



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

**"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE QUITOSANAS
PROVENIENTES DE CRUSTACEOS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA MALDONADO VEGA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL AREA DE ALIMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA DEL CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN (CINVESTAV) Y EN EL LABORATORIO DE INGENIERIA AMBIENTAL DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE INGENIERIA UNAM, BAJO LA DIRECCION DEL DR. SERGIO CAFFAREL MENDEZ Y DE LA M. en I. GEORGINA FERNANDEZ VILLAGOMEZ.

AGRADECIMIENTOS

A LAS INSTITUCIONES CINVESTAV-IPN, UNAM Y CONACYT POR LAS FACILIDADES PRESTADAS PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

AL DEPARTAMENTO DE MATEMATICAS POR PERMITIR EL USO DE SUS SERVICIOS DE COMPUTACION.

AL INSTITUTO NACIONAL DE PESCA POR LAS FACILIDADES PARA LA OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE LANGOSTILLA, A TRAVES DEL CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION PESQUERA, LA PAZ, B.C.

AL FONDO DE ESTUDIOS E INVESTIGACIONES RICARDO J. ZEVADA POR EL APOYO ECONOMICO PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A LA Q.F.B. ARTEMISA POSADA (Jefe de Control Quimico), A LA Q.F.I. ISABEL WENZ, A LA Q.F.B. MARIA EUGENIA LAGARDE Y LA Q.F.B. ESTELA CADENA TODAS ELLAS DE LA SECCION DE SERVICIOS DE CONTROL ANALITICO Y EVALUACION DE CALIDAD DEL CINVESTAV-IPN POR LA AYUDA PRESTADA EN LAS DETERMINACIONES DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

A LA M. EN I. GEORGINA FERNANDEZ VILLAGOMEZ Y AL M. en I. BALTAZAR LUCERO M. POR EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACION DE UNA PARTE DE ESTE ESTUDIO, POR SU AMISTAD GRACIAS.

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS DE LA CARRERA DE BIOLOGIA DE LA GENERACION 83-86 POR COMPARTIR LOS MEJORES MOMENTOS EN UNA ETAPA DE NUESTRA FORMACION.

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS DEL AREA DE ALIMENTOS: BETTY, CONCHITA, ANA, ALEJANDRA, AUREA, NAHUN, RICARDO, GUSTAVO, ALBERTO, ARACELI, JUSTO, SERAFIN Y DON JUAN.

A TODAS Y CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE EN ALGUNA FORMA HAN CONTRIBUIDO EN EL LOGRO DE ESTE TRABAJO.

A MI DIRECTOR DE TESIS:

DR. SERGIO CAFFAREL MENDEZ, POR HABERME
GUIADO EN EL PRESENTE TRABAJO, POR SUS
VALIOSAS OBSERVACIONES A LO LARGO DE
ESTE ESTUDIO.

A MIS PADRES:

EMILIO MALDONADO S.
GUADALUPE VEGA DE M.

GRACIAS POR SU CARINO, APOYO Y COMPRESION
PARA LOGRAR UNA DE LAS METAS ANHELADAS.

A MIS HERMANOS:

MON, CAROLINA, MECHE, LILIA, LUPE, VERONICA,
AIDA, ALMA, EMILIO, MELO, EDUARDO, ALE, Y
SABINO.

PORQUE COMPARTIMOS LOS MEJORES MOMENTOS DE
NUESTRAS VIDAS COMO FAMILIA, POR SU ALEGRIA Y
CARINO.

CON CARINO Y RESPETO A MIS TIOS:

MA. DE LOS ANGELES VEGA Y LUIS MEDINA

MI SEGUNDA FAMILIA.

NOMENCLATURA

MUESTRAS ESTUDIADAS:

QB-Aa	QC-Aa	QR-Aa	QL-Aa
QB-Ca	QC-Ca	QR-Ca	QL-Ca
QB-An	QC-An	QR-An	QL-An
QB-Cn	QC-Cn	QR-Cn	QL-Cn

donde: Q = Quitosana; B = Camarón botalón; C = Camarón cristal; R = Camarón de roca; L = Langostilla mexicana; A = Acido acético; C = Acido clorhídrico.
a = Presión reducida de aire; n = Atmósfera de nitrógeno

QCS = Quitosana Comercial Sigma

Cat-floc = Polielectrolito catiónico sintético

DETERMINACIONES:

NKT = Nitrógeno Kjeldahl Total

ST = Sólidos Totales

SDT = Sólidos Disueltos Totales

SST = Sólidos Suspendidos Totales

UTN = Unidades de Turbiedad Nefelométricas

REACTIVOS:

HCl = Acido clorhídrico

NaOH = Hidróxido de sodio

EDTA = Acido etilendiaminotetraacético

AJUSTE MATEMATICO:

X = Concentración de floculante

Y = Porcentaje de Remoción de Turbiedad

X/Y = Eficiencia de Remoción de Turbiedad

CONTENIDO

	PAG
RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES	5
I.- Disponibilidad de la materia prima	6
I.1.- Distribución de la quitina en la naturaleza....	6
I.2.- Fuentes potenciales mundiales de materiales quitinosos	8
I.3.- Disponibilidad del recurso en México	10
I.4.- Aspectos del cultivo del camarón en México.....	12
II.- Métodos de extracción	13
II.1.- Obtención de quitina y quitosana	13
II.2.- Caracterización de polímeros quitinosos	17
III.- Usos de polímeros quitinosos	19
III.1.- Aplicaciones generales	19
III.2.- Tratamiento físico-químico de efluentes.....	19
III.3.- Remoción de metales pesados.....	23
MATERIALES Y METODOS	25
I.- Obtención de las materias primas	26
II.- Análisis de las materias primas	27
II.1.- Composición química proximal	27
II.2.- Contenido en quitina	28
II.2.1.- Método de Stelmock et al.	28
II.2.2.- Método de Welinder	29
III.- Obtención de quitosanas	30
IV.- Caracterización de las quitosanas obtenidas....	34
IV.1.- Composición química proximal	34
IV.2.- Determinación del contenido de grupos amino libres (Grado de desacetilación)	34
IV.3.- Determinación de viscosidad.....	35
V.- Pruebas de coagulación y floculación	35
V.1.- Análisis del agua residual	35
V.2.- Pruebas de jarras	35
V.3.- Ajuste matemático	36
VI.- Pruebas de quelación	36
VI.1.- Análisis estadístico	37

RESULTADOS Y DISCUSION	39
I.- Análisis de las materias primas	40
II.- Estudio de la eliminación de minerales de la mate- ria prima inicial	41
III.- Condiciones de tratamiento	42
IV.- Caracterización de los productos obtenidos	45
IV.1.-Porciento de desacetilación	45
IV.2.-Determinación de viscosidad	46
IV.3.-Porciento de rendimientos	48
V.- Caracterización de las muestras de agua.....	48
VI.- Pruebas de floculación de efluentes provenientes de una industria empacadora de carnes.....	48
VI.1.- Coagulación y floculación	48
VI.2.- Ajuste matemático	52
VI.3.- Determinación de sólidos finales	54
VII.- Pruebas de quelación	56
VII.1.- Quelación de metales	56
VII.1.- Influencia del pH	58
VII.2.- Selectividad	58
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	65
ANEXO	66
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

RESUMEN

Este trabajo consistió en la obtención y caracterización de dieciséis quitosanas provenientes de cuatro especies de crustáceos: Trachypenaeus similis, Penaeus brevirostris, Sicyonia brevirostris y Pleuoncodes planipes. La obtención se realizó siguiendo métodos tradicionales previamente reportados, mientras que la caracterización se efectuó mediante diversos análisis físico-químicos. Por otra parte, se determinó la capacidad coagulante y la capacidad quelante de los diferentes productos obtenidos, encontrándose que algunas muestras resultaron sumamente eficientes como agentes coagulantes en el tratamiento de aguas de proceso de una industria alimentaria. Esta capacidad coagulante de los diversos productos pudiera estar ligada al método de obtención aquí utilizado, mientras que la capacidad quelante respecto de tres metales (cobre, zinc y plomo) pudiera estar correlacionado además de las condiciones del método empleado de factores tales como el tiempo de contacto entre el quelante y metal empleado. De 8 quitosanas experimentales que se estudiaron, durante un tiempo de 15 hr. en soluciones con el metal a probar, se encontró que el atrapamiento siempre fue bastante bueno (90 hasta 100 %) valores que no se vieron influidos por el pH aquí empleado (5 y 7), sin embargo sí se ven influenciados por el tipo de quitosana que se emplee ($p < 0.005$).

I N T R O D U C C I O N

La quitina, polisacárido formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces glicosídicos beta-1-4, se le encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en el reino animal y en los hongos, llegando a constituir el segundo compuesto orgánico más abundante después de la celulosa.

En el caparazón de los crustáceos, la quitina forma parte de un sistema complejo, asociada con carbonatos de calcio, proteínas y otras sustancias orgánicas. Por lo mismo, en su obtención se involucran procesos de extracción.

El polisacárido extraído al someterse a una reacción de desacetilación da un derivado que es la quitosana. Esta debido a que en su estructura presenta grupos amino libres, exhibe interesantes propiedades policatiónicas, quelantes y como formadora de membranas.

En países como Japón, Italia y Estados Unidos se ha acostumbrado en los últimos años a tratar industrialmente los desechos generados por las industrias procesadoras del camarón y del cangrejo para la obtención de quitina y quitosana. Actualmente en dichos países se han venido realizando numerosos estudios referentes a estos polímeros con el fin de estudiar a fondo sus diferentes propiedades y múltiples aplicaciones.

En nuestro país, no obstante el gran potencial pesquero que poseemos, muy poco se ha estudiado acerca de la quitina y de la quitosana, y en parte debido a que se no existe ninguna industria dedicada para su extracción a pesar de que estos biopolímeros presentan gran aplicación en la industria químico-farmacéutica, agroalimentaria y de tratamiento de aguas.

En México el deterioro del agua provocado por los desechos domésticos e industriales vertidos en los efluentes receptores, ha tenido como consecuencia que la calidad de esta se vea seriamente afectada, considerándose éste como un serio problema.

En el tratamiento químico de las aguas, tradicionalmente se han empleado diversos compuestos químicos (sulfato de aluminio, cloruro férrico, hidróxido de calcio, entre otros). En los últimos años los compuestos quitinosos han despertado gran interés por sus aplicaciones como agentes coagulantes y floculantes, además de agentes quelantes en el tratamiento de aguas contaminadas por sólidos suspendidos y metales traza.

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de quitosanas a partir de diferentes especies de crustáceos con el fin de evaluar sus capacidades como agentes coagulantes y quelantes en el tratamiento de efluentes.

Como objetivos particulares se tenían: la caracterización de los productos obtenidos a través de diversos análisis físico-químicos, así como el estudio de su capacidad coagulante y quelante de las diferentes quitosanas y su comparación con un producto comercial y diferentes sales inorgánicas comúnmente empleadas.

A N T E C E D E N T E S

I.- DISPONIBILIDAD DE LA MATERIA PRIMA

I.1.- DISTRIBUCION DE LA QUITINA EN LA NATURALEZA.

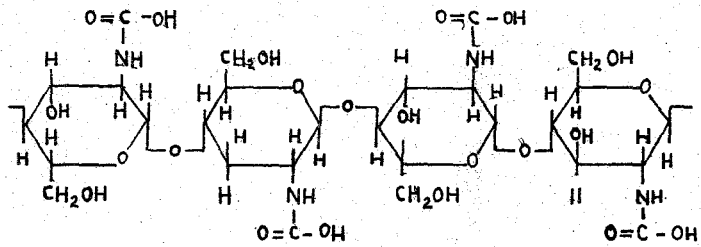
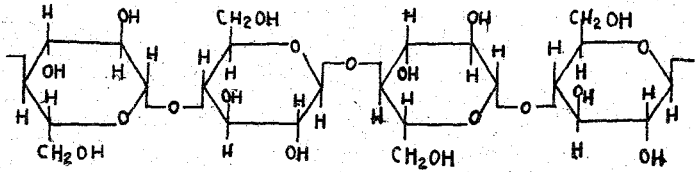
La quitina, polisacárido ampliamente distribuido en los reinos animal (invertebrados) y el de los hongos (mucorales), es considerada el segundo compuesto orgánico más abundante en la naturaleza después de la celulosa (1). Se le encuentra como componente principal del caparazón de artrópodos, en particular de crustáceos e insectos; en moluscos; en hongos y levaduras; en diatomeas y protozoarios (48). Su función principal es como material de estructura y defensa.

Desde el punto de vista químico la quitina es un polisacárido formado por unidades de aminoazúcares (2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa), unidas por enlaces glicosídicos del tipo beta-(1,4). Este aminopolisacárido es de tipo lineal, llegando a formar cadenas de 1000 a 3000 unidades de N-acetil glucosamina (39). Los polímeros quitinosos presentan estrecha relación con la celulosa (figura 1). La diferencia estructural es que en el C-2 de la quitina el grupo hidróxilo está sustituido por un grupo amino acetilado, en tanto en la quitosana éste es reemplazado por un grupo amino.

El nombre quitina (del griego chiton, túnica o cubierta), fue propuesto por Odier en 1823, para la sustancia aislada de los elitros de escarabajos. Este compuesto fue descubierto en 1811 por Braconnot, cuando tratando hongos con agua caliente, alcohol y álcali diluido, obtuvo una sustancia a la que llamó "fungina" (48). Más tarde en 1876 Ledderhose al tratar quitina de artrópodos con HCl obtuvo una sustancia cristalina (un aminoazúcar) a la que dió el nombre de glucosamina.

Debido a la posición que guardan los grupos acetil (2,3 trans) presentes en la cadena de la quitina, ésta al ser sometida a temperaturas de ebullición en soluciones concentradas de álcali, se remueven solo algunos de estos grupos, pudiendo existir unos cuantos grupos N-acetilados en el producto resultante (un grupo acetil por unidad de disacárido). Este polímero que se obtiene se le conoce como quitina desacetilada o quitosana la cual presenta una estructura de unidades de 2-amino-2-deoxy-D-glucopiranosas enlazadas por enlaces glicosídicos del tipo beta (1-4), (7,8).

C E L U L O S A



Q U I T I N A

Figura 1. Estructura del polímero celulosa y compuestos quitinosos.

I.2.- FUENTES POTENCIALES MUNDIALES DE MATERIALES QUITINOSOS.

Allan et. al. (1) han estimado que la cantidad de quitina potencialmente disponible en el mundo ascendería a 150 mil toneladas por año, tomando en cuenta la totalidad de los recursos disponibles (Tabla 1). Tanto la quitina como la quitosana, son típicamente obtenidas a partir de los caparazones de desecho generados en los procesos de pelado del camarón y del cangrejo. El potencial estimado para el caso de los crustáceos es de 39,000 toneladas anuales.

Otros recursos potenciales están dados por: a) las capturas de krill, el cual representa hasta 56 mil toneladas de desechos quitinosos por año; b) en el caso de moluscos, estos representan un potencial en quitina de 22 mil toneladas anuales. Sin embargo, el inconveniente que existe para este tipo de material es su alto contenido en sólidos, principalmente minerales como carbonatos de calcio, lo cual hace que el proceso de extracción de quitina sea largo y costoso; c) a partir de hongos el potencial llega a constituir hasta 32 mil toneladas. Existen otras fuentes (calamar, insectos) consideradas de menor importancia debido a los bajos rendimientos de extracción, sin embargo las quitinas que se obtienen son de buena calidad y son utilizadas para fines específicos.

En el exoesqueleto de crustáceos por lo general la quitina forma sistemas complejos con otros compuestos: De manera que constituye de un 14 a un 35 % del peso seco del caparazón en relación con otros componentes se tiene de un 25 a un 50 % en proteínas y grasas; y de un 25 a un 50 % de minerales (1,8). Tomando en cuenta los volúmenes de desechos generados en el procesamiento de especies marinas la quitina constituye alrededor de un 65 a un 85 % dependiendo del peso del organismo, de la especie procesada, y por otro lado de los mecanismos de limpieza empleados (1). Los valores de composición para otros organismos se muestran en la tabla 2.

TABLA 1 a
FUENTES POTENCIALES MUNDIALES DE QUITINA

ORIGEN DE LA QUITINA	CANTIDAD b COLECTADA	D E S E C H O S		Q U I T I N O S O S		
		FRAC. COLECTADA	PESO HUMEDO	SOLIDOS (%)	PESO SECO	POTENCIAL DE QUITINA c
Crustáceos ^{d,e}	1,700	50-60	468	30-35	154	39
Krill	18,200	40	3,640	22	801	56
Moluscos ^e	1,390	65-85	521	90-95	482	22
Calamar ^f	660	20-40	99	21	21	1
Hongos ^g	790	100	790	20-26	182	32
Insectos	-	-	-	21-56	-	-
TOTAL	22,740		5,518		1,640	150

Fuente (1)

3

- a) Estimaciones con base a valores promedio en toneladas x 10
b) Solo la mitad de los organismos colectados son procesados, excepto hongos donde la producción completa proviene como producto de fermentación.
c) Calculado usando valores promedio de contenido en quitina.
d) Incluye cangrejo, camarón, langosta, etc.
e) Promedio de 5 años (1970-1974) desembarco (almejas y ostras).
f) Cálculo asumiendo que la pluma es un 50 % de agua.
g) Subproductos de la manufactura de ácido cítrico y antibióticos, considerando que la cantidad de ácido cítrico y micelio son equivalentes, los desechos de antibiótico es de 50% no fungales.

