiza a temperaturas elevadas y con ácidos fuertes como el ácido clorhídrico se suele presentar daño del material⁶.

Se probaron distintas condiciones de desmineralización, no encontrando diferencia significativa en cuanto a realizar la desmineralización a una concentración 0.4 N de ácido clorhídrico en relación 1:15 p/v que a 1 N en relación 1:25, ambas a 100 °C. En la Tabla 12, se muestran los resultados de los distintos procesos de desmineralización efectuados sobre el sustrato (AB).

Tabla 12. Desmineralización del sustrato (AB)

Volúmenes de ácido / Concentración	1:15	1:25
	0.4 N	1.18 ± 0.03a
1.0 N	1.14 ± 0.05a	1.15 ± 0.07a

Tratamientos realizados a 100 °C durante 1 hora. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Una vez que se redujo la concentración de ácido clorhídrico y el volumen empleado del mismo, se realizó un ensayo para disminuir la temperatura, puesto que este también es un factor causante de daño a la estructura del polímero, encontrándose que no existe diferencia significativa entre realizar la desmineralización a 25 °C ó 100 °C. Las desmineralizaciones de desperdicios de crustáceos a temperatura ambiente han sido previamente reportadas²⁰ y en el presente estudio no se encontró diferencia significativa en cuanto a realizar dicha etapa a 25 °C ó 100 °C. En la Tabla 13 se muestran los resultados de este ensayo.

Tabla 13. Desmineralización sobre (AB) variando la temperatura

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Cenizas (%)</i>
25	1.16 ± 0.07a
100	1.18 ± 0.03a

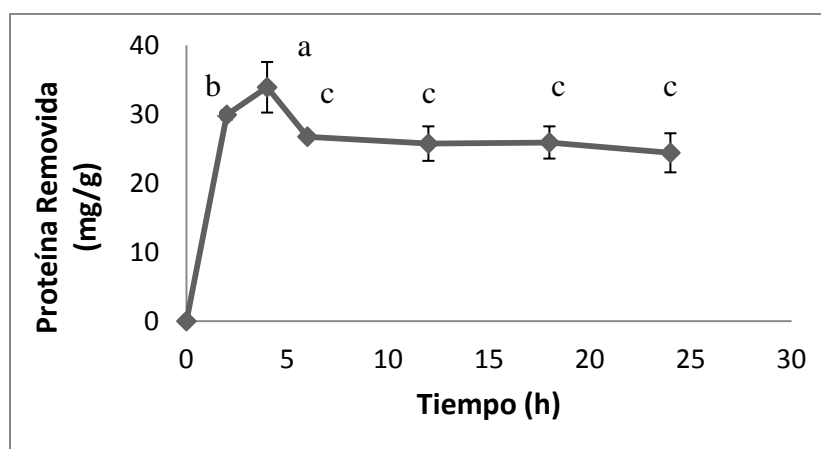
Tratamientos realizados durante 1 hora Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$
 Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas.

Por lo que las condiciones de desmineralización quedaron establecidas a una temperatura de 25 °C, relación 1:15 (p/v) y concentración de ácido clorhídrico 0.4 N durante 1 h.

El sustrato fue lavado con agua corriente hasta neutralidad. El sustrato obtenido fue denominado (ABDM).

8.5 Cinética de desproteínización empleando Protamex® sobre ABDM

Se realizó una cinética de desproteínización con la enzima Protamex® 0.1% sobre el sustrato obtenido de los lavados con buffer y tratamiento con NaOH 0.1 M. En la Figura 9 se aprecia que la mayor desproteínización se da en las primeras horas por lo que se decidió llevar a cabo la reacción hasta las 8 horas.

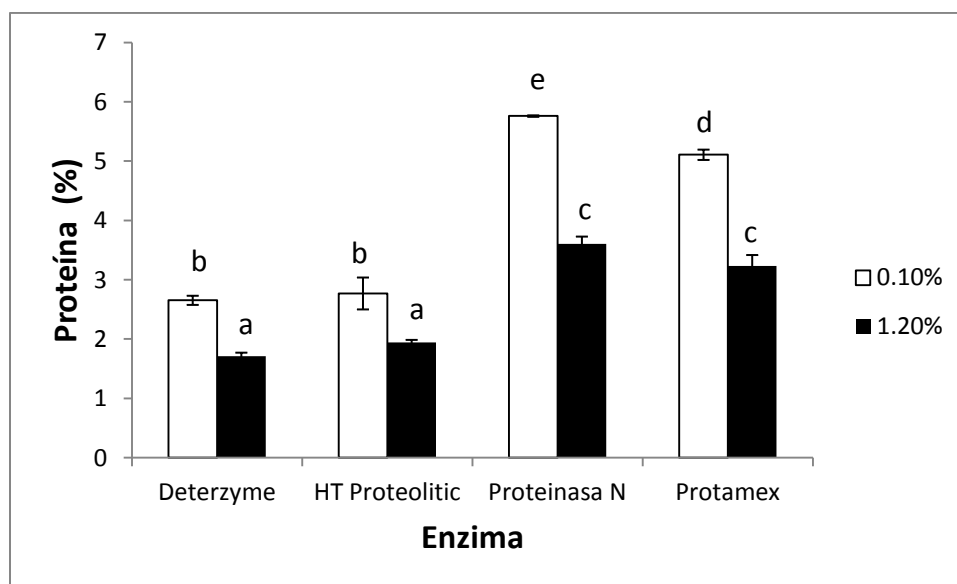


Tratamientos realizados durante 1 hora. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 9. Cinética de desproteínización enzimática con Protamex® 0.1% sobre sustrato llevado hasta lavados con NaOH 0.1 M cuantificada en proteína soluble

8.6 Determinación de enzima con mayor porcentaje de desproteínización

Se probaron cuatro distintas proteasas comerciales en la desproteínización de ABDM, estudiando dos distintas concentraciones de enzima – sustrato, 0.1% y 1.2%. Se encontró que tanto Deterzyme® L – 660 como HT Proteolitic ® 200 fueron las proteasas con las que se obtuvo menores contenidos de proteína (Figura 10). Deterzyme® L – 660 fue seleccionada para continuar los estudios debido a que no hay reportes de hidrólisis proteica en sustratos similares, mientras que HT Proteolytic ha sido reportada en la hidrólisis de carne de pollo³⁷.



