

00567



Universidad Nacional Autónoma de México  
FACULTAD DE QUÍMICA

1  
2ej

ESTUDIO QUÍMICO SOBRE EL APROVECHAMIENTO  
INTEGRAL DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIA DE ALIMENTOS  
(química de alimentos)  
P R E S E N T A:

QFB. ARNALDO JIMMY CAÑIPA MORALES

México, D.F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Carlos Rosas V.  
1er. vocal: Dr. Pedro Valle Vega  
Secretario: Dr. Ernesto Moreno Martínez  
1er. suplente: Dr. José Luis Arredondo  
2do. suplente: M. en C. Adolfo Sánchez Z.

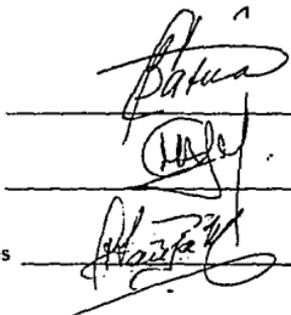
Lugar donde se desarrolló la tesis:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
Laboratorios 4A-B (edif. A), 312 (edif. E) y 201 (edif. B)  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Asesor: Dra. Carmen Durán de Bazúa

Asesor técnico: Dra. Amanda Gálvez Mariscal

Sustentante: QFB. Arnaldo Jimmy Cañipa Morales



The image shows three handwritten signatures, each written over a horizontal line. The top signature is a cursive signature that appears to be 'Rosas'. The middle signature is a cursive signature that appears to be 'Gálvez'. The bottom signature is a cursive signature that appears to be 'Cañipa'.

**“...combate el hambre, no al hombre”.**

**I. A. FEDERICO CASTILLA CHACON**

## AGRADECIMIENTOS

**A mis padres y hermanos**, por todo el apoyo, cariño, aliento y confianza. Su ejemplo me ha servido para seguir adelante las veces que llegué a sentirme derrotado. Con ellos aprendí que no hay esfuerzo pequeño, que todo sale mejor avanzando unidos y que los valores que llevamos dentro nos ayudan a decidir el camino a seguir en los momentos difíciles.

**A la Dra. Carmen Durán de Bazúa**, por la confianza que ha depositado en mí, por su orientación, su tiempo, el apoyo para la ejecución de esta tesis y, sobre todo, por la calidad humana y profesional con la que me ha dirigido.

**A mis profesores**, por los conocimientos que me ayudaron a adquirir y por haberme ofrecido su amistad. En especial a la **Dra. Amanda Galvez**, por su apoyo, tiempo y consejo, determinantes para la culminación de este trabajo.

**A mis amigos y compañeros**, que aunque son pocos, son invaluable y llenan mis días. Con ellos he compartido la parte amena de esta fugaz vida de estudiante y sé que contaré con ellos siempre. Mi agradecimiento especial a **Salvador**, porque me ha brindado la solidaridad de un camarada cuando mi panorama se tornaba sombrío..

**A la Facultad de Química y a la UNAM**, porque además de la infraestructura para el desarrollo de este trabajo, me hacen sentir algo que no puedo definir, pero que me llena de orgullo y me impulsa a luchar para contribuir con mi granito de arena por el mejoramiento de la sociedad.

**A todas las personas** que me apoyaron de una u otra manera y me impulsaron a seguir adelante. En especial a **Paty**, por su ayuda para terminar de escribir esta tesis; por su paciencia, su apoyo, su comprensión y su tiempo.

## “El ser excelente”

- Ser excelente es hacer las cosas, no buscar razones para demostrar que no se pueden hacer
- Ser excelente es comprender que la vida no es algo que se nos da hecha, sino que tenemos que producir las oportunidades para alcanzar el éxito.
- Ser excelente es comprender que en base a una férrea disciplina es factible forjar un caracter de triunfadores.
- Ser excelente es trazarse un plan y lograr los objetivos deseados a pesar de todas las circunstancias.
- Ser excelente es decir: “me equivoqué” y proponerse no cometer el mismo error.
- Ser excelente es levantarse cada vez que se fracasa, con un espíritu de aprendizaje y superación.
- Ser excelente es reclamarse a sí mismo el desarrollo pleno de nuestras potencialidades buscando incansablemente la realización.
- Ser excelente es entender que a través del privilegio diario de nuestro trabajo podemos alcanzar la realización.
- Ser excelente es ser creador de algo: un sistema, un puesto, una empresa, un hogar, una vida.
- Ser excelente es ejercer nuestra libertad y ser responsable de cada una de nuestras acciones
- Ser excelente es sentirse ofendido y lanzarse en contra de la pobreza, la calumnia y la injusticia.
- Ser excelente es levantar los ojos de la tierra, elevar el espíritu y soñar con lograr lo imposible.
- Ser excelente es trascender a nuestro tiempo legando a las futuras generaciones un mundo mejor.

## Resumen

En el presente trabajo se propone el aprovechamiento del cefalotórax de camarón, un desecho muy abundante de la industria pesquera, cuya composición es: 44.7% de proteína, 26.3% de cenizas, 20.7% de fibra cruda (que incluye al biopolímero quitina), 5.2% de grasa y 3.1% de otros carbohidratos. Se separaron los tres componentes de mayor interés: pigmentos, proteína y quitina mediante etapas consecutivas (obtención de harinas, despigmentación, desmineralización y desproteínización química o enzimática). Finalmente, la quitina obtenida fue desacetilada para ser convertida en quitosana, su derivado comercial más importante. En cada etapa se probaron diferentes condiciones y se seleccionó la mejor. Inicialmente las muestras fueron lavadas, secadas, molidas y tamizadas para llegar hasta harinas. El sistema de extracción que dió el mayor rendimiento en la despigmentación fue el conformado por la mezcla éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), una relación masa:volumen de 1:10, 3h, temperatura ambiente, agitación constante a 300 rpm y al abrigo de la luz. Esta extracción alcanzó un valor de  $20.5 \pm 5 \mu\text{g}$  de pigmento/100 g de harina. Se probó el uso de los antioxidantes BHA, BHT y su mezcla al 0.1%, encontrándose para esta última un efecto protector de los pigmentos de hasta el 80% al cabo de 4 semanas. La desmineralización se realizó con HCl 1N, siendo suficiente un tiempo de 3h, temperatura ambiente, rel. m.v 1:10 y agitación constante a 300 rpm, condiciones que permitieron remover el 95% de las sales minerales. El tratamiento elegido para la desproteínización química consistió en el empleo de NaOH al 4.5%, rel. m.v 1:15, 3h, 65°C y agitación constante a 300 rpm, alcanzado un 97% de desproteínización. Alternativamente, se realizó una desproteínización enzimática con la enzima Proteasa alcalina PA 3000 a pH 9.5, 50°C y rel. E/S del 1% (31.25U de actividad), lográndose la liberación del 93% de proteína. El producto residual de ambas desproteínizaciones fue quitina, con aspecto de escamas de color rosa, un contenido de 0.51 a 0.65% de cenizas, sin lípidos detectables y con un contenido de nitrógeno de 7.14 a 7.16% (método químico) y 7.30 a 7.56 (método enzimático). La última etapa consistió en la desacetilación para obtener quitosana. La quitina proveniente de la vía química fue desacetilada adecuadamente empleando NaOH al 50%, rel. m.v 1:15, 60 min, atmósfera de nitrógeno, calentamiento con reflujo a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  y con agitación constante a 300 rpm. La quitosana resultante presentó valores de 7.89 a 8.07% de nitrógeno, 0.5% de cenizas, alta solubilidad en ácido acético al 2%, un grado de desacetilación mayor al 64% y una viscosidad superior a 450 cP, valores que sobrepasan los requerimientos comerciales mínimos. El aspecto físico de estas quitosanas fue el de escamas de color blanco con una ligera tonalidad rosa. La quitina obtenida por vía enzimática no pudo ser desacetilada bajo estas condiciones, siendo necesario probar niveles más amplios de tratamiento. La desacetilación resultó ser una etapa crítica que afecta significativamente al producto. Todos los polímeros fueron analizados por espectroscopia I.R., encontrándose una marcada similitud con la quitina y quitosana comerciales. El rendimiento a partir de harina entera fue del 12% para la quitina y del 11% para la quitosana. El costo en material y reactivos a nivel de laboratorio para la obtención de 100 g de quitosana fue de NS 71.44 (21.52 \$US). Con estos resultados se demuestra la viabilidad de la separación de componentes importantes para la industria, que convierten a los desechos de camarón en una materia prima útil y económica.

**ESTUDIO QUÍMICO SOBRE EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL**  
**DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN**

**CONTENIDO**

---

	página
AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN .....	5
CONTENIDO .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. OBJETIVOS .....	12
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	
3.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAMARÓN .....	13
3.2 COMPOSICIÓN DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN .....	15
3.2.1 PIGMENTOS .....	16
3.2.2 SALES MINERALES .....	18
3.2.3 PROTEÍNA .....	18
3.2.4 QUITINA Y QUITOSANA	
3.2.4.1 GENERALIDADES Y FUENTES .....	19
3.2.4.2 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES .....	21
3.2.4.3 USOS Y APLICACIONES .....	25
3.3 EL CAMARÓN EN MÉXICO .....	27

<b>4. METODOLOGÍA</b>	
4.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA .....	33
4.2 DESPIGMENTACIÓN .....	34
4.3 DESMINERALIZACIÓN .....	35
4.4 DESPROTEINIZACIÓN QUÍMICA .....	35
4.5 DESACETILACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO .....	36
4.6 MÉTODO ENZIMÁTICO .....	36
4.7 CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS .....	37
4.8 ESTIMACIÓN DE COSTOS DE PROCESO A NIVEL DE LABORATORIO .....	37
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	37
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	38
5.1.1 PIGMENTOS .....	40
5.1.2 DESMINERALIZACIÓN .....	44
5.1.3 DESPROTEINIZACIÓN QUÍMICA .....	47
5.1.4 DESACETILACIÓN .....	50
5.2 MÉTODO ENZIMÁTICO .....	54
5.3 COMPARACIÓN ENTRE LA DESPROTEINIZACIÓN QUÍMICA Y LA ENZIMÁTICA .....	54
5.3.1 QUITOSANAS A PARTIR DE QUITINAS OBTENIDAS ENZIMÁTICAMENTE .....	60
5.3.2 GRADO DE DESACETILACIÓN DE QUITOSANAS OBTENIDAS QUÍMICA Y ENZIMÁTICAMENTE .....	60
5.4 AMINOÁCIDOS EN HARINAS DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN .....	69

5.5 ESTIMACIÓN DE COSTOS DE PROCESO A NIVEL DE LABORATORIO .....	70
<b>6.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>76</b>
<b>8.- APÉNDICES</b>	
8.1 MÉTODOS GENERALES .....	81
8.2 OBTENCIÓN DE QUITINA .....	84
8.3 DESPIGMENTACIÓN .....	85
8.4 DESMINERALIZACIÓN .....	86
8.5 DESPROTEINIZACIÓN QUÍMICA .....	87
8.6 DESACETILACIÓN .....	88
8.7 DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	89
8.8 TÉCNICA DE HIDRÓLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS .....	90
8.9 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRUPOS AMINO .....	91
8.10 CÁLCULOS ESTADÍSTICOS .....	92

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos marinos constituyen uno de los rubros económicos de mayor importancia para países que como México, poseen un amplio litoral. Entre éstos, el camarón destaca por ser uno de los productos de mayor demanda en el mercado nacional e internacional, debido principalmente a su excelente valor nutricional y a sus propiedades sensoriales.

Actualmente, la producción nacional de camarón rebasa las 70,000 toneladas anuales, de las que un 40% se distribuye para consumo nacional y el restante 60% es exportado. De 1992 a 1993, la producción de camarón pasó de 66,210 a 73,417 toneladas, cantidad que representa un incremento del 11% aproximadamente y que en el último año le permitió a México obtener ingresos por cerca de 240 millones de dólares por exportaciones ((La Economía Mexicana en Cifras, 1990; Secretaría de Pesca, 1993).

De todo el camarón que se produjo en el país en 1993, el 17% aproximadamente proviene de la camaricultura, cantidad que le permite a México estar entre los 15 primeros productores de camarón de granja a nivel mundial con grandes expectativas de mejorar (Hernández, 1994).

Los valores anteriores corresponden al camarón entero o a los abdómenes en caso de las exportaciones. Debe mencionarse que sólo el 50% del animal es comestible y que el restante 50% está constituido por el cefalotórax, mejor conocido como la cabeza, que no es comestible y representa cerca de 35,000 toneladas anuales de desperdicios, que si no son aprovechados, son contaminantes (tanto en altamar durante su captura, como en tierra en las granjas camarónicas).

Las conchas y caparzones de muchos crustáceos, entre ellos el camarón, contienen proteínas, lípidos, pigmentos, y un biopolisacárido llamado quitina, ampliamente utilizado en la industria especialmente alimentaria y farmacéutica (Mathur y Narang, 1990). Países como Japón y Estados Unidos, producen grandes cantidades de esta sustancia y sus derivados, exportándolos a los demás países.

La quitina está asociada a las proteínas de manera covalente, lo cual le da considerable estabilidad y le confiere a la estructura dureza, rigidez y resistencia a la hidrólisis enzimática. En los crustáceos, la quitina también está asociada a carotenoides, generalmente  $\beta$ -carotenos, astaxantinas y derivados. Esto le confiere color a los tejidos (Muzzarelli, 1978).

La quitina, la quitosana y sus derivados más importantes, poseen propiedades singulares que las hacen muy atractivas desde el punto de vista comercial. La cantidad de derivados que se pueden obtener de ellas, lo mismo que sus aplicaciones, es amplia y se debe fundamentalmente a que se trata de polímeros naturales biodegradables, bioactivos,

flexibles y fácilmente modificables. El cefalotórax de camarón contiene alrededor de 14 a 27% de quitina (Ashford y col., 1977; Muzzarelli, 1978; Austin y col., 1982; Knorr, 1984; No y col., 1989).

El derivado más importante de la quitina es la quitosana, un biopolímero de carácter poliamínico, soluble en soluciones ácidas diluidas y cargado positivamente. Dependiendo de los requerimientos, puede ser utilizado directamente o bien, transformado a uno de sus muchos derivados. Por ello es ampliamente utilizado en la industria, especialmente en plantas procesadoras de alimentos y tratadoras de aguas residuales (Bough y col., 1978a; Bough y col., 1978b; Muzzarelli, 1978).

La quitina y la quitosana cuentan con la aprobación de la Environmental Protection Agency (EPA), para ser empleadas en la purificación del agua potable en una concentración no mayor a 10 mg / L. Su aprobación como ingrediente alimentario por la FDA está en trámite (Knorr, 1986). Se necesitan definir los aspectos de seguridad para entender y aprovechar el valor nutritivo de estos polímeros cuando son sometidos a diferentes tratamientos para su obtención (Knorr, 1991).

Los carotenoides presentes en el camarón están combinados con los grupos amino de la quitina mediante enlaces de tipo base de Schiff. Durante las operaciones para obtener quitosana este enlace no es atacado, por lo tanto la quitosana aún conserva su color (Muzzarelli, 1978). Estos pigmentos se utilizan principalmente para conferir color a muchas especies acuícolas como truchas arco iris y salmones, aumentando así su valor comercial (Meyers, 1977; Simpson y Haard, 1985). El origen natural de este pigmento, ha llamado poderosamente la atención, siendo actualmente sujeto de numerosas investigaciones con el fin de elevar su aprovechamiento.

En cuanto a las proteínas, estudios preliminares indican que el cefalotórax de camarón es especialmente rico en los ácidos glutámico y aspártico. Todos los aminoácidos indispensables están presentes en los siguientes porcentajes en relación al contenido de proteína: treonina 5.38, metionina 2.62, valina 5.42, fenilalanina 4.83, isoleucina 4.68, leucina 7.05, lisina 6.71 y triptofano 1.17 (Simpson y Haard, 1985).

Los componentes restantes del cefalotórax de camarón son las sales minerales (carbonatos y fosfatos) y las sustancias volátiles y no volátiles responsables del peculiar aroma y sabor del camarón. Al parecer la separación de estos componentes no resulta atractiva desde el punto de vista comercial y por ello no se les ha dado importancia. En México, una mínima parte de los desechos de camarón que se generan son secados y molidos para obtener harina de camarón, la cual tiene un uso exclusivamente culinario.

El presente trabajo forma parte de un proyecto global para el manejo de los subproductos de la industria alimentaria, con el fin de aumentar su aprovechamiento y reducir la generación de desechos contaminantes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo principal

Determinar, desde el punto de vista químico, qué tan viable es someter al cefalotórax de camarón a una serie de tratamientos consecutivos para obtener los pigmentos, las proteínas, las sales inorgánicas y finalmente, la quitina y la quitosana.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto del tamaño de partícula y de las condiciones empleadas durante la despigmentación, desmineralización, desproteínización química y desproteínización enzimática de las harinas de cefalotórax de camarón para obtener quitina.
- Comparar los resultados de la desproteínización química con la enzimática.
- Realizar un seguimiento de las modificaciones en la composición del producto en cada etapa por medio de análisis bromatológicos; así como determinar los rendimientos.
- Evaluar la calidad de la proteína presente en el cefalotórax de camarón en base a su perfil de aminoácidos.
- Determinar el efecto del tamaño de partícula y de las condiciones empleadas durante la desacetilación de quitina para obtener quitosana.
- Determinar de manera preliminar los costos del proceso a nivel de laboratorio.

### 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAMARÓN:

El camarón es un crustáceo decápodo, macruro, de tamaño y color variable. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en dos partes: cefalotórax y abdómen, comercialmente conocidos como cabeza y cola, respectivamente. El cefalotórax, que es una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, está cubierto por un caparazón que contiene a la cabeza, los órganos vitales del animal, tres pares de patas prensoras y dos caminadoras. La cresta en la parte superior es rígida, dentada y termina en un rastro alargado por delante de la cabeza (fig. 1). El abdómen se divide en seis segmentos. El último de ellos termina en una punta fina llamada telson y por debajo está la cola que le sirve para nadar. Por dentro del abdómen están los intestinos (Servicio de actualización pesquera, 1990b; Dore y Fridomt, 1987).

Los camarones varían en tamaño, forma y número de apéndices; características que se emplean para la identificación preliminar de especies. Para precisar esta identificación, se recurre a otras características como las espinas y estrias sobre el caparazón, que son indicativas de la posición de órganos internos adyacentes. El rastro, que asemeja la proa de un barco, está proyectado en punta hacia arriba de los ojos, siendo muy largo en algunas especies y en otras poco diferenciables. Esta cualidad, junto con los patrones de dientes en edades tempranas y adultas del camarón, son otros rasgos útiles en la identificación (Dore y Fridomt, 1987).

Los principales camarones tropicales comercializados son cafés y blancos, siendo el color un factor relevante en el precio. En la mayoría de las ciudades en los Estados Unidos, los blancos son preferidos sobre los cafés, mientras que en otros países como Japón, ocurre lo contrario. Al cocerse, ambos camarones adquieren la misma tonalidad, siendo prácticamente imposible distinguir el color original. Los camarones cafés suelen tener un sabor ligeramente más pronunciado (Dore y Fridomt, 1987). Existe una amplia variedad de colores entre las distintas especies de camarones. Comercialmente, el camarón se clasifica más por el color que por la especie.

El camarón es excepcionalmente nutritivo. Es un alimento con alto contenido de proteínas y bajo en grasas. La cantidad limitada de grasas es predominantemente poliinsaturada con cantidades útiles de los ácidos grasos 3-omega, sustancias que aparentemente ayudan a reducir los niveles de colesterol en sangre y se piensa que reducen los riesgos de ataques al corazón, algunos tipos de cáncer y muchos otras enfermedades. Incluso las pequeñas cantidades encontradas en los mariscos, incluyendo el camarón son extremadamente benéficas (Dore y Fridomt, 1987).

Los camarones son capturados mediante rastras arrojadas por barcos camaroneros a lechos arenosos y lodosos del océano. Una vez que la rastra los recoge, la carga se vacía en

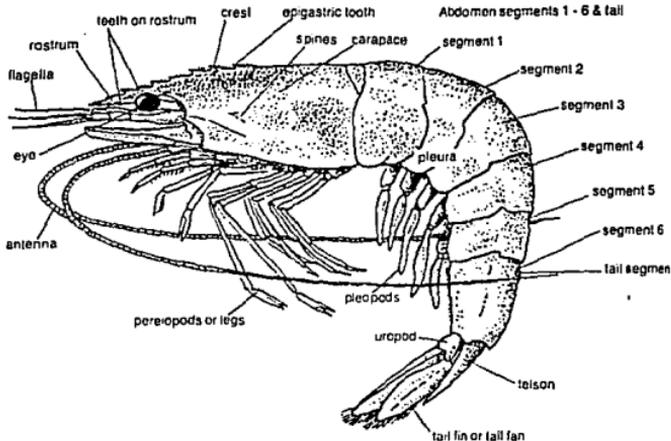


Fig. 1 El camarón.

la cubierta donde el camarón se separa del resto de las especies. La selección puede requerir de varias horas por lo que en ese periodo puede presentarse el deterioro del producto. Allí se descabeza, se lava perfectamente y se coloca en el interior del barco. Las colas de camarón son mezcladas con suficiente hielo para mantener la calidad hasta llegar al muelle. Algunos barcos camaroneros cuentan con sistemas modernos de selección y congelación en cubierta que minimiza el deterioro.

Las cabezas de camarón suelen ser secadas y molidas para elaborar la harina de camarón, que puede ser utilizada en el alimento para animales cuando se desean altas concentraciones de proteína (Desrosier, 1986). En México, una mínima parte de las cabezas de camarón son convertidas en harina para cubrir la demanda. La mayor parte de ellas son desechadas en altamar y por su volumen, causan un impacto ecológico que puede alterar el ambiente.

En el caso de los cultivos camaronícolas, tampoco se aprovecha el cefalotórax y, en vez de contaminar el mar, se contaminan los suelos de las zonas aledañas a las áreas de cultivo, con el consiguiente deterioro ambiental y proliferación de fauna nociva.

### 3.2 COMPOSICIÓN DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN

En las tablas 1 y 2 se presenta la composición química de la porción comestible del camarón y del cefalotórax:

Agua (g)	78.2	Calcio (mg)	63.00
Proteína (g)	18.1	Fósforo (mg)	166.00
Grasa (g)	0.8	Hierro (mg)	1.60
Carbohidratos (g)	1.5	Tiamina (mg)	0.02
Calorías (cal)	91.0	Niacina (mg)	3.20
		Riboflavina (mg)	0.03

Fuente: Charley H., 1987.

Proteína cruda	47.70
Cenizas	26.86
Fibra cruda	19.35
Grasa	4.63
Carbohidratos asimilables	2.47

Fuente: Agricultural Handbook, 1975.

En la tabla 2 se observa que después de la humedad, el componente más abundante de la porción comestible resulta ser la fracción proteica ( 83%), que convierte al camarón en un alimento valioso. En la otra tabla, la composición es muy diferente. Se tiene una cantidad significativa de proteínas, pero han aumentado otras fracciones como la de fibra cruda y la de cenizas que, como se verá más adelante, corresponden a la quitina y a las sales minerales, respectivamente (Mathur y Narang, 1990). Entre la fracción de lípidos se encuentran, además de las sustancias liposolubles responsables de aroma y sabor típicos del camarón, unos pigmentos liposolubles de tipo carotenoide, responsables en parte del color que presenta el camarón ó presentará luego de su cocción. Todos estos componentes elevan el potencial de aprovechamiento del camarón y merecen ser estudiados.

A continuación se describen las características relevantes de los pigmentos, proteínas, sales minerales, quitina y quitosana, que se pueden obtener a partir del cefalotórax de camarón.

### 3.2.1 PIGMENTOS

Entre los componentes del cefalotórax de camarón están unos pigmentos carotenoides con estructuras muy parecidas que globalmente se conocen como astaxantinas. En la fig.2 se muestra la estructura de algunos de ellos. Las primeras tres estructuras corresponden a los estereoisómeros de la astaxantina y la restante a la cantaxantina (Foss y col., 1984). Otro carotenoide presente es el astaceno, considerado como el producto oxidativo de la astaxantina (Meyers y Bligh, 1981; Chen y Meyers, 1982a).

En un estudio acerca del contenido de pigmentos en desechos de cangrejos sin moler, se lograron extraer 150 µg/g de muestra, que por estudio cromatográfico, fue separado en 49.4% de astaxantinas esterificadas, 40.3% de astaxantinas sin esterificar y 10.3% de astaceno (Meyers y Bligh, 1981).

Además de estar esterificadas, las astaxantinas se presentan combinadas con proteínas en varios crustáceos, entre ellos el camarón. Diversos trabajos han demostrado que los cambios de color en estos productos son inducidos por el calor, oxidación, deshidrogenación, solventes orgánicos y otros agentes desnaturizantes. La degradación del éster de astaxantina es un proceso de autooxidación que empieza lentamente y se propaga rápidamente (Chen y Meyers, 1982b). Los mismos autores concluyen que la cantidad de la astaxantina extraída depende del sistema de extracción empleado y que la calidad depende del calor, exposición al oxígeno atmosférico y exposición a la luz, es decir, de las condiciones de procesamiento y almacenaje.