TABLA 2

COMPOSICION QUIMICA DE DESECHOS QUITINOSOS (BASE SECA)

ORGANISMOS	COMPUESTOS INORGANICOS %	PROTEINA/ GRASAS %	QUITINA %
Crustáceos	25 - 50	25 - 50	14 - 35
Krill	24	61	7
Almejas/ostras	85 - 90	*	3 - 6
Calamar	*	76 - 95	1 - 2
Hongos	*	25 - 50	10 - 25
Insectos	*	60 - 80	0 - 8

Fuente: (1) * cantidades insignificantes

1.3.- DISPONIBILIDAD DEL RECURSO EN MEXICO

En las últimas décadas el mar ha representado una de las fuentes principales de explotación de recursos. En el país existe un potencial bastante considerable en lo que se refiere a capturas de crustáceos y moluscos (Tabla 3) (52).

De entre las especies marinas más explotadas, el camarón representa capturas promedio de 74 a 76 mil toneladas anuales, provenientes principalmente de los litorales del Golfo de México y del Pacífico (52). De esta cantidad únicamente es procesado el 55 % y se destina para la exportación. De este porcentaje el 25 % de los desechos generados en esta etapa (caparazones) están constituidos por quitina, por lo que se considera un potencial disponible en 1642 toneladas aproximadamente por año. Estas cifras no incluyen capturas que se obtienen por medio de la acuicultura en zonas de lagunas costeras y que en últimas fechas han tenido gran auge (21). Además si se evitaran las pérdidas en alta mar que representan hasta un 40 % del peso colectado y considerando otros recursos a partir de moluscos, jaibas, langostinos y fauna de acompañamiento del camarón, resulta obvio que el potencial será mucho mayor (52).

Por otra parte, para los litorales del Golfo y del Caribe principalmente en la sonda de Campeche y área de Contoy, una especie que forma parte del recurso camaronero y que ha adquirido gran importancia últimamente debido a que llega a constituir poco más del 70 % de las capturas totales, es el camarón de roca (*Sicyonia brevirostris*). Este organismo tiene especial interés debido a la dureza de su exoesqueleto y al problema que representa su procesamiento y disposición de los desechos. Cabe hacer notar que su explotación con fines comerciales es de época reciente y que se buscan alternativas para su mejor aprovechamiento (4).

Se puede mencionar también que en el Pacífico mexicano las especies de mayor captura son: el camarón rojo (Penaeus brevirostris), el café (P. vannamei), el cristal (P. stylirostris), y de forma secundaria el camarón botallón (Trachypenaeus similis pacificus), el camarón siete barbas (Xiphopenaeus riveti) y el camarón cebrá (Trachypenaeus fœa) (4).

TABLA 3

CAPTURAS DE CRUSTACEOS Y MOLUSCOS EN MEXICO (1984)

VOLUMEN DE CAPTURAS EN PESO VIVO, SEGUN GRUPO Y ESPECIES PRINCIPALES (PESO EN TONELADAS)

GRUPO Y ESPECIES	VOLUMEN DE CAPTURA TOTAL
<u>CRUSTACEOS:</u>	<u>89,365</u>
Camarón	76,114
Jaiba	6,968
Langostino	3,788
Langosta	2,303
otros	192
<u>MOLUSCOS</u>	<u>66,558</u>
Ostión	42,807
Almeja	9,550
Caracol	5,926
Pulpo	5,834
otros	2,441
<u>FAC*</u>	<u>6,138</u>

Fuente (52)

* Fauna de acompañamiento del camarón, potencial estimado 100 mil Ton/ anuales.

Finalmente otra fuente importante de material quitinoso de origen marino lo constituyen las capturas de langostilla (Pleuroncodes planipes). Su potencial está estimado en millones de toneladas (1), sobre todo en una etapa de su ciclo de vida, donde presenta congregaciones bien localizadas lo que hace obtener grandes cantidades de material fresco. Las capturas de estos organismos en el sureste de California se estiman en 27,300 toneladas. Asumiendo que de este material el 80% es agua y de los sólidos el 9% es quitina, la producción por año sería de 490 toneladas. Por supuesto que la langostilla presenta otros usos en acuicultura comercial como suplemento proteínico en dietas de peces o para la extracción de pigmentos. En este último caso, los desechos así generados pueden ser reutilizados para la producción de quitina y quitosana.

I.4.-ASPECTOS DEL CULTIVO DEL CAMARON EN MEXICO

El cultivo del camarón en México ha resultado más ventajoso que las capturas en alta mar. Así, desde 1985 a la fecha nuestro país ha tenido una gran expansión en este campo, donde se crece a un ritmo del 50 por ciento anual. Para 1987 se contaba ya con 78 granjas camaronerías, distribuidas en más de 5,000 hectáreas; considerando 27 granjas más que se encuentran en proceso de construcción, en este año (1988) se esperan tener 7,550 hectáreas abiertas al cultivo (21).

Del millón y medio de hectáreas de lagunas costeras, bahías y zonas estuarinas que existen a lo largo de las costas mexicanas y de acuerdo a la infraestructura con que se cuenta, solamente es aprovechable menos del 2% del potencial en cuanto al cultivo de crustáceos se refiere. Se calcula que para 1992, estarán abiertas al cultivo del camarón unas 70 mil hectáreas, con una capacidad de producción de 70 a 75 mil toneladas de camarón (peso vivo) al año, es decir una cantidad similar a la obtenida actualmente por las capturas en alta mar.

Con una tecnología perfectamente dominada, se obtendrían anualmente cantidades superiores a las capturas en el mar por la mejor flota camaronera. Esto es, mientras que un barco captura en una temporada de 25 a 30 toneladas del crustáceo en peso vivo, en una granja se obtiene el doble. Así en las granjas más sencillas se pueden generar de 600 a 700 kilos de camarón por hectárea por año; dos toneladas en las más tecnificadas.

Con base en los puntos antes mencionados y de cumplirse las expectativas, resulta obvio que la materia prima disponible para la extracción de polímeros quitinosos será considerable en los próximos años y de amplia disposición. Además, considerando las perspectivas de expansión para este tipo de industrialización en la explotación del camarón, la utilización de los desechos generados en su procesamiento sobre todo a nivel de granjas resultará atractiva.

Como se puede observar, el principal recurso potencial de quitina y quitosana en nuestro país, está representado por el gran volumen de capturas de crustáceos y las perspectivas de su cultivo. En igual forma otras fuentes secundarias están dadas por los moluscos y los desechos de hongos filamentosos generados en industrias fermentativas.

II.- METODOS DE EXTRACCION

II.1.- OBTENCION DE QUITINA Y QUITOSANA.

El proceso general para la obtención de quitosanas a partir de desechos de caparazones de crustáceos consiste en tres pasos principalmente:

- 1) Remoción del material proteínico.
- 2) Eliminación de los compuestos minerales.
- 3) Desacetilación del residuo (quitina) hasta la obtención de quitosana (figura 2).

No obstante que existen gran número de procesos para la extracción de los compuestos quitinosos, cuyas variantes se deben sobre todo al origen del material y usos al cual se destina el producto, las etapas arriba descritas son esenciales.

Usualmente estos procesos al incluir tratamientos drásticos para la remoción de minerales y proteínas que se encuentran en estrecha asociación con el material quitinoso, tienen como consecuencia inmediata una alta degradación del producto obtenido.

Algunos métodos para la obtención de quitina y quitosana que han sido desarrollados desde hace varios años. Tales procesos someten el caparazón de diversos crustáceos a un tratamiento con ácidos diluidos para la eliminación de sales minerales (carbonatos de calcio) y a un tratamiento a altas temperaturas con álcali diluido que solubilizan la proteína asociada.

Los métodos descritos como el de Hackman (1954, 1957), Rigby (1937), Broussinac (1968) y Bough *et al.* (1978) difieren en cuanto a las condiciones de tratamiento. En distintos procesos han empleado diferentes tipos de ácidos y álcalis pero los más utilizados resultan ser el HCl en concentraciones de 1 a 5% y NaOH de 1 a 10%, sin embargo otros procesos tales como el descrito por Whistler & BeMiller (1962) presenta condiciones especiales como el empleo de HCl al 37% y a -20°C; en tanto el descrito por Horowitz, Roseman & Blumenthal (1957) desmineralizan con ácido fórmico al 90% por 18 horas a temperatura ambiente. Mientras que el método descrito por Foster & Hackman (1957), el de Takeda & Abe (1962) y Takeda & Katsura (1964) emplean EDTA bajo condiciones controladas de pH y temperatura así como una digestión enzimática que son condiciones menos drásticas que los procesos anteriores (8,39). La duración del ácido y el álcali varían desde tiempos menores de una hora hasta diversos días y las temperaturas van desde menos de 0 a 100°C o inclusive 250°C. Las dificultades que se encuentran para aislar quitinas puras están íntimamente ligadas al proceso y a la remoción total o parcial del material asociado.

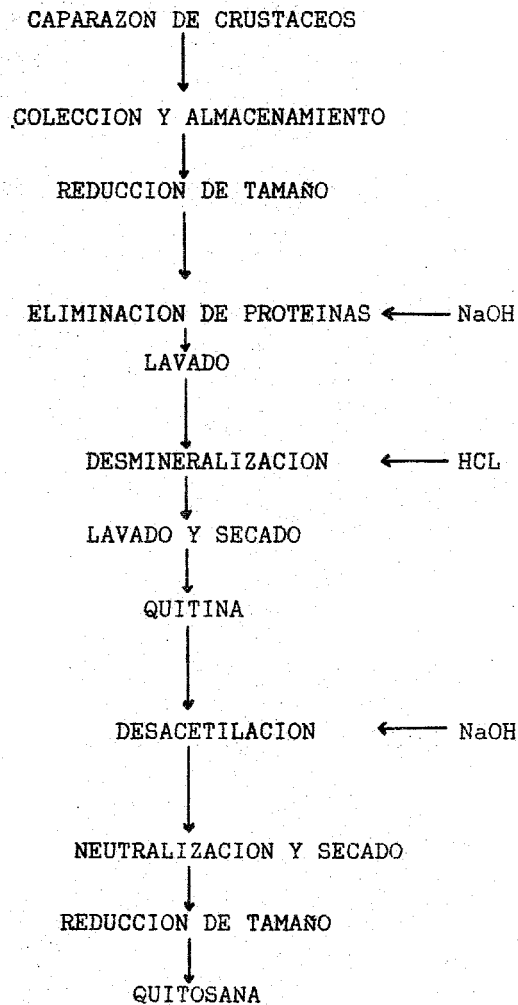


Figura 2 DIAGRAMA DE FLUJO SIMPLIFICADO PARA LA OBTENCION DE QUITINA Y QUITOSANA (28).

En forma general los métodos difieren en tiempos, temperaturas, reactivos, concentraciones de los mismos y origen del material. Sin embargo las etapas primeramente descritas siempre son efectuadas pudiendo variar el orden de los dos primeros pasos de acuerdo al método utilizado. De forma que al no haber un control adecuado de las diferentes variables durante el proceso de extracción los productos finales pueden diferir en términos de sus características en cuanto a valores de viscosidad, grado de desacetilación y degradación del polímero (7,48).

El control de la etapa de desmineralización constituye un paso muy importante en la preparación de quitosanas a partir de caparazones de camarón de forma que en esta etapa se modifica en gran parte las propiedades del producto, particularmente la viscosidad. Incrementos progresivos en la concentración del ácido usado en la desmineralización, hacen que ésta se incremente, pero concentraciones de 1.25 N o mayores de HCl provocan efectos adversos en la viscosidad de los productos finales (39).

La conversión de quitina hasta quitosana es activada por la remoción de grupos acetyl de la quitina dejando libres los grupos amino. Esta desacetilación involucra el uso de álcali concentrado a altas temperaturas, la duración de este tratamiento varía con el tipo de quitosana que se requiere.

En la conversión a quitosana se han empleado diversas condiciones algunas como las descritas por Horowitz et al. (1965) funden quitina con NaOH a 180°C durante 30 minutos; el proceso empleado por Rigby (1936), Wolfrom, Maher & Chaney (1958) y Wolfrom & She-han requiere NaOH al 40 % a 115°C durante 6 horas; Broussinag (1968) empleó una mezcla de KOH 50% etanol de 96 al 25% y monoetilenglicol al 25%; Fugita utilizó 10 partes de quitina con 10 partes de NaOH al 50% continuando con una mezcla de 100 partes de parafina líquida y agitando por 2 hs a 120°C y finalmente enfriando con 80 partes de agua, este proceso resulta simple y requiere de menos NaOH que en los procesos anteriores. Bough et al. (1978) emplearon NaOH al 50% por 5 y 15 minutos bajo una temperatura de 145 a 150°C bajo atmósfera de aire y de nitrógeno controlados.

En estudios previos (39) se ha encontrado que los principales factores que afectan el grado de desacetilación son: la concentración del álcali, temperatura de desacetilación, tiempo de reacción, tratamiento previo hasta quitina, el tamaño de partícula y densidad de la quitina. Estos dos últimos factores son de importancia pues afectan la penetración y la acción hidrolítica que ejerce el álcali sobre el material (7).

Otros estudios evidencian que las diferencias en los grados de desacetilación por un lado son atribuidas a la habilidad de los grupos acetyl de participar en dos tipos de enlaces en la cadena y que uno es más estable que el otro (48). De este modo una forma de lograr una reducción en estos grupos se puede lograr mediante tratamientos sucesivos con álcali.

Otro factor de importancia en la obtención de quitosana es la atmósfera de reacción: se ha observado que en una atmósfera inerte se obtienen quitosanas de mayor viscosidad que las obtenidas bajo una atmósfera de aire; de esta forma se atribuye al oxígeno efectos degradativos sobre el producto final (7,39).

Las variaciones entre métodos se refieren a tiempos, temperaturas y concentraciones del álcali, sin embargo todos poseen en común el empleo de NaOH a concentraciones entre 40 -50% (p/p) y temperaturas entre 100-130°C.

Existen etapas adicionales al proceso general que implican procesos de despigmentación o purificación mediante el uso de solventes orgánicos tales como acetona, éter y alcoholes refluados por un tiempo determinado.

II.2.- CARACTERIZACION DE POLIMEROS QUITINOSOS

La quitina y quitosana muestran una gran variación en sus propiedades químicas y físicas, esto debido a la diversidad en los métodos de preparación y al origen de la materia prima, de este modo se hace necesario el empleo de técnicas que permitan determinar sus propiedades para un mejor conocimiento de éstos y de sus áreas de aplicación.

La caracterización de quitosanas se efectúa por diversos métodos de tipo cuantitativo. Desde el punto de vista fisico-químico se consideran diversos parámetros a evaluar tales como: determinación de viscosidad, contenido en grupos amino libres, solubilidad, peso molecular, rotación óptica, análisis químico proximal, pruebas de eficiencia en cuanto a sus propiedades.

Algunas técnicas tales como difracción de rayos X y espectros infrarrojos han sido utilizadas por mucho tiempo para la descripción de diversas quitinas (44). Estas determinaciones requieren que las muestras a evaluar sean puras para la obtención de patrones de comparación que permitan diferenciar entre las formas cristalográficas (alfa, beta y gama). En los análisis mediante espectros infrarrojos la obtención de gráficas características permiten evidenciar la presencia de grupos específicos que confirman la identidad de las quitosanas. Pero estas técnicas presentan el inconveniente de tiempos muy largos o se requiere de instrumentación especial resultando poco prácticas si se les empleara a nivel industria.

Las determinaciones titulométricas permiten evaluar el contenido en grupos amino libres después de disolver la quitosana en ácido clorhídrico y al ser titulada con hidróxido de sodio, el porcentaje de grupos amino presentes en las muestras se calculan de los valores graficados (curvas de titulación) (12). Un método análogo para determinar de forma indirecta los grupos amino presentes en el producto final es la determinación del porcentaje de nitrógeno, sin embargo llega a ser una prueba muy ambigua debido a la estrecha relación entre las proteínas residuales y los grupos amino que se desean evaluar (10).

