



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPONJA DE QUITINA A PARTIR DE
CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. RONNY ADRIAN FLORES ORTEGA



TUTOR: Dra. en Ing. María del Carmen Durán Domínguez
AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO DESIGNADO

Presidente	Dr. Manuel de Jesús Salmón Salazar
Vocal	Dr. Cecilio Álvarez Toledano
Secretario	Dr. Roberto Olayo González
Primer suplente	Dr. Modesto Javier Cruz Gómez
Segundo suplente	Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

COMITÉ TUTORAL

Dra. María del Carmen Durán Domínguez
Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto
Dr. Manuel de Jesús Salmón Salazar

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

Laboratorio 301, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM; con apoyo económico de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, México D. F.

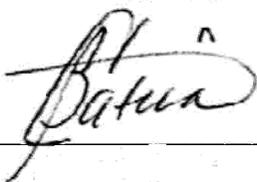
SUSTENTANTE

M. en C. Ronny Adrián Flores Ortega



TUTOR PRINCIPAL

Dra. María del Carmen Durán Domínguez



AGRADECIMIENTOS

A mi Tutora, Dra. María del Carmen Durán Domínguez, por su apoyo y dirección y

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Keiko Shirai Matsumoto y

Dr. Manuel de Jesús Salmón Salazar

A los miembros del Jurado,

A los miembros del Comité Ampliado y,

A los miembros del Jurado de Candidatura por sus valiosos comentarios

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

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

A los maestros, compañeros y personal del Laboratorio 301-E de la Facultad de Química de la UNAM

*Everything should be made as simple as possible,
but not simpler.
A. Einstein*

Resumen

La quitina, un polisacárido presente en el exoesqueleto del camarón, se disolvió y se extrajo, con una mezcla de Metanol, Agua y cloruro de Calcio (disolvente MAC). Se probaron diferentes condiciones de extracción. La mejor se obtuvo con una mezcla de un mol de metanol, cuatro moles de agua y un mol de cloruro de calcio (MAC-141) a 25°C y durante 48 horas de extracción. Con la quitina en solución se formó una espuma con la que se produjo una esponja de quitina (SPQ) al eliminar el disolvente. Este método resultó más sencillo para obtener SPQ que por liofilización, que es el procedimiento más utilizado, porque consume menos energía. Se estudiaron las propiedades mecánicas de la SPQ y se determinó que su perfil de tensión es similar al de una espuma de poliestireno (PS) comercial. La SPQ podría llegar a reemplazar a la espuma de PS en la fabricación de recipientes desechables para comida con la ventaja de ser biodegradable a diferencia del PS. Se determinó el grado de acetilación (0.77) y la estabilidad de las moléculas de quitina en solución y se concluyó que el disolvente MAC y el método de extracción no son agresivos con las moléculas de quitina. Con la información obtenida en la investigación fue posible conjeturar el mecanismo de disolución de la quitina en el disolvente MAC. La disolución se produce cuando el calcio del disolvente MAC rompe los puentes de hidrógeno de la quitina (que son los que le confieren alta insolubilidad) y forma un complejo soluble. El calcio completa, así, su envoltura de solvatación iónica que estaba incompleta por ser el disolvente MAC una solución saturada. En el montaje de las metodologías utilizadas se tomaron en cuenta los principios de la Química Verde para tener un proceso menos contaminante. El disolvente MAC después de usado se recuperó para preparar nuevo disolvente.

Abstract

Chitin, a polysaccharide present in shrimp cephalothorax, was dissolved and extracted with a mixture of methanol, water, and calcium chloride (solvent MAC). Different conditions of extraction were tested. The best conditions were obtained using a mixture of one mole of methanol, four moles of water, and one mole of calcium chloride (MAC-141), at 25°C and 48 hours of extraction time. With chitin in solution a foam was formed, and a chitin sponge (SPQ) was created after solvent elimination. This method, when compared with lyophilization, which is the most used procedure, was simpler for obtaining SPQ because it consumes less energy. The mechanical properties of the SPQ were studied, and it was found that its tension profile was similar to the one of a commercial polystyrene foam (PS). The SPQ might be employed to replace PS foam in the manufacture of food disposable containers with the advantage of being highly biodegradable compared with PS. Degree of acetylation (0.77) and stability of the chitin molecules in solution were determined, and it was concluded that the MAC solvent and the method of extraction carried out were not aggressive with the chitin molecules. An important information obtained in this research was the elucidation of the mechanism of chitin dissolution in the MAC solvent. The dissolution takes place when the calcium ion of the MAC solvent breaks the chitin hydrogen bonds (that are responsible for producing its high insolubility) forming a soluble complex. The calcium completes, in this way, its ionic solvation shell that was incomplete for being the MAC solvent a saturated solution. Green Chemistry principles to have a less pollutant process were the basis for the used methodologies in this research. The MAC solvent can be recovered to prepare new solvent after its use.

Palabras clave: Esponja de quitina, caracterización, química verde, residuos de camarón

Key Words: Chitin sponge, characterization, green chemistry, shrimp wastes

ABREVIATURAS

CC	Cefalotórax de camarón
CPD	Cefalotórax parcialmente desproteínizado
DA	Grado de acetilación por sus siglas en inglés
DMAc	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
IC	Índice de cristalinidad
MAC	Disolvente Metanol-Agua-cloruro de Calcio
PS	Poliestireno por sus siglas en inglés
QUIMAC	Solución de quitina en disolvente metanol-agua-cloruro de calcio
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio por sus siglas en inglés
SPQ	Esponja de quitina

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
I INTRODUCCIÓN	14
I.1 Problemática y propuesta de solución	15
I.2 Hipótesis	15
I.3 Objetivos	16
I.3.1 Objetivo general	16
I.3.2 Objetivos específicos	16
II FUNDAMENTOS	17
II.1 Complejo quitina-proteína	18
II.2 Estructura de la quitina	20
II.3 Métodos de obtención de quitina	22
II.3.1 Tratamiento ácido-base	22
II.3.2 Disolución de quitina	24
II.3.2.1 Sistema DMAc/LiCl	24
II.3.2.2 Sistema MeOH-H ₂ O/CaCl ₂	25
II.4 Bioesponjas	30
II.5 Posibles usos de la esponja de quitina	31
III METODOLOGÍA	35
III.1 Extracción de quitina	35
III.1.1 Materia prima	35
III.1.2 Cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD)	36
III.1.3 Caracterización	36
III.1.4 Disolución de quitina	37
III.1.4.1 Determinación de la viscosidad de soluciones de quitina	37
III.1.4.2 Extracción sólido-líquido de quitina con el disolvente MAC	38
III.1.4.3 Superficie de respuesta para la extracción sólido-líquido de quitina del cefalotórax parcialmente desproteínizado	40
III.2 Formación de esponja de quitina (SPQ)	41
III.2.1 Disolución y precipitación	41
III.2.2 Esponja de quitina por liofilización	41
III.3 Caracterización de la esponja de quitina	42
III.4 Pruebas mecánicas	43

<i>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	<i>45</i>
IV.1 Caracterización y desproteínización de cefalotórax de camarón fresco	45
IV.2 Viscosidad de la solución de quitina en disolvente MAC	47
IV.3 Extracción sólido-líquido de quitina con disolvente metanol-agua-cloruro de calcio (MAC)	50
IV.4 Caracterización de la esponja de quitina	59
IV.5 Propiedades mecánicas de la esponja de quitina	73
<i>V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	<i>77</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>81</i>

Listado de Figuras

Figura II-1. Molécula de quitina: Poli(N-acetil-D-glucosamina) (Roberts, 1992)	17
Figura II-2. Molécula de celulosa.....	18
Figura II-3. Representación esquemática de la microestructura jerárquica de la cutícula de langosta americana. (a) Arreglo antiparalelo de moléculas de quitina formando α -quitina, (b) Nanofibrillas conteniendo de 18 a 25 cadenas de quitina, (c) Fibras de quitina-proteína y biominerales, (d) Contrachapado torcido o estructura Bouligand formado por un apilamiento de planos mineralizados de quitina-proteína, (e) Estructura final compuesta altamente ordenada (Raabe y col., 2007)	19
Figura II-4. Posibles enlaces involucrados en la unión quitina-proteína (Roberts, 1992).....	20
Figura II-5. Polimorfismo de la quitina	21
Figura II-6. Sistema utilizado para identificar a los átomos en las diferentes cadenas de la α -quitina. La cadena directamente debajo de la cadena 1, que es la cadena adyacente a lo largo del eje a, se designa como cadena 3 (Roberts, 1992)	22
Figura II-7. Estructura cristalina de la α -quitina con puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Simetría ortorrómbica ($a=4.74\text{Å}$, $b=18.86\text{Å}$, $c=10.31\text{Å}$) (Blackwell, 1988; Raabe y col., 2007)	23
Figura II-8. Representación de posibles modelos para soluciones acuosas y metanólicas: (a) Antiprisma cuadrado distorsionado en solución acuosa; (b) Capa de solvatación octahédrica; (c) Par iónico de contacto Ca-Cl en solución acuosa; (d) Par iónico de contacto Cl-Ca-Cl en solución acuosa; (e) Capa de solvatación octahédrica en metanol; (f) Par iónico de contacto en metanol (Megyes y col., 2004)	28
Figura II-9. Desacetilación de quitina con solución concentrada de hidróxido de sodio y calor para obtener quitosana y posterior acetilación con anhídrido acético para regenerar la quitina	31
Figura III-1. Diagrama de bloques para la obtención de esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón. CPD: Cefalotórax parcialmente desproteínizado, MAC: Disolvente metanol-agua-cloruro de calcio, QUIMAC: Solución de quitina en disolvente MAC	44