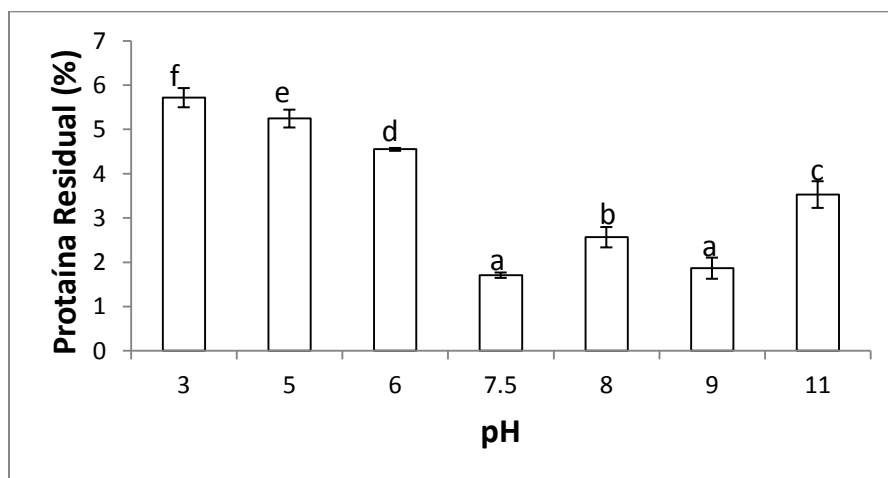
Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 10. Evaluación de las proteasas comerciales en el contenido de proteína del sustrato ABDM

8.7 Determinación de pH óptimo para la desproteínización enzimática con Deterzyme® L – 660

El pH es uno de los principales factores involucrados en los procesos enzimáticos por lo que se procedió a determinar el pH óptimo de desproteínización con Deterzyme® L – 660 sobre el sustrato ABDM. El pH de desproteínización significativamente distinto fue 7.5, coincidiendo con el reportado como óptimo por el fabricante. Este valor de pH se encuentra relacionado con el medio de donde se obtiene esta enzima, pues proviene de la bacteria *Bacillus licheniformis* que de manera natural crece en medios neutros o ligeramente alcalinos lo que influye en que sus proteasas presenten mayores porcentajes de desproteínización cuando el pH se encuentra entre 5 y 11 mientras que el fabricante reporta la mayor actividad de la proteasa a niveles de pH entre 7 y 10; se ha reportado que las proteasas del género *Bacillus* presentan mayores actividades a niveles de pH cercanos a 8³⁸.

Conforme aumenta la acidez del medio de reacción el porcentaje de desproteínización disminuye por lo que se encontró un mayor porcentaje de proteína residual en el sólido; de la misma manera, cuando el medio se alcaliniza a valores de pH superiores a nueve la desproteínización que presenta la enzima es significativamente menor (Figura 11).



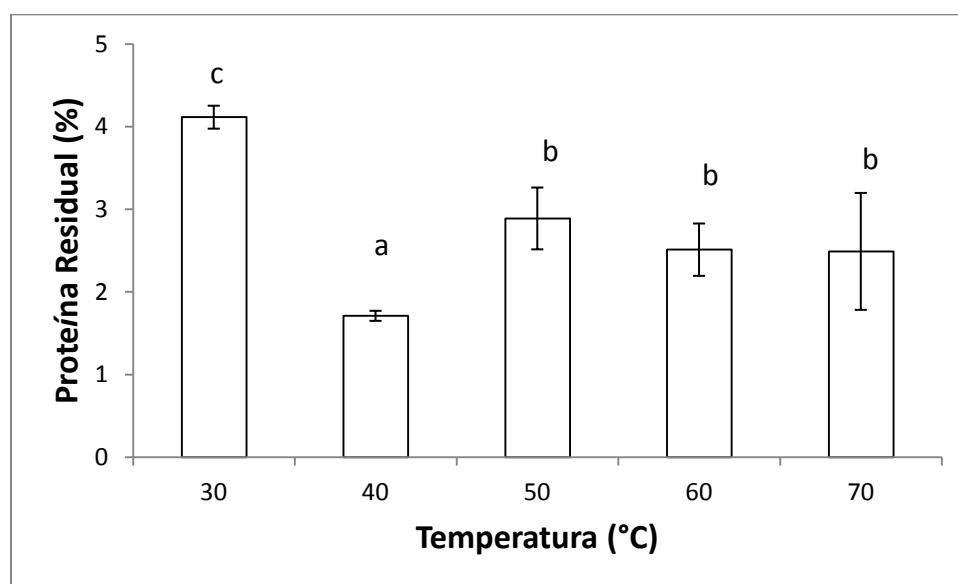
Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 11. Efecto del pH en la desproteínización enzimática del sustrato ABDM empleando Deterzyme a 1.2%

8.8 Determinación de temperatura óptima de desproteínización enzimática con Deterzyme® L – 660 sobre ABDM

En la Figura 12 se presenta la desproteínización lograda con Deterzyme a temperaturas de 30 a 70°C. A 30 °C la proteasa presentó el porcentaje de desproteínización más bajo mientras que a temperaturas mayores de 40 °C no hubo diferencias significativas en los porcentajes de desproteínización (cerca del 50%). La temperatura en la que se observó la mayor cantidad de proteína removida fue 40 °C.