Para extraer el pigmento, el principal obstáculo lo constituye la unión con las proteínas. En estado natural, hay una mutua interacción entre proteínas y carotenos que aumenta la estabilidad de los últimos. Si esta unión se debilita o se rompe, por ejemplo en el secado, entonces la estabilidad de los carotenos decrece. Por esta razón, el precalentamiento de las muestras favorece la extracción de pigmentos (Chen y Meyers, 1982a; 1982b). Estos mismos autores probaron la aplicación de enzimas proteolíticas para remover la unión de proteínas y pigmentos, mejorando el rendimiento en un 58%. En otro estudio, también se utilizaron proteasas bacterianas para separar el complejo caroteno-proteína de la quitina, logrando con ello obtener pigmentos enriquecidos con proteínas (Simpson y Haard, 1985).

Se probaron otros sistemas de extracción tales como acetona, éter de petróleo, aceite de soya, mezclas de éter de petróleo-acetona-agua y acetona-ciclohexano (Kelley y Harmon, 1972; Meyers y Bligh 1981; Chen y Meyers, 1982b).

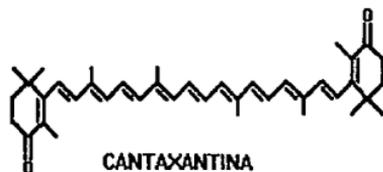
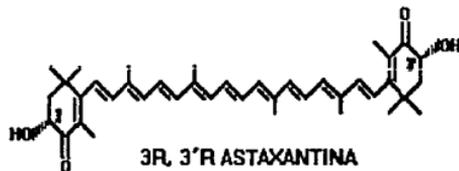
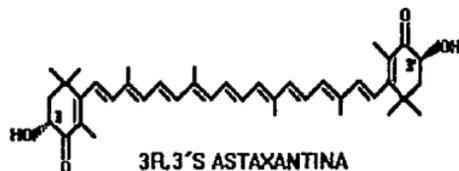
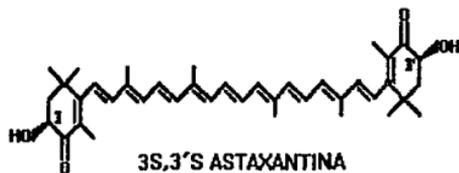


Figura 2. Principales pigmentos encontrados en el cefalotórax de camarón. Las tres primeras estructuras corresponden a los isómeros ópticos de la astaxantina y la última a la cantaxantina.  
Fuente: Foss y col., 1984.

Para el caso de la extracción con aceite de soya, la cantidad de astaxantinas extraídas a partir de desechos de cangrejos de mar resultaron ser mayores a las extraídas por otros métodos. Se probaron adicionalmente el efecto de dos antioxidantes, Endox y Ethoxiquin, sobre muestras frescas, secas y durante la extracción, encontrando resultados positivos. En el caso de las muestras secas, sólo el Endox resultó ser efectivo debido a que contiene EDTA como agente quelante que bloquea la acción catalizadora del hierro durante la autooxidación de la astaxantina (Chen y Meyers, 1982b).

Entre las aplicaciones de las astaxantinas, se puede mencionar su empleo como indicadores de las condiciones de procesamiento, almacenaje y calidad de los camarones (Kelley y Harmon, 1972). Por otro lado, considerando que las astaxantinas son los principales carotenoides en muchas especies acuáticas y que no pueden ser sintetizadas por truchas, salmones y otros animales, es necesario incluirles en su dieta este tipo de pigmentos (Chen y Meyers, 1982a; Foss y col., 1984; Fang y Cheng, 1993). Se encontró que la astaxantina está libre en el tejido muscular de los peces, mientras que en la piel está fija y en forma de diéster (Choubert y Luquet, 1983). El problema con las astaxantinas no es precisamente la concentración de pigmentos presentes en el alimento, sino la absorción en el aparato digestivo del animal que las ingiere. Esta situación determina la preferencia de los consumidores por el pigmento natural sobre el sintético (Choubert y Luquet, 1983; Fang y Chen, 1993).

### 3.2.2 SALES MINERALES

Después de las proteínas, el segundo componente más abundante lo constituyen las sales minerales, principalmente fosfatos y carbonatos de calcio. Estas sustancias se encuentran asociadas a la quitina y las proteínas, dándole al animal la rigidez que lo caracteriza (Broussignac, 1968). Para removerlas, se han utilizado diversos solventes entre los que se pueden mencionar al ácido clorhídrico y al ácido acético al 50% (Meyers y Bligh, 1981). Al incrementar la concentración de ácido, la desmineralización también aumenta, pero se afecta negativamente a la viscosidad del biopolímero residual (Madhavan y Ramachandran, 1974).

Aparentemente, las sales minerales no representan un subproducto de interés.

### 3.2.3 PROTEÍNAS

En la tabla 2 se observa que las proteínas representan casi el 50% del peso seco del cefalotórax de camarón. En la tabla 3 se presenta la composición de aminoácidos en desechos de camarón.

Es posible que hayan algunos grupos amino libres en la quitina, las cuales forman conjugados de tipo complejo iónico o enlaces covalentes con las proteínas (Mathur y Narang, 1990).

La extracción química de proteínas del cefalotórax de camarón implica un tratamiento con NaOH y calor. Las proteínas se pueden recuperar del filtrado proveniente de dicho proceso, si son centrifugadas, ajustadas a un pH de 4.5 con HCl, centrifugadas por segunda vez y secadas en un horno con vacío a 50°C durante 8 horas (No y col., 1989). La recuperación de proteínas de los desechos de camarón requieren sólo que se neutralice el medio, lo cual a la vez facilita la formación de sales en la proteína recuperada (Muzzarelli, 1978). Queda también la alternativa de utilizar enzimas proteolíticas que permitan extraer las proteínas sin dañar al biopolímero ni a los aminoácidos de la proteína.

AMINOÁCIDO <sup>(1)</sup>	CONTENIDO mg/g
Ácido aspártico	63.4
Treonina	25.3
Serina	26.7
Prolina	20.3
Ácido glutámico	91.2
Glicina	25.3
Alanina	31.2
Valina	26.1
Metionina	16.8
Isoleucina	19.2
Leucina	44.6
Tirosina	21.4
Fenilalanina	26.9
Lisina	36.4
Histidina	11.2
Arginina	37.2
<b>TOTAL</b>	<b>523.2</b>

<sup>(1)</sup> El triptófano se destruyó durante la hidrólisis

Fuente: Toma y Meyers, 1975

Las proteínas y péptidos, pueden ser utilizados en la alimentación o para la formulación de medios de cultivo (Bough y col., 1978a).

### 3.2.4 QUITINA Y QUITOSANA

#### 3.2.4.1 Generalidades y fuentes

La quitina es, por mucho, el componente de mayor importancia en el cefalotórax de camarón. Fue descrita por primera vez en 1811 por H. Braconnot, al estudiar la composición de hongos como *Agaricus volvaceus* con álcali, aislando una sustancia

nitrogenada a la cual llamó "fungina". En 1823, A. Oudier descubrió la misma sustancia en la estructura de algunos insectos, dándole el nombre de quitina (palabra derivada del griego que significa tónica o envoltura). Posteriormente se encontró que ambas sustancias eran la misma y se encontraban presentes en otros organismos como levaduras, hongos, bacilos, insectos y algunos crustáceos. Sin embargo fue hasta 1878 cuando se indicó que estaba compuesta por glucosamina y ácido acético, lo que ocasionó controversia entre los hombres de ciencia de la época, estableciéndose finalmente en 1943 que la quitina es un polisacárido acetilado de la glucosamina (Muzzarelli, 1978).

La quitosana fue descubierta en 1859 por Rouget al hervir quitina con KOH, convirtiéndose en una sustancia soluble en ácidos orgánicos. Le llamó "quitina modificada". La mayoría de la información disponible sobre la quitina y la quitosana fue obtenida después de 1950 (Muzzarelli, 1978).

La quitina es un carbohidrato presente en muchos organismos: hongos, levaduras, diatomeas, pared celular de plantas (junto o sustituyendo a la celulosa), cutículas de insectos, artrópodos, cangrejos, krills, camarones, etc. (Muzzarelli, 1978; Berkeley, 1979; Knorr, 1984; Mathur y Narang, 1990 y Knorr, 1991). Sin embargo, actualmente la fuente principal de quitina la constituyen los crustáceos (Mathur y Narang, 1990). En la tabla 4, se presentan las fuentes potenciales de quitina a nivel mundial y en la tabla 5, se presentan las fuentes actuales y futuras de quitina y quitosana.

Tabla 4. Fuentes potenciales de quitina a nivel mundial		
PRODUCTO	DESECHOS (B. S.) 10 <sup>3</sup> Ton métricas	QUITINA 10 <sup>3</sup> Ton métricas
Crustáceos	154	39
Krill	801	56
Almeja y ostra	482	22
Calamar	21	1
<b>TOTAL</b>	<b>1458</b>	<b>118</b>

Fuente: Knorr, 1991

Tabla 5. Fuentes actuales y futuras de quitina y quitosana		
MARISCOS	INSECTOS	MICROORGANISMOS
Langosta (*)	Escorpiones	Hongos
Cangrejo (*)	Arañas	Levaduras
Camarón (*)	Hormigas	Algas verdes y pardas
Krill	Cucarachas	Esporas
Otros crustáceos	Escarabajos	Diatomeas
(*) Fuentes comerciales actuales		

Fuente: Mathur y Narang, 1990

Puede observarse que hay varias fuentes naturales de quitina que podrían llegar a utilizarse en caso de aumentar la demanda.

La obtención de quitina a partir de desechos de algunos crustáceos, como el camarón y el cangrejo, consiste básicamente en dos etapas: desproteinización y desmineralización (Bough y col., 1978a).

La quitosana es obtenida comercialmente mediante una desacetilación alcalina de la quitina (Muzzarelli, 1978). Se han propuesto muchos tratamientos; pero el más estudiado indica que se obtienen buenos resultados si la quitina es sometida a la acción del NaOH al 50% a temperatura de ebullición y por un periodo de 3 horas (Bough y col, 1978a; Pelletier y col., 1990).

La calidad de la quitosana es fuertemente determinada por las condiciones de desacetilación empleadas (Broussignac, 1968; Bough y col., 1978b; Muzzarelli, 1978; Wu y col., 1978).

### 3.2.4.2 Estructura y propiedades

El nombre químico de la quitina es poli- $\beta$ -(1,4)-n-acetil-D-glucosamina, un biopolímero similar a la celulosa y distribuido ampliamente en la naturaleza, ocupando el segundo lugar en abundancia, después de la celulosa. En la figura 3 se presentan las estructuras de este polisacárido y de la quitosana, su derivado (Austin y col., 1981).

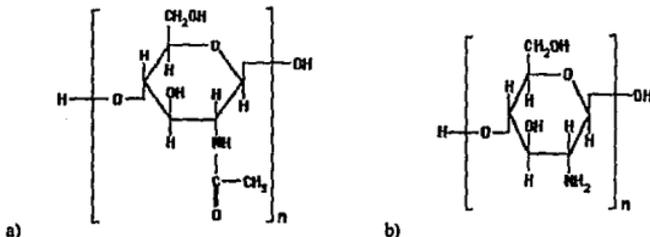


Fig. 3 Estructura química de la quitina (a) y la quitosana (b)

La quitina se presenta en tres formas polimórficas:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , que difieren en el arreglo de las cadenas moleculares. La  $\alpha$  quitina presenta cadenas antiparalelas y es la más compacta y cristalina. La  $\beta$  presenta cadenas paralelas y es la más vulnerable. La  $\gamma$  quitina presenta dos cadenas arriba y una abajo siendo la menos abundante. La explicación en cuanto a la cristalinidad y resistencia al tratamiento térmico, se debe a los puentes de hidrógeno que se forman entre cadenas (Muzzarelli, 1978; Mathur y Narang, 1990).

Las quitosanas son una familia de polímeros derivados de la quitina que han sido lo suficientemente desacetilados para ser solubles en soluciones ácidas diluidas; es decir, las quitosanas. a diferencia de las quitinas están parcialmente desacetiladas (Broussignac, 1968; Muzzarelli, 1978).

En la tabla 6 se presentan algunas propiedades fisico-químicas de la quitina y la quitosana. La quitosana tiene un contenido de nitrógeno mayor a 7%, un grado de desacetilación que oscila entre 60 y 80% (nunca llega al 100%) y una viscosidad de 250 a 2500 cps (Mathur y Narang, 1990).

Tabla 6. Propiedades fisico-químicas de la quitina y quitosana		
CARACTERÍSTICA	QUITINA	QUITOSANA
Composición ideal	$C_8 H_{13} O_5 N$	$C_6 H_{11} O_4 N$
Contenido de Nitrógeno (%)	6 - 7	7 - 9.5
Humedad (%)	2 - 10	2 - 10
Desacetilación (%)	10	60 - 80
Peso molecular (daltons)	$1 - 5 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$
Viscosidad (cps)	insoluble	250 - 2500

Fuente: Mathur y Narang, 1990

De todas las propiedades de estos polímeros, la más difícil de determinar con precisión es el peso molecular, debido a las múltiples interacciones, así como a la dificultad de encontrar con exactitud el valor de la concentración de este polímero. Un método probable es la medición de la dispersión de la luz en una cromatografía de penetración en gel (Rinaudo y Domard, 1989)

La quitina es un sólido de color blanquecino translúcido, prácticamente insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis concentrados o diluidos y solventes orgánicos; los ácidos inorgánicos concentrados la degradan (Broussignac, 1968). La quitina y la quitosana sufren degradación a altas temperaturas; no pueden resistir temperaturas mayores a 100-120°C. La descomposición térmica de la N-acetil-D-glucosamina, alcanza su valor máximo alrededor de los 200°C. En la cocción, la  $\beta$ -quitina se degrada más rápido que la  $\alpha$ -quitina debido a que permite una mejor penetración de agua entre sus cadenas (Muzzarelli, 1978).

La quitosana es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos, al igual que en soluciones alcohólicas ácidas. Es insoluble en agua, soluciones alcalinas y solventes orgánicos puros. Es muy estable y poco sensible a la humedad; se descompone a temperaturas mayores a 185°C. La viscosidad que presenta en soluciones de ácido acético es dependiente del tiempo de tratamiento de desacetilación (Muzzarelli, 1978; Pelletier y col., 1990).

Bough y col. (1978a y 1978b), indican la imposibilidad de establecer con certeza la relación que hay entre el peso molecular, la viscosidad y el empleo de una atmósfera de nitrógeno en la desacetilación.

Las características de la quitosana dependen de los grupos acetilo residuales, con la aclaración de que la desacetilación tiene un límite superior del 85%. La quitosana empieza a precipitar a pH mayores a 5.8 (Broussignac, 1968).

La quitosana forma numerosas sales, por ejemplo: acetato, acrilato, benzoato, citrato, glicolato, lactato, malato, piruvato y tartrato, por citar las más comunes. Todas las sales son solubles en agua excepto el cromato, tungstato, sulfato, picrato y molibdato. Para preparar una de estas sales es necesario agregar al medio el ácido correspondiente. La formación de sales es un método útil para purificar la quitosana de material extraño como residuos, proteínas y gomas (Nud'ga y col., 1970).

En la tabla 7 se presentan las propiedades catiónicas que posee la quitosana cuando se encuentra solubilizada en un medio ácido diluido.

Tabla 7. Propiedades catiónicas de la quitosana
- Polielectrolito lineal
- Alta densidad de carga
- Excelente floculante
- Adherencia a superficies cargadas negativamente
- Afinidad con proteínas estructurales como el cabello y la piel
- Quelante iónico de metales
- Hierro, cobre
- Metales tóxicos (Cd, Hg, Pb, Cr, Ni)
- Radionúclidos (Pu, U)

Fuente: Sandford, 1989.

En la tabla 8 se presentan las propiedades de importancia industrial de la quitina y la quitosana. Cabe destacar la baja toxicidad que poseen, lo cual les permite ser consideradas como ingredientes alimentarios (Hirano, 1989; Knorr, 1991).

Tabla 8. Propiedades de importancia industrial de la quitina y la quitosana
- Componentes principales de biomasas tales como caparazón de cangrejo y camarón
- Recursos naturales biológicamente reproducibles
- Biodegradables y no contaminantes del ambiente natural
- Biocompatibles no sólo con tejido animal, sino también con vegetal
- Biopolímeros (aminopolisacáridos)
- Baja toxicidad (LD <sub>50</sub> 16 g/kg de peso en ratones)
- Biológicamente funcionales
- Intercambiables en la conformación molecular
- Aptos para la manufactura de geles, fibras, coloides, películas, etc
- Contienen grupos amino e hidroxilo, químicamente modificables

Fuente: Hirano, 1989.

Las propiedades de la quitina varían con la fuente y el método de preparación (Austin y col., 1981). La característica final de la quitosana, depende de los reactivos, concentraciones, tiempo y temperatura empleados durante su proceso de manufactura (Bough y col., 1978a).

### 3.2.4.4 USOS

**ALIMENTOS.**- Los principales usos de la quitina y quitosana en el área de alimentos son:

- Agentes para tratar sistemas acuosos; esto incluye la reducción de sólidos totales, recuperación de proteínas, purificación de bebidas (agua, jugos, cerveza, vinos, etc.) y remoción de sustancias indeseables como metales pesados, plaguicidas, etc (Bough y Landes, 1978; Knorr, 1984 y 1991). Además de reducir la turbidez a cero, la quitosana redujo también la cuenta microbiana al ser utilizada para tratar jugo de manzana inoculado con bacterias gram positivas y gram negativas (Soto-Peralta y col., 1989; Popper y Knorr, 1990).
- Ingredientes funcionales para controlar la textura, estabilidad, mejorar el flujo de otros ingredientes, dar volumen, controlar la viscosidad y para incrementar el contenido de fibra dietética (Knorr, 1984).
- Aprovechando que la quitina y quitosana no se absorben, han sido empleadas como acarreadores de enzimas, células, pigmentos, sabores y nutrimentos. También como medios de atrapamiento que permiten la liberación controlada de ingredientes concentrados, sabores, nutrimentos, agentes antimicrobianos y sustancias agroquímicas (Knorr, 1983 y 1984).
- La actividad anticolesterolémica detectada en la quitosana, ha permitido su incorporación como ingrediente en algunos alimentos como galletas y pastas dietéticas (Hirano, 1989).
- La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), aprobó el uso de la quitosana para la purificación de agua potable hasta una concentración máxima recomendada de 10 mg/L (Knorr, 1984).
- La quitosana se ha utilizado en la fabricación de películas para elaborar empaques (Knorr, 1991).

**MEDICINA.**- Propiedades importantes de la quitosana como su biocompatibilidad, ausencia de toxicidad, capacidad para absorber líquidos, formación de películas y unión selectiva a ciertos lípidos como el colesterol, le han permitido tener grandes aplicaciones en el área médica. Entre estas se puede mencionar su capacidad como cicatrizante, hemostático, anticolesterolémico y formador de sistemas para la liberación controlada de fármacos. También se ha usado en la elaboración de hilos de sutura y la fabricación de lentes de contacto (Sandford, 1989). En Japón, se ha probado con éxito la implantación de piel artificial elaborada a base de quitosana y colágeno (Hirano, 1989).

**COSMETOLOGÍA.**- En esta industria, la quitina, quitosana y sus derivados, se utilizan para la elaboración de cosméticos dérmicos, capilares y pastas dentales. La quitosana despolimerizada es utilizada como ingrediente en shampúes, enjuagues y tónicos capilares debido a que su solución acuosa es viscosa, forma una película, retiene la humedad y da suavidad al cabello (Hirano, 1989; Sandford, 1989).

**AGRICULTURA.**- La quitosana tiene la aprobación de la EPA para ser usada como recubrimiento de semillas. Esta técnica permite mejorar la producción en el campo. También ha sido aprobada como un agente floculante para recuperar residuos proteínicos de desechos en plantas elaboradoras de alimentos. Actualmente se trata de aplicar a la quitosana en la

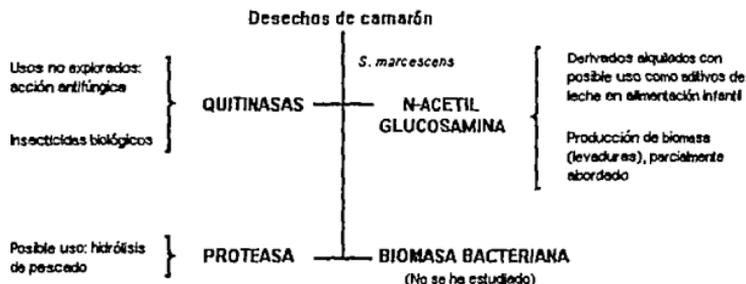
elaboración de productos que permitan la liberación controlada de plaguicidas y herbicidas. La quitosana puede ser adicionada a los cultivos para estimular el desarrollo de cierto tipo de microorganismos benéficos para la agricultura (Sandford, 1989). La quitosana tiene efectos antimicrobianos que pueden ser aprovechados en el empaque de vegetales (Hirano, 1989).

**BIOTECNOLOGÍA.-** Debido a su naturaleza no tóxica, biocompatibilidad, versatilidad y propiedades únicas, la quitosana se utiliza comercialmente para inmovilizar enzimas (por ejemplo glucosa isomerasa) y células (Sandford, 1989). Otros usos en este campo se dan en la aplicación de estos polímeros en la remoción de sustancias indeseables (células, enzimas, iones) presentes en los desechos industriales. La quitosana se usa ampliamente para recuperar biomasa y nutrimentos en la industria alimentaria que incluyen vegetales, cárnicos, camarón y leche (Knorr, 1984).

En la fig. 4 se presenta un diagrama de flujo propuesto por Escudero, 1991, para la obtención de biomasa bacteriana, quitinasas, proteasas y N-acetil glucosamina, a partir de desechos de camarón.

#### 4. Fermentación de un residuo quitinoso mediante el sistema quitinolítico de

*Serratia marcescens*.



Fuente: Escudero, 1991

**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES -** Esta es una de sus principales aplicaciones. La quitosana es un floculante natural que reacciona con polímeros aniónicos para formar complejos polielectrolitos que precipitan y pueden ser prensados, deshidratados y destruídos o aprovechados dependiendo del producto (Sandford, 1989). La quitosana también ayuda a remover algunos metales como mercurio, cobre, etc. que causan daños a la agricultura (No y Meyers, 1989)

El uso de la quitosana para recuperar compuestos orgánicos provenientes de los residuos de la industria pesquera significa una total integración del proceso, pudiendo generar sólidos coagulados con un uso adicional como aditivos (sabores y colores) ó como alimento para animales (No y Meyers, 1989).

OTROS USOS.- La quitosana ha sido probada en otras áreas como por ejemplo en la industria del papel (Muzzarelli, 1978), en cromatografía (Iwata y Nakabayashi, 1974), en alimentación animal como favorecedor del crecimiento de bifidobacterias que permitan la tolerancia a la lactosa (Austin y col., 1981), materia prima para obtener N-acetilglucosamina y glucosamina (Muzzarelli, 1978; Pelletier y col., 1990), etc.

### 3.3 EL CAMARÓN EN MÉXICO

La captura del camarón está entre las actividades pesqueras más antiguas del país. Si bien los primeros datos nacionales de la pesquería se consignan a partir de 1947, la continuidad de la información se mantiene parcialmente por medio de estimaciones y es hasta los años setenta cuando se empiezan a tener información más fidedigna de esta actividad (De la Lanza y col., 1993). Los principales puertos dedicados a esta actividad se localizan en Tampico, Tamps., Campeche, Camp., Salina Cruz, Oax., Mazatlan, Sin., Guaymas y Puerto Peñasco, Son. De la producción anual de camarón, el 39.9% se distribuye en el mercado nacional y el 60.1% en el internacional (La economía mexicana en cifras, 1990).

En la tabla 9 se presentan los datos de los últimos 10 años de actividad pesquera de camarón, traducidos en términos de producción nacional, producción acuícola y volumen e ingresos obtenidos por las exportaciones del producto.

AÑO	PRODUCCIÓN NACIONAL DE CAMARÓN (Ton)	PRODUCCIÓN ACUÍCOLA DE CAMARÓN (Peso Vivo, Ton)	VOLUMENES DE EXPORTACIÓN DE CAMARÓN (Ton)	VALOR DE LAS EXPORTACIONES DE PRODUCTOS PESQUEROS	
				CAMARÓN	TODAS LAS ESPECIES
1984	76,114	-	33,697	402,061	522,474
1985	74,599	35	30,500	326,768	392,936
1986	73,215	43	31,718	354,083	477,326
1987	83,882	286	35,457	435,128	586,582
1988	72,200	551	28,517	370,836	545,124
1989	74,804	2,846	25,922	338,073	523,677
1990	62,747	4,960	21,267	276,471	457,244
1991	62,150	4,969	21,076	263,450	454,238
1992 (1)	66,210	8,326	17,349	205,608	383,580
1993 (2)	73,417	10,125	20,180	239,159	411,539

(1) Cifras preliminares

(2) Cifras estimadas

Fuente: Secretaría de Pesca, 1993.

En la figura 5 se presenta una gráfica de la producción nacional de camarón con base en los datos anteriores. Se puede observar que el año de mayor producción fue 1987 y que ésta disminuyó en 1990 y 1991, alcanzando una paulatina recuperación en 1992 y 1993. El último año se volvió a lograr una producción mayor a las 70,000 toneladas. A pesar de este incremento, la industria camarónica atraviesa una etapa difícil, pues su crecimiento no es como se esperaba y esto se debe en alguna medida al aumento de la competencia en el mercado internacional.