Figura IV-1. Caracterización de cefalotórax de camarón fresco, promedio de tres determinaciones	45
Figura IV-2. Composición de cefalotórax de camarón entero (CC) y cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD), promedio de tres repeticiones	46
Figura IV-3. Aumento de la viscosidad de la mezcla CPD-MAC en función del tiempo de extracción a 25°C. Aguja S28 (0.3-120 r.p.m.).....	48
Figura IV-4. Viscosidad, a 25°C, de la solución de quitina (0.43±0.04%) en función del tiempo. Aguja S28 (30 y 1 r.p.m.).....	48
Figura IV-5. Viscosidad, a 25°C, de la solución de quitina (0.43±0.04%) en función de la velocidad de rotación de la aguja S28 del viscosímetro Brookfield.....	49
Figura IV-6. Diagrama de solubilidad del sistema ternario metanol-agua-cloruro de calcio (MAC) a 25°C.....	50
Figura IV-7. Diagrama ternario de solubilidad para la quitina en el sistema metanol-agua-cloruro de calcio a 25°C. Los círculos representan cuatro soluciones sobre la línea de saturación y cuatro en la zona monofásica. A=MAC-141, B=MAC-231, C=MAC-552, D=MAC-321, A'=MAC-281, B'=461, C'=551, D'=741	51
Figura IV-8. Porcentaje de extracción de esponja de quitina (SPQ), en la línea de saturación, con diferentes disolventes MAC a tres temperaturas, promedio de tres determinaciones	52
Figura IV-9. Porcentaje de extracción de esponja de quitina (SPQ), a 25°C, en la línea de saturación y en la zona de instauración. A=MAC-141, B=MAC-231, C=MAC-552, D=MAC-321	53
Figura IV-10. Curva de distribución normal del diámetro de burbujas de aire en espuma de quitina en un área de 0.32 mm ² . Extracción con disolvente MAC-141 a diferentes temperaturas	55
Figura IV-11. Curva de distribución normal del diámetro de burbujas de aire en espuma de quitina en un área de 0.32 mm ² . Extracción a 25°C con diferentes disolventes MAC.....	56
Figura IV-12. Microfotografía óptica, aumento X10, de solución de quitina extraída a 10°C (porosidad estimada = 18%) y a 25°C (porosidad estimada = 43%). La porosidad se estimó sumando las áreas de todas las burbujas de aire y restando del área total de la solución en observación.....	57
Figura IV-13. Composición de las esponjas de quitina obtenidas con los disolventes MAC-141 y 231 a 10, 25 y 40°C.....	58

Figura IV-14. Gráfico de contorno para la extracción de esponja de quitina, a 25°C, durante tres días, del cefalotórax parcialmente desproteínizado, con diferentes relaciones de disolvente MAC. Las variables están en unidades codificadas y los círculos pequeños muestran los datos experimentales.....	59
Figura IV-15. Espectro de RMN de ¹³ C para la molécula de quitina. Quitina extraída del cefalotórax de camarón parcialmente desproteínizado con disolvente MAC-141	60
Figura IV-16. Distribución de tamaño de agregados de quitina en disolvente MAC-141 y de quitina Sigma, promedio de cinco determinaciones	63
Figura IV-17. Espectro de difracción de rayos X para esponja de quitina, esponja desmineralizada y quitina	64
Figura IV-18. Espectro infrarrojo de quitina y quitina precipitada del disolvente MAC	65
Figura IV-19. Contenido de calcio, magnesio y hierro en cefalotórax de camarón (CC), cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD) y esponja de quitina (SPQ) por absorción atómica, promedio de tres determinaciones	66
Figura IV-20. Microscopía electrónica de barrido de (a) Esponja de quitina (X200), (b) Espuma de poliestireno (X160) y (c) Espuma de poliuretano (X140)	67
Figura IV-21. Microestructura interna de esponja de quitina y película de quitina, aumento X2000	68
Figura IV-22. Corte transversal de una esponja de quitina obtenida a 25°C con disolvente MAC-231, antes (X200) y después de desmineralizar y desproteínizar (X100). Espesor de la película, antes, 1715±22 μm y después 715±134 μm.....	68
Figura IV-23. Distribución normal para el diámetro de las celdas de la esponja de quitina antes (143±117 μm) y después del tratamiento ácido-base (136±62 μm).....	69
Figura IV-24. Corte transversal de una esponja de quitina obtenida por liofilización, espesor 523±33 μm, aumento X100	69
Figura IV-25. Distribución normal para el diámetro de las celdas de esponja de quitina obtenidas, a 25°C, por precipitación de la espuma y por liofilización	70
Figura IV-26. Análisis de tensión de esponja de quitina (SPQ: 57% quitina, 14% proteína y 29% carbonato), esponja desmineralizada, quitina y espuma de poliestireno (PS).....	73
Figura IV-27. Análisis de tensión de esponja de quitina liofilizada (SPQ: 57% quitina, 14% proteína y 29% carbonato), esponja liofilizada y desmineralizada, quitina liofilizada y espuma de poliestireno (PS).....	74

Listado de Tablas

Tabla III-1. Mezcla CPD-MAC para la determinación de la viscosidad de solución de quitina	37
Tabla III-2. Soluciones metanol-agua para la construcción del diagrama de solubilidad.....	38
Tabla III-3. Diseño factorial compuesto de segundo orden para la extracción de quitina con disolvente MAC	40
Tabla IV-1. Pérdida de peso, contenido de cenizas y nitrógeno total de cefalotórax de camarón después de licuar por 2x30 segundos. Determinación promedio de tres replicas en base seca.....	46
Tabla IV-2. Disolvente MAC a varias relaciones molares	51
Tabla IV-3. Porcentaje de esponja de quitina recuperada y extraída del cefalotórax parcialmente desproteínizado a diferentes temperaturas y con diferentes disolventes MAC, promedio de tres determinaciones.....	53
Tabla IV-4. Viscosidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 10°C.....	54
Tabla IV-5. Densidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 10°C y porcentaje de aire de la espuma.....	54
Tabla IV-6. Viscosidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 25°C.....	54
Tabla IV-7. Densidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 25°C y porcentaje de aire de la espuma.....	54
Tabla IV-8. Viscosidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 40°C.....	54
Tabla IV-9. Densidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 40°C y porcentaje de aire de la espuma.....	55
Tabla IV-10. Diseño factorial compuesto de segundo orden para la extracción de quitina con disolvente MAC	59
Tabla IV-11. Desplazamiento químico para los átomos de carbono de la molécula de quitina. Datos obtenidos en esta investigación y referidos en la literatura.....	60
Tabla IV-12. Tamaño de partícula y peso molecular (PM) de quitina, por dispersión dinámica de luz, en esponja de quitina extraída a 10°C para dos disolventes.....	61
Tabla IV-13. Tamaño de partícula y peso molecular (PM) de quitina, por dispersión dinámica de luz, en esponja de quitina extraída a 25°C para dos disolventes y quitina comercial Sigma.....	62

Tabla IV-14. Tamaño de partícula y peso molecular (PM) de quitina, por dispersión dinámica de luz, en esponja de quitina extraída a 40°C para dos disolventes.....	62
Tabla IV-15. Ángulo 2θ para los planos característicos de la quitina cristalina. Datos de esta investigación y referidos en la literatura	63
Tabla IV-16. Disminución de volumen, en porcentaje, durante el proceso de elaboración de esponja y densidad de esponja de quitina (SPQ).....	72
Tabla IV-17. Propiedades mecánicas de esponja de quitina (SPQ), esponja desmineralizada (SPQ-D), quitina y espuma de poliestireno (PS).....	75
Tabla V-1. Estimación del costo de una bandeja de esponja de quitina a nivel laboratorio (reactivos grado ACS) y nivel industrial (reactivos grado técnico)	79

I INTRODUCCIÓN

La quitina es uno de los materiales orgánicos más abundantes, siendo el segundo polímero natural, después de la celulosa, en cantidad producida anualmente por biosíntesis. Se encuentra en animales, particularmente artrópodos como crustáceos e insectos donde es el principal constituyente del exoesqueleto, en moluscos y en ciertos hongos donde es el polímero fibrilar básico en la pared celular (Muzzarelli, 1977; Roberts, 1992).