Bacillus licheniformis es la fuente de la enzima empleada (Deterzyme® L – 660), se desarrolla a temperaturas de 10 hasta 60 °C³⁸; la temperatura óptima de desproteínización para esta proteasa fue de 40 °C mientras que el fabricante reporta que la enzima mantiene actividad proteolítica hasta 70 °C.

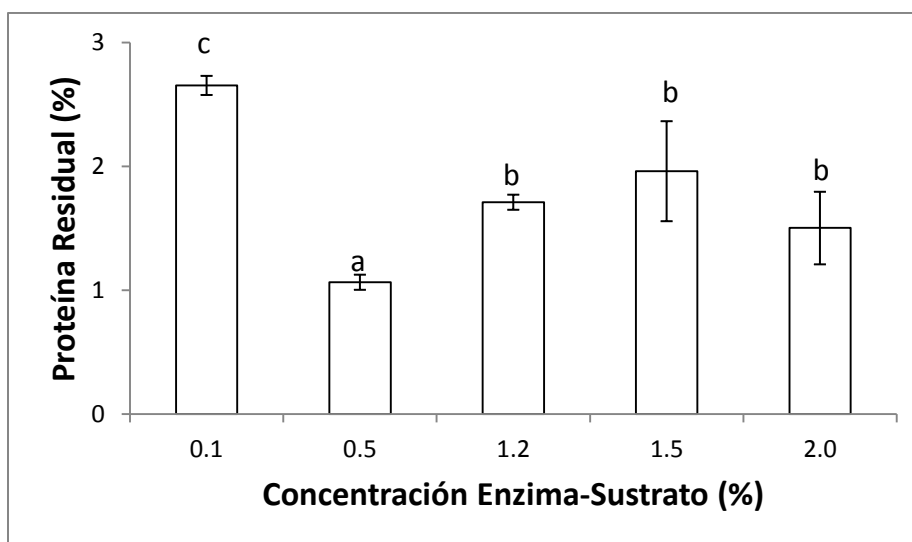


Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 12. Efecto de la temperatura en la desproteínización enzimática del sustrato ABDM empleando Deterzyme a 1.2%.

8.9 Determinación de la concentración de enzima – sustrato para la desproteínización enzimática sobre el sustrato ABDM con Deterzyme® L – 660

Las enzimas se definen como catalizadores capaces de acelerar las reacciones químicas en ambos sentidos sin consumirse en la reacción ni formar parte de los productos y poseen gran especificidad de reacción por el sustrato sobre el cual actúan³⁹. Una de las grandes ventajas de los procesos enzimáticos es el empleo de cantidades relativamente pequeñas de catalizador por lo que se probaron más concentraciones de enzima – sustrato. El mayor porcentaje de desproteínización se encontró a una concentración de enzima – sustrato de 0.5% (Figura 13). Distintos autores han reportado procesos de desproteínización enzimática sobre desperdicio de camarón con concentraciones de enzima que van desde 0.1% con un porcentaje de desproteínización del 36.64%²⁴, 0.5% con porcentaje de desproteínización del 72.5%²³, 1.8% con porcentaje de desproteínización del 33.13%²⁵ y 3.0% con porcentaje de desproteínización de 65%. Estos trabajos fueron realizados con la enzima comercial Alcalasa a excepción del trabajo del realizado con Protamex²⁴.



Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

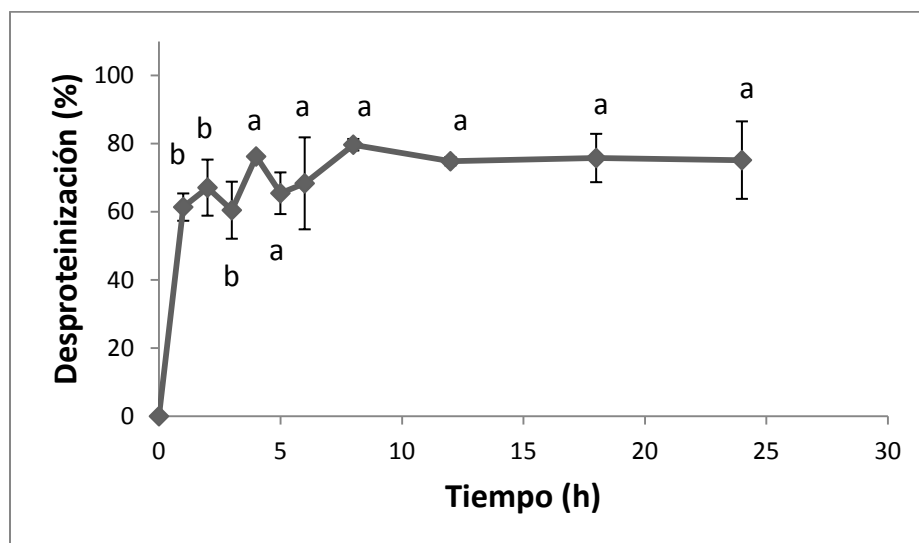
Figura 13. Efecto de la concentración de enzima en la desproteínización enzimática del sustrato ABDM empleando Deterzyme® L – 660

8.10 Cinética de desproteización sobre ABDM con Deterzyme® L – 660

Una vez establecidas las mejores condiciones de desproteización (pH = 7.5, T = 40 °C y 0.5% de enzima - sustrato) se procedió a realizar una cinética.