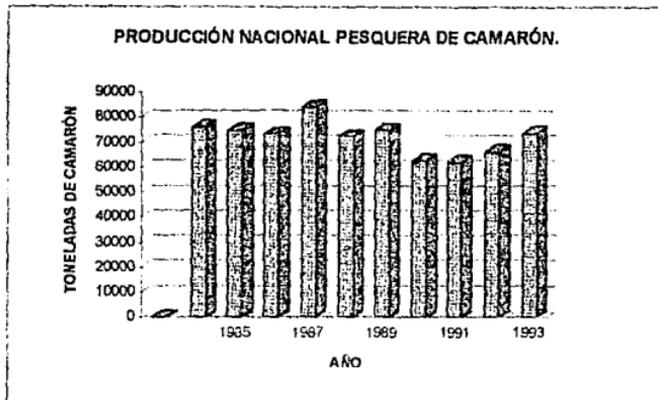


Fig. 5 Producción nacional pesquera de camarón  
Fuente: Secretaría de Pesca. 1993

De toda la producción de camarón en los últimos años, un porcentaje importante corresponde al cultivo en granjas. En la década de los ochenta, países como Ecuador se convirtieron en importantes productores de camarón a nivel mundial gracias a esta actividad (Servicio de Actualización Pesquera, 1990a). La superficie potencial disponible para la camaricultura en México es de aproximadamente 335,000 hectáreas, distribuidas en ambos litorales. En la tabla 10 se presenta la superficie potencialmente disponible para esta actividad, distribuida por estados. Las mejores condiciones para el cultivo de camarón en México, están representadas por terrenos salinos, aldeaños a los esteros y lagunas costeras,

las cuales presentan condiciones de inundación estacional. Esta superficie disponible, que aún no se aprovecha ni en el 1% se ha seleccionado en las áreas que reúnen las mejores condiciones de cultivo con un mínimo de inversión (Peña, 1987).

TABLA 10. SUPERFICIE POTENCIALMENTE DISPONIBLE PARA LA CAMARONICULTURA EN MÉXICO (Hectáreas)	
ESTADO	SUPERFICIE
BAJA CALIFORNIA NORTE	1,000
BAJA CALIFORNIA SUR	3,000
SONORA	40,000
SINALOA	100,000
NAYARIT	92,000
COLIMA	3,000
OAXACA	50,000
CHIAPAS	15,000
TAMAULIPAS	5,000
VERACRUZ	15,000
TABASCO	1,500
CAMPECHE	10,000
TOTAL	335,000

Nota: Estos datos incluyen únicamente a terrenos en buenas condiciones

Fuente: Barrera, 1987

En México, el cultivo de camarón empezó su verdadero ascenso hace 5 años. Entre 1992 y 1993, el cultivo de camarón pasó de 8,326 a 11,846 Ton (cerca del 42%), siendo éste, el único rubro acuícola que tuvo un aumento en su producción. A fines de 1993, se contaban con 286 granjas camarónicas en el país, lo que lo ubica entre los 15 primeros productores de camarón de granja a nivel mundial y el tercero en América Latina (Hernández, 1994). En la figura 6 se presenta un gráfico de la producción acuícola de camarón con base en los datos de la tabla 9. Se puede apreciar el rápido desarrollo de esta actividad.

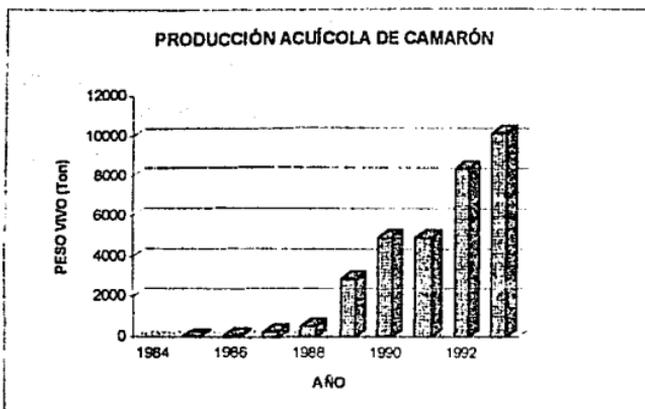


Figura 6. Producción acuícola de camarón  
Fuente: Secretaría de Pesca, 1993

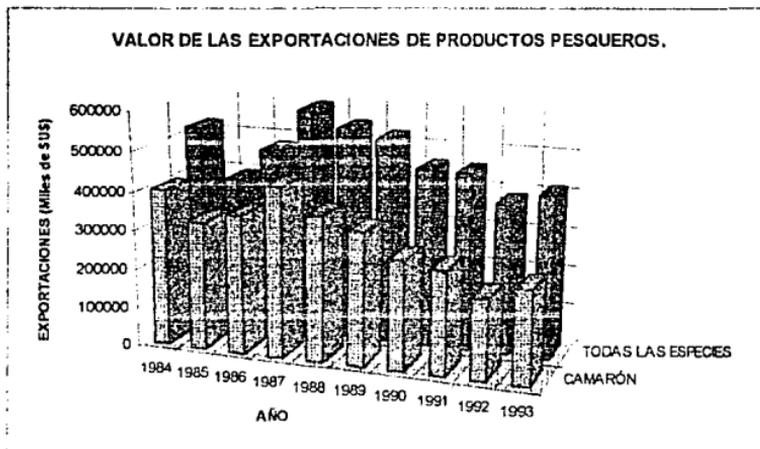


Figura 7. Valor de las exportaciones de productos pesqueros  
Fuente: Secretaría de Pesca, 1993

Las exportaciones de camarón representan una importante fuente de divisas para el país. Del total de exportaciones de productos pesqueros, el camarón aporta más del 50%, como se puede ver en la figura 7. Se observa también que el valor de las exportaciones ha venido disminuyendo desde 1988, lográndose una ligera recuperación en 1993.

Existen ambiciosos proyectos en acuicultura y se espera que para 1995 se genere ingresos por 200 millones de dólares gracias a las exportaciones de camarón cultivado (Hernández, 1994).

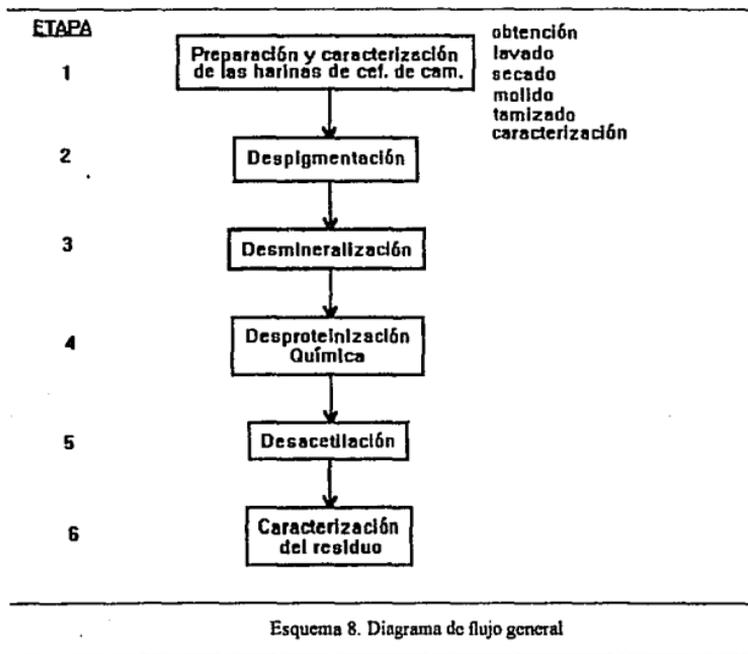
De las anteriores tablas y gráficas se puede observar el gran significado que tiene el camarón para el país. A su vez, se puede apreciar que el monto de captura no ha crecido como se esperaría, pero se está trabajando para lograr un repunte en esta actividad tanto por la vía de la captura como del cultivo.

Esta información da idea de los volúmenes de desechos de camarón que se producen en el país. Su aprovechamiento significaría darle un importante valor agregado a este subproducto que favorecería en todos los aspectos a la población ligada a la captura, cultivo y comercialización del camarón. Por ejemplo, considerando la producción anual promedio de 70 000 Ton/a, se tendría una generación de cefalotórax de camarón de 35 000 a 60 000 Ton/a (ya que parte de la "producción" considerada de camarón corresponde al crustáceo descabezado). Esta es una cantidad realmente importante, tomando en cuenta los posibles subproductos a obtener.

Actualmente en México, hay poca información acerca del aprovechamiento industrial del cefalotórax de camarón. Una de las únicas empresas que está trabajando en el desarrollo de una planta procesadora de dicho subproducto para obtener quitosana, se encuentra en el estado de Quintana Roo; sin embargo, atraviesa por algunas dificultades para lanzar su producto al mercado (Camarena, 1994). No existen reportes acerca del aprovechamiento de los pigmentos del cefalotórax de camarón, ni tampoco de las proteínas

#### 4. METODOLOGÍA

La metodología empleada para realizar este trabajo puede dividirse en las seis etapas que se presentan en la figura 8, más el empleo de un método enzimático, la determinación del contenido de aminoácidos y la evaluación de prefactibilidad.



A continuación se describe cada uno de estos puntos.

#### 4.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA

##### a) Obtención de la muestra

Los cefalotórax de camarón, mejor conocidos como cabezas, fueron obtenidos del mercado de mariscos La Viga, el más importante centro de distribución de pescados y mariscos en la ciudad de México. Las cabezas fueron proporcionadas gratuitamente por los comerciantes debido a que normalmente su presencia favorece la descomposición del camarón y el descabezamiento es una práctica cotidiana, arrojando este desecho a la basura. No se seleccionaron especies, pero predominaron las cabezas de camarón café (*Penaeus aztecus*) y blanco (*P. setiferus*), ambas del Golfo de México. Una vez obtenidas las muestras, se cubrieron con hielo y fueron transportadas así hasta el laboratorio.

##### b) Lavado

Las cabezas de camarón fueron colocadas en bolsas de malla de plástico y lavadas bajo el chorro de agua de la llave hasta que ésta quedara limpia. Luego se dejaron escurrir por aproximadamente 15 minutos.

##### c) Secado

Las cabezas lavadas y escurridas se distribuyeron en capas delgadas sobre charolas de aluminio y se secaron en un secador eléctrico marca Partlow, mod. 860P, a  $80 \pm 5^\circ\text{C}$ , durante 8 horas.

##### d) Molienda

Una vez secas las cabezas se molieron en un molino para cereales marca CeCoCo tipo S.. Es muy importante que las muestras estén completamente secas para evitar posibles dificultades durante la molienda

##### e) Tamizado

El tamizado se realizó empleando un tamizador eléctrico marca Steve-Shaker de W.S. Tyler Co., Ohio. Se obtuvieron 4 grupos con los siguientes intervalos de tamaños de partícula en mm: menores a 0.42; 0.42 a 0.84; 0.84 a 2.00 y 2.00 a mayores. En lo sucesivo, estas partículas se mencionaran con las abreviaturas P1, P2, P3 y P4, respectivamente. Se determinó la proporción que representa cada tamaño de partícula de la harina total .

##### f) Conservación

Las harinas fueron conservadas a temperatura de refrigeración ( $4^\circ\text{C}$  aprox.), en bolsas negras de plástico debidamente cerradas y rotuladas, hasta el momento de ser ocupadas en el estudio.

### g) Caracterización

La humedad, cenizas, grasa cruda y fibra, se determinaron en la harina entera por los métodos estándar (AOAC, 1980). La descripción detallada de estos métodos se encuentra en el apéndice 1.

El contenido de proteína en las harinas de cefalotórax de camarón se hizo restando el nitrógeno quitínico al porcentaje de nitrógeno total y multiplicando esta diferencia por el factor 6.25. Para ello tuvo que determinarse previamente el contenido de quitina de las muestras empleando un método riguroso como es el de Horowitz y col. (1957). La descripción de este método, así como el diagrama de flujo aparecen en el apéndice 2.

## 4.2 DESPIGMENTACIÓN

La despigmentación se realizó tomando como base los trabajos de Meyers y Bligh, 1981 y Chen y Meyers, 1982a.

La despigmentación se realizó sobre las partículas P1, P2, y P3, utilizando como variantes la relación masa:volumen (1:10 y 1:15), el tipo de solvente extractor (éter de petróleo, acetona y la mezcla éter de petróleo:acetona:agua, en relación 15:75:10) y el tiempo de tratamiento (3 y 12 horas). Se mantuvieron constantes la agitación (300 rpm), la temperatura (ambiente) y la protección de la luz. Se hizo una determinación del contenido de cenizas, grasa, y nitrógeno total antes y después de la despigmentación, así como el rendimiento. El contenido de pigmentos en  $\mu\text{g/g}$  de muestra se determinó con la fórmula de Kelly y Harmon, 1972, utilizando un coeficiente de extinción de 2,400, tal como lo propone Kanemitsu y Aoe (1958), para el éter de petróleo a 470 nm. La descripción detallada de la técnica, así como el diagrama de flujo se presentan en el apéndice 3.

El efecto de agentes antioxidantes para aumentar la estabilidad de los pigmentos fue evaluado añadiendo BHA (butil-hidroxitolueno), BHT (butil-hidroxianisol) o BHA + BHT, en una concentración final del 0.1% con respecto a la harina. Esta prueba se realizó con el tratamiento que dió el mejor resultado en cuanto a la extracción de pigmentos (E:A:A, como se verá más adelante). El antioxidante fue añadido antes de comenzar la extracción con el solvente elegido y el resto del procedimiento fue el mismo. La evaluación de la estabilidad se hizo con base en la cuantificación espectrofotométrica del contenido de pigmentos durante cuatro semanas, para lo cual, cada semana se tomaron alícuotas de 1 mL de las soluciones iniciales y se diluyeron en 9 mL de éter de petróleo para su cuantificación. Las soluciones iniciales de las cuales se tomaron las alícuotas, se conservaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), en frascos de color ámbar y perfectamente tapados.

### 4.3 DESMINERALIZACIÓN

La desmineralización se llevó a cabo tomando como base los trabajos de Bough y col., 1978a; No y col., 1989; Mathur y Narang, 1990.

Las harinas despigmentadas fueron sometidas a la desmineralización química con HC1 1N. Se utilizaron como variables el tamaño de partícula (P2, de 0.42 a 0.84 mm y P3, de 0.84 a 2.00 mm), la relación masa:volumen (1:10 y 1:15) y el tiempo de tratamiento (0.5, 1, 2, 3 y 6 horas). El resto de las condiciones fueron: temperatura ambiente (25°C en promedio) y agitación constante (300 rpm). La técnica detallada aparece en el apéndice 4, junto con el diagrama de flujo. La evaluación de la desmineralización se hizo con base en contenido de cenizas de las muestras antes y después del tratamiento. Otras determinaciones que se hicieron antes y después del tratamiento fueron el contenido de grasa y de nitrógeno total, así como la determinación del rendimiento.

### 4.4. DESPROTEINIZACIÓN QUÍMICA

La desproteínización química se realizó tomando como base los trabajos de Bough y col., 1978a; No y col., 1989; Mathur y Narang, 1990.

Las harinas despigmentadas y desmineralizadas, fueron sometidas a un proceso de desproteínización química con NaOH caliente para obtener quitina como producto final. Las variantes de esta etapa fueron el tamaño de partícula (P2, de 0.42 a 0.84 y P3 de 0.84 a 2.00 mm), la relación masa:volumen (1:10 y 1:15), la concentración de NaOH (2.5, 3.5 y 4.5%) y el tiempo de tratamiento (0.5 y 3 horas) se mantuvieron constantes la temperatura (65°C) y la agitación (300 rpm). Se hizo un análisis de grasa, cenizas y nitrógeno total antes y después del tratamiento. El rendimiento también fue determinado. La descripción del método empleado para la desproteínización viene en el apéndice 5. La evaluación del grado de desproteínización se hizo con base en el contenido de nitrógeno total, considerando que la quitina pura contiene 6.9% de nitrógeno (Muzzarelli, 1978) y que un exceso sobre este valor corresponde al nitrógeno proteico. El residuo, que como se dijo se espera sea quitina, fue caracterizado y comparado con la quitina comercial Sigma a través de un análisis comparativo por espectroscopía infrarroja de ambas quitinas.

### 4.5 DESACETILACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

La desacetilación se realizó en base a los métodos descritos por Bough y col., 1978a; Muzzarelli, 1978; No y Meyers, 1989 y Mathur y Narang, 1990.

La desacetilación consistió en someter las muestras desproteínizadas a la acción de una solución concentrada de NaOH hirviendo, con el fin de romper el enlace entre el grupo

amino y el grupo carboxilo de la molécula de quitina. Se utilizaron como variantes el tamaño de partícula (P2, de 0.42 a 0.84 y P3 de 0.84 a 2.00 mm), la relación masa:volumen (1:15 y 1:20), el tipo de atmósfera (aire y nitrógeno) y el tiempo de tratamiento (15 y 60 minutos). Se mantuvieron como condiciones constantes la temperatura ( $105 \pm 5^\circ\text{C}$ ), la agitación y el calentamiento con reflujo. El detalle de la técnica, así como el diagrama de flujo se presentan en el apéndice 6. Se determinó el contenido de cenizas, grasa y nitrógeno final en las muestras antes y después del tratamiento, así como el rendimiento. La evaluación de la desacetilación para el paso de quitina a quitosana se hizo en base a la solubilidad (2g de muestra en 100 mL de ácido acético al 2%), contenido de nitrógeno, grado de desacetilación y viscosidad. Se hizo, además, un estudio por espectroscopía infrarroja de estos productos y de la quitina comercial Sigma, comparándose los resultados.

La viscosidad se determinó con un viscosímetro Brookfield modelo LVF. a 6, 12, 30, 60 y 100 r.p.m. empleando las agujas 1 y 2. Antes de proceder a las lecturas, las muestras se disolvieron en la solución de ácido acético con la ayuda de un agitador magnético. La temperatura de trabajo fue la del ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). La viscosidad (en centipoises), se obtuvo multiplicando la lectura en el aparato por un factor reportado en tablas según la aguja y velocidad empleadas.

El grado de desacetilación se determinó según la técnica de titulación de quitosana descrita por Broussignac, 1968. Esta técnica consiste en medir las variaciones de pH al titular una solución de quitosana en HCl 0.3N con NaOH 0.1N. El grado de desacetilación en %, se obtiene aplicando la fórmula sugerida por el autor con base en dos puntos de la gráfica. La técnica completa viene descrita en el apéndice 9.

$$\% \text{ de NH}_2 = \frac{16.1 (Y - X)}{m}$$

donde:  
 X= mL NaOH (punto de inflexión menor)  
 Y= mL NaOH (punto de inflexión mayor)  
 m= g de muestra

#### 4.6 MÉTODO ENZIMÁTICO

Una vez establecidas las condiciones para obtener quitosana a partir del cefalotórax fresco, se tomó esta metodología con una modificación: la sustitución de la desproteínización química por una desproteínización enzimática, esperando obtener un producto de mejor calidad y menos dañado. A esta metodología se la denominará "método enzimático" para diferenciarla de la anterior a la cual se llamará "método químico".

La desproteínización enzimática consistió básicamente en emplear una enzima que haya demostrado ser efectiva en la desproteínización del cefalotórax de camarón. En un trabajo previo llevado a cabo en este mismo laboratorio se probó el efecto de varias enzimas para desproteínizar el cefalotórax de camarón, se encontró que una enzima, la proteasa alcalina, es la más efectiva. Esta enzima es producida por el *Bacillus licheniformes* y se comercializa bajo el nombre de "Proteasa Alcalina 3000" (Escobedo, 1994).

Las condiciones de trabajo fueron: pH 9.5 regulado con un amortiguador o "buffer" de carbonatos, relación masa:volumen de 5%, relación enzima:sustrato de 1% (31.25U), temperatura de 50°C y 3 horas de tratamiento (Escobedo, 1994). La descripción completa de la técnica viene en el apéndice 7 .

#### 4.7 CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS

Se determinó el contenido de aminoácidos en las muestras de cefalotórax de camarón mediante un analizador de aminoácidos marca Beckman System Gold acoplado al Módulo de Solventes 126. Previamente, se hizo una hidrólisis de las muestras con HCl 6 N a 110°C durante 20 horas, según las especificaciones del equipo. El triptofano, que en estas condiciones es destruido, fue preparado de otra manera. La técnica completa de preparación de las muestras viene descrita en el apéndice 8.

Las muestras para el análisis se presentaron desengrasadas, despigmentadas completamente secas y homogéneas. La lectura del contenido de aminoácidos en mg/g se obtiene directamente del equipo.

#### 4.8 ESTIMACIÓN DE COSTOS DE PROCESO A NIVEL DE LABORATORIO

Se realizó un estudio de costos integrando los requerimientos de material, reactivos y equipo, tomando como base al tratamiento elegido en cada etapa y su rendimiento. Se hizo un cálculo estimado del costo de 100g de quitosana a partir de la materia prima, es decir, las cabezas de camarón frescas.

#### 4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO (Snedecor y Cochran, 1986)

En la despigmentación, desmineralización y desproteínización se obtuvieron valores provenientes de tres réplicas para cada factor. Se realizó un análisis de varianza para ver el efecto de cada factor en el tratamiento. Se compararon la hipótesis nula de "no hay efecto", contra la hipótesis alternativa de "sí hay efecto" a un nivel de significancia del 5%.

Para el caso de la desacetilación, la tabla de análisis de varianza se obtuvo empleando el método de Yates para un experimento factorial  $2^4$  sin réplica. Las hipótesis y el nivel de significancia fueron los mismos que para las tres etapas anteriores.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

La preparación de las muestras, es decir, la obtención, lavado, secado, molienda y tamizado no representan problema alguno, debido a que se utilizan procesos comunes y accesibles. Como resultado del tamizado de las muestras, se encontró que las fracciones mayoritarias son las que corresponden a las particular P2 (de 0.42 a 0.84 mm) y P3 (de 0.84 a 2.00 mm) con un 39.56 y 33.24%, respectivamente, del total de las harinas. Juntas representan más del 70% del total de las harinas. Las partículas P4 (mayores a 2 mm), tienen la ventaja de poder ser molidas nuevamente. En la tabla 11 se presenta la clasificación de partículas de harina de cefalotórax de camarón según su tamaño, en términos de porcentaje.

Tabla 11. Clasificación y porcentaje de partículas de cefalotórax de camarón a partir de 1 kg de muestra molida			
TAMAÑO DE PARTÍCULA mm	RETENIDAS POR TAMIZ #	PESO g	PORCENTAJE
P1    menor a 0.42		190.40	19.04
P2    0.42 - 0.84	40	395.60	39.56
P3    0.84 - 2.00	20	332.40	33.24
P4    mayor a 2.00	10	81.60	8.16
TOTAL		1,000.00	100.00

Los resultados son el promedio de tres determinaciones

El contenido de humedad de las muestras de cefalotórax de camarón en las diferentes etapas del procesamiento se reportan en la tabla 12. En ella se puede apreciar un alto contenido de humedad de las cabezas frescas, 78.7% y una reducción al 9.6% después del secado. El contenido de humedad continúa disminuyendo, aunque en menor proporción, al moler las cabezas, seguramente debido al calor que se genera en el molino durante esta operación. Finalmente, se observa que al separar las partículas por su tamaño, las de tamaño P3 son las que poseen una humedad ligeramente menor a las otras. Estos valores permiten hacer ajustes cuando se trabaje en base seca (b.s.).

Tabla 12. Humedad en muestras de cefalotórax de camarón.

MUESTRA	PESO INICIAL	PESO FINAL	HUMEDAD
	g	g	%
Cabeza fresca	10	2.13	78.7
Cabeza seca	10	9.04	9.6
Harina entera	10	9.27	7.3
Harina P1	10	9.25	7.5
Harina P2	10	9.26	7.4
Harina P3	10	9.31	6.9

Los resultados son el promedio de tres determinaciones.

En la tabla 13 se presenta la composición de la harina entera de cefalotórax de camarón empleada en este trabajo y sus valores se comparan con los reportados por el Agricultural Handbook, 1975. Se observa que el contenido de cenizas y fibra cruda es muy parecido en ambos trabajos. El contenido de grasa fue algo mayor en este trabajo; pero el de proteínas fue menor, quizás debido a que la determinación de proteínas, para el caso del cefalotórax de camarón, es un punto muy polémico por no haber un factor para transformar directamente el nitrógeno total en proteínas. En este caso se utilizó un factor de 5.4, cuyo origen se explicará en la discusión de la tabla 14.

Se puede decir que el cefalotórax de camarón está compuesto mayoritariamente de proteína, lo cual lo hace altamente valioso. El valor nutricional se discutirá al presentar los resultados del contenido de aminoácidos. Las cenizas y la fibra cruda, que incluye a la quitina, son los siguientes componentes en abundancia. Ambas fracciones presumiblemente corresponden a las sales minerales y la quitina, sustancias que conforman el caparazón del camarón.

Tabla 13. Composición de harina de cefalotórax de camarón (b.s.)

CARACTERÍSTICA	BIBLIOGRAFÍA (1)	ESTE TRABAJO (2)
Proteína cruda	47.70	44.71 (3)
Cenizas	26.86	26.32
Fibra cruda	19.35	20.65
Grasa	4.63	5.24
Carbohidratos asimilables por diferencia	1.46	3.08
TOTAL	100.00	100.00

(1) Agricultural Handbook, 1975.

(2) Promedio de tres determinaciones.

(3) Calculada multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 5.4.

En un trabajo realizado por Simpson y Haard (1985), se reporta un contenido de proteína de 43.13%, grasa cruda de 25.2%, cenizas 26%, humedad 4.4% y carbohidratos

14.2%. Los resultados obtenidos en este trabajo son semejantes en todas las fracciones, excepto en el contenido de grasa. Descartando un error experimental, es posible que esta diferencia se deba, principalmente, a las especies empleadas.