Una técnica recientemente probada que presentaría características aceptables en cuanto a que es rápida, sencilla y no se requiera de una instrumentación sofisticada además de ser precisa en la determinación de grupos amino mediante el uso de ninhidrina (34), de manera que se recomendaría como método de uso rutinario en el análisis de calidad de muestras de quitosana durante su extracción.

La viscosidad es un parámetro que ha sido empleado para este tipo de productos como prueba de pureza, esta característica igualmente varía dependiendo del método de extracción. Estas determinaciones permiten conocer que las quitosanas presentan un comportamiento no-newtoniano y pseudoplástico característico de grandes polímeros. Así mismo los compuestos quitinosos presentan el fenómeno de tixotropía, esto es, que la viscosidad decrece conforme transcurre el tiempo y se incrementa la temperatura de 2 a 25 °C (39). Este comportamiento no es tan drástico como pudiera pensarse pero tampoco es despreciable. Por supuesto que el ácido en el que la quitosana es disuelta limita la vida media del polímero, pero en periodos cortos la viscosidad no se altera grandemente (45).

La determinación de grupos acetyl involucra la hidrólisis de la muestra en álcali, acidificación con ácido fosfórico, y titulación del ácido acético liberado. Esta determinación es una prueba clara de efectos hidrolíticos. El grado de acetilación también puede obtenerse a partir de los espectros infrarrojos, esto de acuerdo al contenido en grupos amino determinados por el método titulométrico.

III.- USOS DE POLIMEROS QUITINOSOS

III.1.- APLICACIONES GENERALES

Los polimeros quitinosos han sido evaluados en áreas diversas, tales como las industrias quimico-farmacéutica, agroalimentaria y en el tratamiento de aguas (Tabla 4) (5,6,28).

TABLA 4

APLICACIONES DE POLIMEROS QUITINOSOS.

A p l i c a c i ó n :	P o l i m e r o :
Como agente quelante	Quitosana, quitina
Aditivo en industria papelera y textil	Quitosana, quitina
Adhesivos	Quitosana, quitina
Coagulante	Quitosana
En productos fotográficos	Quitosana
Portador de medicamentos	Quitina
Acelerador de cicatrización	Quitina
Material para suturas quirúrgicas	Quitina

Fuente: (5)

La quitosana, debido a que posee grupos amino libres los cuales contribuyen a sus propiedades policationicas, además de su fácil disolución en ácidos diluidos, es mucho más utilizada que la quitina de la cual deriva. Otros usos de estos polimeros han sido: como componentes de cosméticos; como agentes insecticidas para el control de plagas de plantas; en nutrición animal y en nuevas aplicaciones en la industria del papel.

Como agente coagulante en la industria de tratamiento de aguas residuales la quitosana ha llamado mucho la atención, debido a su efectividad en la separación de coloides y partículas dispersas en el agua (24,26). Este compuesto ha sido aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica en concentraciones no mayores de 10 mg/l para el tratamiento de agua potable. En el Japón ha sido utilizado como ayuda coagulante desde hace aproximadamente unos 30 años (28).

III.2.- TRATAMIENTO FISICO-QUIMICO DE AFLUENTES

Los compuestos coagulantes son evaluados mediante pruebas de jarras donde el parámetro a estudiar es la reducción en turbiedad del efluente después de ser tratado. Las condiciones óptimas de concentración del polimero, pH y temperaturas en ocasiones resultan muy específicas dependiendo de las características y origen de las aguas de desecho. Estas pruebas son utilizadas para el control de calidad de los procesos de coagulación en plantas de tratamiento.

La quitosana y diversos polímeros sintéticos han sido evaluados como coagulantes en el tratamiento de aguas de desecho provenientes de industrias alimentarias (6). Se ha encontrado que la quitosana es particularmente efectiva en la remoción de proteínas así como en la coagulación de subproductos que pueden servir como fuentes de proteínas para alimentación animal. La reducción de sólidos suspendidos y demanda química de oxígeno (DQO) han sido evaluadas en diversos tipos de efluentes alimentarios tales como:

a) En aguas de proceso de vegetales, donde el efluente estudiado contenía 1600 mg/l de sólidos suspendidos, estos fueron reducidos a 6 mg/l por un tratamiento con quitosana, estos valores fueron comparables con el polielectrolito aniónico WT-3000, ambos compuestos resultaron muy efectivos para este tipo de efluente.

b) En el caso de aguas de procesamiento de aves (escaldado, enfriamiento y efluente final). Los efectos combinados de la quitosana y la sedimentación redujeron los sólidos suspendidos (SS) así como la demanda química de oxígeno (DQO) del efluente, en el efluente de enfriamiento en un 60% y 62% respectivamente. En el de escaldado de 77% y 46%, la cantidad de quitosana requerida en el efluente de enfriamiento fue de 6 mg/l y de 30 mg/l en el de escaldado.

c) En efluentes de rompimiento de huevos, se emplearon concentraciones de quitosana de 100 a 200 mg/l combinada con 2 a 20 mg del polielectrolito aniónico Belz 1130 resultando con esto un mejoramiento en la formación de los flóculos. Los sólidos suspendidos fueron reducidos por un 70 a 90% y la DQO por un 55 a 75%. El tratamiento óptimo de coagulación se encontró de 100 mg/l de quitosana con 20 mg/l de Betz 1130 con la recuperación de los sólidos presentes en el agua.

d) En la activación de lodos de cervecera, en casos recientes se ha encontrado que la quitosana actúa como un condicionante en el que se mejora la biodegradabilidad de estos lodos. Las concentraciones fueron de 75 mg/l o mayores encontrándose que los óptimos fueron de 0.6 a 0.8% relativo a los sólidos, la reducción fue de 12000 mg/l a menos de 600 mg/l lo que corresponde a un 95% de efectividad. Generalmente las dosis de 2 a 20 mg/l (p/v) de quitosana han resultado muy efectivas como coagulantes en suspensiones de lodos activados (7,9).

e) En el agua de desecho del empaquetamiento de carnes, la quitosana ha sido evaluada junto con otros polímeros (6). Diferentes pruebas demostraron que la quitosana fue la más efectiva en una concentración de 30 mg/l seguida por otros polímeros sintéticos Atlasep 105 C (+), Natron 86 (+) y Betz 1100 (-) con reducciones de 6.1, 11, 50 y 51 FTU (unidades de turbiedad formazin) respectivamente, estas pruebas se efectuaron al pH del efluente que es de 7.5.

Otras determinaciones mostraron que el rango de pH entre 7 y 8 fue el óptimo y las concentraciones de quitosana fueron de 30 a 40 mg/l alcanzándose reducciones de sólidos suspendidos de 89 % desde 465 a 49 mg/l y la DBO reducida por un 55%. En el caso de estos efluentes se han podido observar efectos de sobredosis del polímero (quitosana) de manera que la turbidez se ve aumentada debido a una reestabilización de los sólidos en la fase de suspensión de los floculos.

Así mismo la quitosana ha resultado efectiva en el tratamiento de aguas del proceso de curado de carnes. Los efectos combinados de la quitosana junto con FeCl en la remoción de la turbidez al mínimo valor de 4.4 FTU fue obtenida con un tratamiento de 10 mg/l de quitosana con 40 mg/l de FeCl₃, los sólidos fueron reducidos en un 95% desde 165 a 8 mg/l y la DQO de 72% desde 865 a 240 mg/l.

f) En aguas del proceso de camarón, se mostró que la dosis óptima para su tratamiento fue de 75 mg/l de sulfato de aluminio, 2mg/l del polímero magnifloc 835 A y pH 5. Las remociones fueron de 87%, 72% y 52% obtenidas para grasas, sólidos suspendidos y DQO respectivamente. La quitosana fue comparada con 21 polímeros sintéticos cada uno a 10 mg/l a pH de 6 a 7 los valores de turbiedad fueron desde 30 a 10 FTU. La quitosana combinada con un polímero aniónico WT-3000 (10 mg/l:5 mg/l) WT-3000 la turbiedad resultó de 10 FTU, la reducción en sólidos fue de 94% desde 2808 a 178 mg/l y la DQO por un 76% desde 6500 a 1560 mg/l.

g) En efluentes de frutas, la coagulación de sólidos se efectúa con 2 mg/l de quitosana y una sedimentación de 2 horas, con una reducción de SS por 94% desde 522 hasta 33 mg/l, la DQO reducida por un 47% .

h) La quitosana como coagulante en suero de quesería, se ha demostrado que la concentración óptima fue de 49 a 62 mg/l con un contenido inicial de 2270 mg/l de sólidos suspendidos obteniéndose una reducción de 90% a un pH de 6. La efectividad de las quitosanas llega a variar en base a las condiciones de su extracción (8), sin embargo las dosis para estos estudios pueden ir entre 70 hasta 150 mg/l con reducciones desde 90 a un 95 % de la turbiedad inicial (60).

i) En otros estudios, la quitosana ha sido utilizada como agente floculante en la recuperación de diferentes cultivos de microalgas utilizadas en maricultura, observándose que la eficiencia de floculación es mayor bajo ciertos valores de pH (8 a 9). Esta habilidad floculante es explicada en base a que siendo la quitosana un polielectrolito con carga positiva puede interactuar con superficies cargadas negativamente como en el caso de la pared celular de estos organismos (38).

En algunos estudios efectuados en la India, la quitosana fué comparada con sulfato de aluminio y ambos coagulantes fueron evaluados en pruebas de jarras. Los resultados mostraron que la quitosana superó a las del sulfato de aluminio, así de una turbiedad inicial de 3200 UTN con 300 mg/l de sulfato de aluminio se redujo a 90 UTN en tanto con 1 mg/l de quitosana se redujo a 10 UTN. Además, la quitosana como co-coagulante puede efectuar una mayor reducción en la turbiedad (0.15mg/l de quitosana más 20 mg/l de sulfato de aluminio) de hasta 4 UTN que cuando se usa como coagulante primario (57).

Ciertamente se puede observar que la quitosana puede ser utilizada en tratamientos fisicoquímicos en el tratamiento de diversos efluentes alimentarios resultando ser competitiva o aún más efectiva que otros polímeros sintéticos utilizados comercialmente.

III.3. - REMOCION DE METALES PESADOS

Los polimeros quitinosos han sido evaluados en cuanto a su propiedad como agentes quelantes (39, 41). En estudios previos efectuados en agua de mar contaminada por metales, se encontró que tanto la quitina como la quitosana han resultado muy efectivas en este tipo de tratamientos. La mayoría de los estudios atribuyen esta habilidad a que el esqueleto de anhidroglucosa del polimero tiene un alto contenido de nitrógeno en forma de grupos amino libres, los cuales son sitios receptores para la acumulación de los metales.

La captación de metales ha sido observada desde sistemas biológicos (algas) relacionado con el polisacárido presente en su pared celular "la quitina". Por otro lado, derivados celulósicos y quitinosos han sido probados en la captación de diversos metales resultando muy eficientes (30,50) los primeros muestran altos valores de quelación pero solo para ciertos metales además de que liberan los iones atrapados - por simples lavados, a diferencia de los polimeros quitinosos que funcionan para un mayor número de metales en forma más efectiva (42,44), en estos últimos tal parece que la mayor o menor captación de los metales depende esencialmente del grado de desacetilación por la disponibilidad de los sitios activos, los grupos amino libres.

Modificaciones efectuadas en las quitinas con glutaraldehído mejoran su propiedad como quelante además de su solubilidad en agua, la capacidad de adsorción así modificada, es atribuida a un aumento de la hidrofiliidad del polimero y a una mejor disponibilidad de los grupos amino. De manera que una mayor hidrofiliidad es esencial para los derivados quitinosos con alta capacidad de quelación por los metales (31,32).

Estudios previos (32,35,41,54) reportan que la capacidad de quelación por parte de la quitosana se ve incrementada en presencia de sulfato de amonio, ácido sulfúrico o glutaraldehído, de forma que la interacción polimero-metal se ve favorecida en un intervalo de pH entre 5.5-7.5, durante esta etapa se cree que el equilibrio de la solución existe una mejor disposición de los grupos amino. Las quitosanas así tratadas acarrean los grupos $-\text{NH}_3^+\text{SO}_4^-$, de forma que los metales catiónicos funcionan como ácidos de Lewis capaces de reaccionar con diversas bases incluido el nitrógeno y el oxígeno.

Se ha observado que la quitina y la quitosana tienen diferentes capacidades de fijación de metales, estas diferencias se deben esencialmente en que la quitosana posee un número mayor de grupos amino disponibles los que le confieren una mayor capacidad quelante, mientras que los grupos N-acetil de la quitina que actúan como los sitios de ligamiento para los metales son menos eficientes en comparación con los grupos amino libres, esta baja capacidad de fijación de los sitios de la quitina es debida a que se establecen enlaces de hidrógeno que impiden la quelación por los distintos metales (39).

En otros trabajos (30,49) se menciona que además de los grupos amino considerados como sitios específicos de ligamiento, existe un mecanismo intermedio entre cationes, donde los iones metales presentan una mayor afinidad por los sitios de ligamiento y son mayormente retenidos. La interacción entre aniones y cationes con las quitosanas, se explican mediante un mecanismo selectivo, donde los aniones interactúan más fácilmente y mucho más rápido que los cationes. Por una parte se considera que los grupos NH_2 de la quitosana actúan como una base débil y los protones en solución crean los grupos NH_3^+ . Esta protonación ocurre rápidamente y explica el porqué la quitosana funciona como polielectrolito catiónico en solución acuosa.

La carga positiva de los grupos NH_3^+ impiden que los metales interaccionen inmediatamente con el polímero, en tanto esto ocurre, existe la formación de un complejo intermedio entre los grupos amino y el anión ($\text{NH}_3^+ - \text{anión}^-$) ocurriendo así una neutralización de la carga (desprotonación). De esta manera los iones metales pueden atacar el par de electrones disponibles del nitrógeno formando un fuerte enlace covalente (50,39).

También se sabe que la quitosana se entrelaza parcialmente con reactivos di o polifuncionales confiriéndole mayor resistencia a la solubilización cuando esta se utiliza en efluentes de pH ácido (36).

En el fenómeno de quelación entre quitosanas y metales se sugiere que ocurren tres pasos importantes: 1) el intercambio iónico, 2) la absorción y 3) la quelación. Estos pasos ocurren y varían en grado de acuerdo al metal en estudio.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

I.- OBTENCION DE LAS MATERIAS PRIMAS.

Las especies de crustáceos utilizadas en este estudio se enlistan en la tabla 7. Los caparazones (cáscaras) de las primeras tres especies fueron colectadas a partir del proceso de pelado durante su comercialización en el mercado de productos marinos "La Viga" (Ciudad de México).

TABLA 7

DESECHOS DE CRUSTACEOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCION DE QUITOSANAS

ORIGEN DEL DESECHO*	NOMBRE CIENTIFICO
Camarón botalón	<u>Trachypenaeus similis pacificus</u>
Camarón cristal	<u>Penaeus brevirostris</u>
Camarón de roca	<u>Sicyonia brevirostris</u>
Langostilla mexicana**	<u>Pleuroncodes planipes</u>

* caparazón sin valor comercial.

** se trabajó con la harina del organismo entero.

Los caparazones trasladados al laboratorio, se sometieron a varios lavados con agua corriente así como a una separación manual del tejido remanente cada especie fue manejada por separado. Una vez lavado el material se secó en estufa de tiro forzado a 70°C durante un tiempo de 16 horas aproximadamente.

Posteriormente, se efectuaron dos procesos de reducción de tamaño de partícula: a) molienda en grueso que se realizó en un molino manual, y b) molienda fina, que se hizo en molino eléctrico Modelo Dumore, 578 HP utilizando malla 0.40 equivalente a un tamaño de partícula de 1 mm. Este tamaño fue elegido con base a estudios previos por ser un tamaño suficiente para la extracción de proteína intrínseca en un tiempo mínimo de una hora (8,15). Las harinas obtenidas fueron analizadas en cuanto a su composición química proximal.

En cuanto a la especie de langostilla mexicana (Pleuroncodes planipes), ésta fue proporcionada por el Centro Regional de Investigación Pesquera-La Paz. B.C.S. a través del Instituto Nacional de Pesca de la Ciudad de México, D.F. En este caso la harina del organismo entero fue sometida a análisis directamente.

II.- ANALISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS

A cada una de las harinas de las diferentes especies se les realizaron las siguientes determinaciones:

II.1.- COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL

HUMEDAD: Se realizó de acuerdo al método 7.003/70 de la A.O.A.C. (2)

CENIZAS: Método 7.010/70 de la A.O.A.C. (2)

EXTRACTO ETereo: De acuerdo al método 7.047/70 de la A.O.A.C (2)

NITROGENO TOTAL: Se empleo el método micro-kjeldahl 42.014/70 del A.O.A.C. (2)

PROTEINA CRUDA: Se obtiene multiplicando el porciento de nitrógeno total por 6.25

FIBRA ACIDO DETERGENTE: Método de Van Soest (1963) reportado por Stelmock et al (54).