La quitina ha revelado, en el siglo XXI, ser un biomaterial prometedor de considerable versatilidad (Khor, 2002) y ha sido referida como el *último recurso de biomasa* (Kurita, 2001). Sus aplicaciones van desde la medicina al tratamiento de agua (Ravi Kumar, 2000). Sin embargo, ha sido poco investigado su uso como plástico natural donde se podría aprovechar la propiedad de ser fácilmente biodegradable, a diferencia de los plásticos derivados del petróleo (Flores, 2004). La quitina, también, se ha empleado como relleno biodegradable en artículos de plástico compuesto (Akimasa y Kazushirou, 1998; Hao, 2003; Motoyasu, 2001).

El interés de las actuales investigaciones en polímeros biodegradables se centra en áreas bien definidas de uso. Los plásticos biodegradables ofrecen una solución al manejo de desechos de empaques. Aplicaciones biomédicas de polímeros biodegradables y biocompatibles generan un enorme interés e investigación. Los usos en este campo son: vendaje para heridas, liberación controlada de drogas e implantes quirúrgicos y otras aplicaciones médicas. Materiales porosos biodegradables se utilizan como soporte para inmovilización de enzimas, separación de moléculas y absorción de metales de transición. También, como matriz para el crecimiento óseo (Seol y col., 2004). Además, hay usos agrícolas, por ejemplo, liberación controlada de fertilizantes y pesticidas (Amass y col., 1998).

1.1 Problemática y propuesta de solución

En general, una esponja de quitina se obtiene al liofilizar¹ un gel de quitina elaborado a partir de una solución de quitina en *N,N*-dimetilacetamida y LiCl (Chow y col., 2001). La elaboración presenta algunos inconvenientes: la *N,N*-dimetilacetamida es tóxica y liofilizar es un proceso que consume mucha energía. Además, para la obtención de quitina se utiliza un tratamiento ácido-base degradante para la molécula de quitina y que genera residuos corrosivos.

Entonces, es importante y necesario investigar un nuevo proceso para la elaboración de esponja de quitina, aplicando los preceptos de la *Química verde*,² para obtener un producto ambientalmente seguro y con ahorro de energía. Desarrollar un disolvente para quitina menos tóxico que se pueda reutilizar y eliminar el uso de sustancias corrosivas disminuirá la generación de desechos. Obtener quitina en disolución facilitará su posterior utilización, pues al ser altamente insoluble en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos se ha dificultado su aplicación industrial. También, utilizar como materia prima para la obtención de quitina un desecho de la industria camaronera, el cefalotórax de camarón, ayudará en la reducción de residuos sólidos. La esponja de quitina podría tener un uso no tradicional como sustituto de los envases desechables de plástico para comida con la ventaja de su rápida biodegradación.

1.2 Hipótesis

La quitina extraída del cefalotórax de camarón por disolución en una mezcla de cloruro de calcio, agua y metanol puede formar una espuma, por la presencia de las proteínas del cefalotórax, que cuando pierda el disolvente precipitará en forma de una estructura esponjosa parecida a una espuma de plástico sintético pero biodegradable.

¹ Liofilizar es separar el agua de una sustancia mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado

² La Química Verde es la utilización de una serie de principios que reducen o eliminan el uso o generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de productos químicos (Anastas y Warner, 1998)

I.3 Objetivos

I.3.1 Objetivo general

Obtener una esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón utilizando una técnica de bajo impacto ambiental basada en la disolución y posterior regeneración de la quitina en forma de esponja.

I.3.2 Objetivos específicos

1. Generar una metodología para la elaboración de esponja de quitina de cefalotórax de camarón por el método de disolución y precipitación.
2. Estudiar el efecto de las variables de extracción (concentración de cefalotórax, tiempo, temperatura, composición del disolvente) en la formación de esponja de quitina.
3. Evaluar las propiedades mecánicas de la esponja de quitina: Tensión de ruptura, porcentaje de elongación de ruptura, módulo de elasticidad, límite elástico y energía de tensión de ruptura.
4. Poner en práctica los principios de la *Química verde* en el montaje de las metodologías utilizadas: Evitar la formación de desechos, utilizar materia prima renovable, reemplazar sustancias tóxicas y corrosivas, reutilizar reactivos y uso eficiente de la energía.

II FUNDAMENTOS

La quitina fue aislada por primera vez en 1811 por Braconnot de algunos hongos superiores como una fracción resistente al álcali y lo llamó fungina. En 1823 Odier aisló un residuo insoluble a soluciones de KOH del élitro de un escarabajo y le dio el nombre de quitina, del griego *chiton*, túnica o cobertura (Shahidi y col., 1999). Odier identificó quitina en el caparazón desmineralizado del cangrejo y sugirió que es el material base del exoesqueleto de todos los insectos y posiblemente de los arácnidos (Roberts, 1992).

La estructura idealizada de la quitina, poli[β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopiranos] se muestra en la Figura II-1. Es estructuralmente similar a la celulosa (Figura II-2) excepto que el grupo C(2)-hidroxilo de la celulosa es reemplazado por un grupo acetamida. Esta similitud en estructura se refleja en los roles similares de los dos polímeros en la naturaleza, ambos actúan como material estructural y de defensa (Roberts, 1992).

La quitina se sintetiza en el organismo a partir de glucosa con la ayuda de algunas enzimas entre ellas la quitinasintetasa. La hidrólisis enzimática de la quitina a acetilglucosamina se realiza por un sistema consistente de dos hidrolasas: quitinasa y quitobiasa. Las quitinasas son enzimas ampliamente distribuidas y son sintetizadas por bacterias, hongos y glándulas digestivas de los animales cuya dieta incluye quitina (Muzzarelli, 1977).

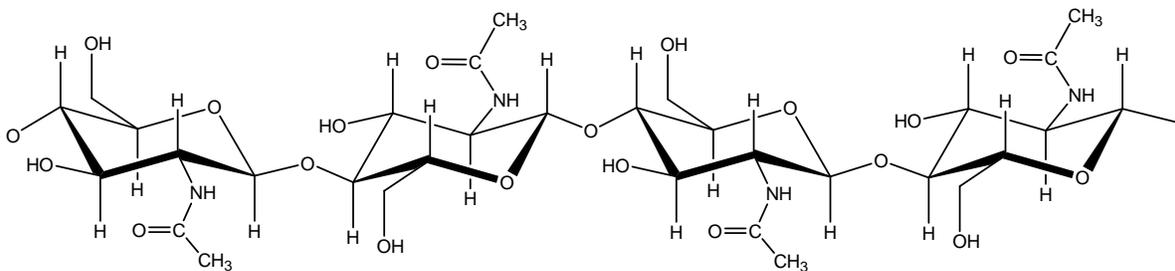


Figura II-1. Molécula de quitina: Poli(*N*-acetil-D-glucosamina) (Roberts, 1992)

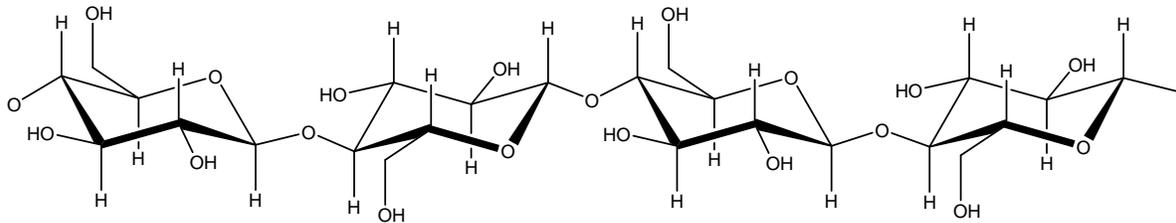


Figura II-2. Molécula de celulosa

II.1 Complejo quitina-proteína

El exoesqueleto de los artrópodos consiste de tejido fibroso de quitina mineralizada. La principal característica de este material biológico nanocompuesto es su organización a varios niveles estructurales (Figura II-3): a nivel molecular está el polisacárido quitina. Su alineamiento antiparalelo forma cristales de α -quitina. El siguiente nivel estructural es el arreglo de 18-25 de tales moléculas en forma de una estrecha y larga unidad cristalina las cuales están envueltas de proteínas formando nanofibrillas de aproximadamente 2-5 nm de diámetro y de aproximadamente 300 nm de largo. El siguiente paso en la escala consiste en el agrupamiento de algunas de esas nanofibrillas dentro de largas fibras de quitina-proteína de aproximadamente 50-300 nm de diámetro. Esas fibras de quitina-proteína forman un tejido plano y periódicamente una red ramificada. Los espacios entre las fibras se llenan con proteínas y biominales de tamaño microscópico y nanoscópico. Los minerales están principalmente en la forma de CaCO_3 cristalino, pero partículas amorfas también pueden ocurrir dependiendo de la especie y el ciclo de muda. El nivel más característico en toda la jerarquía, visible aun con un microscopio óptico, es referido como un contrachapado torcido o un patrón Bouligand. Esta estructura está formada por un apilamiento helicoidal de capas fibrosas de quitina-proteína. Los planos quitina-proteína no consisten exactamente de un conjunto de fibras perfectamente alineadas como se indica esquemáticamente por claridad, ellos tienden a formar arreglos planos en forma de panel de abejas. En la mayoría de los artrópodos la cutícula consiste de tres capas principales: epicutícula, exocutícula y endocutícula. La epicutícula (piel externa) es una capa funcional muy delgada y cerosa, que actúa como una barrera de difusión con el medio. Las capas exocutícula y endocutícula, las cuales soportan la carga mecánica, consisten de un tejido duro fibroso mineralizado de quitina-proteína (Raabe y col., 2005).