En la tabla 14 se presenta el valor de proteína cruda y proteína corregida en las harinas P2 y P3. El primer valor corresponde a la proteína que se obtiene al multiplicar por 6.25 el contenido de nitrógeno total en la muestra. El segundo valor se obtiene restando el nitrógeno quitínico del nitrógeno total, para lo cual se tuvo que hacer un estudio del contenido de quitina de la muestra por el método de Horowitz y col. (1957), cuya técnica se describe en el apéndice 2. Así, la diferencia corresponde exclusivamente al nitrógeno proteico, por lo cual, al multiplicar este valor por 6.25 se obtiene la proteína corregida en la muestra. Este mismo resultado se obtiene multiplicando el nitrógeno total por 5.40 y 5.28 en las partículas P2 y P3, respectivamente. La proteína total reportada en la tabla 3, se obtuvo multiplicando el contenido de nitrógeno total por 5.40, debido a que la distribución de las harinas por tamaño de partícula tiene su valor más alto en el intervalo que corresponde a la partícula P2.

Tabla 14. Cálculo del contenido real de proteínas en muestras de cefalotórax de camarón según su tamaño de partícula			
DETERMINACIÓN		PARTÍCULA	
		P2 0.42-0.84 mm	P3 0.84-2.00 mm
a) Quitina estándar (1)	%	15.84	17.12
b) Nitrógeno quitínico	%	6.88	7.02
c) Nitrógeno quitínico	g	1.09	1.20
d) Nitrógeno	g/100 g de harina	1.09	1.20
e) Nitrógeno total en la muestra	%	8.04	7.71
f) Proteína total, factor 6.25	%	50.25	48.19
g) Nitrógeno quitínico	%	1.09	1.20
h) Quitina (Nx100/6.9)	%	15.80	17.39
i) Nitrógeno corregido (e-g)	%	6.95	6.51
j) Proteína corregida	%	43.44	40.69
k) Factor (j/e)		5.40	5.28

(1) Obtenida por el método de Horowitz y col., (1957).

### 5.1.1 Pigmentos

En la tabla 15 se presenta la cantidad de pigmentos extraídos del cefalotórax de camarón bajo diferentes condiciones. Se observa que la extracción de pigmentos aumenta al disminuir el tamaño de partícula; asimismo, que el solvente extractor más efectivo lo constituye la mezcla éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10). La partícula P1 (menor a 0.42 mm), permite la extracción de cerca de 25 µg de pigmento por g de harina; mientras

que la partícula P2 sólo 20  $\mu\text{g/g}$  y la P3 unos 15 a 16  $\mu\text{g/g}$ . Este efecto favorecedor de una disminución en el tamaño de partícula sobre la extracción de pigmentos ya fue mencionado por Chen y Meyers, 1982a; sin embargo, No y col., 1989, obtuvieron una mayor extracción con tamaños de partícula de 2.00 mm que con partículas de 0.5 mm.

Tabla 15 Pigmentos en muestras de harina de cefalotórax de camarón extraídos bajo diferentes condiciones ( $\mu\text{g/g}$ de muestra)							
SOLVENTE	TIEMPO h	PARTÍCULA P1 menor a 0.42 mm		PARTÍCULA P2 0.42 - 0.84 mm		PARTÍCULA P3 0.42 - 0.84 mm	
		REL. MASA:VOL.		REL. MASA:VOL.		REL. MASA:VOL.	
		R1 1:10	R2 1:15	R1 1:10	R2 1:15	R1 1:10	R2 1:15
S1 ACETONA	T1 3	20.6657	20.4583	16.4306	16.2500	13.2222	13.7778
	T2 12	21.5278	24.4583	16.8750	17.8333	15.4306	14.6667
S2 ETER DE PETRÓLEO	T1 3	6.5167	6.5944	4.2278	4.3472	3.4834	2.9611
	T2 12	6.4333	6.6917	4.4500	4.3361	3.2639	3.6333
S3 ÉTER: ACETONA: AGUA (15:75:10)	T1 3	24.3750	24.4583	19.2222	20.0139	16.3195	15.6667
	T2 12	24.5833	24.7500	19.5695	19.8889	16.5694	14.9306

Los valores son el promedio de tres determinaciones.

Condiciones constantes: agitación (300 rpm), temperatura (ambiente) y al abrigo de la luz.

En cuanto a la concentración de pigmentos obtenida, los resultados de este trabajo fueron superiores a los encontrados por Meyers y Bligh, 1981. Estos autores reportan un contenido de pigmentos de 10  $\mu\text{g/g}$  en los desechos de camarón. En el cangrejo, el contenido de pigmentos es mayor. No y col., 1989, lograron extraer hasta  $119 \pm 5.9 \mu\text{g}$  de pigmentos por cada gramo de muestra de este crustáceo. En otro trabajo, Choubert y Luquet, 1983, encontraron un contenido de 25.2  $\mu\text{g/g}$  en camarón noruego.

En la tabla 16 se presenta el análisis de varianza de la despigmentación. Los valores que dan origen a esta tabla se presentan en la sección de despigmentación del apéndice 10.

Se observa que los factores que afectan la despigmentación son: el tamaño de partícula, el tipo de solvente extractor y la interacción de ambos factores. Esto indica que para extraer pigmentos, es mejor tener partículas de menos de 0.42 mm y utilizar el sistema éter de petróleo:acetona:agua. El resto de los factores e interacciones no son significativos por lo que es indiferente emplear una relación masa:volumen de 1:10 ó 1:15 y un tiempo de 3 ó 12 horas.

Con el fin de optimizar recursos y tiempo, se elige la mezcla éter de petróleo:acetona:agua, una relación masa:volumen de 1:10 y un tiempo de tres horas como condiciones suficientes para lograr una buena extracción de pigmentos para los tres tamaños de partícula.

**Tabla 16. Análisis de varianza (ANDEVA) de la despigmentación**

FACTOR (1)	g. l.	S.C.	M.C.	F. Cal.	F. Crit.	Efecto significativo
P	2	778.9972	389.4986	83.9437	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	sí
R	1	0.0510	0.0510	0.0110	$F_{1,72,0.05} = 3.98$	no
S	2	4 797.2707	2 398.6354	516.9473	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	sí
T	1	4.7709	4.7709	1.0282	$F_{1,72,0.05} = 3.98$	no
PR	2	4.9622	2.4811	0.5347	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	no
PS	4	109.8008	27.4502	5.9160	$F_{4,72,0.05} = 3.60$	sí
PT	2	4.9888	2.4944	0.5376	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	no
RS	2	0.1750	0.0875	0.0189	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	no
RT	1	0.0690	0.0690	0.0149	$F_{1,72,0.05} = 3.98$	no
ST	2	6.4225	3.2113	0.6921	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	no
PRS	4	10.3140	2.5785	0.5557	$F_{4,72,0.05} = 3.60$	no
PRT	2	5.4280	2.7140	0.5849	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	no
PST	4	10.6019	2.6505	0.5712	$F_{4,72,0.05} = 3.60$	no
RST	2	0.6141	0.3071	0.0662	$F_{2,72,0.05} = 3.13$	no
PRST	4	7.7590	1.9398	0.4181	$F_{4,72,0.05} = 3.60$	no
$\epsilon$	72	334.0794				

(1) P = Tamaño de partícula; R = Relación masa:volumen; S = Solvente extractor, T = Tiempo;  $\epsilon$  = Error experimental

En la tabla 17 se presenta la caracterización de las harinas de cefalotórax de camarón, según el tamaño de partícula antes y después de la despigmentación. La composición después de la despigmentación corresponde a las muestras cuyo tratamiento de despigmentación dió el mejor resultado; es decir, muestras tratadas con la mezcla éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), en una relación masa:volumen de 1:10 y un tiempo de 3 horas. Se observa que el tratamiento afecta ligeramente a la fracción correspondiente a las cenizas y el nitrógeno total, como era de esperarse. En cambio la fracción correspondiente a la grasa cruda sufre una disminución de 35%, aproximadamente, debido a que el éter y la acetona empleadas, son solventes lipofílicos y extraen parte de la grasa.

Tabla 17. Composición de harinas de cefalotórax de camarón antes y después de la despigmentación (1)

PARTICULA mm	CENIZAS %		GRASA %		NITRÓGENO %		RENDIMIENTO	
	INICIO	FIN	INICIO	FIN	INICIO	FIN	g INICIO	g FIN %
P1 menor a 0.42	23.90	24.90	6.07	3.89	8.08	8.44	10	9.2 92
P2 0.42 - 0.84	24.60	25.90	5.90	4.12	8.04	7.94	10	9.4 94
P3 0.84 - 2.00	28.10	27.13	5.11	3.52	7.71	7.86	10	9.3 93

(1) Despigmantadas con una mezcla de éter de pentaacetona:agua, (15:75:10) durante 3 horas y con una relación masa:volumen de 1:10.

Los resultados son el promedio de tres determinaciones.

En cuanto al rendimiento, se observa que hay una ligera pérdida de muestra, que más que al tratamiento, se debe a la manipulación, especialmente a la porción que queda adherida al papel filtro durante la filtración.

El efecto de los antioxidantes BHA, BHT o una mezcla de ellos, con una proporción final del 0.1% con respecto a la muestra de harina entera de cefalotórax de camarón, arroja los resultados que se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Influencia de la adición de agentes antioxidantes ( BHA y BHT) al 0.1% en la retención de pigmentos carotenoides extraídos a partir de harina de cefalotórax de camarón

SEMANA	SIN		BHA		BHT		BHA + BHT	
	ANTIOXIDANTE							
	µg/g	% ret.	µg/g	% ret.	µg/g	% ret.	µg/g	% ret.
0	19.42	100	19.58	100	19.79	100	19.17	100
1	17.09	88	19.71	101	19.83	100	19.75	103
2	12.46	64	16.33	83	19.08	96	19.42	101
3	6.50	33	15.06	77	16.98	86	18.25	95
4	1.79	9	12.50	64	15.00	76	15.25	80

Los resultados son el promedio de dos determinaciones.

De la tabla anterior se puede afirmar que ambos agentes antioxidantes retardan la degradación de las astaxantinas, obteniéndose un mayor efecto cuando están combinados. En la figura 9 se representa una gráfica con estos resultados. En la bibliografía se encuentra información sobre el efecto positivo de algunos antioxidantes al ser agregados tanto a muestras frescas como secas (Meyers y Bligh, 1981; Chen y Meyers, 1982b). Sería interesante y útil probar el efecto de estos y otros antioxidantes en muestras frescas y secas de cefalotórax de camarón.

EFFECTO DE ANTIOXIDANTES EN LA RETENCIÓN DE PIGMENTOS  
EXTRAÍDOS DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN

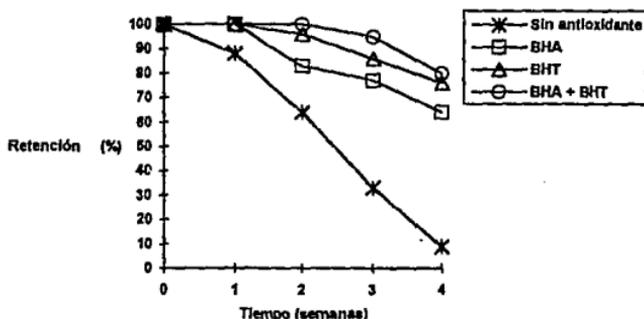


Figura 9. Efecto de antioxidantes en la retención de pigmentos extraídos del cefalotórax de camarón

### 5.1.2 Desmineralización

La desmineralización se evaluó cuantificando las cenizas en la muestras después del tratamiento con HCl. Los resultados se presentan en la tabla 19 y en la figura 10. La partícula P1, no fue considerada por las razones que se explicarán más adelante. Se encontró que aún con seis horas de tratamiento, no fue posible remover el 100% de sales minerales en ninguno de los casos, probablemente debido a que algunas sales resultan inaccesibles a la solución ácida por estar inmersas en el complejo quitina-proteína del cefalotórax de camarón. La desmineralización es mayor en los primeros 30 minutos de tratamiento. Este resultado difiere un poco del encontrado por No y col. (1989), en el cual se produce una desmineralización de desechos de cangrejo en condiciones parecidas y se alcanza una reducción del 60 al 0.3% de cenizas en solo 30 minutos. Es posible que esto se deba al menor contenido de proteína en las harinas de cangrejo en comparación con las de camarón y, por lo tanto, una mayor exposición de las sales al solvente ácido.

Tabla 19. Determinación de cenizas en harinas de cefalotórax de camarón <sup>(1)</sup> desmineralizadas <sup>(2)</sup> bajo diversas condiciones (%)				
TIEMPO	TAMAÑO DE PARTICULA			
	P2 0.42 - 0.84 mm		P3 0.84 - 2.00 mm	
	REL. MASA:VOLUMEN		REL. MASA:VOLUMEN	
	R1 1:10	R2 1:15	R1 1:10	R2 1:15
T1 0.5 h	16.38	11.80	17.46	10.01
T2 1 h	5.94	4.62	6.37	6.09
T3 2 h	3.92	3.78	4.30	3.87
T4 3 h	1.13	1.01	1.21	1.16
T5 6 h	0.90	0.94	0.96	0.95

(1) Harinas previamente des pigmentadas con éter:acetona:agua (15:75:10), relación masa:volumen de 1:10, durante 3 horas.

(2) Condiciones constantes: temperatura (ambiente) y agitación (300 rpm).  
Los valores son el promedio de tres determinaciones

GENIZAS EN HARINA DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN  
DESMINERALIZADA BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

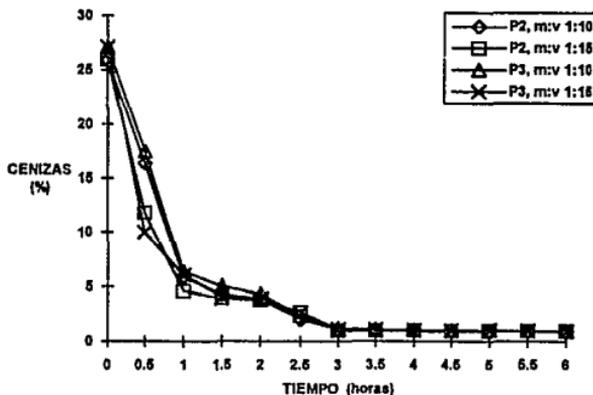


Figura 10. Cenizas en harina de cefalotórax de camarón desmineralizada bajo diferentes tratamientos.  
Para más información, vease la tabla 19.

En la tabla 20 se presenta el análisis de varianza de la desmineralización. Se observa que la desmineralización es afectada por la relación masa:volumen, el tiempo de tratamiento y la interacción de ambos factores. Para el caso de la relación masa:volumen, en las dos primeras horas es mejor la relación 1:15 que la 1:10, por remover una cantidad relativamente mayor de sales minerales; sin embargo esta diferencia llega a ser menor al 0.1% entre las 3 y 6 horas, para ambas relaciones. En cuanto al tiempo, un tratamiento de seis horas genera una desmineralización mayor; sin embargo, se obtienen valores muy aproximados con solo tres horas de tratamiento. Para determinar con mayor precisión el tiempo suficiente de desmineralización, se hizo una comparación de medias entre las 2 contra 3 horas y 3 contra 6 horas, incluyendo en ambos casos las relaciones m:v de 1:10 y 1:15. Esta comparación de medias se realizó por medio de la distribución "t" de student y el resultado, que se presenta en la tabla 41 (apéndice 10), indicó que sólo fue significativo el aumento del tiempo de 2 a 3 horas.

Si se considera que un tratamiento ácido, como el empleado, podría afectar la calidad de la quitosana (Broussignac, 1968; Muzzarelli, 1978; Bough y col., 1978; Madhavan y Ramachandran, 1989) y que éste es el producto hasta donde se pretende llegar, es deseable inclinarse hacia las condiciones menos rigurosas; es decir, un tiempo de tres horas y una relación masa:volumen de 1:10. Ambas condiciones, como se explicó antes, son suficientes para desmineralizar adecuadamente las muestras.

FACTOR (1)	G.L.	S.C.	M.C.	F calculada	F crítica	Efecto significativo
P	1	0.57	0.57	0.23	$F_{1, 40, 0.05} = 4.0848$	no
R	1	30.81	30.81	12.63	$F_{1, 40, 0.05} = 4.0848$	sí
T	4	1349.92	337.48	138.35	$F_{4, 40, 0.05} = 2.6060$	sí
PR	1	0.69	0.69	0.28	$F_{1, 40, 0.05} = 4.0848$	no
PT	4	2.72	0.68	0.28	$F_{4, 40, 0.05} = 2.6060$	no
RT	4	79.91	19.98	8.19	$F_{4, 40, 0.05} = 2.6060$	sí
PRT	4	6.42	1.61	0.66	$F_{4, 40, 0.05} = 2.6060$	no
E	40	97.57	2.44			

(1) P = Tamaño de partícula; R = relación masa:volumen; T = tiempo de tratamiento;

PR, PT, RT y PRT = interacción entre esos factores; E = error experimental.

En la tabla 21 se presenta la composición de las muestras antes y después de la desmineralización. Se puede apreciar que ésta es una etapa crítica en cuanto al rendimiento. En el caso de la partícula P1, que es la más pequeña, el rendimiento es aún más bajo debido a que sufre una importante pérdida durante el lavado en el tamiz. Para corregir esto, se necesitaría adaptar este paso al tamaño de partícula y esto implicaría tratarla de forma

diferente a las demás, por lo que se decide retirarla de las siguientes etapas del proyecto, a pesar de que esta partícula es la que permite la mayor extracción de pigmentos.

PARTÍCULA mm	CENIZAS %	GRASA %	NITRÓGENO %	RENDIMIENTO	
	INICIO - FIN	INICIO - FIN	INICIO - FIN	g INICIO - g FIN	%
P1 menor a 0.42	24.91 - 0.90	3.89 - 3.82	8.44 - 11.17	10 - 1.4	14
P2 0.42 - 0.84	25.90 - 1.09	4.12 - 3.88	7.94 - 10.70	10 - 3.6	36
P3 0.84 - 2.00	27.13 - 1.21	3.52 - 3.56	7.86 - 9.32	10 - 3.8	38

(1) Harinas previamente despigmentadas con la mezcla éter:acetona:agua, (15:75:10) en proporción 1:10 durante 3 horas. Desmineralización realizada con HCl 1N durante 3 horas, rel. m:v 1:10, temperatura ambiente y agitación constante a 300 rpm.

Los resultados son el promedio de tres determinaciones.

### 5.1.3 Desproteínización química

En la tabla 22 se presenta el resultado de la desproteínización química bajo diferentes tratamientos; se esperaba que el producto final fuera quitina. La evaluación de la desproteínización se realizó con base en el contenido de nitrógeno de las muestras, con el conocimiento de que la quitina tiene un contenido de nitrógeno de aproximadamente 6.9% (Muzzarelli, 1978). En dicha tabla, se puede apreciar que en ningún caso se llegó a este valor teórico, siendo las condiciones que dieron los valores más cercanos, un tiempo de tres horas y una concentración de NaOH del 4.5% para todas las relaciones masa:volumen y tamaño de partícula.

Existe información que indica la presencia de complejos entre la quitina y las proteínas, muy resistentes a la mayoría de tratamientos (Muzzarelli, 1978; Austin y col., 1981; Mathur y Narang, 1990). Es posible que debido a estos complejos, se obtengan valores por arriba de 6.9% de nitrógeno. No y col. (1989), afirman que es improbable encontrar una quitina totalmente libre de proteínas. En la tabla 22 se observa también que un tiempo de tres horas, da valores más cercanos a 6.9 que los de media hora. Lo mismo sucede con la solución al 4.5% de NaOH sobre las de 3.5 y 2.5% y también con la relación masa:volumen de 1:15 sobre la 1:10.

Tabla 22. Determinación de nitrógeno en muestras de cefalotórax de camarón <sup>(1)</sup> desproteinizadas bajo diferentes condiciones (%)

SOLUCIÓN NaOH %		TIEMPO h		TAMAÑO DE PARTICULA			
				P2 0.42 - 0.84 mm		P3 0.84 - 2.00 mm	
				REL. MASA:VOLUMEN		REL. MASA:VOLUMEN	
		R1 1:10	R2 1:15	R1 1:10	R2 1:15		
S1 2.5	T1 0.5	10.71	6.85	10.66	9.19		
	T2 3.0	9.16	8.19	9.02	8.13		
S2 3.5	T1 0.5	9.00	8.58	9.05	8.44		
	T2 3.0	7.81	7.63	7.67	7.20		
S3 4.5	T1 0.5	8.94	8.16	8.80	8.11		
	T2 3.0	7.26	7.14	6.15	7.16		

(1) Harinas de cefalotórax de camarón previamente despigmentadas y desmineralizadas. La despigmentación se hizo con la mezcla éter:acetona:agua (15:75:10), relación masa:vol. 1:10 y 3 h. La desmineralización se realizó con HCl 1N, rel. masa:vol. 1:10 y 3 h.

Los valores reportados son el promedio de dos determinaciones

Tabla 23 Análisis de varianza (ANDEVA) de la desproteización química

FACTOR (1)	g. l.	S.C.	M.C.	F. Calculada	F. Crítica	Efecto significativo
P	1	0.01	0.01	0.01	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	no
R	1	7.45	7.45	6.83	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	sí
S	2	13.32	6.66	6.11	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	sí
T	1	16.28	16.28	14.92	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	sí
PR	1	0.85	0.85	0.78	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	no
PS	2	1.61	0.81	0.74	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
PT	1	1.24	1.24	1.14	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	no
RS	2	6.29	3.15	2.89	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
RT	1	3.20	3.20	2.93	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	no
ST	2	1.43	0.72	0.66	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
PRS	2	1.10	0.55	0.54	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
PRT	1	0.15	0.15	0.14	$F_{1,24,0.05} = 4.26$	no
PST	2	0.57	0.29	0.27	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
RST	2	1.21	0.61	0.56	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
PRST	2	1.45	0.73	0.67	$F_{2,24,0.05} = 3.40$	no
E	24	26.18	1.01			

(1) P = Tamaño de partícula; R = relación masa:volumen; S = solución de NaOH; T = tiempo de tratamiento; PR, PS, PT, RS, RT, ST, PRS, PRT, PST, RST Y PRST = interacción entre esos factores; E = error experimental

En la tabla 23 se presenta el análisis de varianza de estos resultados. El origen de esta tabla se presenta en la sección de desproteización del apéndice 10. El tamaño de partícula es el único factor individual que no influye en la desproteización; las interacciones tampoco son significativas. Los otros factores, es decir, la relación masa:volumen, el tiempo y la concentración de NaOH, tienen efecto significativo sobre los resultados.

Al observar el último renglón de la tabla 22 y relacionar esta información con el análisis de varianza de la tabla 23, se encuentra un valor de 6.15% de nitrógeno que es bajo con respecto a los demás y parece deberse más al error experimental que al grado de desproteización. Los valores que se aproximan más al valor teórico de 6.9%, son 7.14 y 7.16% de nitrógeno, que corresponden a un tiempo de tres horas de tratamiento, una relación masa:volumen de 1:15 y una concentración de NaOH de 4.5% para ambos tamaños de partícula. Estas condiciones son elegidas como las más convenientes para lograr una buena desproteización y si se hace el razonamiento presentado en la tabla 14, se tiene aproximadamente un 97% de desproteización con respecto a la harina desmineralizada.

Una vez seleccionado el mejor tratamiento, se confirmó que el producto obtenido correspondiera realmente a la quitina, haciendo un estudio por espectroscopía infrarroja. Los resultados se presentan más adelante, cuando se comparen los métodos químico y enzimático.

En la tabla 24 se presenta la comparación entre la composición de las muestras antes y después de la desproteización. Se observa que las cenizas residuales son cada vez menores y que la fracción de lípidos desaparece completamente. Los valores reportados en las condiciones finales corresponden a las muestras tratadas con NaOH al 4.5%, relación masa:volumen de 1:15 y un tiempo de tres horas. El rendimiento es bajo durante la desproteización química, debido a que la fracción proteica en las muestras es mayoritaria.

PARTICULA mm	CENIZAS %	GRASA %	NITRÓGENO %	RENDIMIENTO	
	INICIO - FIN	INICIO - FIN	INICIO - FIN	g INICIO - g FIN	%
P2 0.42-0.84	1.09 - 0.51	3.88 - 0	10.70 - 7.14	10 - 4.1	41
P3 0.84-2.00	1.21 - 0.65	3.56 - 0	9.32 - 7.16	10 - 4.4	44

(1) Harinas previamente despigmentadas y desmineralizadas. La despigmentación se hizo con éter:acetona:agua (15:75:10), rel. masa:vol. 1:10, 3 horas. La desmineralización se hizo con HCl 1N, rel. masa:vol. 1:10, 3 horas. La desproteización con NaOH al 4.5%, rel. masa:vol. 1:15, 3 horas.

Los resultados son el promedio de dos determinaciones.

#### 5.1.4 Desacetilación

Esta etapa tiene como objetivo convertir a la quitina en su principal derivado: la quitosana, identificable por sus características de viscosidad, solubilidad en soluciones ácidas diluidas y por tener un contenido de nitrógeno mayor al 6.9% de la quitina (Lusena y Rose, 1953; Muzzarelli, 1978). En la tabla 25 se presentan los resultados de la determinación de viscosidad de quitosanas obtenidas bajo diferentes tratamientos. Se utilizó esta variable por tener implícitas a las otras dos. En la tabla 26 se presenta el análisis de varianza de estos valores y la información preliminar y cálculos están en la sección de desacetilación del apéndice 10.