II.2.- CONTENIDO EN QUITINA

El contenido en quitina ha sido determinado convencionalmente con base a la metodología propuesta por Stelmock et al. (54). El método empleado ha sido la determinación de Fibra Acido Detergente debido a la similitud en la estructura molecular entre la quitina y la celulosa, ambos biopolímeros constituyen el principal material fibroso de diversas estructuras y que resisten a la digestión ácido detergente de modo que quedan como residuos que pueden ser evaluados gravimétricamente.

II.2.1.- METODO DE STELMOCK et al (54)

Se pesaron aproximadamente 0.2 g de muestra seca, los cuales se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. A la muestra se le adicionaron 20 ml. de la solución ácido detergente. Esta solución se preparó de la siguiente manera: A un litro de ácido sulfúrico 1 N se le agregaron 20 g de bromuro de cetil trimetil amonio grado técnico. El matraz Erlenmeyer se colocó sobre una parrilla de calentamiento, tapando la boca del matraz con un refrigerante. El sistema así preparado se dejó a temperatura baja para que iniciada la ebullición esta fuera suave durante un tiempo de 60 minutos.

Por otro lado se pesaron crisoles de vidrio de fondo poroso previamente puestos a peso constante, a través de los cuales se filtró la solución del matraz, lavando dos o tres veces con agua caliente. Finalmente, se llevaron a peso constante en estufa de vacío. Para realizar los cálculos de fibra ó quitina presente en la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{FAD} = \frac{\text{CF} - \text{C}}{\text{W}} \times 100$$

donde:

FAD = Porcentaje de fibra ácido detergente
 CF = Peso constante del crisol con fibra, (gramos)
 C = Peso constante del crisol, (gramos)
 W = Peso inicial de la muestra seca, (gramos)

II.2.2.- METODO MODIFICADO DE WELINDER (54)

Este método consistió en una modificación al reportado por Welinder (57) donde: Se pesó un gramo de cada muestra de harina seca. Estas se colocaron en un matraz erlenmeyer de 250 ml. para descalcificarlas en presencia de 40 ml de EDTA al 0.1M dejando en incubación a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm y decantadas. Los residuos fueron transferidos a matraces Erlenmeyer y llevados a reflujo a 95° C en 400 ml de NaOH 2N durante una hora. Este paso se realizó con el fin de eliminar el material proteínico presente en las muestras. Una vez realizado esto las muestras calientes fueron filtradas con ayuda de vacío a través de filtros de fondo poroso puestos previamente a peso constante y lavados tres veces con agua caliente. Finalmente, los residuos se llevaron a peso constante a 60 C en estufa de vacío, para posteriormente ser transferidos a crisoles gooch. Estos se colocaron en la mufla a 550 C durante 2 horas, con el fin de determinar el contenido en cenizas. El cálculo para determinar el contenido en quitina se efectuó mediante la fórmula:

$$\text{A} = \frac{100 (\text{B} - \text{C})}{\text{D}}$$

donde:

A = Contenido en quitina, (porcentaje)
 B = Peso de los residuos secos, (gramos)
 C = Peso de las cenizas, (gramos)
 D = Peso inicial de la muestra seca, (gramos)

III.- OBTENCION DE QUITOSANAS

La metodología seguida para la obtención de quitosanas se basó esencialmente en la descrita por Bough et al. (8). (Figura 4), La cual está basada en tres pasos principales:

a) DESMINERALIZACION: Previamente se realizaron pruebas de remoción de minerales del caparazón de camarón de roca utilizando cuatro tipos de agentes químicos a diferente concentración: ácido acético al 5% (v/v), ácido clorhídrico 1 N, ácido tricloroacético al 10% (p/v) y ácido etilendiaminotetraacético sal disódica 0.1 M. A partir de los cuales se escogieron los dos primeros ácidos para efectuar esta etapa con cada una de las cuatro muestras de crustáceos en una relación 1/10 (p/v), durante un tiempo de 8 a 12 horas en agitación constante utilizando propelas eléctricas y a temperatura ambiente. El residuo fue colectado y lavado con agua destilada hasta neutralidad, finalmente se secó a 100° C en estufa de tiro forzado por un periodo de 6 a 16 horas.

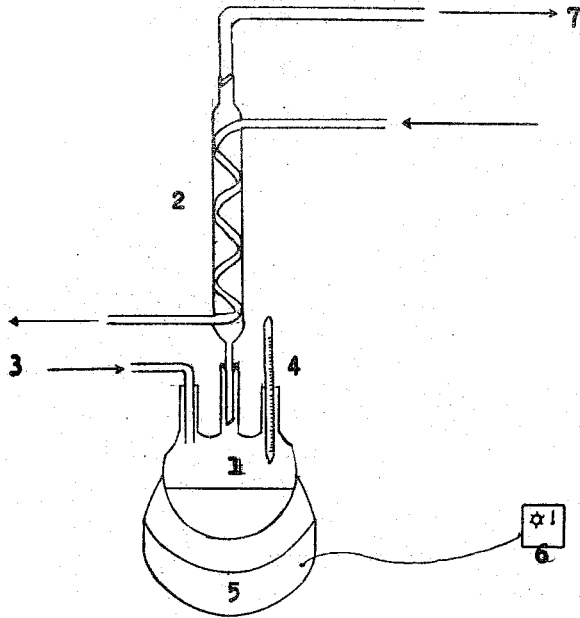
b) DESPROTEINIZACION: Las proteínas adheridas intrínsecamente al caparazón fueron removidas convencionalmente por extracción con alcali diluido. El material desmineralizado se colocó en un matraz redondo de 2 L de capacidad con una solución de NaOH al 3% durante un tiempo de una hora en condiciones de reflujo (100 - 110° C). El material desmineralizado y desproteínizado (quitina) se lavó con agua destilada y se secó en estufa de tiro forzado a 50° C.

c) DESACETILACION DE LA QUITINA: La hidrólisis de los grupos acetil presentes en la estructura molecular de la quitina se llevó a cabo por la acción de una solución concentrada de NaOH al 50% (p/v) a temperatura de ebullición 100 -110°C durante un tiempo de 4 horas. Se hicieron bajo dos tratamientos de presión: a) presión reducida de aire, y b) atmósfera de nitrógeno en un matraz balón de 3 bocas de 2 litros de capacidad (figura 3).

Una vez que se determinaron las condiciones de desmineralización y desproteínización para la obtención de quitina y su derivado quitosana, las cuatro especies se trabajaron bajo condiciones similares a las ya descritas.

En base al proceso de obtención (2 agentes desmineralizantes, 2 atmósferas de desacetilación) y al material disponible (4 especies de crustáceos) se obtuvieron finalmente 16 muestras diferentes de quitosanas.

Faltan las páginas 30 y 31



- 1) Matraz de tres bocas
- 2) Sistema de refrigeración
- 3) Entrada de Nitrógeno y/ vacío
- 4) Termómetro
- 5) Mantilla de calentamiento
- 6) Reóstato
- 7) Sistema de regulación de temperatura

Figura 3. Sistema de tratamiento para la obtención de quitina y quitosana durante las etapas de desproteínización y desacetilación.

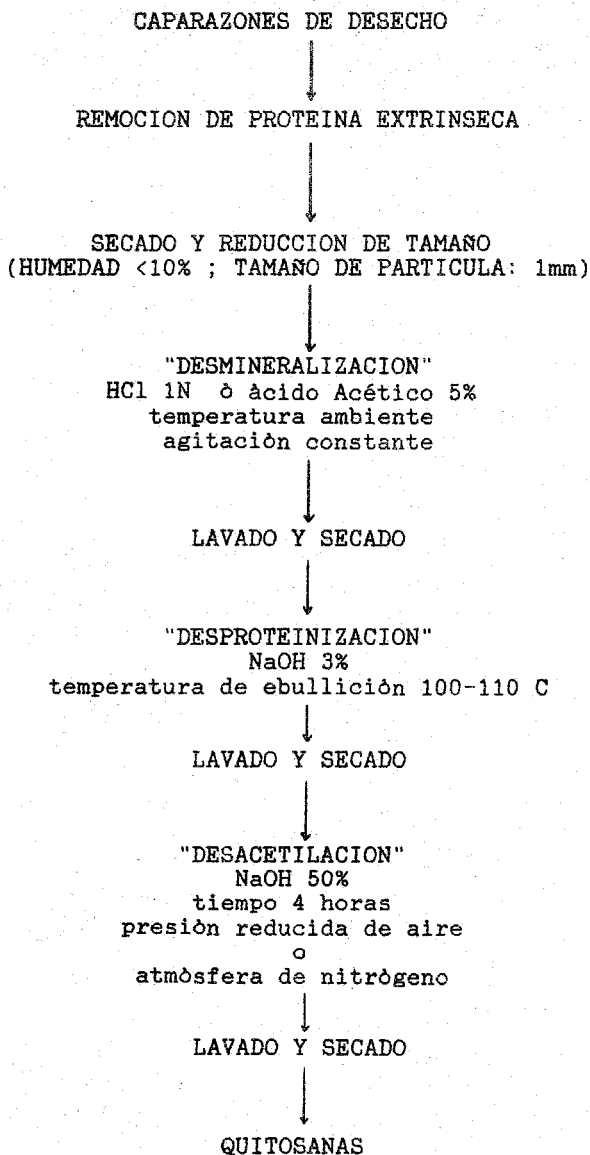


FIGURA 4 DIAGRAMA DE FLUJO USADO PARA LA OBTENCION DE QUITOSANAS (METODO MODIFICADO DE BOUGH et al. (8)).

IV. - CARACTERIZACION DE LAS QUITOSANAS OBTENIDAS

A las 16 quitosanas se les practicaron diversos análisis fisicoquímicos con el fin de caracterizarlas. Simultáneamente se efectuó lo mismo con un producto comercial (quitosana marca Sigma) para poder hacer comparaciones directas.

IV.1. - COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL:

Los porcentajes de humedad, cenizas, extracto etéreo y nitrógeno total, se obtuvieron de acuerdo a los métodos de la A.O.A.C. (2) (ver materiales y métodos II.1).

IV.2. - DETERMINACION DEL CONTENIDO EN GRUPOS AMINO LIBRES (GRADO DE DESACETILACION)

La base del método es la presencia de grupos amino libres determinados por titulación, donde el alcali consumido entre dos puntos de inflexión representan la formación de la sal con los grupos amino libres contenidos en la muestra (Figura 5)

El grado de desacetilación fue determinado con base al método de Broussignac (47): las muestras de quitosanas (200 mg) fueron disueltas en 20 ml de HCl 0.1N y diluidos con 60 ml de agua desionizada. Esta solución fue titulada con NaOH 0.1 N usando un potenciómetro Beckman Modelo 4500. Los puntos obtenidos fueron graficados (pH vs volumen de alcali gastado). En dichas gráficas se obtuvieron dos puntos de inflexión los cuales se compararon contra un patrón de glucosamina para realizar el cálculo del porcentaje de desacetilación, este se efectuó mediante una simple regla de tres tomando a la glucosamina como 100% de grupos amino libres.

IV.3. - DETERMINACION DE VISCOSIDAD

Las lecturas de viscosidad fueron llevadas a cabo en un viscosímetro Brookfield Modelo LVF a temperatura de 25° C utilizando propelas del número 2 y 3, a velocidades de 30 y 60 rpm. En estos experimentos se utilizaron muestras de 500 ml cada una de soluciones al 3% (p/v) de quitosanas libres de humedad y cenizas, disueltas en solución al 3% (v/v) de ácido acético. Los valores reportados de viscosidad fueron promedios de dos determinaciones.

V. - PRUEBAS DE COAGULACION Y FLOCULACION

V.1. - ANALISIS DEL AGUA RESIDUAL

El agua residual o de proceso se obtuvo de una industria empacadora de carnes localizada en la ciudad de México a partir del proceso de cocción de jamones y otros embutidos.

Las muestras fueron colectadas a temperaturas entre 60 - 90°C y colocadas en un cuarto de refrigeración (4°C) hasta su uso en el laboratorio. Primeramente se realizó el análisis químico del agua residual: determinaciones de sólidos totales (ST), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos disueltos totales (SDT), turbiedad, acidez, pH, nitrógeno kjeldahl total (NKT), grasas y aceites con base en los métodos estándar (2,3)

V.2.- PRUEBAS DE JARRAS

Inicialmente se realizaron pruebas exploratorias para determinar las mejores condiciones de pH y dosis óptima necesarias para llevar a efecto los procesos de coagulación. Posteriormente se evaluó la efectividad de los distintos polímeros obtenidos en el laboratorio, en el tratamiento de aguas de proceso de una industria agroalimentaria, comparándolos contra una quitosana comercial, un polielectrolito catiónico y dos sales inorgánicas ($Al_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$).

Las pruebas de jarras consistieron en lo siguiente: Se coloca un litro de muestra de agua en un vaso de precipitado de 2 L realizándose el ajuste de pH hasta el valor deseado con ayuda de ácido acético 2% ó NaOH 0.1N. Los vasos se colocan bajo un aparato de agitación "Jart Tests" Modelo Phipps-Bird. Las dosis de coagulantes en el caso de las quitosanas fueron disueltas previamente en ácido acético al 1%, las muestras así preparadas fueron adicionadas a un mismo tiempo a cada una de los vasos, mezclando a 100, 30, y 20 rpm según los tiempos indicados en la figura 6. Las muestras se dejaron sedimentar por 10 minutos y finalmente se tomo una muestra de sobrenadante de cada uno de los vasos al cual se le determinó turbiedad en un turbidímetro Hach Modelo 2100 A, pH, sólidos totales (ST), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos disueltos totales (SDT) de acuerdo con los métodos estándar (3).

V.3.- AJUSTE MATEMATICO

La eficiencia de coagulación fue establecida en base a los valores de turbiedad iniciales y finales. Por un lado se estudió el efecto de pH sobre la coagulación, y por el otro, la influencia de la concentración de los biopolímeros y productos comerciales utilizados.

Para cada una de las muestras, la prueba de jarras se realizó sobre un rango de concentraciones de 0 - 600 mg/l. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicados y los datos

obtenidos fueron entonces evaluados por medio de un análisis de regresión (60). Después de que los modelos fueron seleccionados, las derivadas fueron obtenidas para tener los valores de X y Y en los puntos de inflexión, lo cual suminis-

tró información acerca del porciento de reducción máxima en la turbiedad (Y) a la concentración óptima de coagulante (X), para cada producto. Esta información fue convertida en un cociente de Y/X, el cual representó la máxima eficiencia de los productos en términos de porciento de reducción en la turbiedad por unidad de concentración (mg/l) de cada muestra de coagulante.

VI.- PRUEBAS DE QUELACION

Las quitosanas obtenidas por desacetilación a presión reducida de aire (8 muestras) y la quitosana comercial Sigma fueron evaluadas con respecto de su capacidad de quelante de 3 iones metálicos, adaptando la metodología reportada por Muzzarelli et al. (45) y por Kurita et al (31).

Se prepararon soluciones 0.0005M de los metales a estudiar ($ZnSO_4$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$) utilizando agua desionizada. De estas soluciones estocck se tomaron 50 ml y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml ajustandose a dos diferentes valores de pH (5.0 y 7.0). Se añadieron 200 mg. de quitosana colocandose los matraces en agitación constante (80 rpm) durante 15 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, las soluciones fueron filtradas a través de papel Whatman número 1 con ayuda de equipo de vacío. A los filtrados obtenidos se les determinó el pH tomándose enseguida alicuotas de 10 ml. y aforando éstas con agua desionizada. Las concentraciones de metal residual presente en el filtrado fueron determinadas por espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 560.

El porciento de quelación para cada ión metálico de cada una de las quitosanas evaluadas se determinó con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

donde:

A = Porciento de ión quelado
C_i = Concentración inicial del ión
C_f = Concetración final del ión

VI.1.- ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos en las pruebas de quelación respecto a los tres metales fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) pudiéndose comparar el tipo de muestra, la variación del pH y la eficiencia de remoción de los metales pesados (anexo).