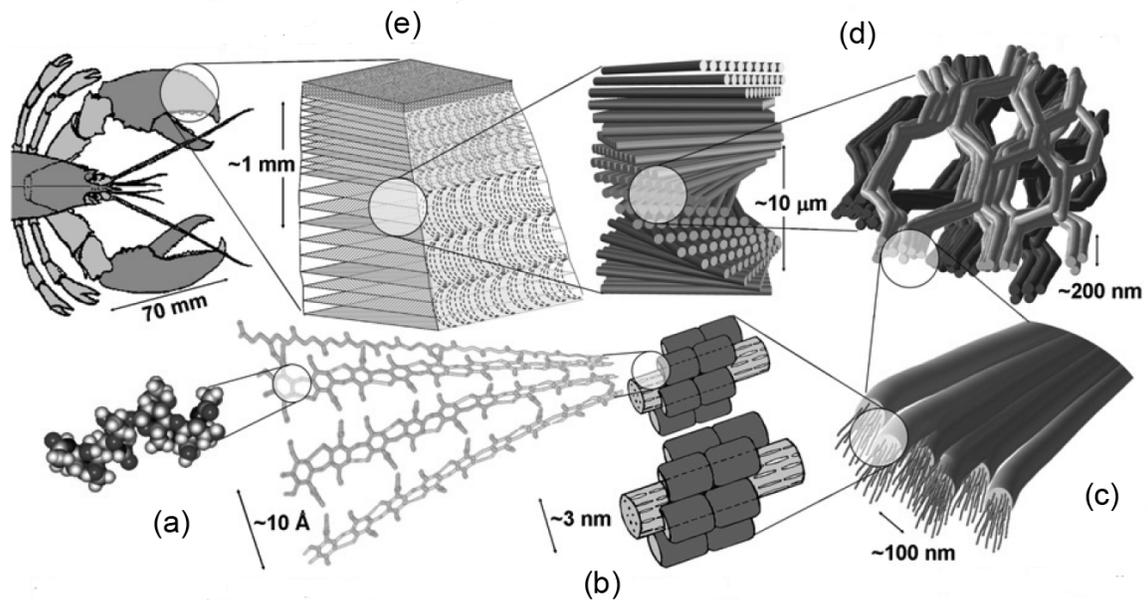


Figura II-3. Representación esquemática de la microestructura jerárquica de la cutícula de langosta americana. (a) Arreglo antiparalelo de moléculas de quitina formando α -quitina, (b) Nanofibrillas conteniendo de 18 a 25 cadenas de quitina, (c) Fibras de quitina-proteína y biominerales, (d) Contrachapado torcido o estructura Bouligand formado por un apilamiento de planos mineralizados de quitina-proteína, (e) Estructura final compuesta altamente ordenada (Raabe y col., 2007)

En el CC las proteínas se encuentran unidas covalentemente a la quitina formando complejos estables. Hay dos tipos principales de proteínas que difieren principalmente en su solubilidad: las artropodinas solubles en agua a alta temperatura y las esclerotinas insolubles (Muzarelli, 1977; Peniston y Johnson, 1980). Las proteínas débilmente asociadas se pueden remover al lavar el exoesqueleto con agua caliente (No y col., 1989) o con una solución alcalina caliente. Alrededor de 2/3 partes de las proteínas presentes en el CC son así removidas. Aproximadamente el 16% del peso del exoesqueleto de algunas especies de crustáceos son proteínas más fuertemente enlazadas que permanecen unidas a la quitina aún después de un tratamiento alcalino intensivo, por lo que es altamente improbable que muestras de quitina pura puedan ser preparadas sin algo de proteína residual remanente menor del 5% (Chang y Tsai, 1997; No y col, 1989). Las proteínas pueden esclerotizarse por entrecruzamientos de fenoles *o*-dihídricos. Se piensa que su rol biológico es como mecanismo de defensa contra la acción de las quitinasas. Las proteínas una vez esclerotizadas pueden prevenir el exceso de hidratación (Roberts, 1992).

Se han propuesto algunos posibles arreglos entre las cadenas de quitina y de proteínas que incluyen (Figura II-4): formación de un grupo amida entre un grupo amino desacetilado de

quitina y un grupo ácido carboxílico de la cadena proteica, que puede ser un *C*-terminal del grupo ácido carboxílico o un grupo lateral de un aminoácido ácido (II-4a); enlace a través de una estructura de base de Schiff (II-4b) o a través de una estructura *N*-glicosídica que involucra el grupo amida de la asparagina (II-4c) o una estructura *O*-glicosídica que involucra serina (II-4d); o a través de grupos ácidos carboxílicos de un pequeño número de unidades de ácido *N*-acetilmurámico en la cadena y el grupo amino de un residuo alanil terminal (II-4e) (Roberts, 1992).

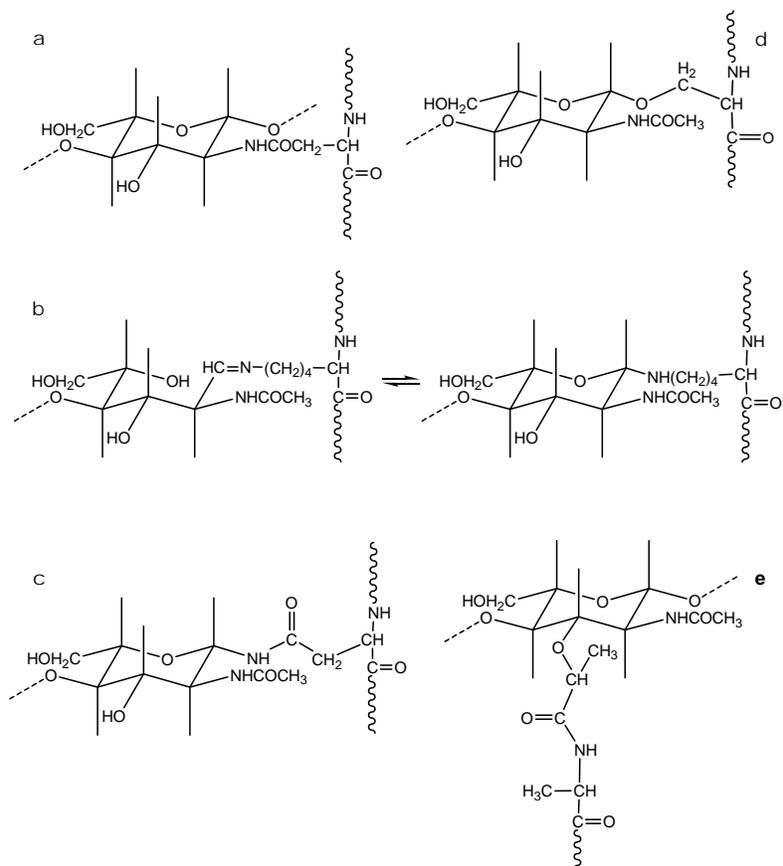


Figura II-4. Posibles enlaces involucrados en la unión quitina-proteína (Roberts, 1992)

II.2 Estructura de la quitina

La quitina tiene una estructura cristalina altamente ordenada. Se han encontrado tres formas polimórficas, α -, β - y γ -quitina, las cuales difieren en el arreglo de las cadenas dentro de las regiones cristalinas (Figura II-5). En la α -quitina las cadenas están anti-paralelas, en la β -quitina están paralelas y, en la γ -quitina dos cadenas están hacia arriba por una hacia abajo. La

forma que parece ser la más estable es la α -quitina, toda vez que la β - y γ -quitina pueden convertirse a la forma α por un tratamiento apropiado (Roberts, 1992).

Por mucho, la forma más abundante y la más extensamente investigada es la α -quitina que se encuentra en la cutícula de los artrópodos y en ciertos hongos. La β -quitina se encuentra en el calamar y existe como un hidrato cristalino de baja estabilidad ya que el agua puede penetrar entre las cadenas de las capas. La γ -quitina se encuentra en los capullos de los escarabajos. Las tres formas de quitina han sido encontradas en diferentes partes del mismo organismo lo que indica que las tres formas son relevantes a la función y no al grupo animal (Muzarelli, 1977).