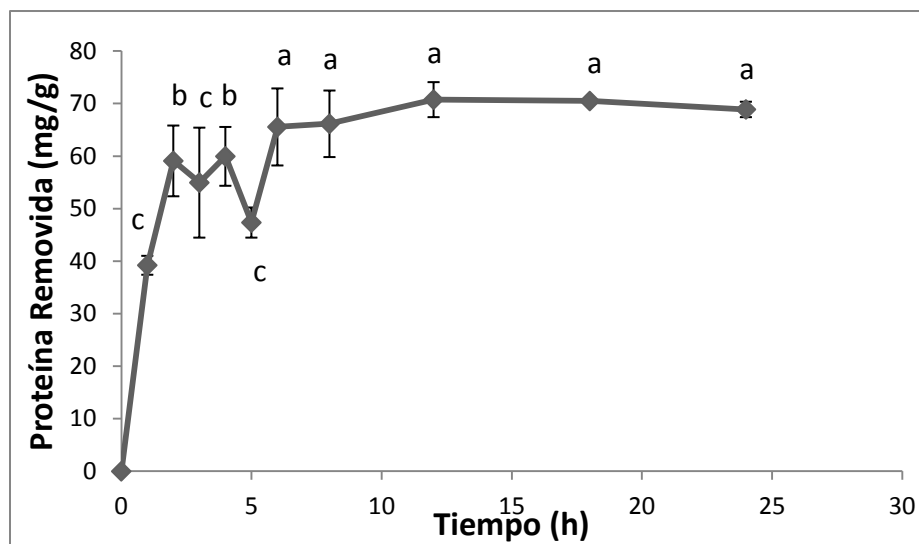
La cinética fue monitoreada por proteína soluble y proteína residual en el sólido. Se aprecia que la parte más importante de la desproteización se desarrolla en las primeras horas, este comportamiento ha sido previamente reportado, permitiendo la reacción hasta por 6 horas con la enzima comercial Alcalasa sobre desperdicio de camarón²³.

Se obtuvo un porcentaje de desproteización del 60% en los primeros sesenta minutos de reacción pero se decidió continuar hasta las cuatro horas de reacción (76.2% de porcentaje de desproteización) por encontrar diferencia significativa en la desproteización. Este comportamiento se observó en proteína soluble y proteína en el sólido. En las figuras 14 y 15 se muestran los resultados de la cinética.



Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 14. Cinética de desproteización (en proteína residual del sólido) sobre el sustrato ABDM empleando Deterzyme a pH 7.5, temperatura 40 °C y concentración de enzima - sustrato 0.5%



Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Duncan $\alpha \leq 0.05$.

Figura 15. Cinética de desproteínización (en proteína soluble) sobre el sustrato ABDM empleando Deterzyme a pH 7.5, temperatura 40°C y concentración de enzima – sustrato 0.5%

8.11 Disminución de proteína y cenizas a lo largo del proceso de obtención de Quitina

El contenido de proteína del desperdicio de camarón fue de 29.82% \pm 0.98 y después del protocolo de remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar fue de 14.5% \pm 0.55 con lo que prácticamente se redujo a la mitad el contenido de proteína (Figura 16). Con la desproteínización enzimática empleando Deterzyme® L – 660 se obtuvo un contenido de proteína de 1.07% \pm 0.13 en la quitina obtenida, mejorando considerablemente trabajos previos donde empleando la enzima comercial Alcalasa obtuvieron un 9.31% de proteína residual²¹.

En cuanto al contenido de cenizas con la desmineralización química se redujo a 1.08% \pm 0.1 a partir del inicial (16.99% \pm 0.08) en el desperdicio de camarón (Figura 16). El contenido de cenizas que presentó la quitina obtenida se encuentra dentro de lo

reportado previamente: $1.73\% \pm 0.1$ obtenido tras una fermentación láctica y desmineralización con ácido clorhídrico 0.4 N^{24} ; también es un contenido de cenizas que iguala lo reportado por métodos termoquímicos agresivos que presentan porcentaje de cenizas desde 0.1 hasta 2.0%.

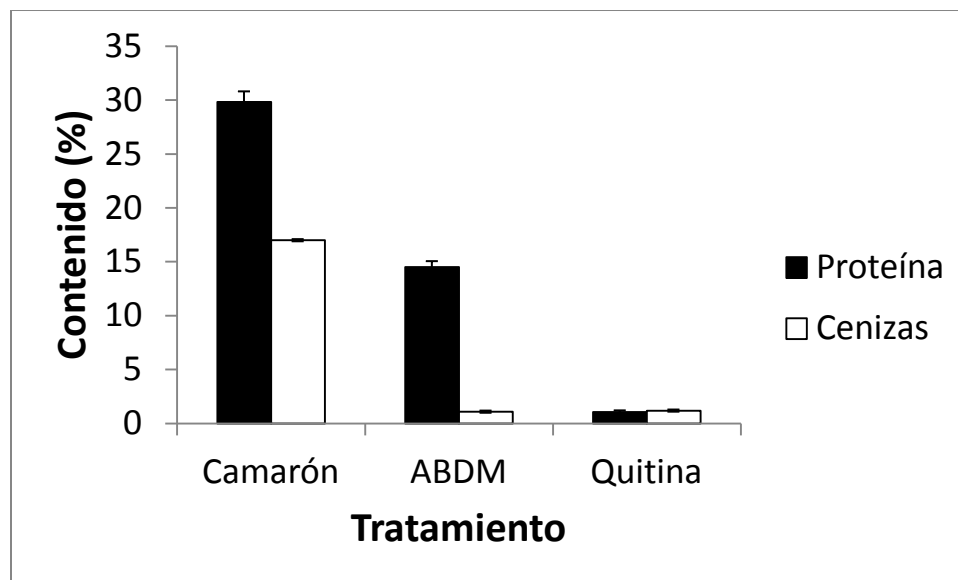


Figura 16. Disminución de proteína y cenizas a lo largo del proceso de obtención de Quitina

8.12 Rendimientos en la obtención de Quitina, porcentaje de desmineralización, porcentajes de desproteínización enzimático, global y rendimiento de Quitosano

Durante el proceso de obtención de quitina se obtuvo un rendimiento del $21.32\% \pm 0.82$, el cual es bajo ya que teóricamente el desperdicio de camarón contiene un 30% de quitina. Este rendimiento se puede mejorar ya que se presentaron pérdidas durante el protocolo de remoción de proteína sarcoplásmica y miofibrilar sin embargo en otros trabajos se han reportado rendimientos de 22% de quitina²³.