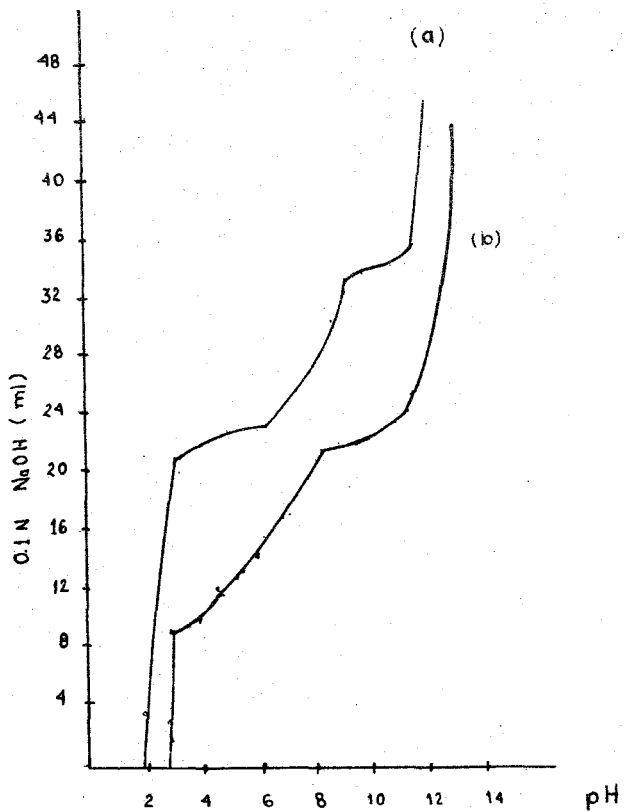


Figura 5. (a) Curva de titulación para la D-Glucosamina
 (b) curva de titulación para la quitosana -
 QB-Aa.

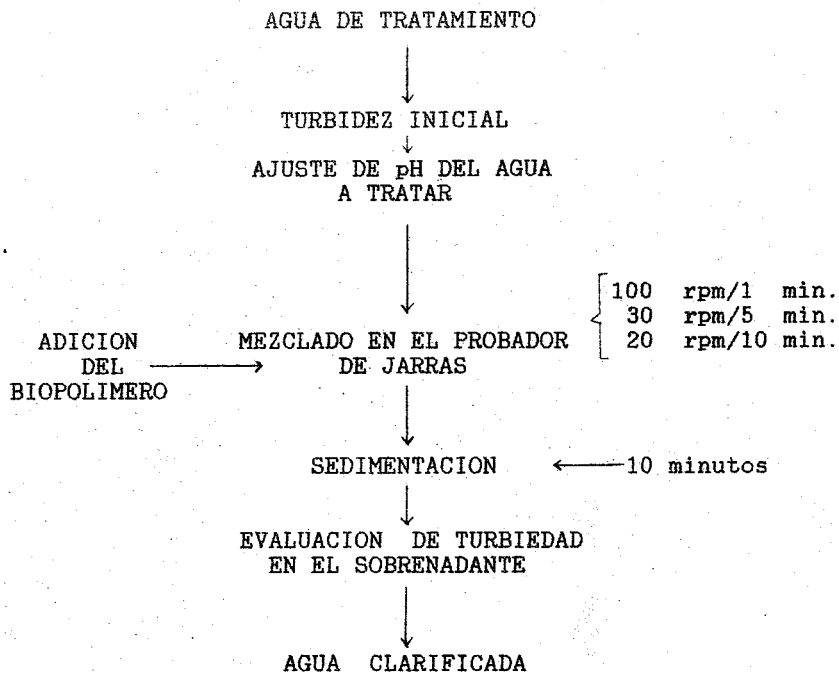


Figura 6 Diagrama de flujo del proceso de coagulación y floculación en un probador de Jarras.
Fuente: Fernández, (20).

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

I. - ANALISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS

En la tabla 8, se pueden observar los resultados del análisis químico proximal de las diferentes harinas de crustáceos. Según la especie de crustáceo considerada, el contenido de material mineral es variable, con valores que van desde 26 a 55 %. Los valores de proteína igualmente son variables según la especie, desde 15 a 40 %. Los resultados obtenidos para fibra ácido detergente representan una estimación de la quitina contenida en los caparazones de desecho, en base a estudios previos (1,54,56) estos valores se encuentran dentro de los reportados, en el caso de las tres primeras especies en que la harina estaba constituida esencialmente de caparazones, mientras que en el caso de la langostilla la harina se preparó a partir del organismo completo, razón por la cual los valores de grasa fueron mayores para esta especie y más bajos para las tres primeras.

TABLA 8
ANALISIS QUIMICO PROXIMAL DEL MATERIAL INICIAL

MUESTRA	%C *	% N **	% F.A.D. ***	% E.E. ****
CAMARON BOTALON	26.3	39.6	23.6	2.8
CAMARON CRISTAL	43.9	15.2	23.4	1.5
CAMARON DE ROCA	54.8	20.8	21.4	1.1
LANGOSTILLA	26.0	33.6	8.2	19.1

Resultados en base seca. Determinaciones por duplicado.

- * Cenizas totales.
- ** Nitrogeno Kjeldahl total x 6.25
- *** Fibra Acido Detergente.
- **** Extracto Etéreo.

La determinación de quitina, por el método de F.A.D., es de gran utilidad puesto que es una determinación precisa, y aplicable para este tipo de material por la gran similitud de la estructura molecular entre la quitina y la celulosa, en la que originalmente fué empleada (54).

Las diferencias encontradas en el contenido de quitina, para las especies estudiadas, creemos que son debidas a las relaciones existentes entre quitina y compuestos asociados (minerales y proteínas), y por otro lado la influencia del estadio en que se encuentran los organismos.

La aplicación de dos métodos en la determinación de quitina, fue con el fin de verificar cual era el más adecuado, entre el EDTA-NaOH y F.A.D., en ambas determinaciones encontramos valores muy semejantes (datos no mostrados), pero el método de EDTA-NaOH implica tiempos mucho más largos para su determinación, que el método de F.A.D.

De este modo al no existir diferencias significativas entre ambos métodos, la determinación de quitina por este último es más recomendable, durante la digestión ácido detergente las proteínas y minerales asociados son eliminados en el mismo proceso, mientras que por la naturaleza fibrosa de la quitina, esta resiste al tratamiento de digestión permaneciendo como residuo, el cual es cuantificado como residuo quitinoso.

II. - ESTUDIO DE LA ELIMINACION DE MINERALES DE LA MATERIA INICIAL.

Uno de los componentes que existen en mayor abundancia en la mayoría de las especies marinas, son las sales minerales principalmente el carbonato de calcio, por lo que un paso para la obtención de quitina a quitosana, involucra primero una eliminación de estos componentes, mediante el uso de ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido acético, sulfúrico, EDTA, entre otros. En nuestro caso, se emplearon los ácidos clorhídrico y acético, por dos razones, el clorhídrico es el más ampliamente utilizado tanto en laboratorio como a mayor escala para la producción de quitinas y por otro lado como estudio comparativo en su efecto sobre las características de nuestros productos.

En el laboratorio se realizó la determinación de cenizas, para cuantificar la proporción de carbonato de calcio que existía en las muestras; tomando en cuenta que al determinar cenizas totales, las referimos a óxido de calcio según la siguiente ecuación:



Con las cenizas determinadas para los cuatro tipos de harinas (caparazones), se realizaron calculos de los mililitros necesarios de ácido clorhídrico para la eliminación de minerales, los resultados se muestran en la tabla 9.

TABLE 9
HCL NECESARIO PARA DESMINERALIZACION SEGUN ESPECIE

MUESTRA	CENIZAS (%)	HCL ml 100 gr*
C. BOTALON	25.36	38.32
C. CRISTAL	43.03	65.05
C. DE ROCA	54.97	81.60
LANGOSTILLA	24.13	36.48

* valores calculados

Como se puede observar el ácido necesario para la eliminación total de minerales varía de una especie a otra, debido a que cada una presenta un contenido diferente en minerales. Las condiciones bajo las cuales se trataron las muestras, fue en base a reportes previos (8), en el que se utilizó una relación muestra:ácido de 1:10, los ácidos empleados fueron clorhídrico 1N y acético al 5%. Debido a que en las muestras no se llevó una eliminación total de minerales, se efectuaron pruebas de desmineralización con la especie de mayor contenido en cenizas (camarón de roca) encontrándose que con un aumento de volumen en el ácido empleado (1:40) muestra ácido se logra una reducción de 1.7 % de cenizas en tanto que a una concentración mayor del ácido al 10% la relación se reduce a (1:20) con resultados semejantes (2.5%). Como se puede observar en la Tabla 10, la relación óptima extracción aquí encontrada es tres veces más a la que normalmente se reporta. Pero debemos tomar en cuenta que esta relación varía de acuerdo a la concentración del ácido y al contenido en sales según la especie.

TABLA 10
DESMINERALIZACION DE CAMARON DE ROCA, UTILIZANDO ACIDO ACETICO AL 5 Y 10%, EN DISTINTA RELACION MUESTRA:VOLUMEN.

ACIDO ACETICO 5%				ACIDO ACETICO 10%			
RELACION P/V	AGITACION (H)		% C*	RELACION P/V	AGITACION (H)		% C*
	4 **	24 ***			0****	4**	
1/20	11.3	8.1	11.7	1/10	-	8.4	8.5
1/20	12.2	7.3	7.7	1/20	-	2.5	2.5
1/40	1.7	2.8	1.7	1/40	-	2.5	2.5
1/40	1.7	2.6	2.7	1/40	1.7	-	1.7
1/80	1.7	1.3	1.3	1/80	-	1.5	1.5
1/80	0.8	1.5	1.4	1/80	1.4	-	1.4

- * Cenizas promedio de tres determinaciones.
 ** Cenizas a 4 horas de agitación
 *** Cenizas a 24 horas de agitación a 80 rpm
 **** Cenizas sin agitación

III.- CONDICIONES DE TRATAMIENTO

En cuanto a los métodos para la extracción de polímeros quitinosos, la información es amplia, así como las fuentes a partir de las cuales se han extraído. Indudablemente que las condiciones bajo las cuales se obtienen estos polímeros tienen gran influencia sobre las características finales del producto. En la medida que cada uno de estos factores sea controlado se obtendrán productos con mejores propiedades.

En base a la experiencia, con cada una de las especies aquí estudiadas, las condiciones de extracción fueron heterogéneas porque si bien, el método fue bajo condiciones de extracción semejantes, existieron factores que no se controlaron de forma adecuada, tales como el proceso de desmineralización. Así los resultados obtenidos fueron variables (Tabla 11) y en muchos de los casos no se pueden comparar, por un lado porque partimos de cuatro especies distintas de crustáceos en la que investigaciones anteriores reportan diferencias interespecies en la constitución de la quitina presente en el caparazón (10,11). De forma que cada una de las muestras presenta características propias Tabla 11. Por otro lado, algunos autores (1,10,39), mencionan que la variación entre las quitosanas, esta en función del método empleado y en menor grado de las especies utilizadas. Comparando los valores de caracterización para las quitosanas obtenidas a partir de una misma especie, y bajo condiciones similares de extracción no necesariamente se obtienen quitosanas con propiedades iguales, y por tanto pueden o no parecerse con las de otras especies. De esta forma, se puede observar que el método para su extracción juega el papel más importante en las características de las quitosanas.

El conocimiento de las propiedades de cada una de las quitosanas, nos permitió entre otras cosas cuantificar si el proceso de manufactura era el adecuado para nuestro material, si las características resultaban ser las apropiadas (como son desacetilaciones por arriba de 60 %, y viscosidades altas) para el estudio planteado y que se garantizara la reproducibilidad en los resultados, de esta forma el proceso puede ser modificado según la especie con que se trabaje, ya que una de las diferencias radicó esencialmente en contenidos de minerales, y por ello puede requerir de tratamientos distintos para la eliminación más efectiva de estos componentes.

Con base en nuestros resultados, se pudo observar que existen especies que presentan características apropiadas, para la extracción del polímero, sobre todo que pueden ser seleccionadas, ya sea porque tienen un bajo contenido en el material asociado a la quitina (proteínas y minerales), lo que repercute en un proceso más corto (horas), en comparación con el material que posee altos contenidos en proteínas y minerales, y por tanto implica procesos largos (días) y aunque se somete a condiciones semejantes de extracción, esta no es homogénea de forma que resulta ser incompleta en algunos casos, con repercusión en las propiedades del producto.

Para las muestras que se trabajaron con ambos ácidos y bajo presión reducida de aire, suponemos que las variaciones entre estas muestras influyó el tiempo de exposición al ácido

TABLA 11
ANALISIS QUIMICO PROXIMAL DE LAS QUITOSANAS
EXPERIMENTALES

MUESTRA*	%E. E.	%N	% C	%QUITOSANA (desacetilada)	% RENDIMI- ENTO. (chitosana)
QB-Aa	0.63	6.50	1.5	87.4	26.9
QB-Ca	0.74	7.05	0.3	88.4	28.8
QB-An	0.85	5.90	9.2	44.4	26.6
QB-Cn	0.55	6.18	12.3	46.6	13.2
QC-Aa	0.81	7.70	4.8	85.9	31.5
QC-Ca	0.42	7.70	0.8	80.8	12.3
QC-An	0.78	7.00	19.7	47.4	34.5
QC-Cn	0.91	5.92	1.2	46.7	29.5
QR-Aa	0.96	6.25	4.0	80.8	28.9
QR-Ca	0.84	6.96	1.8	96.0	33.2
QR-An	0.65	6.14	25.9	52.6	32.1
QR-Cn	0.39	5.85	0.4	54.0	18.6
QL-Aa+	1.60	5.17	3.5	48.1	06.7
QL-Ca+	2.80	6.75	4.7	49.6	09.2
QL-An+	0.43	6.40	6.5	59.2	10.8
QL-Cn+	0.13	6.25	4.4	44.4	10.8
QC.	0.72	5.96	1.5	78.8	-
GLUCOSAMINA	-	-	-	100.0	-
QUITINA**	-	-	0.5	13.6	-

Resultados en base seca.

Determinaciones por duplicados

* Productos obtenidos con base al método previamente reportado (8)

** Valores reportados en la bibliografía (7)

+ Quitosanas de langostilla obtenidas a partir de harina del organismo completo, mientras que las demás son a partir de harina del caparazón.

(8 a 12 h), provocando cambios en los que existe una degradación estructural, tal que el ácido clorhídrico, siendo un ácido fuerte puede conllevar a un proceso más brusco, mientras que el acético presentó un proceso más suave en la eliminación de minerales, sin embargo, como ya se mencionó el clorhídrico es el más utilizado a nivel laboratorio e industria.

Brine & Austin (10), observaron que los productos desmineralizados son parcialmente degradados dependiendo del ácido utilizado, de tal forma que las quitinas sufren hidrólisis ácida y alcalina, y conforme el proceso sea más o menos prolongado estos productos decrecen en pesos moleculares por efecto en la pérdida de enlaces glicosídicos y grupos funcionales (pérdida de acetilos). En estos estudios se puede ver que la utilización de ácidos distintos definitivamente se alteran las características del producto (quitosana). Otros investigadores reportan que la simple manipulación química y física de las especies para obtener quitina y de esta a quitosanas se obtienen productos con propiedades significativamente diferentes.

En este trabajo, la desmineralización fue realizada en dos etapas, esto es, una primer relación 1:10, con repetición de este paso para asegurarnos de una separación casi total, se observó que la eliminación de minerales depende mucho más de la relación muestra:volumen (quitinas/ácido) que del tiempo de contacto, ya que si el volumen no es el suficiente aún con un tiempo largo la eliminación de minerales es incompleta. En base a los cálculos estequiométricos antes descritos se pudo corroborar lo observado en el laboratorio Tabla 10.

En la determinación de viscosidad los minerales presentaron efectos e interacciones en las propiedades de las quitosanas, tal como se expone más adelante.

IV. - CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

IV.1. - PORCIENTO DE DESACETILACION

El grado de desacetilación de las quitosanas, es una de las características de mayor importancia y que depende de los grupos amino libres presentes, los cuales le van a conferir propiedades importantes para su utilización. Como se puede observar en la Tabla 11, parece existir un efecto entre las atmósferas de tratamiento, de forma que las muestras tratadas bajo una presión reducida de aire presentaron un porcentaje de desacetilación mayor (por arriba de 80%) que las tratadas bajo atmósfera de nitrógeno, tal efecto creemos que se debió a que en la primera condición, se logró

reducir e incluso eliminar el oxígeno atmosférico el cual ejerce un efecto degradativo en las muestras (8), en el segundo caso, el efecto provocado por el flujo del gas nitrógeno al recipiente de reacción, provoca una reducción drástica de la temperatura de tratamiento de 110 a 60 °C, de tal forma que se logra una atmósfera inerte pero a baja temperatura, y por consecuencia una reacción de tipo heterogénea, ya que la inyección del gas fue intermitente por periodos de 10 minutos, en tales condiciones se obtuvieron quitosanas en la que los valores de desacetilación fueron más bajos (44 a 58%) que los tratados a presión reducción de aire.