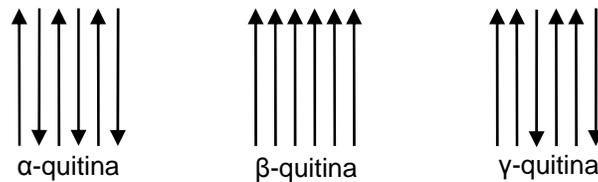


Figura II-5. Polimorfismo de la quitina

En la Figura II-6 se representa el sistema usado para identificar los átomos en las diferentes cadenas de la α -quitina (Roberts, 1992). La conformación de la α -quitina se considera una celda ortorrómbica, la estructura cristalina está dada en la Figura II-7. La celda unitaria contiene secciones de dos cadenas de disacáridos con un enlace completo de hidrógeno intramolecular $C(3')-OH \cdots O(5)$ e intermolecular $C(2_1)N-H \cdots O=C(7_3)$ y una mezcla estadística 50/50 intra/intermolecular del par de enlaces de hidrógeno $O(6_1')H \cdots O(7_1)/O(6_2)H \cdots O(6_1')$ y $O(6_2)H \cdots O(7_2')/O(6_1')H \cdots O(6_2)$. Todos los grupos hidroxilos están totalmente enlazados por puentes de hidrógeno, tiene puentes de hidrógeno intermolecular a lo largo de ambos ejes a y b para prevenir el hinchamiento en agua (Roberts, 1992). Los puentes de hidrógeno son muy importantes desde el punto de vista técnico y químico pues son los que le confieren a la quitina las peculiares características físicas y químicas macroscópicas, como la alta insolubilidad en agua. Dependiendo del número de puentes de hidrógeno la quitina presentará regiones hidrofílicas o hidrofóbicas. (Muzarelli, 1977).

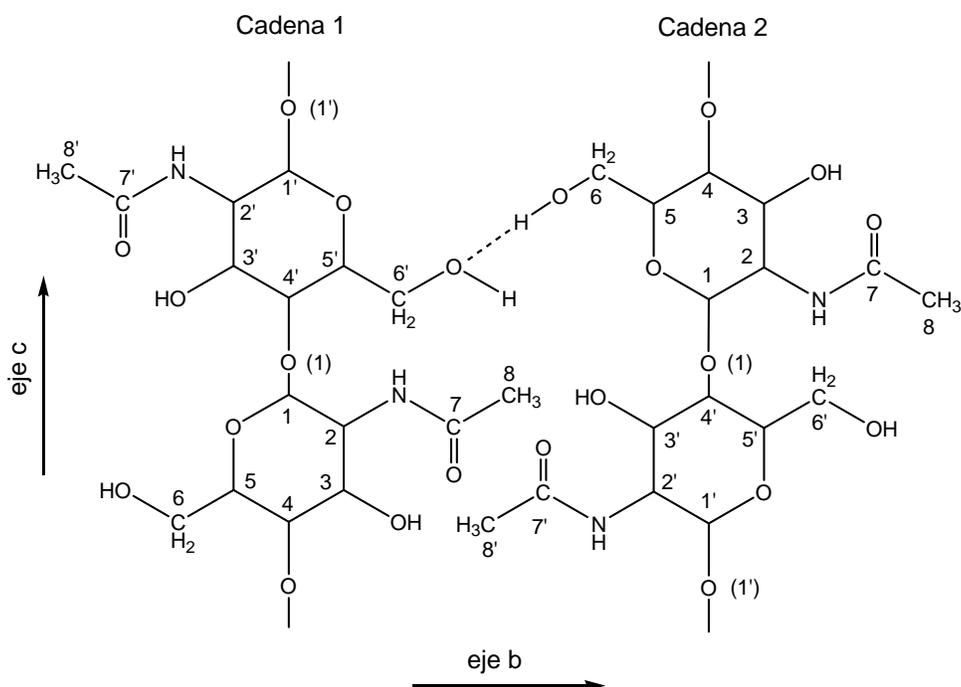


Figura II-6. Sistema utilizado para identificar a los átomos en las diferentes cadenas de la α -quitina. La cadena directamente debajo de la cadena 1, que es la cadena adyacente a lo largo del eje *a*, se designa como cadena 3 (Roberts, 1992)

II.3 Métodos de obtención de quitina

La α -quitina se obtiene comercialmente del exoesqueleto de cangrejos y camarones. El exoesqueleto tiene como componentes principales quitina, carbonato de calcio y proteínas. También contiene pigmentos y grasa en pequeñas cantidades. La quitina es muy estable a los ácidos y álcalis y no es soluble en disolventes ordinarios. Por lo tanto, se puede aislar como un producto que permanece después de la descomposición con ácido y álcali de las otras sustancias presentes en el exoesqueleto (Kurita, 2001). En la literatura se encuentran muchos métodos para la remoción de proteínas y minerales del exoesqueleto (Muzarelli, 1977), pero ninguno evita los efectos perjudiciales en el peso molecular y el grado de acetilación de la molécula de quitina.

II.3.1 Tratamiento ácido-base

El exoesqueleto primero se limpia y trata con ácido para remover el carbonato de calcio. Para la desmineralización generalmente se utiliza HCl, HNO₃, H₂SO₃, CH₃COOH o

HCOOH, pero el HCl es el preferido y se usa en concentraciones entre 0.3 y 2 M durante 1-48 h a temperaturas que varían de 0 a 100°C. El HCl durante el proceso también disminuye el peso molecular de la quitina. El exoesqueleto descalcificado se corta en pequeños pedazos o se pulveriza y se desproteíniza con tratamientos alcalinos. La solución alcalina penetra en los intersticios de la matriz del caparazón para romper el enlace entre las proteínas y la quitina. Típicamente se trata con soluciones acuosas de NaOH 1-2 M durante 1-72 h a temperaturas que varían de 65 a 100°C. La quitina se obtiene como un polvo blanquecino. El tratamiento alcalino, además, produce desacetilación en la molécula de quitina (Percot y col., 2003).

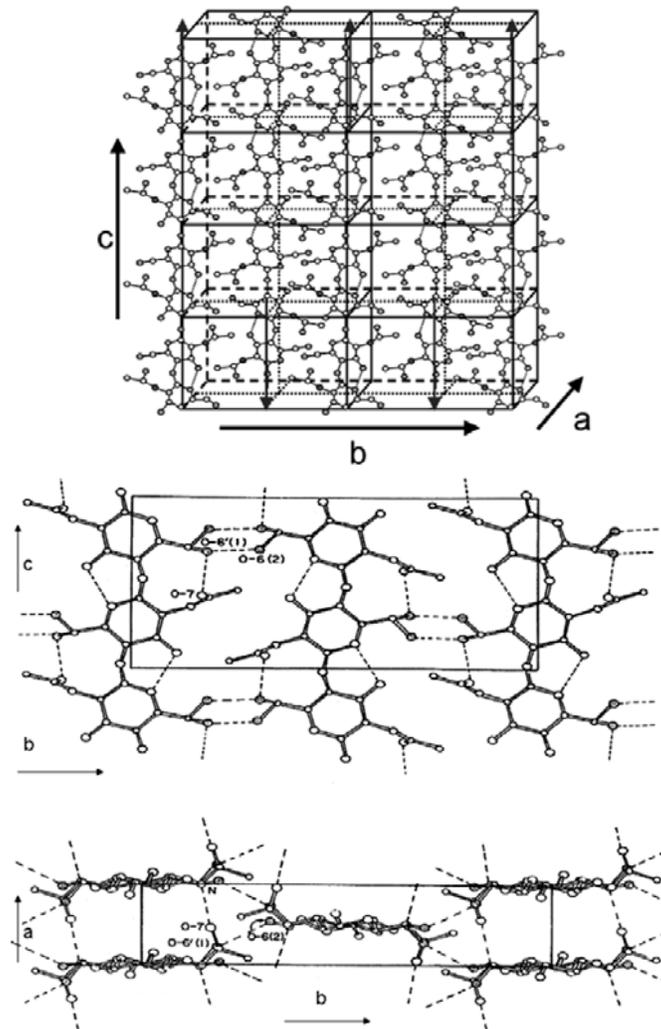


Figura II-7. Estructura cristalina de la α -quitina con puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Simetría ortorrómbica ($a=4.74\text{\AA}$, $b=18.86\text{\AA}$, $c=10.31\text{\AA}$) (Blackwell, 1988; Raabe y col., 2007)

También se pueden utilizar métodos complementarios al tratamiento ácido-base. Por ejemplo, la degradación enzimática de las proteínas con proteasas en condiciones suaves. Sin embargo, después del tratamiento permanece proteína residual entre 1 a 7% y el tiempo de reacción es más largo comparado con el método químico (Cira y col., 2002; Percot y col., 2003). En los residuos de los crustáceos hay algo de proteína libre ocluida que se puede remover por lavado. Se puede desproteinizar parcialmente el cefalotórax de camarón fresco mediante un proceso de licuado con agua (Singer y Wooten, 2003) obteniéndose finalmente quitina con una pureza del 60%. Cuando se seca primero el cefalotórax las proteínas y lípidos se enlazan a la quitina y entre ellas, por uniones químicas, volviéndose mucho más resistentes a la separación posterior. Si el exoesqueleto es tratado prontamente en estado húmedo, se puede cortar fácilmente en tamaños de partícula muy pequeño y de esa manera, la proteína, la grasa y mucho del calcio pueden separarse y removerse por simple lavado con agua. También se puede recuperar una mezcla de quitina y carbonato del exoesqueleto usando únicamente etapas mecánicas de secado, molienda y clasificación por aire (Muralidhara, 1981). La limitante es que secar el cefalotórax entero requiere mucha energía y por lo tanto es costoso e ineficiente.