Tabla 25. Viscosidad de quitosanas obtenidas a partir de quitinas (1), desacetiladas bajo diferentes tratamientos (cp)					
		TAMAÑO DE PARTICULA			
		P2 0.42 - 0.84 mm		P3 0.84 - 2.00 mm	
ATMÓSFERA	TIEMPO min	REL. MASA:VOLUMEN		REL. MASA:VOLUMEN	
		R1 1:15	R2 1:20	R1 1:15	R2 1:20
A1 AIRE	T1 15	34	44	21	45
	T2 60	180	196	178	203
A2 NITRÓGENO	T1 15	96	318	139	174
	T2 60	459	316	671	328

(1) Harinas de cefalotórax de camarón previamente despigmentadas, desmineralizadas y desproteinizadas.

La despigmentación se hizo con la mezcla éter:acetona:agua (15:75:10), relación masa:vol. 1:10 y 3h.

La desmineralización se realizó con HCl 1N, rel. masa:vol. 1:10 y 3 h. La desproteínización se hizo con NaOH al 4.5%, rel. masa:volumen de 1:15, durante 3 horas.

En la anterior tabla se observa que el único factor que favorece marcadamente la desacetilación es la atmósfera de nitrógeno. Los demás presentan variaciones. Como se puede apreciar en casi todos los casos, al aumentar el tiempo de tratamiento, la viscosidad también aumenta, pero sin una proporción definida; sin embargo, en las casillas marcadas por P2, R2 y A2, un tiempo T1 de 15 minutos da incluso un valor mayor de viscosidad que el obtenido en T2 a los 60 minutos. Estas variaciones de viscosidad con respecto al tiempo, son explicables si se considera que hay tres factores en la desacetilación: la desproteínización de las quitinas, que va completándose al paso del tiempo; el grado de hidrólisis, que aumenta con el tiempo y, finalmente, la viscosidad que se ve favorecida con el avance de la desproteínización y desfavorecida con el avance de la hidrólisis del polímero. Es necesario determinar con más precisión el tiempo de tratamiento exacto para mejorar los valores de viscosidad de la solución de quitosana.

Tabla 26 Análisis de varianza (ANDEVA) de la desacetilación.

FACTOR (1)	g. l.	S.C.	M.C.	F. Calculada (2)	F. Crítica	Efecto significativo
P	1	841	841	210	F 1, 1, 0.05=161.45	si
R	1	1482	1482	371	F 1, 1, 0.05=161.45	si
A	1	160,000	160,000	40,000	F 1, 1, 0.05=161.45	si
T	1	172,225	172,225	43,056	F 1, 1, 0.05=161.45	si
PR	1	8,281	8,281	2,070	F 1, 1, 0.05=161.45	si
PA	1	1,056	1,056	264	F 1, 1, 0.05=161.45	si
PT	1	7,310	7,310	1,828	F 1, 1, 0.05=161.45	si
RA	1	5,776	5,776	1,444	F 1, 1, 0.05=161.45	si
RT	1	33,856	33,856	8,464	F 1, 1, 0.05=161.45	si
AT	1	11,772	11,772	2,943	F 1, 1, 0.05=161.45	si
PRA	1	10,506	10,506	26,265	F 1, 1, 0.05=161.45	si
PRT	1	20	20	5	F 1, 1, 0.05=161.45	no
PAT	1	5,929	5,929	1,482	F 1, 1, 0.05=161.45	si
RAT	1	35,156	35,156	8,789	F 1, 1, 0.05=161.45	si
PRAT	1	4	4			

(1) P = Tamaño de partícula; R = relación masa:volumen; A = Atmósfera; T = tiempo de tratamiento; PR PA, PT, RA, RT, AT, PRA, PRT, PAT, RAT Y PRAT = interacción entre esos factores.

(2) Calculada tomando el valor de la cuádruple interacción como estimador del error experimental

Del análisis de varianza presentado en la tabla 26, se puede ver que, todos los factores e interacciones resultaron significativos, excepto la interacción PRT (entre el tamaño de partícula, la relación masa:volumen y el tiempo). Esto es indicativo de que la viscosidad es fuertemente dependiente del tiempo de tratamiento, de la relación masa:volumen, el tipo de atmósfera y el tamaño de partícula, así como las interacciones de todos estos factores con la excepción mencionada. Estos resultados están de acuerdo con las afirmaciones de que factores como la atmósfera, la temperatura, el tiempo, el tamaño de partícula y la concentración de NaOH, son determinantes en las propiedades que tendrá la quitosana (Muzzarelli, 1978). Para definir un poco más el panorama se podrían ampliar los niveles de estos factores con la finalidad de establecer el punto en que la viscosidad alcanza un valor máximo.

En la tabla 27 se presenta el contenido de nitrógeno, la solubilidad y la viscosidad de las quitosanas obtenidas. Se observa que en ambas atmósferas, aire o nitrógeno, las muestras se hacen altamente solubles en ácido acético al 2% después de 60 minutos de tratamiento; sin embargo, sólo las muestras desacetiladas con atmósfera de nitrógeno presentan una viscosidad mayor a 200 cp. Estos resultados coinciden con los reportados por Bough y col., (1978a, b). Es posible que en el caso del aire, el grado de hidrólisis sea mayor y esto ocasiona una disminución de la viscosidad. Las muestras tratadas con aire durante 15 minutos son poco solubles en la solución ácida, su viscosidad es baja y su contenido de nitrógeno llega a valores cercanos al 6.9% de la quitina. Es posible que en estas muestras se haya alcanzado la desproteínización total en ese tiempo y simultáneamente se haya logrado cierto grado de desacetilación que la hace algo soluble. Esta observación fue comentada anteriormente por Nud'ga y col. (1970).

Comercialmente, se acepta una quitosana cuya viscosidad sea superior a 200 cps (Muzzarelli, 1978). En el caso de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que un tratamiento con NaOH al 50% durante una hora, con relación masa:volumen de 1:15 y bajo atmósfera de nitrógeno, produce una quitosana de calidad aceptable, soluble en ácido acético al 2% y con valores de viscosidad de 459 y 671 para las partículas P2 y P3, respectivamente.

Tabla 27. Propiedades de quitosanas obtenidas a partir de quitinas <sup>(1)</sup> desacetiladas bajo diferentes tratamientos.

TIPO DE PARTIC. mm	RELACION MASA:VOL.	ATMÓSFERA	TIEMPO minutos	SOLUBILIDAD AC. ACET. 2%	NITRÓGENO %	VIŠC. cp
P2 0.42-0.84	R1 1:15	A1 Aire	15 T1	muy poca	7.10	34
			60 T2	alta	7.72	180
		A2 Nitrógeno	15 T1	mediana	-	96
	60 T2		alta	7.89	459	
	R2 1:20	A1 Aire	15 T1	muy poca	6.99	44
			60 T2	alta	7.97	196
A2 Nitrógeno		15 T1	mediana	7.45	318	
	60 T2	alta	8.16	316		
P3 0.84-2.00	R1 1:15	A1 Aire	15 T1	muy poca	7.05	21
			60 T2	alta	7.54	178
		A2 Nitrógeno	15 T1	muy poca	6.74	139
	60 T2		alta	8.07	671	
	R2 1:20	A1 Aire	15 T1	muy poca	7.03	45
			60 T2	alta	7.84	203
A2 Nitrógeno		15 T1	mediana	7.02	174	
	60 T2	alta	8.21	328		

(1) Harinas previamente despigmentadas, desmineralizadas y desproteinizadas. La despigmentación se hizo con la mezcla éter:acetona:agua (15:75:10), rel. m:v 1:10 y 3 horas. La desmineralización se hizo con HCl 1N, rel. masa:volumen 1:10, 3 horas. La desproteización se hizo con NaOH al 4.5%, 3h. relación masa:volumen de 1:15. La desacetilación se hizo con NaOH al 50%, una relación masa:volumen de 1:15, durante una hora a 105 ± 5°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.

En la tabla 28 se presenta la composición de las muestras antes y después de la desacetilación. Se observa que el contenido de cenizas se reduce un poco más y que las muestras no contienen grasa. El nitrógeno, como era de esperarse, presenta un incremento ocasionado por el cambio de la composición porcentual del polímero al perder el grupo acetilo. El rendimiento en esta etapa es bajo y éste puede explicarse en base al efecto del NaOH sobre la molécula de quitina que, como se dijo anteriormente, aún contenía algo de proteína. El NaOH termina de eliminar esta proteína y, además va hidrolizando al polímero produciendo muchos fragmentos. Es decir, el rendimiento encontrado es ocasionado por la pérdida de proteína, grupos acetilo y fragmentos del polímero que se pierden durante el lavado.

Tabla 28. Composición de harinas de cefalotórax de camarón antes y después de la desacetilación <sup>(1)</sup>

PARTICULA mm	CENIZAS % INICIO - FIN	GRASA % INICIO - FIN	NITRÓGENO % INICIO - FIN	RENDIMIENTO	
				g INICIO	g FIN y %
P2 0.42-0.84	0.51 - 0.46	n.d. <sup>(2)</sup>	7.14 - 7.89	3, 2.6	87%
P3 0.84-2.00	1.21 - 0.65	n.d. <sup>(2)</sup>	7.16 - 8.07	3, 2.7	90%

(1) Harinas previamente despigmentadas, desmineralizadas y desproteinizadas. La despigmentación se hizo con la mezcla éter:acetona:agua (15:75:10), relación masa:vol 1:10 y 3 horas. La desmineralización se hizo con HCl 1N, relación masa:volumen 1:10, 3 horas. La desproteización se hizo con NaOH al 4.5%, 3h y una relación masa:volumen de 1:15. La desacetilación se hizo con NaOH al 50%, rel. masa:volumen 1:15, 1 hora a 105°C y bajo atmósfera de Nitrógeno.

(2) n.d. = no determinado.

Los resultados son el promedio de 2 determinaciones.

## 5.2 Método enzimático

Como se mencionó en la sección 4.6, una vez que se establecieron las condiciones óptimas para obtener quitosana por el método químico, se probó la utilización de una enzima proteolítica como una alternativa a la desproteización química. La enzima elegida fue una proteasa alcalina que mostró buenos resultados al ser utilizada para desproteizar harinas de cefalotórax de camarón en este mismo laboratorio (Escobedo, 1994). El resto de la metodología fue la misma.

Tabla 29. Composición de harinas de cefalotórax de camarón <sup>(1)</sup> antes y después de la desproteización enzimática

PARTICULA mm	CENIZAS % INICIO - FIN	GRASA % INICIO - FIN	NITRÓGENO % INICIO - FIN	RENDIMIENTO	
				g INICIO	g FIN %
P2 0.42-0.84	1.09 - n.d.	3.88 - n.d.	10.70 - 7.30	10 - 4.6	46
P3 0.84-2.00	1.21 - n.d.	3.56 - n.d.	9.32 - 7.56	10 - 6.5	65

(1) Harinas previamente despigmentadas y desmineralizadas. La despigmentación se hizo con la mezcla éter:acetona:agua (15:75:10), relación masa:vol 1:10 y 3 horas. La desmineralización se hizo con HCl 1N, relación masa:volumen 1:10, 3 horas. La desproteización se realizó con la enzima proteasa alcalina al 1% E/S, 50°C, 3h y pH de 9.5.

n.d. = no determinado

Los resultados son el promedio de 2 determinaciones.

En la tabla 29 se presenta la composición de las muestras antes y después de ser desproteinizadas enzimáticamente. Se observa que el contenido de nitrógeno de las muestras sufrió una reducción y se acercó, sin llegar a él, al valor de 6.9% teórico para la quitina. El rendimiento para ambos tamaños de partícula es muy diferente. Descartando un error experimental, esto podría explicarse si se considera que las partículas P2 son más pequeñas y permiten un mayor contacto con las enzimas, mientras que en el caso de las partículas P3, por ser más grandes, este contacto y por lo tanto la proteólisis, es menor. Este argumento puede reforzarse si se observa el contenido de nitrógeno de ambas muestras. El valor más grande corresponde a la partícula P3, lo que indica que esta muestra fue menos

desproteínizada que la de partícula P2. El porcentaje de desproteínización enzimática fue de alrededor del 93% con respecto a la harina desmineralizada.

### 5.3 Comparación entre la desproteínización química y la enzimática

En la tabla 30 se presenta el análisis comparativo entre las quitinas obtenidas tanto por desproteínización química, como enzimática. Se incluyen además, los valores de la quitina comercial Sigma y la quitina estándar obtenida en este mismo trabajo por el método de Horowitz y col. (1957), a partir de las muestras de harina de cefalotórax de camarón. Se observa que la única que alcanza el valor teórico de 6.9% de nitrógeno, es la quitina estándar. Las quitinas obtenidas por vía química y enzimática están por encima de este valor. La quitina Sigma, extrañamente, tiene un valor de 6.29, valor que podría explicarse en función del origen de esta quitina, ya que proviene de desechos de cangrejo y se desconoce su grado de purificación. Ninguna de las muestras es soluble en ácido acético, lo cual indicaría cierto grado de desacetilación. La apariencia física de escamas es similar en todas las muestras, pero varían de color; la quitina Sigma es blanca, la estándar es rosa pálida y las últimas son de color rosa muy parecidas entre sí. En el caso de la quitina estándar, este color puede deberse a que el tratamiento propuesto para su obtención por Horowitz y col. (1957), es más drástico que las tratadas química y enzimáticamente.

	INICIAL <sup>(1)</sup>		MÉTODO ESTÁNDAR <sup>(2)</sup>		MÉTODO QUÍMICO <sup>(3)</sup>		MÉTODO ENZIMÁTICO <sup>(4)</sup>		QUITINA SIGMA
	P2	P3	P2	P3	P2	P3	P2	P3	
CENIZAS %	25.90	27.13	0.26	0.48	0.51	0.65	nd	nd	0.85
GRASA %	5.90	5.11	0	0	0	0	nd	nd	0
NITROGENO %	8.04	7.71	6.88	7.02	7.14	7.16	7.30	7.56	6.29
SOLUBILIDAD (Ac. acético al 2%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
APARIENCIA FÍSICA	escamas		escamas		escamas		escamas		escamas
COLOR	café		rosa pálido		rosa		rosa		blanco

(1) Condiciones iniciales para los métodos estándar, químico y enzimático

(2) Método de Horowitz y col., 1957

(3) Desproteínización con NaOH al 4.5%, 3h, rel. masa:vol. 1:15

(4) Desproteínización con la enzima proteasa alcalina al 1% con relación a la proteína, 3h y 50°C.

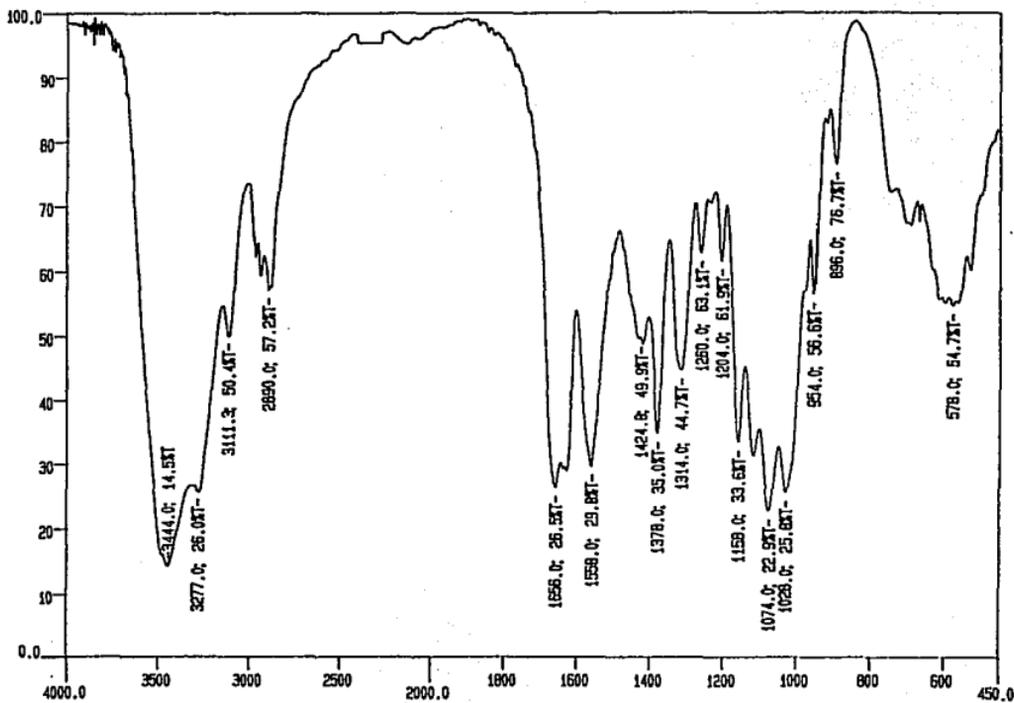
nd = no determinado

ns = no soluble

A fin de confirmar que las muestras obtenidas, realmente sean de quitina, se realizó un estudio por espectroscopia infrarroja. En las figuras 11 a la 14, se presentan los espectros de todas estas muestras, incluida la quitina Sigma. En el caso de las quitinas provenientes del método enzimático, el espectro obtenido fue el mismo para los dos tamaños de partícula, por lo tanto, sólo se incluye uno de ellos. Se puede observar que todos los espectros tienen un patrón de curvas semejante, con los picos característicos en las mismas posiciones; es posible superponerlas. Sin embargo, en todas se tienen unos picos adicionales en la franja comprendida entre  $1204$  y  $1424\text{ cm}^{-1}$  que parecen indicar que, además de los grupos funcionales de la quitina, se tienen otros que podrían corresponder a algunos aminoácidos. Esto es comprensible puesto que, ninguna de las muestras está purificada y se acepta que no tienen una desproteinización total. A pesar de ello, todas las muestras presentan un espectro similar al de la quitina comercial Sigma y, por lo tanto, puede suponerse que todas corresponden a espectros de quitina.

Figura 11. Quitina Sigma

LT



CH-1

Figura 12. Quina. Método enzimático

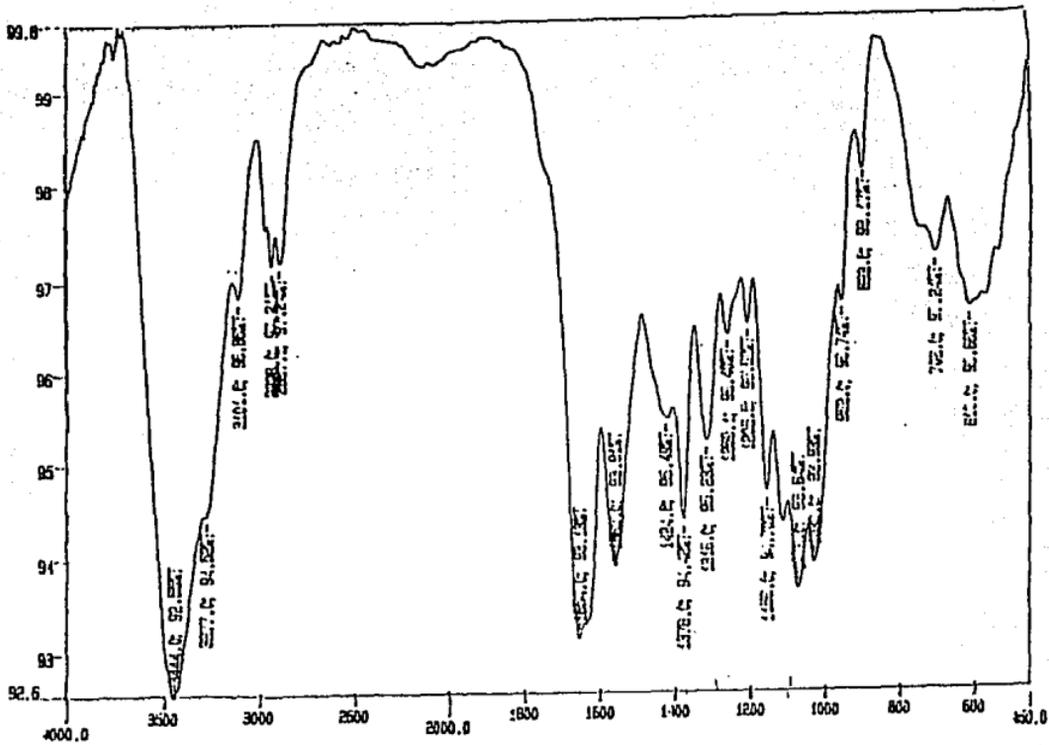


Figura 13. Quinta. Método químico. Partícula P2 (0.42 - 0.84 mm)

54

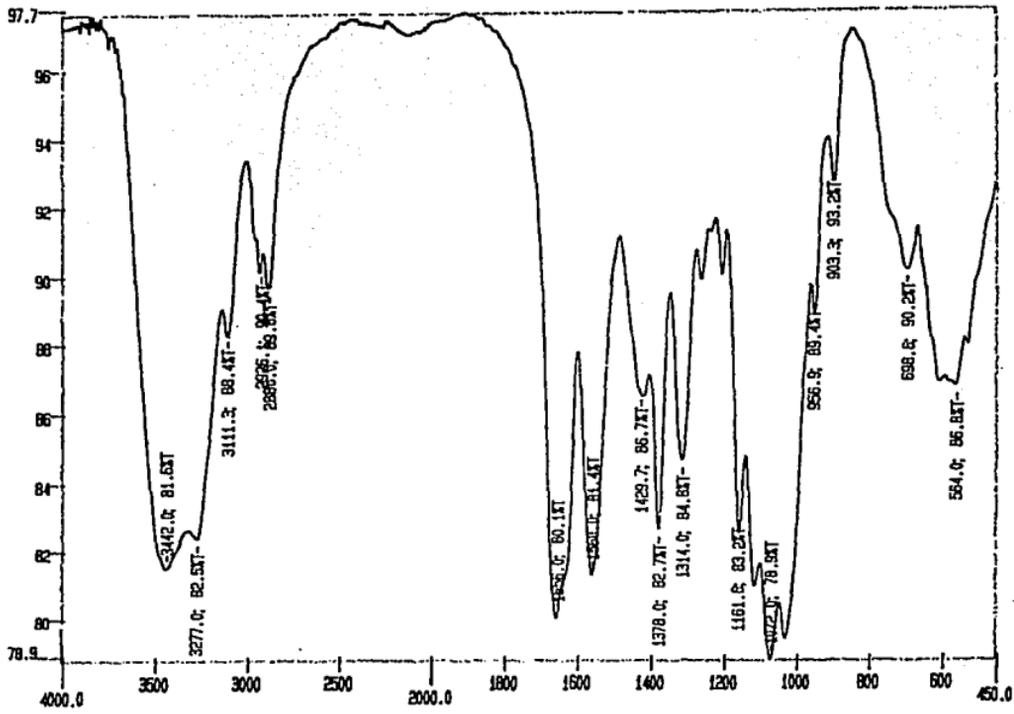
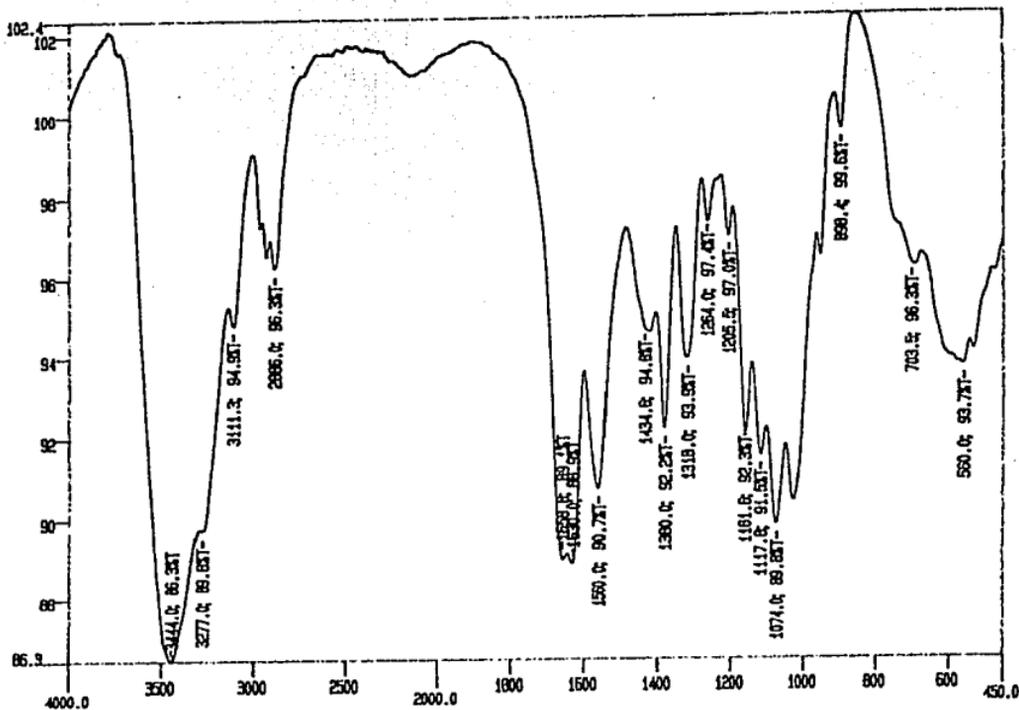


Figura 14. Quitina. Método químico. Partícula P3 (0.84 - 2.00 mm)



### 5.3.1 Quitosanas a partir de quitinas obtenidas enzimáticamente

Las quitinas obtenidas enzimáticamente, fueron sometidas a un tratamiento de desacetilación empleando la misma metodología que las quitinas del método químico; es decir, fueron tratadas con NaOH al 50%, relación masa:volumen 1:15,  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$ , durante 60 minutos y bajo atmósfera de nitrógeno. Finalizado el tratamiento, se hizo la prueba diferencial entre la quitina y la quitosana: la solubilidad en ácido acético al 2%. Se encontró que estas quitosanas no se disolvían en dicha solución, por lo que se buscó una prueba confirmatoria para determinar el grado de desacetilación de estas muestras. Los resultados se discuten en el siguiente punto.