Se obtuvo un porcentaje de desmineralización del $96.79\% \pm 2.18$ (equivalente a 1.16% de cenizas) el cual se encuentra dentro de lo reportado por distintos autores que han obtenido porcentajes de cenizas por debajo del 2.0% (1.6% y 0.2%^{22, 23}).

Se presentan dos porcentajes de desproteización, el enzimático y el global; el primero fue de $76.22\% \pm 0.23$ el cual es alto comparado con otros reportes 65%²¹, 65.1%²² y 61.0%²³.

El porcentaje de desproteización global fue de $96.38\% \pm 0.53$ (equivalente a 1.07% de proteína residual) por lo que el contenido de proteína residual es bajo comparado con otros reportes donde empleando la enzima comercial Alcalasa se obtuvo 9.31% de proteína residual en quitina²²; en otro trabajo se obtuvo 92.84% de desproteización total después de tratar el desperdicio de camarón con una fermentación ácido láctica y un tratamiento enzimático con la enzima comercial Protamex²⁴.

El rendimiento de quitina a quitosano fue de $82.71\% \pm 1.97$, este valor se encuentra dentro de lo reportado en la literatura por el método heterogéneo (60 al 80%)²⁶.

En la Tabla 14 se presentan los rendimientos antes mencionados.

Tabla 14. Rendimientos en la obtención de Quitina, porcentaje de desmineralización, porcentajes de desproteización enzimático, global y rendimiento de Quitosano

<i>Rendimiento de Quitina (%)</i>	<i>Porcentaje de desmineralización (%)</i>	<i>Porcentaje de desproteización enzimático (%)</i>	<i>Porcentaje de desproteización global (%)</i>	<i>Rendimiento de Quitosano (%)</i>
21.32 ± 0.82	96.79 ± 2.18	76.22 ± 0.23	96.38 ± 0.53	82.71 ± 1.97

8.13 Caracterización de Quitina

A pesar de que a lo largo del tratamiento no hay una etapa específica para remover la grasa, se observa una importante reducción de esta, pasando de un contenido inicial del desperdicio del $20.47\% \pm 0.30$ a $1.51\% \pm 0.25$, esto se debe a la serie de lavados consecutivos con los que fue tratado el material. Al igual que un bajo contenido de proteína residual, un bajo contenido de grasa asegura que durante el proceso de obtención de quitosano con hidróxido de sodio, esta grasa se saponificará y al neutralizar el quitosano se removerá en su totalidad.

El peso molecular es uno de los parámetros más importantes en cuanto a la calidad de la quitina; el peso molecular de la quitina (obtenido por viscosidad intrínseca) fue de $930.31\text{KDa} \pm 11.55$ valor que se encuentra dentro de lo reportado por distintos autores quienes han obtenido quitina por métodos químico-biológicos, empleando fermentaciones ácido lácticas y tratamientos biológico-enzimáticos^{24, 39}.

Químicamente, la diferencia entre quitina y quitosano radica en el grado de acetilación; el producto se considera quitina cuando presenta un grado de acetilación superior al 80% y la quitina obtenida tiene un 100% de grado de acetilación, es decir, la totalidad del material aún conserva su grupo acetilo. Resultados similares han sido reportados previamente^{24, 39}.

La quitina es insoluble en disolventes comunes por lo que generalmente el porcentaje de solubles se determina en dimetilacetamida (DMAc) con cloruro de litio (LiCl) al 5%. La obtención de quitina a través de un método no agresivo con el polímero puede resultar en un alto grado de cristalinidad lo que involucra el difícil acceso del disolvente en el proceso de solvatación y esto repercute en un bajo porcentaje de solubles.

Previamente han sido reportados bajos porcentajes de solubles en quitinas obtenidas a través de métodos no agresivos³⁹.

Tabla 15. Caracterización de la Quitina obtenida enzimáticamente^{24, 39}

<i>Parámetro</i>	<i>Quitina Obtenida</i>	<i>Referencia</i>
Proteína (%)	1.08 ± 0.13	ND
Cenizas (%)	1.28 ± 0.10	< 2.0
Grasa (%)	1.51 ± 0.25	ND
Peso Molecular (M_v) (kDa)	930.31 ± 11.55	800 - 1130
Grado de acetilación (%)	100	> 80
% de solubles	71.92 ± 10.92	> 90

% de solubles determinado en DMAc con 5% de LiCl

8.14 Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR de la Quitina

La Figura 17 muestra el espectro infrarrojo de la quitina obtenida comparado con una quitina comercial (Quitina de la marca Sigma Aldrich) encontrando importantes similitudes.

Se muestran las bandas características: grupo -C-H (2892 cm^{-1}), C-O-C (1019 cm^{-1}) y se definen las bandas de los grupos -OH (3434 cm^{-1}) y -N-H (3254 cm^{-1}). Se aprecian las bandas del grupo Piranósico (1070 cm^{-1})¹⁹.