IV.2.- DETERMINACION DE VISCOSIDAD

Como se muestra en la tabla 12, los valores de viscosidad en quitosanas fueron variables para cada una de estas. El comportamiento aquí observado, fue que el material desmineralizado con ácido clorhídrico, presentaron valores más altos respecto de las muestras tratadas en acético. En estudios anteriores (9-11), se menciona que en presencia de sales la viscosidad decrece, esto nos sugiere que los valores bajos en la mayoría de los casos se encuentran en estrecha relación por la presencia de minerales no extraídos totalmente durante la desmineralización, pudiendo así existir una interacción de las sales remanentes de las muestras y el ácido que se emplea para la determinación de la viscosidad. De esta forma ocurre una reacción entre el calcio y el ácido acético dando lugar a la formación de acetato de calcio insoluble. Es de notarse que en ausencia de sales, las muestras presentaron valores más altos. Creemos que de acuerdo al proceso aquí empleado y en base a reportes previos (9), existe un segundo efecto sobre los valores de viscosidad, las sales minerales no removidas, principalmente el carbonato de calcio puede convertirse a hidróxidos por el uso de álcali concentrado en la etapa de desacetilación (4 h), y por consecuencia no existe una reducción del contenido de calcio debido a la insolubilidad del hidróxido formado ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). De tal forma que al estar presente, la viscosidad se ve disminuida.

Así mismo, conforme la etapa de desacetilación se prolonga, los valores de viscosidad se ven disminuidos. Tal efecto, parece estar relacionado con la concentración del álcali y las altas temperaturas empleadas (9,12,36), estudios previos reportan que este último factor causa una degradación mayor en la longitud de las cadenas del polímero, mientras que, a bajas temperaturas el efecto degradativo es mínimo por lo que valores bajos en viscosidad, se infiere a que la muestra fue preparada a altas temperaturas, como ocurrió en nuestro caso.

TABLA 12

DETERMINACION DE VISCOSIDAD EN QUITOSANAS EXPERIMENTALES

ATMOSFERA REDUCIDA DE AIRE		ATMOSFERA DE NITROGENO	
MUESTRA	(cP)	MUESTRA	(cP)
QB-Aa	164	QB-An	7.3
QB-Ca	45	QB-Cn	253.0
QC-Aa	3	QC-An	16.4
QC-Ca	134	QC-Cn	88.0
QR-Aa	2	QR-An	464.0
QR-Ca	3325	QR-Cn	775.0
QL-Aa	73	QL-An	10.0
QL-Ca	979	QL-Cn	40.0

Determinaciones realizadas por duplicado.

cP.- centipoises

Debido a que las quitosanas que obtuvimos muestran gran variación en sus valores, esto nos sugiere que el proceso de desmineralización es una etapa determinante, en nuestro caso por la naturaleza del material inicial se hace necesario un control más eficiente.

IV.3. - % PORCIENTO DE RENDIMIENTOS

En la tabla 11 se muestra los rendimientos para cada una de las muestras obtenidas, los resultados más bajos corresponden a las muestras extraídas a partir de langostilla donde los porcentajes de quitina para esta especie son menores respecto de las otras muestras de camarón. Los valores están dados, por el proceso de tratamiento hasta quitosanas, encontrándose que los valores corresponden a la quitina presente en los caparazones de las especies estudiadas.

V. - CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS DE AGUA.

La composición del agua con la que se probaron los polímeros experimentales se muestra en la tabla 13. Como se puede observar, está presente un contenido alto de sólidos totales, con una turbiedad de 110 UTN; así mismo los valores de grasas y aceites aquí encontrados son muy altos respecto al máximo permitido para las aguas residuales industriales que es de 70 mg/l y el valor determinado fue de 432 mg/l. En base a estas características se hace necesario un tratamiento previo antes de ser vertidas al alcantarillado como usualmente se hace con estas aguas.

TABLA 13

COMPOSICION PROMEDIO DEL AGUA DE COCCION DE UNA INDUSTRIA EMPACADORA DE CARNES.

PARAMETROS	VALORES *
SOLIDOS TOTALES	2271 mg/l
SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES	250 mg/l
SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES	188 mg/l
SOLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS	62 mg/l
SOLIDOS DISUELTOS TOTALES	2021 mg/l
ACIDEZ	135 mg/l
GRASAS Y ACEITES	432 mg/l
NITROGENO KJELDAHL TOTAL	93 mg/l
pH	7.3
TURBIEDAD	110 UTN

* promedio de cuatro determinaciones (3)

VI. - PRUEBAS DE FLOCULACION DE EFLUENTES PROVENIENTES DE UNA INDUSTRIA EMPACADORA DE CARNES.

VI.1.- COAGULACION Y FLOCULACION

Los fenómenos de coagulación y floculación han sido objeto de diversas investigaciones, donde se han desarrollado las teorías que explican los mecanismos que ocurren durante la precipitación de sólidos presentes en las aguas residuales, o potables. En los procesos de tratamiento de aguas se ha observado la importancia del efecto del pH y la influencia que ejerce sobre la eficiencia en estos procesos de coagulación-floculación se realizaron pruebas preliminares para encontrar el pH óptimo del proceso, los valores estuvieron comprendidos entre 3.5 y 9.5, en base a los resultados se encontró que para nuestro caso no existían diferencias significativas en este rango de pH estudiado respecto del pH natural del agua, por lo cual se optó por trabajar al pH del efluente (pH 7.3), punto en cual se evita el ajuste de pH y por tanto reducción en costos de tratamiento.

Los resultados obtenidos acerca de la reducción de turbiedad se muestran en la tabla 14, las dosis probadas fueron de 0 a 600 mg/l, los valores estan dados en Unidades de Turbiedad Nefelométricas (UTN), a grandes rasgos se podrá ver que las muestras QB-Aa, QB-Ca, QC-Ca, QC-Cn, QR-Cn, y QL-An, presentaron los mejores resultados en cuanto a disminución en la turbiedad por debajo de 10 UTN a dosis bajas con valores que van de 10 a 40 mg/l, comparadas con la quitosana comercial figura 7, mientras que para el resto de las muestras para alcanzar valores semejantes de turbiedad se requirió de dosis mayores, efecto que se atribuye a la presencia de sales minerales no eliminadas.

VI. - AJUSTE MATEMATICO

En la Tabla 15, los valores estan dados en porciento de reducción de la Turbiedad, a partir de los cuales se realizó un ajuste matemático para cada muestra mediante un análisis de regresión (59), a partir de las ecuaciones cúbicas se calcularon los valores para X y Y (Tabla 16) a partir de estos obtuvo la información acerca del porciento de reducción más alta en la turbiedad (Y), para el agua estudiada hasta alcanzar el máximo en la reducción de turbiedad a la concentración óptima del coagulante (X).

Mediante la ecuación:

$$Y = f (X (1), X (2), X (3))$$

La eficiencia óptima de cada quitosana fue evaluada, donde Y representa el porcentaje de reducción en la turbiedad; X(1), la concentración del coagulante en mg/l, y X(2) y X(3) son el cuadrado y el cubo de la concentración respectivamente.

Los datos calculados se muestran para las 16 quitosanas estudiadas comparadas con una quitosana comercial, un producto sintético, y dos sales; los cálculos están dados para una reducción en turbiedad del 95% con la dosis mínima, en base a estos valores de Y/X nos está representando la eficiencia de remoción de sólidos, en las muestras de quitosanas del camarón botalón esta relación presenta valores bastante buenos tal como se verificó en los datos de reducción en la turbiedad (Tabla 14 y 15).

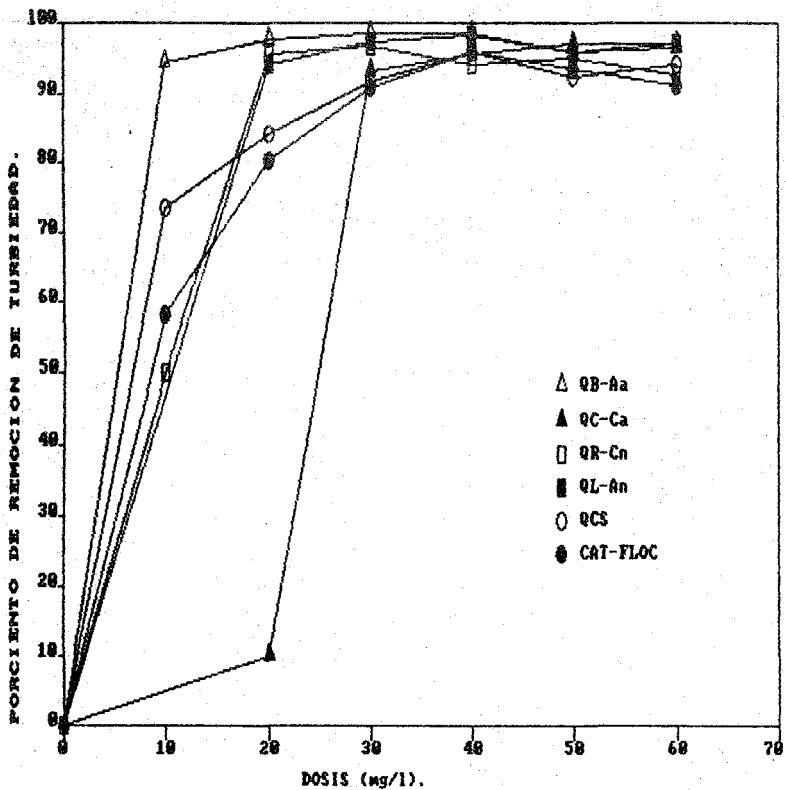


FIGURA 7. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE DIVERSOS AGENTES FLOCULANTES SOBRE LA REMOCION DE TURBIEDAD EN EL AGUA CRUDA A pH NATURAL (Escala Ampliada).

TABLA 14

REMOCION DE TURBIDEZ (UTN) EN AGUAS DE DESECHO DE UNA EMPACADORA DE CARNES A pH NATURAL (7.35) UTILIZANDO QUITOSANAS EXPERIMENTALES

Muestra	Concentración mg/l					
	10	20	30	40	50	60
QB-Aa (2)*	6.0	2.5	1.6	1.7	4.4	4.0
QB-Ca (2)	5.3	1.4	2.4	5.5	6.0	5.6
QB-An (2)	51.0	39.0	36.0	32.0	27.0	27.0
QB-Cn (2)	44.0	30.0	19.0	15.0	17.0	7.4
QC-Aa (2)	55.0	57.0	55.0	55.0	59.0	55.0
QC-Ca (2)	290.0	99.0	7.4	4.9	3.1	3.3
QC-An (1)	37.0	32.0	26.0	20.0	16.0	16.0
QC-Cn (1)	22.0	15.0	8.6	5.4	4.0	3.5
QR-Aa (2)	55.0	53.0	55.0	53.0	50.0	50.0
QR-Ca (1)	55.0	15.0	56.0	53.0	17.0	10.0
QR-An (2)	110.0	42.0	38.0	13.0	8.0	13.0
QR-Cn (2)	55.0	4.7	3.5	6.4	5.5	8.0
QL-Aa (1)	39.0	96.0	36.0	53.0	36.0	33.0
QL-Ca (1)	66.0	63.0	63.0	60.0	58.0	32.0
QL-An (2)	140.0	6.6	3.0	2.0	4.5	3.1
QL-Cn (2)	59.0	60.0	59.0	66.0	40.0	35.0
QSC (3)	8.0	3.3	5.0	4.5	8.4	6.4
Cat-floc	46.0	41.0	25.0	4.4	7.1	9.6
FeCl ₃		32.0	38.0	-	42.0	-
Al ₂ (SO ₄) ₃		93.0	100.0	47.0	52.0	55.0

	Concentración en mg/l					
	100	200	300	400	500	600
QB-An (2)	140.0	5.6	4.3	2.9	3.0	2.2
QB-Cn (2)	7.0	3.7	3.6	7.0	3.3	5.3
QC-Aa (2)	48.0	43.0	36.0	35.0	18.0	21.0
QC-An (2)	5.6	2.5	2.3	4.7	5.9	9.5
QC-Cn (2)	1.8	1.4	1.3	3.2	2.9	1.8
QR-An (2)	3.9	33.0	53.0	67.0	65.0	97.0
QR-Cn (2)	64.0	53.0	72.0	50.0	48.0	50.0
QL-Aa (2)	3.5	1.5	3.5	5.0	-	-
QL-Ca (2)	9.6	2.4	2.3	4.5	6.6	8.4
QL-Cn (2)	7.2	2.9	2.0	3.2	6.2	7.3
FeCl ₃ (2)	18.0	2.6	2.6	-	-	-
Al ₂ (SO ₄) ₃	22.0	1.4	3.4	22.0	8.5	-

* () número de repeticiones

Turbidez inicial del agua a tratar: 110 UTN

TABLA 15

PORCIENTO DE REMOCION DE TURBIEDAD EN AGUAS DE DESECHO DE UNA INDUSTRIA EMPACADORA DE CARNES, UTILIZANDO QUITOSANAS EXPERIMENTALES.

Muestra	Concentración mg/1					
	10	20	30	40	50	60
QB-Aa	94.5	97.7	98.0	96.0	96.4	94.4
QB-Ca	95.2	98.7	97.8	95.0	94.0	95.0
QB-An	53.6	64.5	67.3	70.9	75.5	75.5
QB-Cn	60.0	72.7	82.7	86.4	86.5	84.5
QC-Aa	50.0	48.1	50.0	46.3	50.0	56.3
QC-Ca	*	10.0	93.2	95.5	97.1	98.0
QC-An	66.6	70.9	76.3	81.8	85.4	85.6
QC-Cn	80.0	86.4	92.2	95.1	96.4	96.8
QR-Aa	50.0	51.0	50.0	51.8	51.8	50.0
QR-Ca	50.0	86.4	50.0	51.8	84.5	90.1
QR-An	*	61.8	65.5	88.2	92.7	88.2
QR-Cn	50.0	96.0	97.0	94.2	95.0	93.0
QL-Aa	65.0	13.0	67.3	50.0	76.4	70.0
QL-Ca	40.0	43.0	43.0	45.4	47.3	71.0
QL-An	*	94.0	97.3	98.2	96.0	97.2
QL-Cn	46.0	45.5	46.4	40.0	63.6	68.0
QSC	92.0	97.0	95.4	95.9	92.0	94.2
Cat-floc	58.1	62.7	72.2	96.0	-	-
FeCl ₃	-	70.9	65.4	-	61.8	-
Al ₂ (SO ₄) ₃	15.4	9.0	57.3	52.3	52.3	50.0

	Concentración en mg/1					
	100	200	300	400	500	600
QB-An	-	94.8	96.1	97.4	97.3	98.0
QB-Cn	93.6	96.6	96.0	93.6	97.3	95.1
QC-Aa	60.9	67.2	68.2	68.0	83.6	80.9
QC-An	94.9	97.7	97.9	95.7	94.6	91.4
QC-Cn	98.4	98.8	97.1	97.9	97.4	98.4
QR-An	95.4	70.0	52.0	40.0	41.0	40.0
QR-Cn	42.0	52.0	35.0	54.5	56.0	55.0
QL-Aa	97.0	98.6	98.0	95.5	-	-
QL-Ca	97.0	98.6	96.8	95.9	-	-
QL-Cn	93.4	97.4	98.3	97.2	94.4	93.0
FeCl ₃	83.6	97.6	-	-	-	-
Al ₂ (SO ₄) ₃	80.0	98.8	96.9	80.0	92.3	-

* mayores de 110

TABLA 16
VALORES CALCULADOS PARA EFICACIA EN LA REDUCCION
DE TURBIEDAD A LA DOSIS MINIMA DE COAGULANTE.

MUESTRA	DOSIS MINIMA (mg/l)	% DE REDUCCION POR UNIDAD DE CONCENTRACION Y/X
QB-Aa	12	7.9
QB-Ca	37	2.6
QB-An	45	2.1
QB-Cn	32	2.9
QC-Aa	32	2.9
QC-Ca	50	1.9
QC-An	-	-
QC-Cn	72	1.3
QR-Aa	23	4.1
QR-Ca	76	1.2
QR-An	-	-
QR-Cn	23	4.2
QL-Aa	-	3.4
QL-Ca	27	-
QL-An	22	4.3
QL-Cn	57	1.6
QCS	20	4.7
CAT-FLOC	39	2.4
FeCl ₃	136	0.7
Al ₂ (SO ₄) ₃	153	0.6

X concentración del floculante

Y porcentaje de reducción en la turbiedad

Y/X eficiencia en la remoción de turbiedad por unidad de concentración.

VI.3.- DETERMINACION DE SOLIDOS FINALES.

La determinación de sólidos finales en las muestras de agua tratadas con quitosanas como coagulantes, se encontró que los valores están estrechamente relacionados con la eficiencia en la reducción de la turbiedad, de tal forma que los ST, se redujeron en un 50%, de los cuales la mayoría corresponden a SDT como coloides sobre todo por la naturaleza del efluente empleado, quedando un mínimo de SST por efecto del proceso de coagulación de las quitosanas. El agua resultante del tratamiento presentó características aceptables para ser reutilizada dentro de la misma empacadora.