### 5.3.2 Grado de desacetilación de quitosanas obtenidas química y enzimáticamente

La determinación del grado de desacetilación se realizó por la técnica de Broussignac, 1968 (ver sección 4.5). En las figuras 16 y 17, se presentan los resultados de dicha prueba para las quitosanas obtenidas química y enzimáticamente, así como de la quitosana comercial Sigma. Se puede observar, que sólo las quitosanas obtenidas químicamente y la quitosana Sigma presentan los dos puntos de inflexión mencionados por el autor, que permiten cuantificar el grado de desacetilación. Las quitosanas provenientes del método enzimático carecen en lo absoluto de estos dos puntos y tienen el mismo comportamiento del blanco (sólo HCl).

## TITULACIÓN DE QITOSANAS. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN

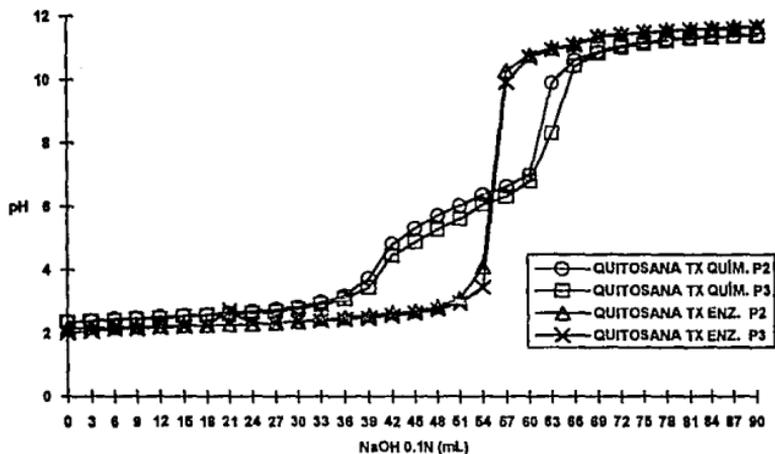


Figura 16. Titulación de quitosanas. Determinación del grado de desacetilación.  
Condiciones de desacetilación: NaOH al 50%, rel. m:v 1:15, atmósfera de nitrógeno,  $105 \pm 5^\circ\text{C}$ , 60 min.

## CURVA DE TITULACIÓN. GRADO DE DESACETILACIÓN DE QUITOSANAS

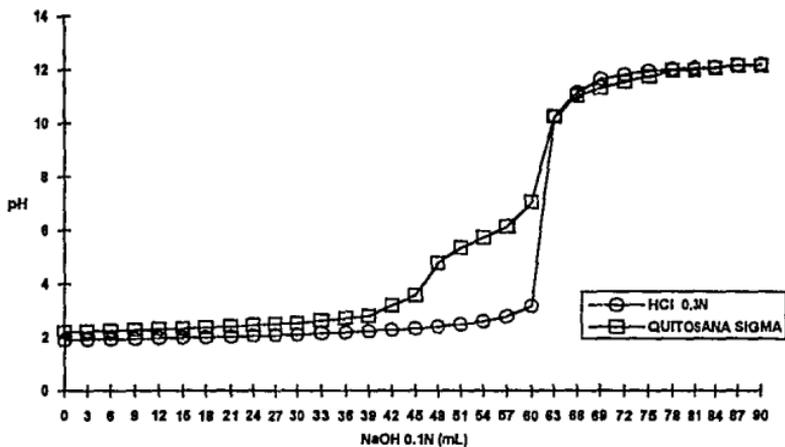


Figura 17. Curva de titulación de quitosana Sigma y de un blanco.

Este resultado fue inesperado, pues la quitina proveniente de una desproteización enzimática presentó una composición similar a la quitina obtenida químicamente. Incluso se esperaba obtener un mejor resultado por tener un grado de hidrólisis del polímero mucho menor a la tratada químicamente. La posible explicación de este fenómeno es que la desproteización con NaOH al 4.5%, a 65°C durante 3 h en la desproteización química, constituyen un pretratamiento necesario para la posterior desacetilación y obtención de quitosana. Diversos autores como Lusena y Rose (1953), mencionan que la realización de la desproteización y desacetilación por etapas cortas, con lavados intermedios, dan resultados mucho más efectivos que si la muestra se tratara de forma corrida, el mismo tiempo. Otra posibilidad es que el tratamiento de desacetilación no sea el adecuado. La bibliografía reporta lo determinante de esta etapa en las propiedades finales de la quitosana (Broussignac, 1968; Muzzarelli, 1978; Pelletier y col., 1990; Mathur y Narang, 1990).

Para que la quitina obtenida enzimáticamente pueda tener una desacetilación apropiada, es necesario hacer un estudio similar al realizado con la desproteización química en el que se incluyan otros niveles para los factores probados. Como ese estudio no es el objetivo central de este trabajo, se espera que los resultados aquí presentados sirvan de base para un estudio posterior en el que se resuelva este problema. En lo se presentarán los resultados del método químico.

En las gráficas 16 y 17, se pueden observar los dos puntos de inflexión X y Y de la quitosanas obtenidas químicamente y la quitosana Sigma. Al sustituir estos valores en la fórmula propuesta por Broussignac, 1968, se encuentran los siguientes resultados:

$$\text{Quitosana Sigma:} \quad \% \text{NH}_2 = \frac{16.2 (63-46) (0.1)}{0.5} = 55.08$$

$$\text{Quitosana obtenida químicamente:} \quad \% \text{NH}_2 = \frac{16.2 (62-41) (0.1)}{0.5} = 68.04$$

Partícula P2 (0.42-0.84 mm)

$$\text{Quitosana obtenida químicamente:} \quad \% \text{NH}_2 = \frac{16.2 (64-44) (0.1)}{0.5} = 64.80$$

Partícula P3 (0.84-2.00 mm)

Existen algunas controversias en cuanto al grado de desacetilación que debe tener la quitosana, sin embargo, se acepta un valor mínimo de 60% (Mathur y Narang, 1990). La desacetilación nunca es total (Muzzarelli, 1978). En este caso, los grados de desacetilación obtenidos para los dos tipos de partícula (P2 y P3), así como el de la quitosana Sigma, se encuentran por debajo de estos valores. Esto indicaría cierta discrepancia entre los productos obtenidos en este trabajo y la quitosana Sigma. Con lo informado en la literatura,

este aspecto es discutible, ya que los otros parámetros de evaluación de calidad tales como contenido de nitrógeno, solubilidad en ácido acético y viscosidad, son satisfactorios. Rinaudo y Domard (1989), citan que a pesar de su importancia, la interpretación de los resultados del grado de desacetilación es muy compleja.

En la tabla 31 se comparan las características entre las quitosanas provenientes de la desproteínización química y la quitosana comercial Sigma.

Tabla 31 Análisis comparativo entre quitosanas obtenidas por el método químico y una quitosana comercial				
		MÉTODO QUÍMICO (1)		QUITOSANA SIGMA
		P2	P3	
CENIZAS	%	0.46	0.49	0.30
GRASA	%	0	0	0
NITROGENO	%	7.89	8.07	7.63
SOLUBILIDAD (Ac. acético al 2%)		muy alta		alta
GRADO DE DESACETILAC.	%	68.04	64.80	55.08
VISCOSIDAD CPS		459	671	428
APARIENCIA FÍSICA		escamas		escamas
COLOR		blanco rosáceo		blanco

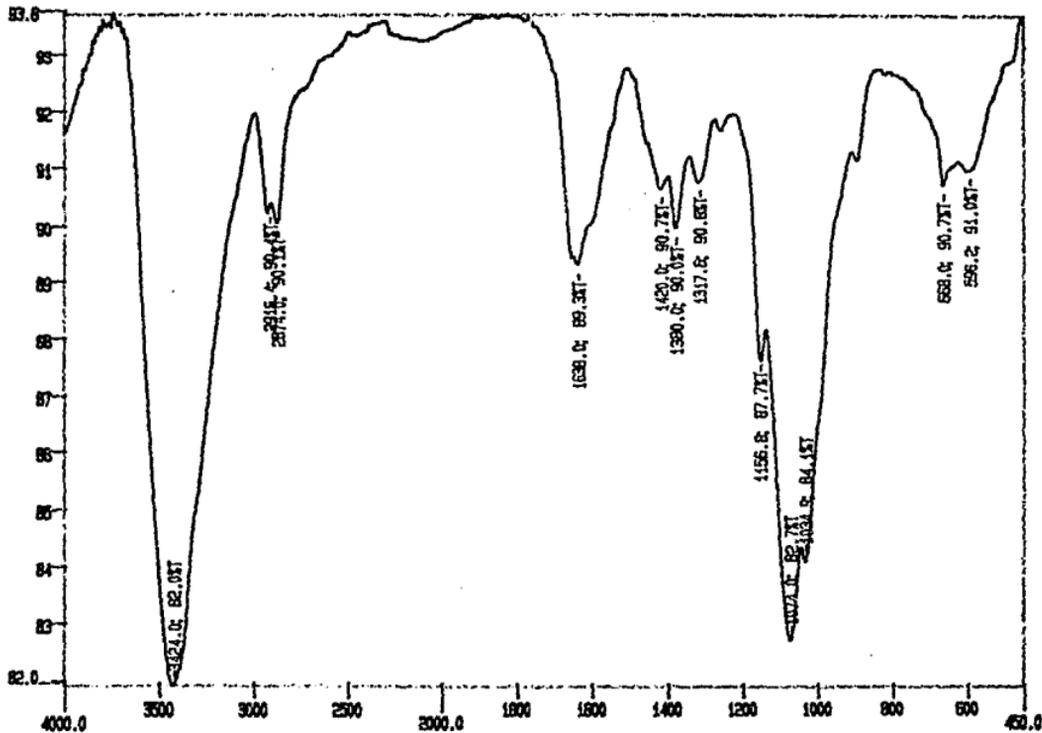
(1) Harinas previamente despigmentadas, desmineralizadas y desproteínizadas. La despigmentación se hizo con la mezcla éter:acetona:agua (15:75:10), relación 1:10 3 horas. La desmineralización se hizo con HCl 1N, relación masa:volumen 1:10, 3 horas. La desproteínización se hizo con NaOH al 4.5%, 3h, relación masa:volumen de 1:15. La desacetilación se hizo con NaOH al 50%, una relación masa:volumen de 1:15, durante una hora a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ .

En la tabla anterior se puede apreciar que las propiedades de la quitosana obtenida químicamente en el presente trabajo, superan en algunos aspectos a la quitosana Sigma. Esta situación pudo hacerse palpable al disolver estas muestras en ácido acético al 2%. Mientras las primeras se disolvían completamente, la quitosana Sigma presentaba algunas partículas en suspensión que no llegaron a solubilizarse. Esta suspensión tiene una apariencia que recuerda los "ojos de pescado" reportados por Bough y col. (1978a), entre sus observaciones.

En las figuras 18, 19 y 20, se presentan los resultados del análisis por espectroscopía infrarroja de las tres quitosanas de la tabla 31. Se puede observar que los espectros son muy

Figura 18. Quinosa Sigma

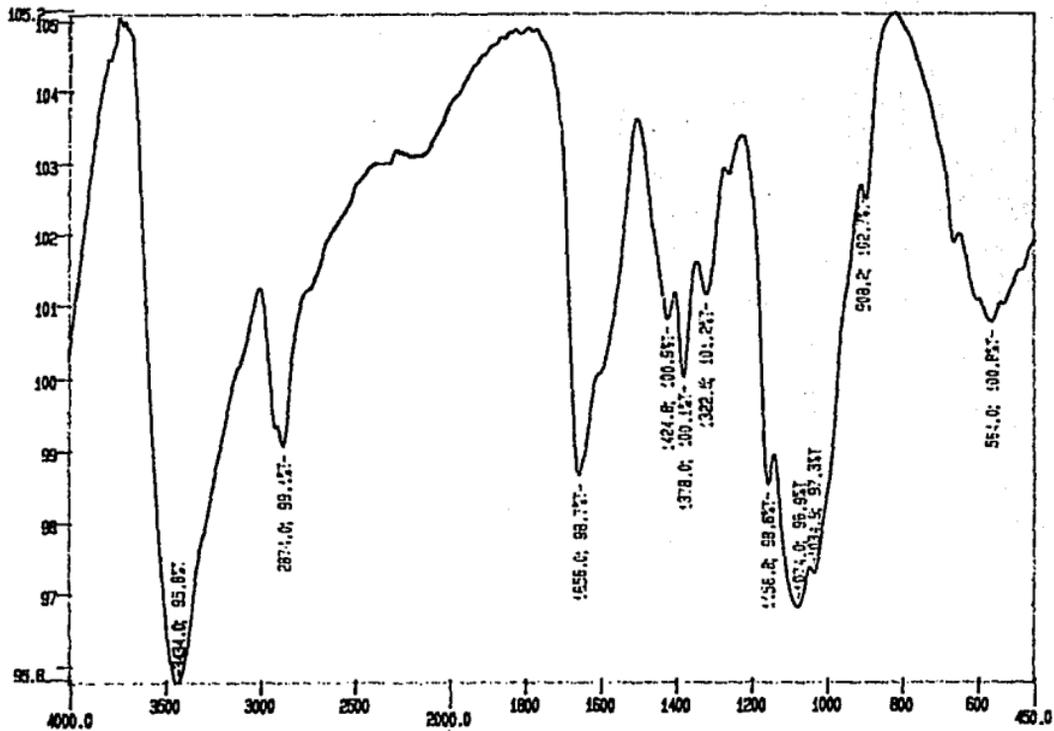
IR



IR-1

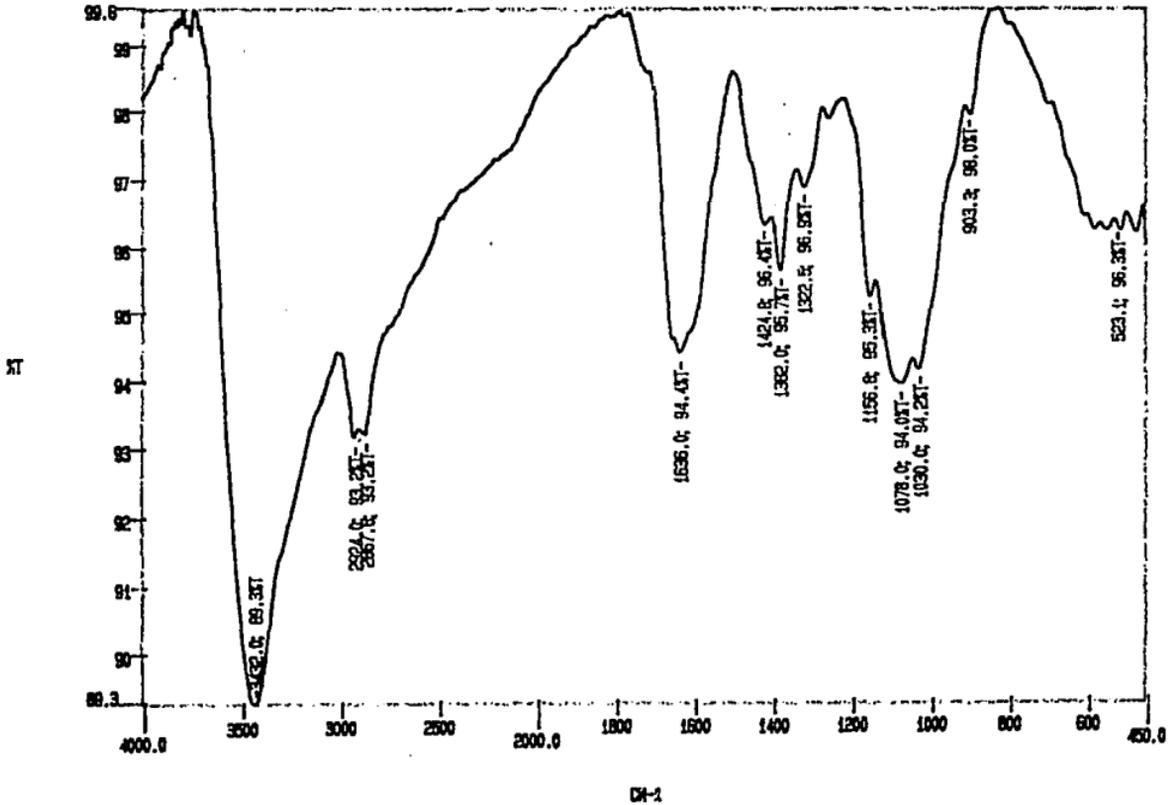
Figura 19. Quitosana. Método quíntico. Partícula P2 (0.42 - 0.84 mm)

Es



CM-1

Figura 20. Quitosana. Método químico. Partícula P3 (0.84 - 2.00 mm)



similares entre sí, lo cual indica que los residuos obtenidos de la desacetilación, son de quitosana. Al compararlos con los de la quitina, se ve que, en los espectros de quitosana, han desaparecido los picos a 1560 y 3270  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las aminas secundarias. Estas son las principales diferencias (Muzzarelli, 1978).

En la tabla 32 se presentan los parámetros propuestos para la estandarización de la quitina y quitosana según las aplicaciones. Puede observarse que los requerimientos a nivel industrial son los más accesibles por lo que los productos obtenidos en este trabajo no tendrían ninguna dificultad para satisfacerlos. Las especificaciones en los otros grados tienen que ver con el grado de pureza del producto y, con un poco más de trabajo, se puede establecer el camino para tener acceso a estas aplicaciones.

Tabla 32. PARÁMETROS PROPUESTOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA.				
PARÁMETRO	GRADO			
	MEDICO	COSMETICO	ESTÁNDAR	INDUSTRIAL
Origen	X	X	X	X
Apariencia (color)	X	X	X	X
Viscosidad o peso molecular	X	X	X	X
Tamaño de partícula	X	X	X	X
Solubilidad en ác. acético al 0.5%	X	X	X	X
Contenido de humedad	X	X	X	X
Cenizas	X	X	X	
Metales pesados	X	X		
Microbios	X	X		
Proteínas	X			
Pirógenos	X			

Hirano, 1989.

#### 5.4 Aminoácidos en harinas de cefalotórax de camarón

En la tabla 33 se presenta el contenido de aminoácidos de las muestras de harina entera de cefalotórax de camarón, harina desmineralizada y el patrón FAO'73 para los aminoácidos indispensables, a manera de referencia. La calificación química que recibe la harina entera es del 61.5%, siendo limitante la isoleucina, en base al patrón FAO'73. La harina desmineralizada tiene una calificación de 48%, siendo el triptofano el aminoácido limitante. Al comparar el contenido de aminoácidos en harina entera y desmineralizada, se observa que el tratamiento de desmineralización afecta a los aminoácidos aromáticos, lisina y triptofano. Los ácidos aspártico y glutámico son los más abundantes. Estos resultados coinciden con los reportados por Simpson y Haard (1985).

Tabla 33. Contenido de aminoácidos en harina de cefalotórax de camarón

AMINOACIDO	Harina entera g aa/100 g proteína	Harina desmineraliz. g aa/100 g proteína	Patrón FAO'73 g aa/100g proteína
Ac. aspártico	8.61	10.37	
Ac. glutámico	6.98	11.82	
Serina	4.27	18.78	
Histidina	1.50	2.08	
Glicina	7.76	9.38	
Arginina	6.31	7.50	
Alanina	6.28	7.16	
<b>Treonina</b>	<b>3.80</b>	<b>4.40</b>	<b>4.00</b>
<b>Azufrados</b>	<b>2.24</b>	<b>2.71</b>	<b>3.52</b>
<b>Valina</b>	<b>3.33</b>	<b>5.60</b>	<b>4.96</b>
<b>Aromáticos</b>	<b>10.78</b>	<b>5.93</b>	<b>6.08</b>
<b>Isoleucina</b>	<b>2.46</b>	<b>4.36</b>	<b>4.00</b>
<b>Leucina</b>	<b>6.40</b>	<b>6.97</b>	<b>7.04</b>
<b>Lisina</b>	<b>4.32</b>	<b>2.40</b>	<b>5.44</b>
<b>Triptofano</b>	<b>1.25</b>	<b>0.46</b>	<b>0.96</b>

Aminoácido en negritas = indispensable

Los resultados están dados en base seca

### 5.5 Estimación de costos del proceso a nivel de laboratorio

A continuación se presenta una relación de los rendimientos, material, reactivos, equipo y tiempo necesarios para la realización de este proyecto. El estudio económico no está entre los objetivos de este trabajo pero se considera de interés reportar un estudio preliminar acerca de costos y rendimiento, con la aclaración de que éstos corresponden a un nivel experimental y deberán ajustarse si se desea realizarlos a nivel piloto.

En la tabla 34, se presenta el rendimiento por etapas para la obtención de quitosana a partir de cabezas frescas de camarón. Debido a las razones explicadas en la desmineralización, la partícula P1, sólo es mencionada hasta la etapa de despigmentación. La P2 y P3, son consideradas en forma individual y también agrupadas junto a la P4 por considerar a estas tres partículas compatibles con la metodología propuesta. Se incluye también el rendimiento de la desproteínización enzimática sólo con carácter informativo, pues como se dijo anteriormente, este tratamiento no está integrado con el resto de la metodología, sino que es un estudio independiente. En dicha tabla, se puede observar que la etapa crítica en cuanto al rendimiento, es la desmineralización.

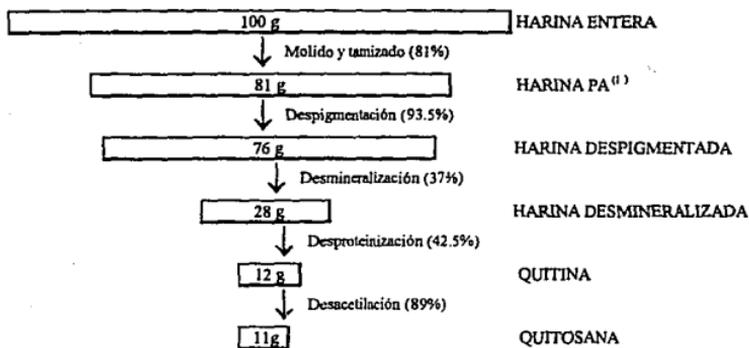
ETAPA	TIPO DE PARTÍCULA mm				
	P1 < 0.42	P2 0.42-0.84	P3 0.84-2.00	P4 > 2.00	PA (P2+P3+P4)
Secado <sup>(2)</sup>	21.3/P1	21.3/P2	21.3/P3	21.3/P4	21.3/PA
Molido y tamizado	18.91	39.56	33.24	8.16	80.96
Despigmentación	92.00	94.00	93.00	-	93.50
Desmineralización	-	36.00	38.00	-	37.00
Desproteínización química	-	41.00	44.00	-	42.50
Desproteínización enzimática	-	46.00	65.00	-	56.00
Desacetilación	-	87.00	90.00	-	89.50
Rel. quitosana/cabeza fresca	-	-	-	-	2.30
Rel. quitosana/harina PA	-	-	-	-	11.00

(1) Los valores en cada casilla son con respecto a la casilla anterior de la columna.

(2) En esta etapa, aún no hay separación por tipo de partículas, por lo tanto se adopta el valor del rendimiento total del secado (21.3%).

En la figura 21 se presenta un esquema ilustrando el avance del tratamiento integral a partir de 100 g de harina entera y tomando los rendimientos mencionados en la tabla 34. Es decir, por cada 100 g de harina entera, se obtienen 11 g de quitosana.

Figura 21. Rendimiento de quitosana a partir de 100 g de harina entera de cefalotórax de camarón.



<sup>(1)</sup> PA = P2+P3+P4. La partícula P1 fue descartada. Para mayor información ver texto.

En la tabla 35 se presentan los requerimientos mínimos, divididos en etapas. Estos valores se presentan resumidos en la tabla 36. Posteriormente, en la tabla 37 se traducen los insumos y equipo empleados en la obtención de 100 g de quitosana, a términos económicos, con precios vigentes a la fecha. Se observa que el renglón correspondiente a la acetona, representa más del 50% del costo final de la quitosana. Este solvente, junto con el éter de petróleo, presenta la ventaja de poder ser recuperado, con lo que se obtendrían costos mucho más bajos. Para acercarse a la realidad estos costos, se puede adicionar un 50% que correspondería a los gastos administrativos, con los cuales, el costo de 100 g de quitosana sería de N\$ 107.16.

Actualmente, en el mercado no se encontró quitosana de producción nacional. La quitosana comercial Sigma es de importación y tiene un costo de 34 dólares por cada 100 g, es decir N\$ 112.88.