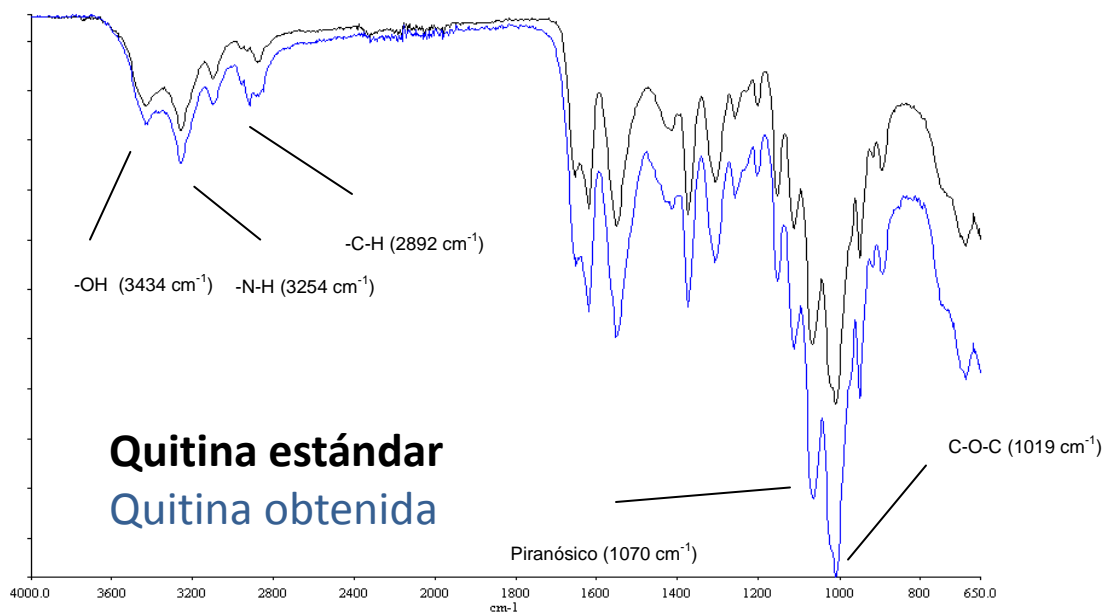


Figura 17. Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR de la Quitina

8.15 Caracterización de Quitosano

El grado de acetilación es también un importante parámetro de calidad, pues los requerimientos de desacetilación y peso molecular del quitosano pueden variar en función de la aplicación deseada, un ejemplo es su actividad antimicrobiana, la cual está en función del número de grupos aminos disponibles²⁶.

Tabla 16. Caracterización del quitosano obtenido por el método heterogéneo^{24, 39}

Parámetro	Quitosano Obtenido	Referencia
Cenizas (%)	0.67 ± 0.11	< 1.0
Peso Molecular (Mw) (Kda)	197.83 ± 10.10	100-1000
Grado de acetilación (%)	3.99 ± 0.99	< 20
% de solubles	80.68 ± 11.01	ND

% de solubles determinado en ácido acético 0.1 M

8.16 Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR del Quitosano

Se muestra el espectro del quitosano obtenido superpuesto con una muestra de Quitosano de la marca Sigma Aldrich donde se observan las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula; aparece la banda del grupo amino (1621 cm^{-1}) y se definen las bandas de los grupos -OH (3434 cm^{-1}) y -N-H (3254 cm^{-1}), respecto al espectro de la quitina. Se aprecian las bandas del grupo -C-H (2892 cm^{-1}), grupo Piranósico (1070 cm^{-1}) y grupo C-O-C (1014 cm^{-1}). Las señales correspondientes a los grupos C-O-C, anillo piranósico, C-H y O-H, se mantienen presentes durante todas las etapas, pues no desaparecen de la estructura⁵.

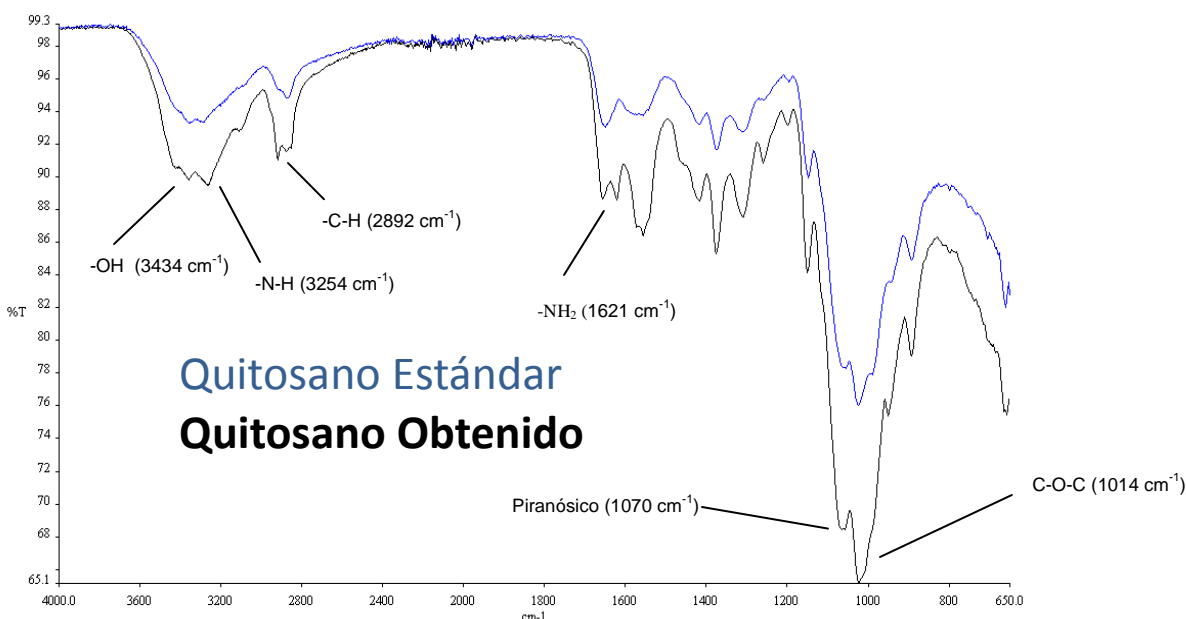


Figura 18. Espectrofotometría infrarroja ATR-FTIR del Quitosano

8.17 Resonancia Magnética Nuclear para Quitosano

El espectro de resonancia magnética (Figura 19) se muestra una banda en 2.1 ppm que corresponde a los protones del grupo acetamido mientras que la fracción para el grupo *D*-Glucosamina se muestra alrededor de 3.2 ppm (Masivo B). En el intervalo de 3.5 a 4.2 ppm (Masivo A) se observan las señales de los protones H3-H6 para *D*-Glucosamina. Alrededor de 4.8 ppm se aprecian las bandas correspondientes a los protones del grupo amino traslapados con los pertenecientes a los grupos hidroxilo³⁹.