II.3.2 Disolución de quitina

La quitina se puede extraer del CC utilizando un disolvente adecuado (solución saturada de cloruro de calcio en agua y metanol) (Flores y col., 2004). El CC se puede, también, desproteinizar con NaOH y desmineralizar con una solución de HCl en metanol y adicionar, posteriormente, cloruro de calcio dihidratado para disolver a la quitina (Seiichi y Yutaka, 2005). Este último método presenta los inconvenientes de utilizar ácidos y bases.

Polisacáridos como la celulosa y quitina son extremadamente difíciles de disolver y necesitan disolventes específicos. La quitina es un material intratable, soluble sólo en ácidos minerales fuertes, soluciones de tiocianato de sodio y otras soluciones de sales concentradas. La mayoría causa desintegración o rápida degradación con disminución en el peso molecular o hidrólisis del grupo acetilo o ambos (Austin, 1977).

II.3.2.1 Sistema DMAc/LiCl

Uno de los sistemas de disolvente más usados en las últimas décadas es la *N,N*-dimetilacetamida con cloruro de litio (DMAc/LiCl). Originalmente desarrollado en 1976 para

disolver quitina (Austin, 1977) se extendió rápidamente su uso para celulosa. El LiCl se coordina con el grupo carbonilo del acetilo de la quitina y forma un complejo soluble en DMAc (Rinaudo, 2006; Striegel, 1997). Aunque el mecanismo de disolución aún no ha sido claramente postulado, la mezcla DMAc/LiCl ha probado ser un disolvente apropiado para preparar soluciones, geles y fibras de quitina, usando los métodos de coagulación con un no-disolvente o evaporación de disolvente (Yilmaz y Bengisu, 2003).

La *N,N*- dimetilacetamida es tóxica (ICSC 0259, 1994). Se absorbe por inhalación y a través de la piel. Puede afectar al sistema nervioso central y al hígado y posiblemente cause efectos tóxicos para la reproducción humana.

II.3.2.2 Sistema MeOH-H₂O/CaCl₂

Un disolvente para quitina menos tóxico que el sistema DMAc/LiCl es la solución saturada de cloruro de calcio en metanol (Mitsunori y Toshihisa, 1995). Para poder disolver a la quitina el sistema MeOH-H₂O/CaCl₂, rompe los puentes de hidrógeno y forma un complejo quitina-sal de calcio soluble que modifica el arreglo de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, cambiando la estructura cristalina de la quitina (Reeves y Chen, 2003). Sistemas similares son utilizados como disolventes para seda (Ha y col., 2003) y nylon y, también, son los más estudiados.

Estos disolventes se describen como soluciones salinas con envoltura de solvatación iónica incompleta. Por ejemplo, la disolución de la proteína fibroína de la seda, con el sistema nitrato de calcio-agua-metanol, ocurre porque ésta completa la envoltura de solvatación de los iones. Si la unión al calcio de los ligandos del disolvente y los contraiones es muy fuerte, la disolución puede no ocurrir. El proceso de disolución es un fenómeno físico y requiere la relación apropiada de iones calcio y ligandos (que dependen, además, de la naturaleza del contraión del calcio). El factor más crítico para la disolución de la fibroína son las relaciones molares del nitrato de calcio, agua y metanol (1:4:2). Al menos tres moléculas de agua por un ion de calcio son necesarias para comenzar la disolución de la fibroína (Ha y col., 2003). En el disolvente nitrato de calcio en metanol, se crea un ambiente único entre el metanol, un disolvente hidrofóbico, y los iones calcio, cargados positivamente. Las moléculas de metanol son capaces de dirigir las cadenas laterales hidrofóbicas lejos del disolvente mientras que los iones calcio se unen al oxígeno del carbonilo. Para esta unión del calcio y para romper los puentes de hidrógeno y las estructuras secundarias estables, se necesita tener una alta concentración de nitrato

de calcio en solución. El sistema $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{-MeOH}$ disuelve la fibroína bajo condiciones endotérmicas. El proceso de disolución requiere energía térmica y mecánica. Una vez que se pasa esta barrera energética la fibroína es relativamente estable en solución (Mathur y col., 1997). En el nylon-6, los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de la amida se coordinan con los iones calcio de la solución de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}\text{-MeOH}$. Se piensa que los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos del enlace peptídico de la fibroína también se coordinan con los iones calcio. Sin embargo, el mecanismo de disolución en ambos casos podría no ser el mismo. Parece ser que las moléculas de agua, también, actúan como agente de hinchamiento para la fibroína de la seda o como componente de los enlaces de coordinación (Ha y col., 2003).

Dependiendo del método utilizado para determinar el número de coordinación del cloruro de calcio disuelto en agua o metanol se tienen diferentes valores (Megyes y col., 2004; Wahab y Mahiuddin, 2001). En general, en soluciones diluidas, 1 M, de cloruro de calcio, el ion Ca^{2+} está rodeado de ocho (de 5 a 10) moléculas de agua y de 6 (de 4 a 7) moléculas de metanol. El número de coordinación decrece con el incremento de concentración. La capa de solvatación del ion Cl^- está compuesta de 6 moléculas de disolvente para cada solución. No se han reportado estudios sistemáticos de la estructura del sistema ternario concentrado de calcio-haluro-metanol (Megyes y col., 2004).

En soluciones acuosas poco concentradas, 1M, hay suficientes moléculas de solvato disponible para completar la capa de solvatación de ambos iones Ca^{2+} y Cl^- , suponiendo que el ion calcio está octacoordinado y el ion cloruro está hexacoordinado y no se han formado pares iónicos de contacto¹. Esto sin embargo, no es cierto para una concentración mayor, 4M y obviamente tampoco para una más concentrada, 6M, simplemente por las condiciones de estequiometría (Megyes y col., 2004). A 5.1 mol/kg, no existe agua libre en la solución y todas las moléculas de agua están involucradas en la capa de hidratación primaria del cloruro de calcio, resultando en una estructura rígida debido a las predominantes interacciones fuertes ion-disolvente (Wahab y Mahiuddin, 2001). En una solución 1M, la segunda esfera, Ca-O^{II} , contiene 13 moléculas de agua. El número de moléculas de agua en la segunda esfera decrece con el incremento de la concentración. Probablemente con el incremento de la concentración, la

¹ Un par iónico es un par de iones con carga opuesta que se mantienen juntos por fuerzas de atracción electrostáticas sin la formación de un enlace covalente. Si los iones constituyentes están en contacto directo (y no separados por el disolvente o por otra molécula neutra) se designan como un par iónico de contacto. Un par iónico cuyos iones constituyentes están separados por una o varias moléculas de disolvente u otras moléculas neutras son descritos como un par iónico separado por disolvente

segunda esfera de hidratación del ion calcio se destruye y otra interacción ion-ion (separada por disolvente) aparece en su lugar. Por ejemplo, átomos de cloro penetran en la segunda esfera de hidratación y forman pares iónicos separados por disolvente. También se pueden encontrar pares iónicos de contacto Ca-Cl. En soluciones de baja concentración, el ion Cl^- está solvatado por seis moléculas de agua, el número de coordinación Cl-O decrece con el incremento en la concentración (Megyes y col., 2004).

La dinámica de solvatación de un electrolito en metanol es diferente a la del agua, debido a que el metanol exhibe débiles interacciones ion-disolvente por su pobre capacidad de formar puentes de hidrógeno y por su estructura característica. Tiene grupos hidrofílicos, $-\text{OH}$, e hidrofóbicos, $-\text{CH}_3$, y puede formar sólo dos puentes de hidrógeno. En cambio, el agua puede participar en la formación de un máximo de 4 puentes de hidrógeno con el anión y con otras moléculas de agua en la esfera de hidratación primaria (Wahab y Mahiuddin, 2001). En el metanol, si la concentración de la sal CaX_2 (X es cloro, yodo o bromo) se incrementa sobre 2 mol/L, la estequiometría de las soluciones no permiten la formación de envolturas de solvatación independientes para cationes y para aniones y se espera que se formen en abundancia en la solución pares iónicos separados por disolvente y hasta de contacto (Megyes y col., 2004).