ETAPA	g iniciales/ g finales	Material y reactivos	Equipo, potencia y tiempo	Operación manual
Obtención, secado, molido y tamizado de muestras	4450/768	Materia prima (cabezas de camarón).	Secador eléctrico 3700W, 8h Molino para cereales 470W, 15' Tamizador 971W, 15'	2 h
Despigmentación	768/718	Éter de petróleo 1.73 L Acetona 5.76 L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 154 g	Agitador eléctrico 400W, 3h Rotavapor 400W, 1h Estufa para secado 300W, 6h	2 h
Desmineralización	718/266	HCl conc. 0.06 L	Agitador eléctrico 400W, 3h Estufa para secado 300W, 6h	1 h
Desproteínización química	266/113	NaOH 0.18 kg	Agitador eléctrico con control de temperatura 600W 3h Estufa para secado 300W 6h	1 h
Desacetilación	113/100	NaOH 1.13 kg Nitrógeno 110 L	Parrilla eléctrica 350W 2h Estufa para secado 300W 6h	1 h

MATERIAL Y REATIVOS	EQUIPO, POTENCIA Y TIEMPO	OPERACIÓN MANUAL
Cabezas de camarón 4.45 kg	Secador eléctrico 3710W, 8 h	7 h
Éter de petróleo 1.73 L	Molino para cereales 470W, 15'	
Acetona 5.76 L	Tamizado 471W, 15'	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.16 kg	Agitador 400W, 6'	
HCl 0.60 L	Agitador con control de temperatura 600W, 3 h	
NaOH 1.31 kg	Rotavapor 400W, 1 h	
N <sub>2</sub> 0.11 m <sup>3</sup>	Estufa para secado 300W, 24 h	
	Parrilla eléctrica 350W, 2 h	

**TABLA 37. COSTOS ESTIMADOS DE LOS INSUMOS EMPLEADOS EN LA OBTENCIÓN DE 100 g DE QUITOSANA A PARTIR DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN**

INSUMO	CANTIDAD	PRECIO REF. <sup>(1)</sup>	TOTAL
Cabeza de camarón	4.45 kg	0	0
Éter de petróleo <sup>(2)</sup>	1.73 L	4.65/L	8.05
Acetona <sup>(2)</sup>	5.76 L	6.33/L	36.46
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.16 kg	30.3/Kg	4.85
HCl	0.60 L	13.39/L	8.04
NaOH	1.31 kg	5.62/kg	7.36
N <sub>2</sub>	0.11 m <sup>3</sup>	5.80/m <sup>3</sup>	0.64
Energía eléctrica	42.54 KWH	0.142/KWH	6.04
			71.44

<sup>(1)</sup> Precios en nuevos pesos, vigentes en el mercado al 20 de junio de 1994.

<sup>(2)</sup> Solventes recuperables.

En el caso de los pigmentos, el rendimiento es de alrededor de 20 µg/g de harina entera, es decir que por cada 100 g de muestra se obtienen 2 mg de pigmentos. El precio de la astaxantina sintética en el mercado es de N\$ 800 por un kg al 8%; es decir N\$ 10 por cada g de pigmento (Lab. Roche, 1994). No se tiene referencia del costo del producto natural, pero se espera que sea mucho mayor que el sintético.

Las otras fracciones del cefalotórax de camarón, es decir las sales minerales y la proteína, no han sido considerados en este estudio de prefactibilidad; pero como es de suponer, representan una utilidad adicional que podría compensar parte de los gastos del procesamiento de los desechos de camarón.

## **6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Se realizó un estudio bromatológico del cefalotórax de camarón, encontrándose que está compuesto por un 44.71% de proteína, 26.32% de cenizas, 20.65% de fibra cruda (incluye quitina), 5.24% de grasa y 3.08% de otros carbohidratos.

Se probaron varios métodos de despigmentación, obteniéndose los mejores resultados al utilizar la mezcla éter:acetona:agua en proporción 15:75:10 como solvente extractor, una relación masa:volumen de 1:10, durante 3 horas, a temperatura ambiente, agitación constante y al resguardo de la luz. Se encontró que los factores que influyen en la extracción son el tamaño de partícula, el solvente extractor y la interacción de ambos. La recuperación de pigmentos oscila entre los 20.5 ± 4.5 µg por cada g de muestra.

Se probó el uso de agentes antioxidantes (BHA, BHT y BHA + BHT) en una concentración del 0.1%. El mejor resultado se obtuvo al emplear la mezcla de ambas sustancias, logrando conservar alrededor del 80% de los pigmentos extraídos, al cabo de cuatro semanas, conservando las muestras a temperatura ambiente y en frascos color ámbar.

Se realizó una desmineralización con HCl 1N bajo diferentes condiciones, encontrándose los mejores resultados al utilizar una relación masa:volumen de 1:10, un tiempo de 3 horas, agitación constante y temperatura ambiente. Se descartó la partícula más pequeña (P1) por ser improcedente con esta etapa. Tuvieron efecto significativo la relación masa:volumen, el tiempo de tratamiento y la interacción entre ambos factores. Al descartar la partícula P1, el tamaño de partícula perdió su significancia. El producto final contiene 1.09-1.21% de cenizas, 3.56-3.88% de grasa y 9.32-10.7% de nitrógeno.

Se realizó una desproteínización química con NaOH bajo diferentes condiciones. En ningún caso se llegó a una desproteínización completa. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear NaOH en una concentración del 4.5%, relación masa: volumen de 1:15, durante 3 horas, a 65°C y agitación constante. Resultaron significativos la relación masa:volumen, la concentración de NaOH y el tiempo de tratamiento, no así las interacciones. El producto final, confirmado por espectroscopía I. R., fue quitina. Característicamente, tenía forma de escamas de color rosa, un contenido de nitrógeno de 7.14-7.16%, cenizas de 0.51-0.65% y no se detectaron lípidos.

Se llevó a cabo una desacetilación de la quitina obtenida empleando NaOH al 50%. Las mejores condiciones fueron establecidas por el empleo de una relación 1:15 de masa: volumen, durante 60 minutos a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$ , atmósfera de nitrógeno, reflujo y agitación constante. Resultaron significativos todos los factores, excepto la interacción tamaño de partícula-relación masa:volumen-tiempo (PRT). Esto demuestra que la desacetilación es una etapa crítica durante el proceso. El producto final fue quitosana con un contenido de nitrógeno de 7.89-8.07%, cenizas 0.46-0.65%, altamente soluble en ácido acético al 2%, un grado de desacetilación de 64-68% y una viscosidad de 459-671 cp.

A pesar de que la desproteínización química no fue totalmente efectiva, se complementa muy bien con la desacetilación empleada, obteniéndose una quitosana con características ligeramente superiores a la quitosana comercial marca Sigma. La presencia de quitosana fue confirmada por espectroscopía I. R.

El tamaño de partícula sólo debe considerarse para la extracción de pigmentos, siendo más efectiva, la más pequeña. En el resto de las etapas, se puede trabajar con las partículas P2 y P3 juntas, es decir de 0.42 a 2.00 mm, sin que se afecten los resultados.

Se probó adicionalmente la inclusión de una desproteínización enzimática como una variante, dejando igual el resto de la metodología. La enzima seleccionada fue proteasa alcalina 3000 en una concentración del 1% (31.25U) con respecto a las proteínas de la muestra. Las otras condiciones fueron: 3 horas de tratamiento, 50°C, pH de 9.5 y agitación constante. El resultado fue una quitina en forma de escamas de color rosa, con un contenido

de 7.30-7.56% de nitrógeno. Se realizó un estudio por espectroscopía I.R., sin encontrar diferencias marcadas entre esta quitina, la obtenida por el método químico y una quitina comercial.

La quitina obtenida por el método enzimático fue sometida sin éxito a un proceso de desacetilación para convertirla en quitosana. Es necesario probar otras condiciones o ampliar las utilizadas en el presente trabajo, a fin de encontrar el método adecuado de desacetilación de esta quitina.

La quitina obtenida por el método químico cumple con los requerimientos básicos para ser aceptada en la industria y su explotación constituye una alternativa viable desde el punto de vista químico. Es necesario efectuar un estudio económico más preciso a fin de determinar la viabilidad del proceso en este respecto.

En el estudio de costos a nivel de laboratorio, se encontró un rendimiento del 12% de quitina el cual transformado en quitosana, representa un 11 % en base a la harina seca. El costo de material y reactivos de 100 g de quitosana en el laboratorio fue de N\$ 71.44 (21.52\$US) y si le adicionamos un 50% correspondientes a gastos administrativos, el costo de 100g de quitosana sería de N\$ 107.16 (32.28 \$US); valor ligeramente inferior al de la quitosana comercial Sigma. Cabe mencionar que la calidad de la quitosana obtenida por el método químico resultó superior en solubilidad y viscosidad a la quitosana comercial Sigma.

El cefalotórax de camarón es un subproducto que puede y debe ser aprovechado. Se cuenta con las ventajas de que proviene de un recurso renovable, es una materia prima económica y, además, como se ha expuesto durante todo el trabajo, tiene un potencial industrial muy grande, especialmente como fuente de quitina, quitosana, pigmentos y proteínas. A esto, debemos agregarse que se evitaría el problema de estos residuos contaminantes, tanto en altamar como en tierra. El dominio de esta tecnología abriría nuevas perspectivas para el aprovechamiento de otras fuentes no convencionales de quitina como los crustáceos, hongos, insectos, etc.

La siguiente etapa debe ya comprender estudios a escala de banco o piloto para evaluar su factibilidad técnico-económica y con estos resultados ofrecer la tecnología desarrollada al sector productivo

Asimismo, debe profundizarse el estudio a nivel de laboratorio de la desproteínización enzimática-desacetilación para obtener quitosanas útiles para la agroindustria, en especial para recubrimientos de productos hortofrutícolas que aumenten su vida de anaquel y disminuyan sus pérdidas postcosecha.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural Handbook. 1975. *Composition of foods*. U.S. Dept. of Agriculture, 8.
- Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. 1992. Tomo I Exportación.
- AOAC. 1980. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Assoc. Offic. Anal. Chem. *Horwitz, W. Ed.* 13a. Ed.. Washington, D.C. U.S.A.
- Ashford, N.A.; Hattis, D. y Murray, A.E. 1977. Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. *MIT Sea Grant Report MISG 77-3*. MIT: Cambridge, Ma., USA.
- Austin, P.R.; Brine, C.J.; Castle, J.E. y Zikakis, J.P. 1981. Chitin: New Facets of Research. *Science*, 212: 749-53.
- Barrera, V.B. 1987. La camaronicultura: práctica reciente en México. *Acuavisión*, 2(8):4-7.
- Berkeley, R. 1979. Chitin, chitosan and their degradative enzymes. En: "Microbial polysaccharides and polysaccharases". Ed. R.C.W. Berkeley, G.W., Gooday y D.C. Ellwood. Academic Press, Londres: 205-236.
- Bough, W.A.; Salter, W.L.; Wu, C.M. y Perkins, B.E. 1978a. 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.* 20:1931-43.
- Bough, W.A.; Wu, A.C.M.; Campbell, M.R., Holmes, M. R. y Perkins, B. E. 1978b. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. II. Coagulation of activated sludge suspensions. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 1945-1955
- Bough, W.A y Landes. 1978. Citado en: "Use of chitinous polymers in food". Knorr D. 1984. *Food Technol.*, 38 (1): 85.
- Broussignac, P. 1968. Le chitosane. Un haut polymère naturel dans l'industrie. *Chimie et industrie-génie chimique*, 99 (9): 1241-1247
- Camarena, T. 1994. Comunicación personal. Chakay-derivados. Tulúm, Q. Roo, México

- Charley, H. 1987. *Tecnología de alimentos*. Limusa, México, pag. 603.
- Chen, H. M. y Meyers, S. P. 1982a. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *J. Food Sci.*, 47: 892-96
- Chen, H. -M. y Meyers, S. P. 1982b. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 469-73.
- Choubert G. y Luquet, P. 1983. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri Rich.*) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture*, 32: 19-26.
- De la Lanza, E. G.; García C., J. L.; Tovilla, H.C.; Arredondo, J. L. 1993. Ambientes y pesquerías en el litoral Pacífico mexicano. INEGI México, D.F.
- Desrosier, N. 1986. *Elementos de tecnología de alimentos*. CECSA, México: 412-14.
- Dore, I. y Frimodt, C. 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Publisher Van Nostrand Reinhold, N.Y.: 19-42.
- Escobedo, G. 1994. Obtención de quitina por métodos enzimáticos a partir de cefalotórax de camarón. Tesis de Licenciatura. UNAM, Fac. de Química, México.
- Escudero, A. B. 1991. La quitina: un biopolímero de uso potencial para la industria. *Impulso tecnológico*. Instituto Tecnológico de Veracruz, 1 (2): 18-22.
- Fang, T. y Cheng, Y-S. 1993. Improvement of astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimize of culture conditions. *J. Ferm. Bioeng.*, 75 (6): 466-469.
- Foss, P.; Storebakken, T.; Schiedt, K; Liaaen-Jensen, S.; Austreg, E. y Streiff, K. 1984. Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with cantaxanthin. *Aquaculture*. 41: 213-226.
- Hernández, U. 1994. Sin resultados claros, el acuerdo de modernización de la acuicultura. *El financiero*. Secc. Economía, México, D.F., (22 de Marzo de 1994): 28.
- Hirano, S. 1989. Production and applications of chitin and chitosan in Japan. En: Skjak-Bræks, G.; Anthonsen, T. y Sandford, P. 1989. Proceedings from the 4th conference on chitin and chitosan held in Trondheim, Norway, August 22-24, 1988. Pp 51-69.

- Horowitz, S. T.; Roseman, S y Blumenthal, H. J. 1957. Preparation of glucosamine oligosaccharides. 1. Separation. Citado en: Muzzarelli R. 1978. *Chitin*. Pergamon Press. U.K: 90.
- Iwata, S y Nakabayashi, T. 1974. Method for the elimination of coloring substances. Citado en: Muzzarelli R. 1978. *Chitin*. Pergamon Press. U. K.: 183
- Kanemitsu, T. y Aoe, H. 1958. Studies on the carotenoids of salmon I. Identification of the muscle pigments. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 24: 209-15.
- Kelley, C. E. y Harmon, A. W. 1972. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *Fish. Bull.*, 70 (1): 111-3.
- Knorr, D. 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, 48:36.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, 85-97.
- Knorr, D. 1986. Nutritional quality, food processing, and biotechnol aspects of chitin and chitosan: a review. *Process Biochem.*, 2 (2): 90-92.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.*, 45 (1): 114.
- La economía mexicana en cifras. 1990. Ed. Nacional Financiera. 11a. edición, México,D.F.
- Lab. Roche (1994) Comunicación personal. Depto. de ventas. Lab. Roche S.A. de C.V., México, D.F.
- Lusena, C.V. y Rose, R.C. 1953. Preparation and viscosity of chitosan. Citado en: Muzzarelli, R. 1978. *Chitin*. Pergamon Press, U.K: 95.
- Madhavan, P. y Ramachandran, N.K.G. 1974. Utilization of prawn waste. Isolation of chitin and its conversion to chitosan. *Fish Technol.*, 11: 50-53.
- Mathur, N. K. y Narang, Ch. K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *J. Chem Educ.*, 67 (11): 938-942.
- Meyers, S. P. 1977. Using crustacean meals and carotenoids fortified diets. *Feedstuffs*, 49: 19.

Meyers, S. P. y Bligh, D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *J. Agric. Food Chem.*, 29: 505-8.

Muzzarelli, R. A. A. 1978. *Chitin*. Pergamon Press, U.K.: 24, 29,45, 47, 62-64, 87, 93-95, 103-105

No, H. K. y Meyers, S. P. 1989. Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 580-583.

No, H. K.; Meyers, S. P. y Lee, K. S. 1989. Insolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, 37 (3): 575-79.

Nud'ga, L.A.; Plisko, E.A. y Danilov, S.N. 1970. Production of chitosan and study of its fractionation.. Citado en: Muzzarelli, R. 1978. *Chitin and chitosan*. Pergamon Press, U.K.: 95.

Pelletier, A.; Lemire, Y.; Sygusch, J.; Chornet, E. y Overend, R. P. 1990. Chitin/chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. *Biotechnol. Bioeng.*, 36: 310-15

Peña, E.A. 1987. Distritos de acuicultura: Instrumentos de desarrollo regional. *Acuavisión*, 2 (8): 8-9.

Popper, L. y Knorr, D. 1990. Application of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technol.*, 44 (7): 84.

Rinaudo, P.A. y Domard A. 1989. Solution properties of chitosan. En: Skjak-Bræks, G.; Anthonsen, T. y Sandford, P. 1989. Proceedings from the 4th Conference on chitin and chitosan, held in Trondheim, Norway, August 22-24, 1988. Pp 71-83.

Sandford, P. 1989. Chitosan commercial uses and potential applications. En: Skjak-Bræks, G.; Anthonsen, T. y Sandford, P. 1989. Proceedings from the 4th conference on chitin and chitosan, held in Trondheim, Norway, August 22-24, 1988 Pp 51-69.

Secretaría de Pesca. 1993. Presentado en el 5<sup>to</sup> Informe de Gobierno. 1993. Anexo II del Poder Ejecutivo Federal, México, D.F.

Servicio de Actualización Pesquera. 1990a. La industria ecuatoriana del cultivo de camarón. Secretaría de Pesca, México, 15: 7.

Servicio de Actualización Pesquera. 1990b. Especies de Camarón. Secretaría de Pesca, México, 65:1-10.

- Simpson, B. K. y Haard, N. F. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *J. Appl. Biochem.*, 7: 212-22.
- Snedecor, G. y Cochran, W. 1986. Métodos estadísticos. CECSA, México
- Soto-Peralta, N. V.; Miller, H. y Knorr, D. 1989. Effects of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. *J. Food Sci.*, 54: 495.
- Toma, R.B. y Meyers, S.P. 1975. Isolation and chemical evaluation of protein from shrimp cannery effluent. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 632.
- Wu, A. C. M.; Bough W. A.; Holmes M. R. y 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: 1957-66.

## 8. APÉNDICES

### **APÉNDICE 1. MÉTODOS GENERALES**

#### **1.1 Determinación de humedad**

- a) Método de la termobalanza
- b) Método de secado en la estufa

#### **a) Método de la termobalanza**

La humedad se determina usando una termobalanza OHAUS (Fisher Sci, Halifax, Canadá).

El método consiste en pesar 10 g de muestra en el plato del aparato, extenderla lo mejor posible y conectar el aparato de tal manera que la lámpara quede exactamente sobre la muestra. Seleccionar el tiempo y el voltaje adecuado con los controles (de preferencia condiciones suaves). Registrar la variación de peso cuando éste llegue a un valor constante. Calcular el porcentaje de pérdida de peso, el cual corresponde al contenido de humedad de la muestra.

#### **b) Método de secado en la estufa**

Pesar 2 g de harina en pesafiltro de aluminio con tapa, el cual ha sido previamente pesado después de secarlo 2 horas a 130°C. Secar la muestra una hora a 130°C con la ventilación abierta. Retirar de la estufa, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente.

Calcular el porcentaje de humedad reportándolo como pérdida de peso por secado a 130°C:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{(A - B)}{m} \cdot 100$$

Donde:

- A = peso del pesafiltro más muestra húmeda
- B = peso del pesafiltro más muestra seca en estufa
- m = peso de la muestra en gramos

#### **1.2 Determinación de cenizas (AOAC, 1980)**

Pesar con precisión 3 g de harina en una cápsula de porcelana previamente pesada después de haber sido calcinada 2 horas a 600°C. Calcinar la muestra carbonizándola primero con mechero en una campana de extracción, hasta que ya no salga humo. Meter a

la mufla, cuidando que la temperatura no pase de 550°C para evitar que los cloruros se volatilicen. Suspender el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises (si se observan puntos negros, humedecerlas con unas gotas de agua destilada, secar en la estufa a 130°C y volver a calcinar). Enfriar en desecador y pesar. El porcentaje de cenizas se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(A - B)}{m} \cdot 100$$

Donde:            A = peso de la cápsula + cenizas  
                       B = peso de la cápsula vacía  
                       m = peso de la muestra en gramos

### 1.3 Determinación de grasa

#### a) Método de Goldfish

Poner a peso constante un vaso del aparato de extracción Goldfish con 2 ó 3 perlas de vidrio. En un cartucho del aparato de extracción Goldfish, colocar 2 g de muestra seca, ya que aunque el éter penetra lentamente en los tejidos cuando están secos, lo hacen aún más lentamente cuando están húmedos. Colocar el cartucho en el aparato de extracción y aproximadamente 60 a 80 mL de éter etílico en el vaso. Realizar la extracción durante 4 a 6 horas hasta que por medio de una prueba con papel filtro se conozca el final de la extracción. Retirar el cartucho y reemplazarlo por un tubo para recuperar la mayor parte de éter hasta que el contenido del vaso esté casi vacío. Terminar de llevar a sequedad en una estufa con vacío a 70-80°C, hasta que el peso del vaso con la grasa no varíe más de 5 mg. La concentración de lípidos se calcula por diferencia de pesos y los resultados se expresan en lípidos extraídos por 100 g de material.

### 1.4. Determinación de fibra cruda (AOAC, 1980)

Se pesan 2 g de harina desengrasada, se colocan en un vaso digestor de 600 mL, añadir 1 g de asbesto preparado y 200 mL de solución de ácido sulfúrico al 1.25% (0.255N) hirviendo. Calentar de inmediato (debe empezar a ebullición antes del minuto), reflujar durante 30 min rotando el vaso de vez en cuando para incorporar las partículas que se adhieren a las paredes. Filtrar a través de papel seda especial utilizando vacío y lavar con agua destilada caliente hasta que no se dé reacción ácida con rojo de metilo, pasar el residuo que quede en el filtro al vaso digestor ya limpio, usando una espátula y repetir la operación con una solución hirviendo de sosa al 1.25% (0.313 N). Después de reflujar 30 min se filtra sobre el mismo papel seda, se lava con 25 mL de ácido sulfúrico al 1.25% hirviendo y con agua destilada caliente hasta que el filtrado no dé reacción alcalina al rojo de metilo.

Pasar cuantitativamente el residuo a un vaso de precipitados lavando con agua destilada y filtrar sobre un crisol Gooch que lleva una delgada capa de asbesto y que ha sido calcinado

durante 1 hora a 600°C. Llevar a la mufla y calcinar a 600°C durante 30 minutos. Enfriar y pesar.

Determinar un blanco, tratando 1 g de asbesto preparado, con ácido y con álcali en la misma forma en que se procedió para la muestra. El contenido de fibra se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{(A - B)}{m} \cdot 100$$

Donde: A = peso del crisol Gooch después de 2h a 30°C menos el peso del crisol después de calcinar 30 min a 600°C  
 B = peso perdido en la determinación del blanco  
 m = peso de la muestra en gramos

### 1.5 Determinación de nitrógeno total

#### a) Método Macrokjeldahl (AOAC, 1980)

Se pesan 0.5 g de harina en un papel delgado y con todo y papel se introduce en un matraz kjeldahl de 800 mL, se agregan de 7 a 8 g de reactivo de selenio y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agregan piedras de ebullición y se coloca el matraz en el digestor para que se volatilice la materia orgánica. Una vez que la solución queda completamente clara (2 horas aproximadamente), enfriar y diluir con 350 mL de agua destilada y enfriar sobre hielo. Añadir 80 mL de una solución al 50% de NaOH haciéndola resbalar lentamente por las paredes del matraz. Agregar uno o dos g de zinc. Conectar el matraz, sin agitar, a la alargadera del sistema de destilación del equipo que, a su vez, está conectado a otra alargadera introducida en 50 mL de HCl 0.1N contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL adicionados de 5 gotas de rojo de metilo como indicador. Una vez conectado el matraz, agitar para mezclar las dos capas e inmediatamente colocar en la parrilla de calentamiento del aparato. Destilar aproximadamente 250 mL y suspender la destilación, retirando primero el matraz con el destilado de manera que la alargadera quede por encima y antes de apagar la parrilla dejar destilar unos minutos, con el objeto de lavar la alargadera por dentro y después lavarla por fuera, recogiendo los lavados en el matraz.

Titular el exceso de ácido con solución valorada de HCl 0.1N, hasta vire amarillo del indicador rojo de metilo. Corregir mediante una determinación en blanco de los reactivos y el papel empleados.

El contenido de nitrógeno se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(\text{mL blanco} - \text{mL problema}) (N. \text{ NaOH}) (0.014)}{\text{g de muestra}} (100)$$

## APÉNDICE 2. OBTENCIÓN DE QUITINA (Método de Horowitz y col., 1957)

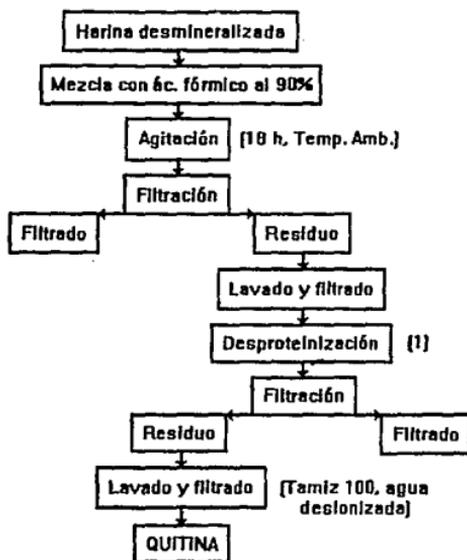
- Descripción del método
- Diagrama de flujo

### a) Descripción del método

Se pesan 10 g de muestra descalcificada (b.s.) y se mezclan con 100 mL de ácido fórmico al 90%. Agitar durante 18 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la mezcla se diluye con agua desionizada y se filtra con un tamiz número 100. Hacer enjuagues con agua desionizada. Posteriormente, el residuo se trata con 500 mL de una solución de NaOH al 10% a 100°C con agitación constante durante 2.5 horas. Enjuagar con agua desionizada. El residuo es quitina.