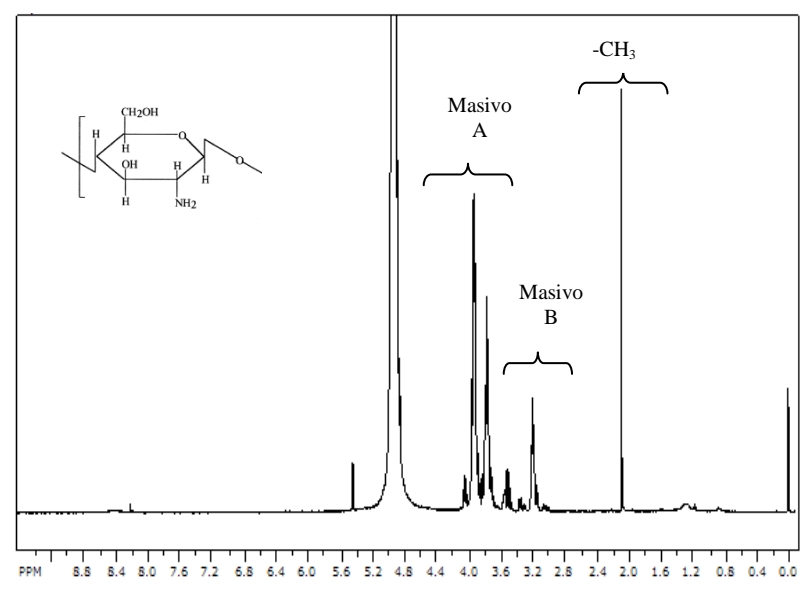


Figura 19. Espectro de RMN¹H del Quitosano

9. Conclusiones

Se establecieron las mejores condiciones de desproteización enzimática empleando proteasas comerciales con la finalidad de llevar a cabo la desproteización del desperdicio de camarón con lo que fue posible obtener quitina de características similares al polímero obtenido a través del método químico.

Paralelamente se implementó un protocolo de remoción de proteína soluble (sarcoplásmica y miofibrilar) de desperdicio de camarón para facilitar el acceso de la enzima a la proteína estromal.

Se determinó que la enzima comercial con mayor porcentaje de desproteización fue Deterzyme® L – 660; con esta enzima se obtuvo quitina, la cual se caracterizó encontrando 1% de proteína residual.

A partir de la quitina obtenida enzimáticamente se obtuvo quitosano por medio del método químico y se caracterizó.

La quitina obtenida por medio del proceso desarrollado presentó características similares a las quitinas obtenidas por el método termoquímico con las siguientes ventajas: empleo de menor cantidad de agua, reducción de consumo energético y eliminación de empleo de álcali en el proceso de obtención. Así mismo dio como resultado la obtención de un quitosano de calidad para ser empleado como excipiente en formulaciones, recubrimiento de alimentos y sistemas de liberación controlada de fármacos.

10. Perspectivas

Si bien se logró obtener quitina evitando el empleo de álcali, el proceso puede ser aún más limpio; previamente se han reportado trabajos en los que la etapa de desmineralización (tradicionalmente realizada con soluciones de ácido clorhídrico) se realiza con métodos físicos (como la sonicación) con lo que se podría mejorar el proceso.

En este trabajo la obtención de quitosano se realizó por el método tradicional (que se lleva a cabo con solución concentrada de álcali) pero se estudian procesos de desacetilación físicos y enzimáticos con lo que se podría obtener quitosano en un proceso totalmente “limpio”.

Los hidrolizados proteicos obtenidos en el proceso presentan potencial aplicación como agentes antioxidantes, por lo que se propone un estudio más detallado de ellos.

11. Referencias

1. Chavarría L. Camarón Ficha No. 8/UE. Programa Desarrollo Económico Sostenible en Centroamérica. 2010: 1-15.
2. Okzus A., Ozyilmaz A. A comparative study on proxymate, mineral and fatty acid compositons of deep seawater rose shrimp and red shrimp. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009; 8 (1): 183-189.
3. Comisión Nacional de Pesca. Anuario de Producción Pesquera. Gobierno de México. 2002.
4. Perea E. Pecuario y pesquero: desciende exportación mexicana de camarón a EU. 2009.
5. Cocoltzi H., Águila E., Flores A., Viveros E. y Ramos E. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*. 2009; 22 (3): 57-60.
6. Pacheco N., Garnica-González M ., Ramírez-Hernández J., Flores-Albino B., Gimeno M., Bárzana E. y Shirai K. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 2009; 100: 2849–2854.
7. Shirai K., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., González R. y Hall GM. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001; 28: 446–452.
8. Kumar R., Muzzarelli A., Muzzarelli C., Sashiwa H., and Domb J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*. 2004; 104: 6017-6084.
9. Muzzarelli R. Chitin. Pergamon. Press, Oxford. 1977: 305.
10. Shirai K., Guerrero L.I. y Hall G. La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia*. 1996; 47 (4): 317- 328.
11. Majeti N. and Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*. 2000; 46: 1–27.