Con el incremento de la concentración, el número de coordinación del calcio decrece. Esto se explica mediante un mecanismo de cuatro pasos². Los iones completamente solvatados cambian a una esfera de solvatación distorsionada, luego a pares iónicos separados por disolvente y, finalmente, pares iónicos de contacto (aunque parcialmente solvatados). Este mecanismo explica bien el decrecimiento en el número de coordinación con la falta de moléculas de disolvente a alta concentración. Y soporta la idea de que el ion calcio está listo a perder sus moléculas de solvatación, acomodando la estructura de solvatación; el ion cloruro nuevamente permanece hexacoordinado aún cuando la concentración es alta (Megyes y col., 2004).

² Las moléculas de disolvente tienden a solvatar los iones con el número máximo de coordinación disponible de acuerdo a un modelo simple de cuatro pasos (Megyes y col., 2004): **1)** En soluciones diluidas, todos los iones están completamente solvatados con al menos una capa de moléculas de solvato, se encuentra el número máximo de elementos de simetría en las capas de solvato (cuando las consideraciones de simetría son aplicables del todo). **2)** Con incrementos de concentración, los iones solvatados están aún separados, pero las capas de solvato pueden volverse incompletas, la simetría, gradualmente, se distorsiona. **3)** Si las moléculas disponibles de disolvente, además, decrecen en número (más bajo que la suma promedio del número de coordinación de los cationes y aniones) se forman pares iónicos separados por disolvente. La simetría original de las capas de solvato se distorsiona, pero, puede o no cambiar en promedio. **4)** Con un mayor incremento en la concentración del ion, la falta relativa de moléculas de disolvente obliga a la formación de pares iónicos de contacto. Las estructuras de esas capas de solvatación pueden diferir grandemente de las estructuras originales de solvato. Los procesos que gobiernan en una solución iónica es la solvatación de iones con tendencia a alcanzar la máxima simetría disponible. Cualquier desviación, por ejemplo cambios en simetría dependiente de concentración, fuerte tendencias a formar pares iónicos en el líquido, etc., pueden causar desviaciones en la forma de la estructura esperada

En soluciones acuosas de baja concentración (Figura II-8), con 8 moléculas de agua para el catión y 6 para el anión, se forma una estructura antiprisma cuadrado distorsionada para la esfera de solvatación del catión con los átomos de oxígeno hacia el catión (II-8a).

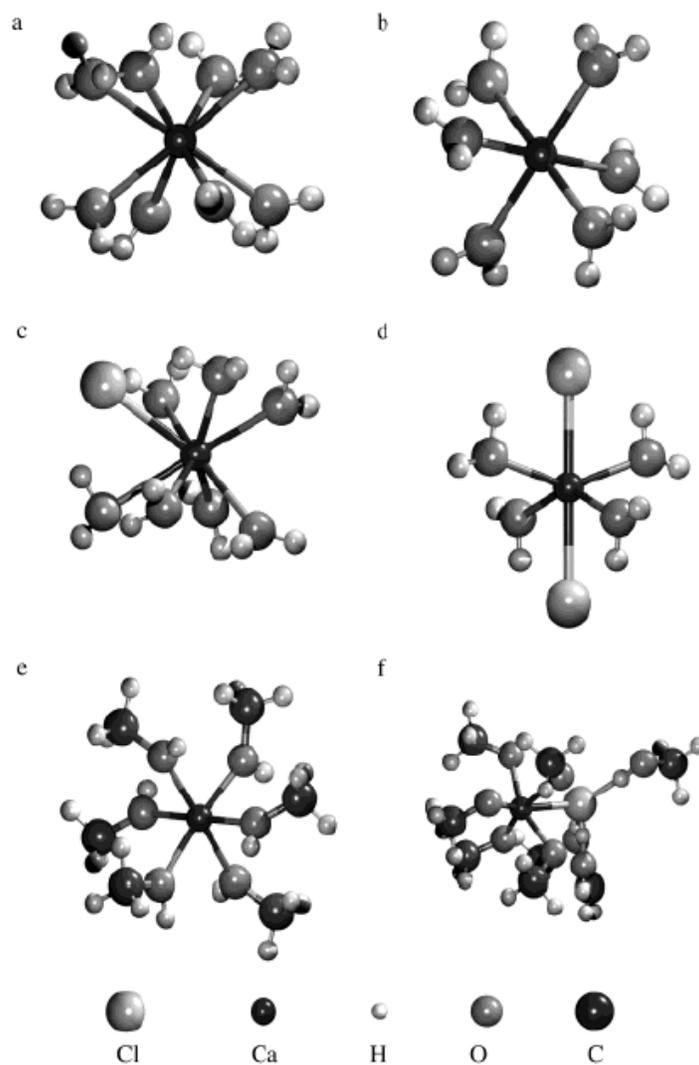


Figura II-8. Representación de posibles modelos para soluciones acuosas y metanólicas: (a) Antiprisma cuadrado distorsionado en solución acuosa; (b) Capa de solvatación octahédrica; (c) Par iónico de contacto Ca-Cl en solución acuosa; (d) Par iónico de contacto Cl-Ca-Cl en solución acuosa; (e) Capa de solvatación octahédrica en metanol; (f) Par iónico de contacto en metanol (Megyes y col., 2004)

En soluciones más concentradas la posible unidad estructural podría ser un ion calcio hexacoordinado, (II-8b) o un par iónico de contacto con uno o dos iones cloro conectados a la

molécula de disolvente (II-8c y II-8d). El número de coordinación para el ion calcio en una solución 1M en metanol es seis. La esfera de solvatación Ca–O es octaédrica. Con un incremento en la concentración, el número de coordinación del Ca–O decrece ligeramente y la esfera de coordinación octaédrica se destruye. Aún a altas concentraciones la interacción entre moléculas de metanol no desaparece completamente. Esto sólo es posible si se forman pares iónicos de contacto o separados por disolvente o ambos y la mayor parte del metanol permanece en la solución. Pares iónicos de contacto no se encuentran en soluciones 1M, probablemente porque ellos no están presentes y todos los iones están solvatados, pero esto es verdad aún si ellos están presentes, ya que su contribución a la estructura es muy baja a esta concentración. El número de moléculas de disolvente en la segunda esfera de solvatación decrece con la concentración de 11 a 9. En soluciones de baja concentración, el ion Cl^- se solvata con 6 moléculas de metanol. El ion calcio está hexacoordinado, así, su esfera de solvatación tiene, presumiblemente, simetría octaédrica (II-8e). El número de coordinación del ion cloruro también es 6 pero la geometría regular octaédrica para el ion cloruro es menos probable. En soluciones 1M se pueden encontrar pares iónicos separados por disolvente mientras que en soluciones 2M la esfera de solvatación octaédrica del ion calcio se destruye y pares iónicos de contacto Ca–Cl se forman (II-8f); La esfera de solvatación de iones calcio y cloro son forzadas a compartir moléculas de metanol (Megyes y col., 2004).

Aplicando métodos *ab initio* (Megyes y col., 2004), la energía de unión de cada molécula de solvato añadida una a una al complejo $\text{Ca}(\text{S})_n^{2+}$, siendo S agua o metanol, cuando n es suficientemente grande, cambia ligeramente y alcanza valores apreciables sólo cuando puede, en realidad, competir con las energías de los puentes de hidrógeno entre moléculas de disolvente. Este límite se puede alcanzar con $n = 8$ para agua y $n = 6$ para metanol. En la primera esfera de coordinación el número de coordinación es seis y el arreglo octaédrico es obviamente el más estable, cualquier intento de colocar más moléculas en el complejo rompe la simetría. En contraste, el contraión cloruro, muestra su usual estabilidad: el número de coordinación es seis aún a alta concentración pero sin la simetría octaédrica. El ion calcio forma un hidrato estable con ocho moléculas de agua. La inserción de una novena molécula de agua dentro de la esfera de hidratación es prácticamente imposible. La energía de unión del agua presenta una tendencia lineal decreciente conforme más moléculas de agua se añaden a la capa de hidratación. La energía requerida para remover una molécula de agua desde una esfera con 7 u 8 moléculas de

agua, es aproximadamente de 50-55 kJ mol⁻¹ y no es mucho mayor que la energía típica de un puente de hidrógeno entre dos moléculas de agua. El comportamiento de la energía de unión para remover una molécula de metanol sigue el mismo comportamiento que los agrupamientos acuosos. La energía es una función del número de moléculas solvatadas. La remoción de una molécula de metanol de una esfera de siete moléculas requiere mucho menos energía, aproximadamente 26 kJ mol⁻¹, que para un agrupamiento de seis.

II.4 Bioesponjas

Materiales porosos biodegradables tienen una gran demanda en varias aplicaciones como sistemas de liberación controlada de drogas, soporte para inmovilización de enzimas, separación de moléculas y absorción de metales de transición. Estos materiales, también, han sido utilizados ampliamente en ingeniería de tejidos biológicos para la reparación y obtención de tejidos (Chow y Khor, 2000).