### b) Diagrama de flujo

#### Obtención de quitina por el método de Horowitz y col., 1957



(1) 2.5 h a 100°C, agitación constante, NaOH al 10% y a razón de 50 veces la muestra inicial

### APÉNDICE 3. DESPIGMENTACIÓN

- a) Descripción de la técnica
- b) Diagrama de flujo

a) Descripción de la técnica (basada en los trabajos de Meyers y Bligh, 1981 y Chen y Meyers, 1982a)

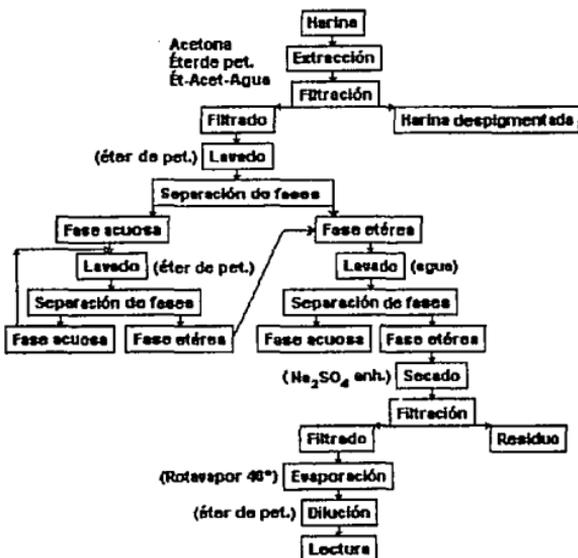
Se colocan 20 g de harina en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se añaden 200 ó 300 mL del solvente, según el caso. Se tapan con papel aluminio y se agitan durante el tiempo preestablecido, al abrigo de la luz. Finalizada la extracción, se filtra con papel filtro grueso y vacío. Las muestras se lavan sobre el papel filtro con una pequeña porción del solvente respectivo, hasta que éste quede claro; la harina así extraída se seca y se guarda para la siguiente etapa del proyecto. El filtrado se lava con éter de petróleo en un embudo de separación y se separan las fases, quedando los pigmentos en la fase etérea. Las fases etéreas se van reuniendo en otro embudo de separación. Este proceso se repite varias veces hasta que ambas fases queden lo más claras posible. Posteriormente, la fase etérea se lava con agua destilada a fin de remover todo resto de acetona y luego se añade sulfato de sodio anhidro para remover los restos de agua. Se deja así toda la noche. Luego se filtra en un embudo de porcelana con una capa de sulfato de sodio anhidro y con vacío. El filtrado se evapora a sequedad con un rotavapor Buchi a 40°C (Buchi y Co., Suiza). Finalmente, el residuo se diluye con un volumen conocido de éter de petróleo y se lee en el espectrofotómetro a 470 nm.

El contenido de pigmentos en µg/g de muestra, se determinó con la fórmula de Kelley y Harmon, 1972, utilizando un coeficiente de extinción de 2400, tal como lo proponen Kanemitsu y Aoe, 1958, para el éter de petróleo a 470 nm.

$$\mu\text{g pigm./g muestra} = \frac{(A) (D) (10)}{100 (G) (d) (E)}$$

Donde:

- A = absorbancia a 470 nm
- D = mL disolvente empleado
- G = g de muestra
- d = ancho de la celda en cm
- E = coeficiente de extinción (para este caso, E = 2400)

b) Diagrama de flujo DespigmentaciónDiagrama de flujo Despigmentación**APÉNDICE 4. DESMINERALIZACIÓN**

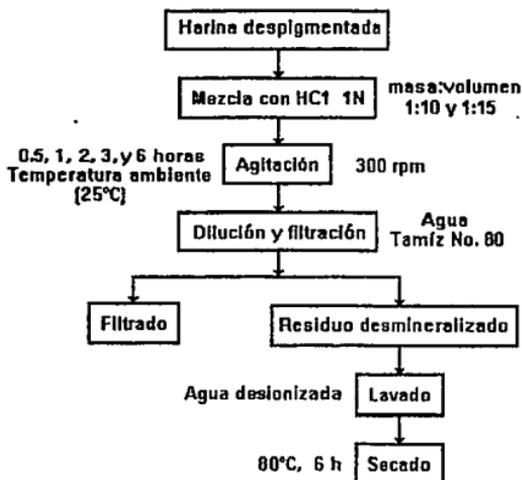
- Descripción de la técnica
- Diagrama de flujo

a) Descripción de la técnica (basada en los trabajos de Bough y col., 1978a; No y col., 1989 y Mathur y Narang, 1990).

Se introducen 10 g de harina despigmentada (b. s.) a un matraz Erlenmeyer de 125 mL. A continuación se agregan lentamente 100 ó 150 mL de HCl 1N, según el caso, se tapa con papel aluminio y se agita el tiempo correspondiente (3 ó 12 h), a temperatura ambiente. Es importante agregar poco a poco la solución de HCl 1N, debido a que al entrar en contacto con la harina, se produce un gran desprendimiento de gas, seguramente CO<sub>2</sub>, el cual forma mucha espuma y puede salir del matraz llevando consigo algo de harina.

La mejor manera de evitar esto es añadiendo el ácido lentamente y de manera controlada. Transcurrido el tiempo de agitación, las muestras se diluyen con agua de la llave y se lavan a chorro de agua sobre un tamiz No. 80 para remover las sales y alcanzar la neutralidad. El último lavado se hace con agua desionizada, luego se pasan a un papel filtro grueso y se remueve la mayor cantidad posible de humedad con vacío. Finalmente, el residuo se seca en una estufa a 80°C durante 6 horas.

b) Diagrama de flujo. Desmineralización



**APÉNDICE 5. DESPROTEINIZACIÓN QUÍMICA**

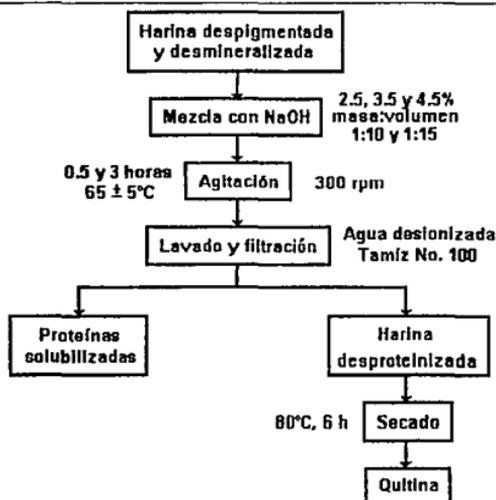
- a) Descripción de la técnica  
b) Diagrama de flujo

a) Descripción de la técnica (basada en los trabajos de Bough y col., 1978a; No y col., 1989 y Mathur y Narang, 1990).

Se introducen 10 g de harina despigmentada (b.s.) y desmineralizada (b.s.) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agregan 100 ó 150 mL, según el caso, de la solución de NaOH

al 2.5, 3.5 ó 4.5%. Se tapa el matraz con papel aluminio y se coloca en un baño a 65°C con agitación constante. Transcurrido el tiempo preestablecido, se diluye con agua de la llave y se filtra sobre un tamiz No. 100, se lava a chorro de agua hasta alcanzar la neutralidad y remover la proteína hidrolizada. El último lavado se hace con agua desionizada. Luego, el sólido se pone sobre papel filtro grueso y se remueve toda la humedad posible con vacío. Finalmente, el residuo se seca en una estufa a 80°C durante 6 horas.

b) Diagrama de flujo. Desproteínización



## APÉNDICE 6. DESACETILACIÓN

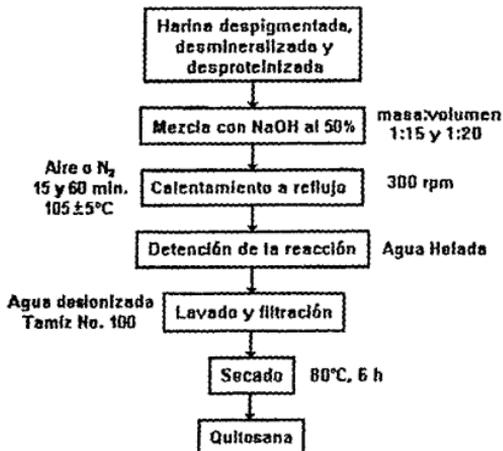
- a) Descripción del método  
b) Diagrama de flujo

a) Descripción de la técnica (basada en los trabajos de Bough y col., 1978a; Muzzarelli, 1978; No y Meyers, 1989 y Mathur y Narang, 1990).

Se colocan 5 g de harina despigmentada, desmineralizada y desproteínizada (b.s.) en un matraz de bola de tres entradas y se añaden 75 ó 100 mL, según el caso, de NaOH al 50%

y un agitador magnético. En la primera entrada del matraz se coloca un termómetro, en la segunda una terminal de nitrógeno y en la tercera se conecta un refrigerante. El matraz se coloca en un recipiente que contenga nujol y que lo cubra en un 60% a modo de baño. Este recipiente deberá estar sobre una parrilla provista de plato térmico y agitador. Una vez revisados todos los ensambles, abrir el tanque hasta obtener un flujo bajo pero continuo de este gas (aproximadamente 10 L/h); luego se empieza a calentar y agitar el sistema hasta que alcance los  $105 \pm 5^\circ\text{C}$ , instante a partir del cual se mide el tiempo. Transcurrido el tiempo elegido, la mezcla se vierte sobre hielo para detener la reacción. Luego se lava a chorro de agua de la llave en un tamiz No. 100 hasta alcanzar la neutralidad. El último lavado se hace con agua desionizada y el residuo se pasa a un papel filtro grueso donde con la ayuda de vacío, se remueve toda la humedad posible. Finalmente, el sólido es secado en una estufa a  $80^\circ\text{C}$  por 6 horas.

b) Diagrama de flujo Desacetilación



**APÉNDICE 7. DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA** (Escobedo, 1994)

Descripción del método.

Pesar 10 g de harina de cefalotórax de camarón previamente despigmentada y desmineralizada y mezclar con 80 mL de un buffer de carbonatos ajustando el pH a 9,5,

verificando con potenciómetro. Por otro lado preparar 5 mL de una solución de la enzima proteasa alcalina, de tal forma que la relación enzima:proteína sea del 1%. Colocar, sin mezclar, ambas soluciones en un baño de agua a 50°C. Una vez alcanzada esa temperatura en ambos sistemas, añadir la solución enzimática a la muestra, y empezar a contabilizar los 180 minutos de hidrólisis, controlando la temperatura y manteniendo constante la agitación (300 rpm). Transcurrido este tiempo, inactivar a la enzima llevando el sistema a ebullición durante 5 minutos. Enfriar y lavar a chorro de agua en un tamiz No. 100 para remover la proteína hidrolizada. Enjuagar con agua desionizada, realizar un nuevo filtrado sobre papel filtro grueso, remover toda la humedad posible con vacío y secar en una estufa a 80°C durante 6 horas.

## APÉNDICE 8. TÉCNICA DE HIDRÓLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

### a) Preparación de la muestra

La muestra para el análisis de aminoácidos debe estar completamente seca, y homogénea, y con el menor contenido posible de grasa, sales, pigmentos y carbohidratos.

### b) Aminoácidos totales.

- Se pesan de 2 a 3 mg de muestra; se adicionan 200  $\mu$ L de HCl 6N por cada mg de muestra. Se burbujea nitrógeno.
  - Se sellan los tubos a una presión menor de 25 militorr.
  - Se dejan los tubos (ampolletas), a 110°C durante 20 h.
- Después de este tiempo, se abren las ampolletas y se evapora el HCl en un condensador de vacío.

Una vez secas las muestras, se guardan en congelación a -4°C, selladas con parafina hasta el momento del análisis.

### c) Triptofano.

- Se pesan de 2 a 3 mg de muestra; se adicionan 100  $\mu$ L de HCl 4N de ácido metanosulfónico, conteniendo 0.2% de 3-(2 aminoetil)indol · HCl .
- Se sellan los tubos a una presión menor de 25 militorr.
- Se dejan los tubos a 110°C durante 22 h.
- Transcurrido este tiempo se dejan enfriar los tubos y se guardan en congelador a -4°C hasta el análisis.

### d) Análisis de aminoácidos

Las muestras preparadas que se encuentran en congelación se sacan, se disuelven en agua y se hace una dilución 1:10 (en caso de triptofano se abren las ampolletas y se mide el volumen total en que están disueltas y se hace la dilución).

Se filtran por membrana de 0.22  $\mu$  de porosidad para eliminar partículas.

Se toman 50  $\mu$ L de la muestra, se adicionan 500  $\mu$ L de reactivo de OPA y después de 120 s se inyecta.

#### Para aminoácidos totales

Solución A: Solución de acetato de sodio 50 mM, pH 6.8.

Solución B: Metanol 100 %

Flujo: 1,5 mL - min.

Columna: Ultrasphere XL ODS, 7 cm de longitud, 4,5 mm de diámetro, 3  $\mu$  tamaño de partícula.

Detector de Fluorescencia: RFU, 0.05 filtro de emisión mayor de 418 nm, filtro de excitación 360 nm, loop 5  $\mu$ L

#### Gradiente de aminoácidos totales y triptofano

tiempo	%B	Duración
0	15	5
5	22.5	3
15	35	10
35	70	15

El sistema se equilibra en 10 % de B.

Para triptofano el solvente B es metanol:acetonitrilo (75:25), con el mismo gradiente.

### **APÉNDICE 9 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRUPOS AMINO**

(Broussignac, 1957)

- Pesar 0.5 g de quitosana con exactitud de mg.
- Disolver a la temperatura ambiente en 20 mL de HCl 0.3 normal.
- Añadir 400 mL de agua destilada para permitir una buena dispersión del precipitado que se irá formando.
- Titular en retroceso con NaOH normal, controlando el pH con un potenciómetro y manteniendo constante la agitación.
- Trazar la curva de pH en función de los mL de NaOH añadidos.
- Determinar gráficamente los volúmenes de NaOH X y Y en mL, correspondientes a los dos puntos de inflexión.
- Llamar peso en gramos de la muestra tomada.

El porcentaje de grupos amino contenidos en la pruebas será:

$$\% \text{ de NH}_2 = \frac{16.1 (Y - X)}{m}$$

## APÉNDICE 10 CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

- a) Despigmentación
- b) Desmineralización
- c) Desproteínización
- d) Desacetilación

### a) Despigmentación

TABLA 38. PIGMENTOS EN HARINA DE CEFALOTORAX DE CAMARON EXTRAÍDOS, CON DOS RÉPLICAS, BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS ( $\mu\text{g/g}$ )

SOLVENTE EXTRACTOR		TIEMPO h		TAMAÑO DE PARTICULA mm											
				P1 menor a 0.42				P2 0.42 - 0.84				P3 0.84 - 2.00			
				RELACION HARINA:SOLVENTE				RELACION HARINA:SOLVENTE				RELACION HARINA:SOLVENTE			
R1	1:10	R2	1:15	R1	1:10	R2	1:15	R1	1:10	R2	1:15				
ACETONA S1	3 T1	21.1667	21.5000	16.2500	16.2500	12.9583	13.3333	19.9583	20.2083	16.1250	16.5000	13.2917	14.2500		
		20.8750	19.6667	16.9167	16.0000	13.4167	13.7500	21.2917	25.0000	16.8750	17.3333	15.2500	14.1687		
		21.6250	24.0000	16.6250	18.6667	15.0517	14.5417	21.6667	24.3750	17.1250	17.5000	16.0000	15.2917		
	12 T2	6.5000	6.5500	4.4083	4.1667	3.5417	2.8917	6.5167	6.5833	4.0917	4.4000	3.2917	3.0667		
		6.5333	6.6500	4.1833	4.4750	3.6167	2.9250	6.2083	6.9250	4.4333	4.3750	3.2250	3.5583		
		6.4500	6.5667	4.3583	4.2583	3.2333	3.6417	6.6417	6.5833	4.5583	4.3750	3.3333	3.7000		
ETER DE PET: ACETONA: AGUA (15:75:10) S3	3 T1	24.1667	24.0833	19.3333	19.8333	15.8750	15.3750	24.0417	25.0833	18.9167	19.7917	16.2917	15.7083		
		24.9167	24.2083	19.4167	20.4167	16.7917	15.9167	24.5833	24.5417	19.2500	19.5833	16.7083	15.0000		
		24.0833	24.9583	19.9167	19.5000	16.2917	14.6250	25.0833	24.7500	19.5417	20.5833	16.7083	15.1667		
	12 T2	24.1667	24.0833	19.3333	19.8333	15.8750	15.3750	24.0417	25.0833	18.9167	19.7917	16.2917	15.7083		
		24.9167	24.2083	19.4167	20.4167	16.7917	15.9167	24.5833	24.5417	19.2500	19.5833	16.7083	15.0000		
		24.0833	24.9583	19.9167	19.5000	16.2917	14.6250	25.0833	24.7500	19.5417	20.5833	16.7083	15.1667		

TABLA 39 . MATRÍZ DE TRATAMIENTOS. DESPIGMENTACIÓN

		TAMAÑO DE PARTICULA					
		P1		P2		P3	
SOLVENTE EXTRACTOR	TIEMPO h	RELACIÓN HARINA:SOLVENTE		RELACION HARINA:SOLVENTE		RELACION HARINA:SOLVENTE	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
S1	T1	62.0000	61.3750	49.2917	48.7500	39.6667	41.3333
	T2	64.5834	73.3750	50.6250	43.5000	46.2917	44.0001
S2	T1	19.5500	19.7833	12.6833	13.0417	10.4501	8.8834
	T2	19.3000	20.0750	13.3499	13.0083	9.7916	10.9000
S3	T1	73.1251	73.3749	57.6667	60.0417	48.9584	47.0000
	T2	73.7499	74.2500	58.7084	59.6666	49.7083	44.7917

Suma de cuadrados:

P = 778.9972	R = 0.0510	S = 4 797.2707	T = 4.7709
PR = 4.9622	PS = 109.8008	PT = 4.9888	RS = 0.1750
RT = 0.0690	ST = 6.4225	PRS = 10.3140	PRT = 5.4280
PST = 10.6019	RST = 0.6141	PRST = 7.7590	$\epsilon = 334.0794$

## b) Desmineralización

TABLA 40. CENIZAS EN MUESTRAS DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN DESMINERALIZADAS, CON DOS RÉPLICAS, BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS (%)								
		TAMAÑO DE PARTICULA mm						
		P1 0.42 - 0.84		P2 0.84 - 2.00				
TIEMPO h	RELACIÓN MASA:VOLUMEN			RELACIÓN MASA:VOLUMEN				
	R1	1:10	R2	1:15	R1	1:10	R2	1:15
0.5		16.60		10.73		18.33		12.78
		11.25		10.68		17.16		10.43
	T1	21.28		14.00		16.90		6.82
1		5.03		4.31		7.08		4.67
		4.69		4.87		6.30		6.18
	T2	8.11		4.67		5.74		7.43
2		4.85		4.41		6.07		3.20
		3.75		3.23		3.92		4.12
	T3	3.15		3.71		2.90		4.28
3		1.42		1.16		0.88		1.10
		1.16		0.87		1.19		0.94
	T4	0.80		1.01		1.57		1.44
6		0.88		0.79		1.06		0.95
		0.87		1.03		1.02		0.92
	T5	0.94		0.99		0.80		0.97

Tabla 41. Comparación de medias entre los tratamientos de desmineralización a tiempos de 2 contra 3 horas y de 3 contra 6 horas

Tratamiento	n	$\bar{x}$	$\sigma$	$\mu$	t <sub>calc.</sub>	t <sub>tablas</sub>	H <sub>0</sub> : $\bar{X} = \mu$
P2, R1, T4	3	1.13	0.31	0.94 <sup>(1)</sup>	1.0571	±4.3027	se acepta
P2, R1, T5	3	0.90	0.04	0.94 <sup>(1)</sup>	-1.8232	±4.3027	se acepta
P2, R2, T4	3	1.01	0.15	0.94 <sup>(1)</sup>	0.8356	±4.3027	se acepta
P3, R1, T4	3	1.21	0.35	0.95 <sup>(2)</sup>	1.3030	±4.3027	se acepta
P3, R1, T5	3	0.96	0.14	0.95 <sup>(2)</sup>	0.1237	±4.3027	se acepta
P3, R2, T4	3	1.16	0.26	0.95 <sup>(2)</sup>	1.4247	±4.3027	se acepta
P2, R1, T3	3	3.92	0.86	1.01 <sup>(3)</sup>	5.8512	±4.3027	se rechaza
P2, R1, T4	3	1.13	0.31	1.01 <sup>(3)</sup>	0.6696	±4.3027	se acepta
P2, R2, T3	3	3.78	0.59	1.01 <sup>(3)</sup>	8.1174	±4.3027	se rechaza
P3, R1, T3	3	4.30	1.62	1.16 <sup>(4)</sup>	3.3644	±4.3027	se acepta
P3, R1, T4	3	1.21	0.35	1.16 <sup>(4)</sup>	0.2471	±4.3027	se acepta
P3, R2, T3	3	3.87	0.58	1.16 <sup>(4)</sup>	8.0439	±4.3027	se rechaza

Tomando como  $\mu$  el valor correspondiente a: (1) = P2, R2, T5; (2) = P3, R2, T5; (3) = P2, R2, T4; (4) = P3, R2, T4. Las claves P, R y T vienen en la tabla 40.

TABLA 42. MATRIZ DE TRATAMIENTOS. DESMINERALIZACIÓN					
TIEMPO h		TAMAÑO DE PARTICULA mm			
		P1 0.42 - 0.84		P2 0.84 - 2.00	
		RELACIÓN MASA:VOLUMEN		RELACIÓN MASA:VOLUMEN	
		R1 1:10	R2 1:15	R1 1:10	R2 1:15
0.5	T1	49.13	35.41	52.39	30.02
1	T2	17.83	13.87	19.12	18.28
2	T3	11.75	11.35	12.89	11.60
3	T4	3.38	3.04	3.64	3.48
6	T5	2.69	2.81	2.88	2.84

Suma de cuadrados:

$$P = 0.57$$

$$R = 30.81$$

$$T = 1349.92$$

$$PR = 0.69$$

$$PT = 2.72$$

$$RT = 79.92$$

$$PRT = 6.42$$

$$\epsilon = 97.57$$

c) Desproteínización

TABLA 43. CONTENIDO DE NITRÓGENO EN MUESTRAS DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN DESPROTEINIZADAS, CON UNA RÉPLICA, BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS (%)							
SOLUCIÓN NaOH		TIEMPO h		TAMAÑO DE PARTICULA mm			
				P2 0.42 - 0.84		P3 0.84 - 2.00	
				RELACIÓN MASA:VOLUMEN		RELACIÓN MASA:VOLUMEN	
		R1	R2	R1	R2		
S1 2.5	0.5	10.96	4.34	9.31	8.76		
	T1	10.45	9.36	12.01	9.62		
	3	8.84	9.22	8.93	7.22		
	T2	9.48	7.15	9.11	9.03		
S2 3.5	0.5	9.74	8.27	9.00	7.97		
	T1	8.26	8.89	9.10	8.91		
	3	8.19	7.72	7.80	7.31		
	T2	7.43	7.54	7.54	7.08		
4.5	0.5	8.06	8.33	8.19	7.93		
S3	T1	9.82	7.99	9.40	8.28		
	4.5	3	7.15	6.99	6.81	7.20	
S3	T2	7.36	7.29	5.49	7.12		

TABLA 44. MATRIZ DE TRATAMIENTOS. DESPROTEINIZACIÓN

SOLUCIÓN NaOH		TIEMPO h	TAMAÑO DE PARTÍCULA mm			
			P2 0.42 - 0.84		P3 0.84 - 2.00	
			RELACIÓN MASA:VOLUMEN		RELACIÓN MASA:VOLUMEN	
		R 1	R 2	R 1	R 2	
S 1 2.5	0.5 T 1	21.41	13.70	21.32	18.38	
	3 T 2	18.32	16.37	18.04	16.25	
S 2 3.5	0.5 T 1	18.00	17.16	18.10	16.88	
	3 T 2	15.62	15.26	15.34	14.39	
4.5 S 3	0.5 T 1	17.88	16.32	17.59	16.21	
4.5 S 3	3 T 2	14.51	14.28	12.30	14.32	

Suma de cuadrados:

P = 0.01      R = 7.45      S = 13.32      T = 16.28  
 PR = 0.85      PS = 1.61      PT = 1.24      RS = 6.29  
 RT = 3.20      ST = 1.43      PRS = 1.10      PRT = 0.15  
 PST = 0.57      RST = 1.21      PRST = 1.45      e = 26.18

d) Desacetilación

TABLA 45. VISCOSIDAD DE QUITOSANAS. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRATAMIENTO. MÉTODO DE YATES						
FACTOR	VISCOSIDAD	I	II	III	IV	S. C.
-	34	55	144	871	3,402	-
P	21	89	727	2,531	116	841
R	44	235	757	-113	-154	1,482
PR	45	492	1,774	229	-364	8,281
A	96	358	-12	291	1,600	160,000
PA	139	399	-101	-445	130	1,056
RA	318	1,130	5	-173	-304	5,776
PRA	174	644	224	-191	-410	10,506
T	180	-13	34	583	1,660	172,225
PT	178	1	257	1,017	342	7,310
RT	196	43	41	-89	-736	33,856
PRT	203	-144	-486	219	-18	20
AT	459	-2	14	223	434	11,772
PAT	671	7	-187	-527	308	5,929
RAT	316	212	9	-201	-750	35,156
PRAT	328	12	-200	-209	-8	4

P=Tamaño de partícula; R=Relación masa.volumen; A=Atmósfera; T=Tiempo.