En la tabla 17, se muestran los sólidos determinados en el agua clarificada con quitosanas, a la mínima turbiedad (por debajo 10 UTN). Por otro lado los valores de pH finales son mostrados en cada determinación como valores promedio, puede observarse que tanto las quitosanas experimentales, la quitosana comercial y CAT-FLOC existió muy poca variación, en comparación con las sales de fierro y aluminio empleadas donde el pH fué un poco más ácido, tal efecto tiene gran importancia ya que si el pH varía después de un tratamiento con coagulantes, tendría implicaciones de tipo secundario, y tomar en cuenta otros factores tales como un diseño de tuberías para la conducción de aguas ácidas o alcalinas según el caso.

En esta tabla se muestran los valores de porcentaje de reducción de SST, si se compara con la columna de dosis requeridas, puede observarse que en la mayoría de los casos las reducciones fueron muy buenas, excepto para algunas quitosanas donde para tener el mismo efecto en la reducción de sólidos requerían de una dosis mayor. Los mejores resultados se tomaron aquellos en que la dosis fue la mínima requerida (20 a 40 mg/l) para un buen efecto de la reducción de la turbiedad, así mismo se compara con las sales comúnmente utilizadas en este tipo de procesos en los que se requiere de dosis más altas de 120 mg/l para $FeCl_3$ y 150 mg/l para $Al_2(SO_4)_3$.

TABLA 17

DETERMINACION DE SOLIDOS EN AGUAS CLARIFICADAS UTILIZANDO QUITOSANAS EXPERIMENTALES.

MUESTRA	DOSIS mg/l	ST mg/l	SST mg/l	SDT mg/l	% SST*	UTN	pH final
ACIEC**	-	2271	250	2021	-	110	7.3
QB-Aa	20	1590	5.7	1584	97.7	2.5	6.9
QB-Ca	20	1165	3.2	1162	98.7	1.4	7.0
QB-An	60	1700	12.2	1687	94.8	5.3	6.8
QB-Cn	200	1255	8.4	1246	96.6	3.2	7.0
QC-Aa	500	1510	40.9	1469	83.6	18.0	6.8
QC-Ca	40	647	11.1	636	95.5	4.9	7.0
QC-An	200	1163	3.2	1160	98.7	2.5	6.6
QC-Cn	60	1128	9.7	1118	96.8	3.5	7.2
QR-Aa	600	1110	3.0	1107	98.8	1.3	7.0
QR-Ca	60	1255	22.7	1232	90.9	10.0	6.8
QR-An	50	1105	36.7	1069	85.4	8.0	5.8
QR-Cn	30	1030	7.9	1022	96.8	3.5	7.0
QL-Aa	200	1210	3.5	1206	98.6	1.5	6.9
QL-Ca	200	1258	3.0	1255	98.8	2.4	6.7
QL-An	40	1174	4.5	1169	98.1	2.0	7.1
QL-Cn	200	1234	6.6	1227	97.4	2.9	7.2
QC.	20	1375	7.5	1367	97.0	3.3	6.6
CAT-FLOC	40	-	-	-	-	4.4	7.2
FeCl ₃	120	-	-	-	-	5.0	5.2
Al ₂ (SO ₄) ₃	150	-	-	-	-	5.2	6.0

* Porcentaje de reducción de sólidos suspendidos totales

** Agua de cocimiento de una industria empacadora de carnes.

VII.- PRUEBAS DE QUELACION

VI.1.- QUELACION DE METALES.

Debido a los requerimientos que establecen las normas de sanidad no es posible descargar los metales pesados junto con las aguas residuales. De este modo se han desarrollado trabajos (30,40,48,50), donde se ha demostrado que las quitosanas pueden ser utilizadas para quelar metales tales como: Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Hg, Ni, Ag, Zn, entre otros que son considerados como elementos tóxicos.

En la tabla 18, se muestran las determinaciones preliminares acerca del comportamiento mostrado por las quitosanas en el atrapamiento con los metales Zn, Cu y Pb. Su quelación por los diferentes metales aquí probados se encuentra en estrecha relación al porcentaje de desacetilación o grupos amino libres en las muestras, algunos investigadores (34,46) mencionan que la capacidad de quelación por parte de los compuestos quitinosos (quitina y quitosana) para formar complejos poliméricos con algunos iones metálicos, esta dado por la presencia de átomos de nitrógeno en la quitosana, los cuales son considerados los principales portadores de pares electrónicos para el ligamiento de metales.

A grandes rasgos puede observarse en la tabla 18 el comportamiento de las quitosanas sobre la quelación de los metales, parece que existe una selectividad. En tanto lo que pudo observarse para la quitosana comercial, esta presentó siempre un atrapamiento menor respecto de las muestras experimentales posiblemente el tamaño y dureza de este material fueron decisivos en su comportamiento (43).

Sin embargo, existen diversas explicaciones acerca del comportamiento mostrado por este tipo de biopolímeros en la quelación de metales, de modo diversos autores (34, 42,44), coinciden que las fuerzas de atracción por parte del polímero hacia los metales, reside en los grupos amino libres presentes en la quitosana, ya que de la comparación entre quitina y quitosana, esta última es bastante efectiva.

Los complejos así formados que involucran mecanismos de adsorción de metales por parte del polímero, parece no ser el único mecanismo involucrado, sino que existen otros como la formación de nódulos en la superficie de la quitosana relacionados con la quelación de los iones (55). En los estudios preliminares efectuados se observó que con un tiempo de contacto de 90 minutos entre la solución y el agente quelante (quitosanas), existió un atrapamiento mayor para el ión cobre, seguido por el zinc y plomo. En tanto que en las pruebas posteriores, el tiempo de contacto se prolongó hasta

15 horas con una agitación constante a 80 rpm, encontrándose que bajo estas condiciones, su efectividad fue mucho mayor para los tres metales que en las primeras pruebas. Esto se corroboró con los datos que se muestran en la tabla 19 donde se indican los valores del metal remanente encontrado bajo dos condiciones de acidez. En la tabla 20 se muestran los valores del metal remanente bajo las condiciones antes mencionadas y en la tabla 21 sus valores en porciento del metal colectado encontrándose que en la mayoría de los casos existió un buen acomplejamiento por parte de las muestras. En el caso particular de la muestra comercial, esta presentó una menor quelación para plomo y cobre pero un buen atrapamiento para el zinc.

VII.1.- INFLUENCIA DEL pH

El pH final de las soluciones se presenta en la tabla 22, se puede observar que este parámetro varió de una muestra a otra, pero en la mayoría de los casos presentó una tendencia a mantenerse a pH neutro o muy cercano a éste, de manera que en una aplicación mayor conlleva la ventaja de no tener variaciones en el pH final de la solución tratada.

Los datos de la tabla 21 muestran que una vez realizado el análisis de varianza, para conocer los efectos interactivos de los distintos factores involucrados, encontramos que en nuestro caso no importó que metal se estuviera probando en la quelación por parte de las quitosanas, la respuesta siempre fué bastante buena, así mismo estos valores no se vieron influidos por las condiciones de acidez evaluadas (pH 5 y 7) alcanzando una alta eficiencia en el atrapamiento de los tres metales. Bajo estas condiciones las quitosanas probadas no necesariamente removieron por igual a los metales probados (cobre, plomo y zinc) puesto que el análisis estadístico mostró una interacción significativa entre metales y quitosana evaluada ($p < 0.05$), de manera que el tipo de quitosana si presentó efecto sobre la mayor o menor quelación, así se tuvieron muestras bastante efectivas para la remoción alcanzando valores de hasta 99 y 100 % (tabla 21) en tanto otras tuvieron menor quelación presentando valores de 70 a 85%.

VII.2.- SELECTIVIDAD

En la tabla 23 y 24, se muestran los valores de la interacción para los tres metales donde se probaron cuatro muestras experimentales y el producto comercial, esta determinación indirectamente nos permitió observar que aparentemente existe una selectividad de acomplejamiento por el cobre, aunque para zinc y plomo realmente las diferencias fueron mínimas, obteniéndose valores de 99 y 100% de metal quelado. En el caso del producto comercial, nuevamente presentó bajos atrapamientos tanto para cobre y plomo, presentando una buena remoción por el zinc (tabla 24).

En forma general, podemos ver que las condiciones bajo las cuales fueron probadas las quitosanas, en un tiempo de 90 minutos estas tienden a atrapar principalmente el ión cobre, seguido del plomo y zinc. Aparentemente los tiempos en que se realizaron las pruebas ejercen cierto efecto sobre la quelación de los metales Tablas 21 y 23. En la interacción de los tres metales la efectividad de las quitosanas no se ve

grandemente influenciada, presentando cierta selectividad por atrapar cobre en un principio, pero no siendo menos efectiva para el plomo y el zinc. Con base a los reportes previos y los resultados obtenidos los factores que mayor influencia han ejercido en la efectividad de las quitosanas como coagulantes, resultan ser las sales minerales remanentes, disminuyendo en cierta forma la disponibilidad de los grupos amino.

TABLA 18
COMPORTAMIENTO PRESENTADO POR QUITOSANAS EXPERIMENTALES
EN EL ATRAPAMIENTO DE IONES METALES (Zn, Cu, Pb).*

MUESTRA	ATRAPAMIENTO POR METAL (mayor a menor)	VALORES (%)
QB-Aa	Cu > Zn > Pb	70.0 > 62.8 > 27.5
QB-Ca	Cu > Zn > Pb	81.7 > 75.1 > 23.5
QC-Aa	Cu > Zn > Pb	69.8 > 65.9 > 37.9
QC-Ca	Cu > Zn > Pb	75.8 > 64.8 > 19.9
QR-Aa	Zn > Cu > Pb	93.0 > 79.9 > 71.6
QR-Ca	Cu > Zn > Pb	72.6 > 58.6 > 19.6
QL-Aa	Pb > Zn > Cu	97.2 > 89.5 > 51.6
QL-Ca	Pb = Zn > Cu	96.5 = 96.4 > 58.4
QC.	Cu > Pb > Zn	50.6 > 25.9 > 10.4

* Estudios previos, tratamientos con agitación constante durante 90 minutos a 80 rpm y temperatura ambiente, adicionando 200 mg de quitosana. Determinaciones por duplicados.

TABLA 19
COMPORTAMIENTO PRESENTADO POR QUITOSANAS EXPERIMENTALES
EN EL ATRAPAMIENTO DE IONES METALICOS (Zn, Cu, Pb) A DOS pH
AJUSTADOS. **

MUESTRA	pH 5.0 **		pH 7.0 **	
	ATRAPAMIENTO	VALORES (%)	ATRAPAMIENTO	VALORES (%)
QB-Aa	Zn > Pb > Cu	99 > 96 > 71	Zn = Pb > Cu	97 = 96 > 93
QB-Ca	Pb > Cu > Zn	96 > 89 > 78	Pb = Cu > Zn	100 = 100 > 87
QC-Aa	Pb = Zn > Cu	98 = 98 > 63	Pb > Zn > Cu	99 > 97 > 90
QC-Ca	Pb > Cu > Zn	97 > 80 > 71	Pb = Cu = Zn	98 = 97 > 76
QR-Aa	Pb = Zn > Cu	98 = 98 > 80	Pb = Zn > Cu	100 = 99 > 88
QR-Ca	Pb = Zn > Cu	97 = 97 > 70	Pb = Zn > Cu	94 > 94 > 73
QL-Aa	Pb > Zn > Cu	100 > 97 > 94	Cu = Pb = Zn	100 = 100 = 99
QL-Ca	Zn = Pb > Cu	99 = 98 > 94	Cu = Pb = Zn	100 = 100 = 99
QC	Zn > Pb > Cu	89 > 42 > 00	Zn > Pb > Cu	85 > 41 > 04

Determinaciones por triplicado.

** ajustados con NaOH 0.1 N

TABLA 20
VALORES DE METAL REMANENTE EN SOLUCIONES
TRATADAS CON QUITOSANAS EXPERIMENTALES.

MUESTRA	Pb pH 5.0	Pb 7.0	Cu 5.0	Cu 7.0	Zn 5.0	Zn 7.0
standar						
0.0005M	117	116.2	6.0	7.0	298.00	300.0
QB-Aa	4.2	4.6	1.75	0.5	1.28	8.4
QB-Ca	4.1	0.0	0.62	0.0	64.00	38.7
QC-Aa	2.2	0.4	2.20	0.7	4.49	7.9
QC-Ca	3.4	2.3	1.20	0.2	86.20	70.6
QR-Aa	1.5	0.0	1.20	0.8	6.33	1.6
QR-Ca	2.5	7.5	1.80	0.4	9.97	80.7
QL-Aa	0.0	0.5	0.37	0.0	8.38	1.8
QL-Ca	2.3	1.0	0.33	0.0	1.60	3.2
QC	68.0	68.0	6.00	6.7	31.36	44.0

Tratamientos con agitación constante durante 15 hora a 80 rpm y temperatura de 25 C. Determinaciones por triplicado.

TABLA 21

QUELACION DE METALES (Pb, Cu, Zn) POR QUITOSANAS EN SOLUCIONES A pH AJUSTADOS (valores en porciento de quelacion).

MUESTRA	pH*	5.0 Pb	7.0 Pb	5.0 Cu	7.0 Cu	5.0 Zn	7.0 Zn
0.0005 M **	-	-	-	-	-	-	-
QB-Aa	96.4	96.0	70.8	92.8	99.6	97.2	
QB-Ca	96.4	100.0	98.7	100.0	78.5	87.2	
QC-Aa	98.1	99.6	63.3	90.0	98.5	97.3	
QC-Ca	97.1	98.0	80.0	97.1	71.1	76.5	
QR-Aa	98.7	100.0	80.0	88.6	97.9	99.5	
QR-Ca	97.9	93.5	70.0	94.3	96.6	73.1	
QL-Aa	100.0	100.0	93.8	100.0	97.2	99.3	
QL-Ca	98.0	99.1	94.5	100.0	99.5	98.9	
QC***	41.8	41.5	00.0	4.2	89.5	85.3	

* pH inicial de las soluciones

** Solución inicial del metal

*** Muestra comercial de quitosana

Condiciones de tratamiento: agitacion cte. 15 horas, a 80 rpm, temperatura de 25 C, 200 mg de muestra (quitosana).

TABLA 22

MEDICIONES DEL pH AL FINAL DE CADA TRATAMIENTO

MUESTRA	Pb	Pb	Cu	Cu	Zn	Zn
pH inicial	5.1	7.1	5.1	7.1	5.1	7.1
QB-Aa	5.7	5.6	7.6	8.5	7.5	7.7
QB-Ca	6.6	6.0	6.5	7.2	7.0	6.8
QC-Aa	8.0	7.9	7.6	9.4	7.8	8.0
QC-Ca	6.0	6.4	7.3	8.6	7.0	6.8
QR-Aa	7.2	6.9	7.6	8.1	7.5	7.3
QR-Ca	7.0	6.3	7.1	7.3	6.7	7.0
QL-Aa	6.7	6.8	7.5	7.5	7.4	7.2
QL-Ca	7.0	6.6	7.3	7.4	7.0	7.4
QC	5.2	5.7	5.2	5.9	6.4	6.3

TABLA 23

INTERACCION DE TRES METALES EN UNA SOLUCION TRATADA CON
QUITOSANAS EXPERIMENTALES.

MUESTRA	Pb mg/l	Cu mg/l	Zn mg/l	pH final
stock				
0.0005 M	64.8	8.0	300.4	-
QB-Ca	0.5	0.0	2.6	7.18
QC-Ca	0.6	0.0	14.0	7.04
QR-Aa	0.8	0.0	3.5	7.65
QL-Aa	1.2	1.2	3.3	7.74
QC.	22.4	3.3	54.0	5.07

Determinaciones a pH ajustado de 7.0, en una solución de 60 ml adicionando 200 mg de quitosanas, con agitación cte. durante 15 Horas a 80 rpm. Determinaciones por triplicado.

TABLA 24

VALORES EN PORCIENTO DE METAL QUELADO

MUESTRA	Cu	Zn	Pb
QB-Ca	100	99	99
QC-Ca	100	95	99
QR-Aa	100	98	99
QL-Aa	85	99	98
QC.	58	82	65

Determinaciones por triplicado.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

1.- Los métodos para la obtención de quitosanas a partir de crustáceos están establecidos, por lo que en el presente trabajo nos adaptamos a un tratamiento previamente reportado, sin embargo, el método parece que no ejerce el mismo efecto sobre harinas de diferentes especies de crustáceos, por lo que cada producto obtenido presentó otras propiedades fisicoquímicas.

2.- Algunos de los productos estudiados mostraron excelentes resultados en relación a su capacidad quelante y coagulante, muchos fueron comparables e inclusive superiores a los compuestos químicos comerciales.

3.- El grado de eficiencia para la coagulación y quelación, dependen de las características de cada quitosana, siendo el método para su extracción lo que determina la mayor o menor disponibilidad de los grupos amino libres. Un contenido alto de minerales remanentes en las muestras, influye en gran parte para su eficiencia en estos procesos.