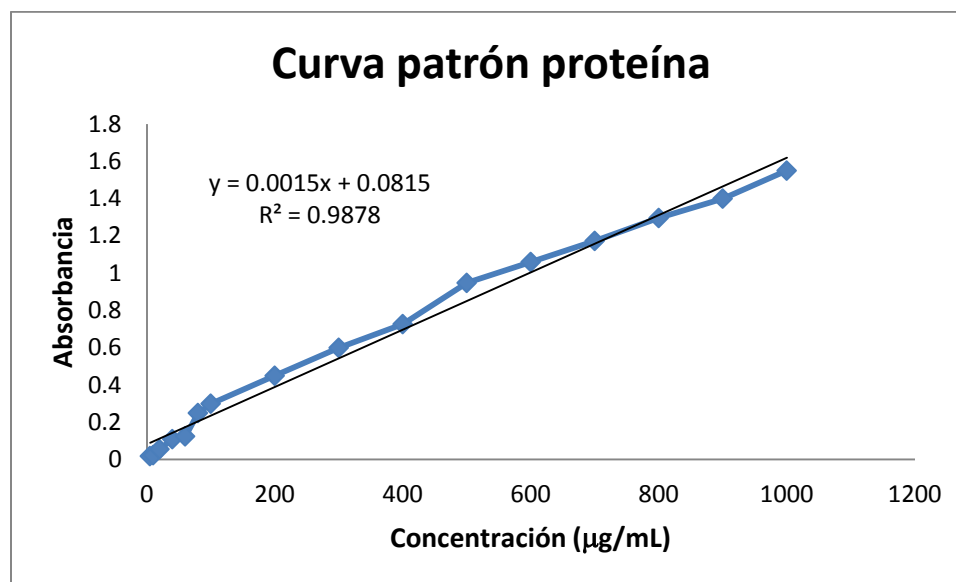
12. Xu J. and McCarthy P. Chytosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules*. 1996; 29: 3436-3440.
13. Hirano S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 1999; 48 (8): 732-734.
14. Duarte M., Ferreira M., Marvaño M. y Rocha J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2002; 31: 1-8.
15. Niamnuy C., Devahastin S. and Soponronnarit S. Changes in protein compositions and their effects on physical changes of shrimp during boiling in salt solution. *Food Chemistry*. 2008; 108: 165–175.
16. Cira L. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. 2000.
17. Shahidi F. and Synowiecki J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agric Food Chem*. 1991; 39:1527-1532.
18. Dutta P., Dutta J. y Tripathi S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and industrial Research*. 2004; 63: 20-31.
19. Mármol Z., Paez G., Rincon M., Araujo K. Aiello C., Chandler C. y Gutiérrez E. Quitina y quitosano, polimeros amigables, una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. 2011: 53-58.
20. No H. y Meyers S. Preparation y characterization of Chitin y Chitosan A Review. *Journal of aquatic food product technology*. 1995; 4 (2).
21. Mizani M., Aminlari M. and Khodabandeh M. An Effective Method for Producing a Nutritive Protein Extract Powder from Shrimp-head Waste. *Food Science and Technology International*. 2005; 11: 49-54.
22. Duarte H. and Netto F. Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology. Journal of Food Science*. 2006; 71 (5): 298-303.

23. Valdez-Peña U., Espinoza-Pérez J., Sandoval-Fabian G., Balagurusami N., Hernandez-Rivera A., De La Garza Rodriguez M., y Contreras Esquivel J. Screening of Industrial Enzymes for Deproteinization of Shrimp Head for Chitin Recovery. *Food Sci. Biotechnol.* 2010; 19 (2): 553-557.
24. Juárez C. Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicio de camarón. Tesis de Especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana. 2010.
25. Dey S. and Dora K. Optimization of de production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal Food Science Technology.* 2011.
26. Rocha-Pino Z., Shirai K., Arias L. y Vázquez-Torres H. Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de β quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2008; 7 (3): 299-307.
27. Gimeno M., Ramírez-Hernández J., Martínez-Ibarra C., Pacheco N., García-Arrazola R., Bárzana E. and Shirai K. One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *Journal of Agricol Food Chemistry.* 2007; 55: 10345–10350.
28. López-Mata M., Ruiz-Cruz N., Silva-Beltran P., Gassos-Ortega L. y Ornelas-Paz J. Aprovechamiento del residuo de camarón para la elaboración de recubrimientos comestibles con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. *Ideas CONCYTEG.* 2011; 6 (71): 552-560.
29. López-Cervantes J., Sánchez-Machado I. y Rosas-Rodríguez J. Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2006; 1105: 106-110.
30. Association of Official Analytical Chemists. Official method of analysis. 16th ed Washington (DC). 1999.
31. Cira L., Huerta S., Hall G. and Shirai K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry.* 2002; 37: 1359-1366.

32. Peterson G. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally aplicable. *Analitical Chemistry*. 1977; 83: 346-356.
33. Shirinivas M. and Stevens W. Chitin produccion by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan.
34. Kasaai M. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 2008; 71: 497-508.
35. Bajaj M., Winter J. and Claudia Gallert C. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangoncrangon shrimp waste. *Biochemical Engineering Journal*. 2011; 56: 51–62.
36. De Barros L., Marques N., Melchionna P. and Záchia M. Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. *Food Science and Technology International*. 2000; 6 (4): 301-306.
37. Folasade M. Olajuyigbe and Joshua O. Some properties of extracellular protease from *Bacilluslicheniformis* LBBL-11 isolated from “iru”, atraditionally fermented African locust bean condiment. *African Journal of Biochemistry Research*. 2008; 2 (10): 206-210.
38. Brandan N., Llanos C., Barrios B., Escalante M. y Ruiz D. *Enzimas*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina. 2008.
39. Juárez C. Obtención y caracterización de quitina biológica y su desacetilación a quitosano. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. 2012.

12. Anexos

12.1 Curva patrón de Seroalbúmina bovina realizada por el método de Lowry-Peterson



Anexo 1. Curva patrón de Seroalbúmina bovina realizada por el método de Lowry-Peterson