4.- Las quitosanas obtenidas bajo una presión reducida de aire, presentaron características aceptables tanto para la coagulación como para la quelación. Para este tipo de muestras el proceso de extracción es más viable por la reducción de costos.

5.- En el estudio de quelación, algunas quitosanas presentaron cierta selectividad por el atrapamiento de metales, propiedad que puede ser empleada en el tratamiento de efluentes que presenten una carga alta de los metales estudiados.

6.- Este tipo de quitosanas probadas como coagulantes y quelantes, provocan muy poca variación en el pH de las soluciones tratadas, característica que resulta ventajosa respecto a otros productos generalmente utilizados.

7.- Las quitosanas estudiadas resultaron coagulantes efectivos a nivel laboratorio para el tratamiento de efluentes de origen alimentario; además de la recuperación de subproductos con posibilidades de ser utilizados en la suplementación de dietas para animales.

8.- En el país existen importantes fuentes potenciales de material quitinoso que no son utilizados. La metodología aquí estudiada representaría una alternativa para el aprovechamiento integral de diversas especies de origen marino, además de que por otro lado se resuelve el problema de la disposición de desechos.

RECOMENDACIONES

- 1.- Se hace necesario un control estricto del proceso de obtención para finalmente tener quitosanas con características uniformes.
- 2.- Los procedimientos para la caracterización deben ser rápidos de manera que permitan estudiar los productos durante su proceso de extracción para que exista una homogeneidad en las propiedades de las muestras.
- 3.- Las muestras probadas a nivel laboratorio que resultaron altamente eficientes como agentes quelantes deben ser probadas en un efluente proveniente de una industria para verificar su aplicación, haciéndose conveniente una comparación con distintos efluentes.
- 4.- Debido al origen de la materia prima para este estudio, se hace necesario mejorar el paso de desmineralización para evitar que las quitosanas que se obtengan presenten material interferente en sus propiedades.
- 5.- En la etapa de eliminación de proteínas debe considerarse el contenido de grasas saponificables en la materia prima ya que al contacto con el álcali estos provocan la formación de espumas factor que influiría en los volúmenes de los contenedores de reacción.

ANEXO

TABLA 25

ANALISIS ESTADISTICO
CAPACIDAD QUELANTE DE QUITOSANAS

NUM. DE TRATAMIENTO	QUITOSANA-METAL	x METAL REMOVIDO %
1	I QB-Aa - Pb	96.2
2	" - Cu	81.8
3	" - Zn	98.4
1	II QB-Ca - Pb	98.2
2	" - Cu	94.8
3	" - Zn	82.8
1	III QC-Aa - Pb	98.8
2	" - Cu	76.6
3	" - Zn	97.9
1	IV QC-Ca - Pb	97.5
2	" - Cu	88.5
3	" - Zn	73.8
1	V QR-Aa - Pb	99.3
2	" - Cu	84.3
3	" - Zn	98.6
1	VI QR-Ca - Pb	95.7
2	" - Cu	82.1
3	" - Zn	84.8
1	VII QL-Aa - Pb	99.9
2	" - Cu	96.9
3	" - Zn	98.3
1	VIII QL-Ca - Pb	98.5
2	" - Cu	97.2
3	" - Zn	99.2
1	IX QCS - Pb	41.7
2	" - Cu	2.1
3	" - Zn	87.4

FACTORES: QUITOSANAS, METALES

TABLA 26

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	G1	suma de cuadrados	cuadrados medios	Fobs.	F tablas 0.05 0.01	
Tratamientos	26	23080.48	887.7110	18.48	1.91	2.44
Quitosana	8	13493.35	1686.6685	35.12**	2.30	3.26
Metales	2	2105.68	1052.8386	21.92	3.35	5.49
Quitosana x metales	16	7481.46	467.5912	9.74	2.03	2.74
Error	27	1296.83	48.0308			
Total	53	24617.57				

TABLA 27

REMOCION DE METALES POR LAS QUITOSANAS ESTUDIADAS

QUITOSANAS	M Pb	E T	A Cu	L	E S Zn
I	192.4		163.6		198.8
II	196.4		189.7		165.7
III	197.7		153.3		195.8
IV	195.1		177.1		147.6
V	198.7		168.6		197.3
VI	191.4		164.3		169.7
VII	199.9		193.8		196.6
VIII	197.1		194.5		198.4
IX	83.4		4.2		174.8

TABLA 28

CUADRO DE PROMEDIOS

EFEECTO DE LA QUITOSANA Y DEL METAL REMOVIDO

QUITOSANA	Pb	Cu	Zn
I	96.2	81.8	98.4
II	97.2	94.8	82.8
III	98.8	76.6	97.9
IV	97.5	88.5	73.8
V	99.3	84.3	98.6
VI	95.7	82.1	84.8
VII	99.9	96.9	98.3
VIII	98.5	97.2	99.2
IX	41.7	2.1	87.4

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- ALLAN, G.G., FOX, J.R. & KONG, N. (1978) A critical evaluation of potential sources of chitin and chitosan. In: Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan. Muzzarelli, R.A.A. & Pariser, E.R. (Eds) pp. 64-78 MIT Sas Grant Report MITSG 78-7
- 2.- A.D.A.C. (1970) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11 th. ed Washington, D.C.
- 3.- A.P.H.A., A.W.W.A., & W.P.C.F. (1975) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- 4.- ARREGUIN, S.F. (1981) Diagnósis de la pesquería de camarón de roca (*Sicyonia brevirostris* Stimpson, 1971) de Con-tov, Q. Roo, México. Ciencia Pesquera. México, 1(2):21-41.
- 5.- BERKELEY, R.C.M. (1979) Chitin, Chitosan and their degradative enzymes. In: Microbial Polysaccharides and polysaccharases 205-236. Academic Press, London.
- 6.- BOUGH, W.A. (1976) Chitosan -a polymer from seafood waste, for use in treatment of food processing wastes and activated sludge. Process Biochem. 11(1): 13-16
- 7.- BOUGH, W.A., WU, A.C.M., & MILLER, B. (1978) Effect of time of deacetylation on molecular weight distribution, acetyl content, viscosity, and performance of chitosan as a conditioning agent for activated sludge. 1er. Proceeding Pp.1-28
- 8.- BOUGH, W.A., SALTER, W.L., WU, A.C.M. & PERKINS, B.E. (1978) Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular weight distribution of chitosan products. Biotechnol. & Bioeng., 20:1931-1943
- 9.- BOUGH, W.A., WU, A.C.M., CAMPBELL, T.E., & HOLMES, M.R. & PERKINS, B.E. (1978) Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. II. Coagulation of activated sludge suspensions. Biotechnol. & Bioeng., 20: 1945-1955
- 10.- BRINE, C. J. & AUSTIN, P.R. (1981) Chitin variability with species and method of preparation., Comp. Biochem. Physiol. 69 B: 283-286.
- 11.- BRINE, C. J. & AUSTIN, P.R. (1981) Chitin isolates: Species variation in residual amino acids. Comp. Biochem. Physiol. 20 B: 173-178
- 12.- BROUSSIGNAC, P. (1969) Un haut polymere naturel peu connu dans l'industrie Le chitosane, Chimie et Industrie-Genie Chimique., 99(9): 1241-1247

- 13.- COOKBOOK MANUAL DE ABSORCION ATOMICA, (1976) The Perkin-Elmer Corporation E.U.
- 14.- CORRIPIO, E.C. (1982) Aspectos biotecnológicos de la fauna de acompañamiento del camarón en la región noroeste del Golfo de México. Ciencia Pesquera, México (3): 1-8
- 15.- COSIO, I.G., FISHER, R.A. & CARRDAD, P.A. (1982) Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. J. Food Sci. 47: 901-905
- 16.- DENTEL, S.K., RESTA, J.J. SHETTY, V.P. & BOBER, A.T. (1988) Selecting coagulant, filtration, and sludge conditioning aids; Research and technology. 80(1):72-84
- 17.- EIDEN, M., JEWELL, C. & WIGHTMAN, (1980) Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. J. Appl. Polymer Sci. 25: 1587-1599
- 18.- E.P.A. Environmental Protection Agency (1976) Application of sewage sludge to cropland appraisal of potential hazards of the heavy metals to plants and animals. E.U. 24-35
- 19.- FAUST, S.D. & ALY, D.M. (1983) Chemistry of Water Treatment. pp.277-367 Butterworth Publisher, E.U.
- 20.- FERNANDEZ, V.G. (1986) Manual de laboratorio de Química del agua, División de Estudios de Posgrado Facultad de Ingeniería, UNAM. México.
- 21.- GONZALEZ, R. M. L. (1988) Conviene más cultivar que capturar camarones. Publicado en el Diario El Nacional día 22 de Julio, año LX-Tomo II núm. 21,352, pp.7 México.
- 22.- FORSTNER, U., & WITTMANN, G.T.W. (1979) Metal pollution in the aquatic environment. 10-45, 358 Springer-Verlag Berlin
- 23.- HACKMAN, R. H. (1982) The estimation of chitin in arthropod cuticles, In: Proceedings of the Second International Conference on chitin and chitosan. 5-9 Hirano, S. & Tokura, S. (eds) Sapporo, Japón.
- 24.- JOHNSON, R.A. & GALLANGER, S.M. (1984) Use of coagulants to treat seafood processing wastewaters. J. WPCF. 56(8):970-975
- 25.- KARIM, M. I. A. & BISTRUNK, W. A. (1985) Treatment of potato processing wastewater with coagulating and polymeric flocculating agents. J. Food Sci. 50:1657-1661

- 26.- KNORR, D. (1977) Protein recovery from waste effluents of potato processing plants. *J. Food Technol.* 12:563-580
- 27.- KNORR, D. (1982) Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47:593-595.
- 28.- KNORR, D. (1984) Use of chitinous polymers in food a challenge for food research and development. *Food Technol.* 38: 85-97
- 29.- KUMAR, S.G. & HANSEN, P.M.T. (1972) New reaction mixture for spectrophotometric determination of N-acetylhexosamines, *Analytical chemistry.* 44(2):398-400
- 30.- KUMAR, P. & DARA, S.S. (1982) Utilization of agricultural waste for decontaminating industrial/domestic wastewaters from toxic metal. *Agricult. Wastes* 4:213-223
- 31.- KURITA, K., SANNAN, T., IWAKURA, Y. (1979) Studies on chitin VI Binding of metal cations. *J. Appl. Polymer Sci.* (23): 511-515
- 32.- KURITA, K., KOYAMA, Y. & TANIGUCHI, A. (1986) Studies on chitin IX. *J. Appl. Polymer Sci.* 31:1169-1176
- 33.- LATLIEF, S. J., & KNORR, D. (1983) Effect of chitin as coagulating aid on protein yield, composition and functionality of tomato seed protein concentrates. *J. Food. Sci.* 48:1587-1590
- 34.- LOPEZ DE ALBA, P. L., PACHECO, M. A., URBINA, Z. B., & ALVARADO, M.J.C. (1988) Capacidad adsorbente de algunos iones metálicos sobre quitosanas y polvos adsorbentes obtenidos de las cáscaras de diferentes especies de camarón. *Inst. de Invest. Científicas, Universidad de Guanajuato, México.*
- 35.- LOPEZ DE ALBA, P.L., PACHECO, M.A., & ANDREW DE RIQUER, G.A. (1988) Estudio de la interacción de algunos iones metálicos de transición y Cerio (IV) y Uranio (VI) con quitosana. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 33(1):59-64
- 36.- MADHAVAN, P. & RAMACHANDRAN, N.K.G. (1978) Metal-binding property of chitosan from prawn waste. In: *Proceeding of the first International Conference on Chitin and Chitosan.* Muzzarelli, R.A.A. & Paisier, E.R. (eds) pp. 444-447 MIT Sea Grant Report MIT96.

37.- MARSÌ, M.S. & RANDALL, V.G (1978) Chitosan and chitosan derivatives for removal of toxic metallic ions from manufacturing-plant waste stream. In: Proceeding of the first International Conference on Chitin and Chitosan. Muzzarelli, R.A.A. & Paiser, E.R. (eds) pp. 444-447 MIT Sea Grant Report MITSB. chitin and chitosan.

38.- MORALES, J., NOUE, J. & PICARD, G. (1985) Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. *Aquacultural Engineering*. 4:257-270

39.- MUZZARELLI, R. A. A. (1977) Chitin. Pergamon Press Ltd. N.Y.

40.- MUZZARELLI, R. A. A. & ROCCHETTI, R. (1974) The determination of copper in sea water by atomic absorption spectrometry with a graphite atomizer after elution from chitosan. *Anal. Chim. Acta* 69: 35-42

41.- MUZZARELLI, R. A. A. & ROCCHETTI, R. (1974) The determination of vanadium in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry on chitosan after separation from salt. *Anal. Chim. Acta* 70:283-289

42.- MUZZARELLI, R. A. A., ROCCHETTI, R., & MUZZARELLI, M.G. (1978) The isolation of cobalt, nickel and copper from manganese nodules by chelation chromatography on chitosan. *Separation Sci. Technol.* 13(2):153-163

43.- MUZZARELLI, R. A. A., TANFANI, F. & SCARPINI, G. (1980) Chelating, film-forming, and coagulating ability of the chitosan-glucan complex from *Aspergillus niger* industrial wastes. *Biotechnol. & Bioeng.* 22:885-896

44.- MUZZARELLI, R. A. A., TANFANI, F. & EMANUELLI, M. (1981) The chelating ability of chitinous materials from *Streptomyces*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus*, and *Chaetophora cucurbitarum*. *J. Appl. Biochem.* 3:322-327

45.- MUZZARELLI, R.A.A., TANFANI, F., EMANUELLI, M., MUZZARELLI, G.M. & CELIA, G. (1981) The production of superior quality. *J. Appl. Biochem.* 3: 316-321

46.- MUZZARELLI, R. A. A., TANFANI, F., EMANUELLI, M. & BOLOGNINI, L. (1985) Aspartate glucan, glycine glucan, and serine glucan for the removal of cobalt and copper from solutions and brines. *Biotechnol. & Bioeng.* 27:1115-1121

47.- FANGBURN, S. H., TRESCONY, P. V. & HELLER, J. (1984) Partially deacetylated chitin: Use in self-regulated drug delivery systems chitin, chitosan, and related enzymes. In: Chitin, Chitosan and related enzymes. ZIKAKIS, J.P. (ed.) 13-17. Academic Press, Inc. Orlando.

48.- PIGMAN, W. W. (1960) Advances in carbohydrate chemistry. 15 edit. by W.W. PIGMAN Academic Press. E.U. 371-393

49- QUINTERO, R. R. (1981) Ingeniería Bioquímica, teoría y aplicaciones. ed. Alhambra, 247-267 México.

50.- RAMACHANDAN, K. & MADHAVAN, P. (1982) Metal binding property of chitosan from different sources. In: Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan pp.187-190; 248-250 Hirano, S. & Tokura, S. (eds) Sapporo, Japón.

51.- SAKABUCHI, T. & NAKAJIMA, A. (1982) Recovery of uranium by chitin phosphate and chitosan phosphate. Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan pp.177-182 Hirano, S & Tokura, S (eds). Sapporo, Japón.

52.- SEPESCA (1984) ANUARIO ESTADISTICO DE LA SECRETARIA DE PESCA Dirección General de Informática, Estadística y Documentación pp.78-82 México.

53.- S.S.A. Secretaría de Salubridad y Asistencia (1973) Memorias de la Primera reunión nacional sobre problemas de contaminación ambiental. 51-64, 341-347 México.

54.- STELMOCK, R. L. HUSBY, F. M. & BRUNDAGE, A. L. (1985) Application of van soest acid detergent fiber method for analysis of shellfish chitin. J. Dairy Sci., 68:1502-1506

55.- SUDER, B. J. & WITGHTMAN, J. P. (1983) Interaction of heavy metals with chitin and chitosan. II. Cadmium and zinc. Adsorption from solution. Ottewill, R. H., Rochester, C. H. & Smith, A. L. (eds) 244-335 Academic Press.

56.- VAN SOEST, P.J. (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. J. A.O.A.C. 46(5):825-835

57.- VARELA, S. J. (1986) Análisis comparativo de polímeros naturales y sintéticos aplicados al tratamiento de aguas. Tesis profesional. División de Estudios de Posgrado Facultad de Ingeniería UNAM. México.

58.- WELINDER, B.S. (1974) The crustacean cuticle I. Studies on the composition of the cuticle. Comp. Biochem. Physiol. 47 A: 779-787.

59.- WINDLICH, W. (1988) Una catástrofe programada, publicada en el diario Tribuna Alemana, publicado el 6 de Julio, pp.12 Hamburgo.

60.- WU, A. D., BOUGH, W. A., HOLMES, M.R. & PERKINS, B. E. (1978) Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products III. Coagulation of cheese whey solids. Biotechnol. & Bioeng. 20: 1957-1966