El procedimiento más empleado actualmente para la elaboración de bioesponjas es a partir de liofilización de geles.^{3,4} La quitosana⁵ en una solución diluida de ácido acético forma un gel que liofilizado origina una esponja de quitosana que ha tenido aplicación principalmente en el campo biomédico (Seol y col., 2004). La quitina, en cambio, puede disolverse en una mezcla de *N,N*- dimetilacetamida y LiCl y formar un gel al coagular con agua. La esponja de quitina se obtiene luego de liofilizar el gel (Chow y col., 2001). El principal inconveniente, como ya se mencionó, de utilizar *N,N*- dimetilacetamida como disolvente es su toxicidad. Un disolvente para quitina menos tóxico es la solución saturada de cloruro de calcio en metanol (Mitsunori y Toshihisa, 1995). El gel de quitina se forma al coagular con agua la quitina disuelta en la solución metanol-cloruro de calcio. Liofilizando el gel se consigue la esponja de quitina. Se ha obtenido esponja de quitina, sin necesidad de liofilizar, sumergiendo en HCl diluido un gel de quitina mezclado con carbonato de calcio. La liberación de CO₂ al descomponerse el carbonato origina la esponja (Chow y Khor, 2000). El inconveniente es que el HCl además

³ Morrison (1995) obtuvo por primera vez esponjas a partir de geles de biopolímeros al eliminar el agua del gel por liofilización y pudo controlar el tamaño de poro variando el disolvente utilizado (Morrison, 1994). Los espacios dejados por los cristales de hielo dentro del gel congelado forman la estructura porosa de la esponja

⁴ La gelificación es la asociación o enlace de largas cadenas poliméricas mediante puentes cruzados que originan un entramado tridimensional que atrapa e inmoviliza el líquido en su interior formando una estructura rígida resistente al flujo bajo presión (Glicksman, 1982)

⁵ Quitina con un grado de acetilación menor a 0.35, soluble en agua a pH ácido (Ravi Kumar, 2000)

degrada parcialmente a las moléculas de quitina (Percot y col., 2003). También se obtiene quitina porosa al dispersar un polímero soluble en agua en una solución de quitina en *N,N*-dimetilacetamida y luego coagular y extraer el polímero soluble con agua (Kifune y col., 1986). El método requiere del uso de *N,N*-dimetilacetamida y de un paso final de liofilización. El producto puede ser usado como material absorbente. Se ha ensayado utilizar sales solubles en lugar de polímeros solubles para la elaboración de esponja de celulosa⁶ (Stieg, 1966) o, también, disolver la celulosa en una solución de cloruro de zinc y agua y formar una espuma con ayuda de surfactantes. El producto seco forma una esponja que se puede utilizar en artículos para el cuidado personal (Reeves y Chen, 2003). Otro método para obtener esponja de quitina es liofilizando quitosana, que es soluble en ácido acético diluido, y luego acetilando con anhídrido acético para regenerar la quitina (Ryogo y Masa, 1995). Éste es un método indirecto laborioso que requiere primero desacetilar la quitina para formar quitosana y luego volver a acetilar para regenerar la quitina (Figura II-9).

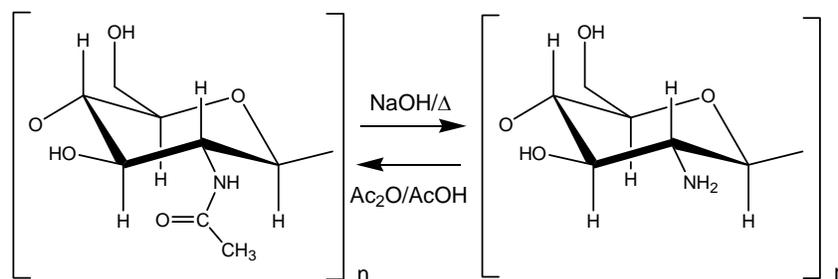


Figura II-9. Desacetilación de quitina con solución concentrada de hidróxido de sodio y calor para obtener quitosana y posterior acetilación con anhídrido acético para regenerar la quitina

II.5 Posibles usos de la esponja de quitina

Como ya se mencionó, materiales porosos biodegradables son utilizados ampliamente para la reparación y fabricación de tejidos biológicos. El material de soporte debe ser suficientemente poroso y poseer una adecuada estabilidad mecánica. También debe ser biocompatible y biodegradable o bio-absorbible. Sirven como soportes temporales para las células transplantadas antes de ser sustituido por la matriz extracelular. El desarrollo de un buen polímero biodegradable que actúe como soporte temporal es un factor importante que puede determinar el éxito de una terapia de trasplante celular.

⁶ Un polisacárido estructuralmente parecido a la quitina (Kurita, 2001)

Se ha investigado el uso de quitosana en el trasplante de osteoblastos para la regeneración ósea (Seol y col., 2004). Sin embargo, el uso de quitosana como soporte poroso presenta complicaciones. La alta densidad de grupos amino le confiere características hemostáticas⁷ que generan problemas de coagulación sanguínea. La quitosana no puede ser aplicada en ingeniería de tejidos biológicos donde el contacto con la sangre es esencial. La quitina, en cambio, no presenta este inconveniente pues la presencia de grupos amida reducen el carácter policationico y disminuyen la propiedad hemostática (Chow y Khor, 2000; Chow y col., 2001).

Matrices porosas de quitina no son citotóxicas y tienen potencial para servir de soporte para el crecimiento y proliferación celular *in vitro*. Para emplear a la quitina como material biomédico es necesario un alto grado de pureza (Khor, 2002), por eso, en esta investigación se orientó el uso de la espuma de quitina como posible sustituto del material con que se elaboran los artículos de plástico desechables para comida, pues no se requiere quitina de elevada pureza. Además, según nuestro conocimiento, no existen investigaciones dirigidas hacia ese campo.

La ciencia y la tecnología en el último siglo han logrado asombrosos progresos y han hecho la vida diaria más confortable. Una variedad de polímeros sintéticos han sido desarrollados y utilizados como fibra sintética, plástico y caucho sintético en lugar de los tradicionales como fibra natural, maderas y caucho natural. Los polímeros sintéticos son utilizados en muchos campos incluyendo transportación, construcción, empaquetado, equipos eléctricos, aplicaciones médicas, etc. Actualmente, aproximadamente 150 millones de toneladas de plástico son producidas anualmente en todo el mundo y la producción y consumo continúa en aumento. La mayoría de esos plásticos se originan del petróleo y el incremento en la producción de plásticos, como consecuencia, resulta en el incremento del consumo de petróleo. Más importante y peligroso, la alta durabilidad de los materiales poliméricos sintéticos comparados con los usados tradicionalmente, causa seria contaminación ambiental debido a los desechos de polímeros sin degradar (Okada, 2002).

Una de las estrategias para resolver los problemas de las fuentes fósiles y el ambiente global es a través del reciclaje de desechos de materiales poliméricos. Pero no es suficiente pues no siempre es posible recuperar todos los plásticos utilizados. Además, el proceso de reciclaje consume una considerable cantidad de energía térmica y no se puede reciclar plásticos por siempre, esto es, los plásticos reciclados eventualmente son incinerados o enterrados en los sitios de disposición controlada. En tales casos es indispensable el uso de polímeros biodegra-

⁷ La hemostasia es la detención de una hemorragia por medios físicos o químicos

dables que sean reciclados por microorganismos sin consumo de energía térmica y el empleo de materias primas de fuentes renovables (Okada, 2002).

Polímeros biodegradables son los polímeros que pueden ser degradados y catabolizados a dióxido de carbono y agua por microorganismos (bacterias, hongos, etc) en un ambiente natural.⁸ Cuando se degradan no deben generar ninguna sustancia que sea peligrosa al ambiente natural. Los polímeros biodegradables se clasifican en tres grandes categorías: (1) poliésteres producidos por microorganismos, (2) polisacáridos naturales (como la quitina) y otros biopolímeros y, (3) polímeros sintéticos, particularmente poliésteres alifáticos (Okada, 2002). Se han diseñado y sintetizado muchos polímeros biodegradables potenciales pero aún no se ha logrado el polímero biodegradable ideal: que presente un alto rendimiento mientras es utilizado y que se biodegrade fácilmente cuando termina su vida útil.

Los envases desechables (de un solo uso) para alimentos elaborados de espuma de poliestireno (PS) en forma de platos, bandejas y vasos tienen una vida útil muy corta y cuando se eliminan sin reciclar son un problema en los vertederos donde ocupan espacio y permanecen sin degradarse⁹. Es importante desarrollar un material en forma de esponja fácilmente biodegradable como una alternativa a la espuma de PS (Petersen y col., 1999). La quitina tiene el potencial para formar una esponja estable altamente insoluble en agua y biodegradable (Flores, 2004), apropiada para este tipo de envases desechables de comida rápida. Las características que deben cumplir los plásticos fotodegradables y biodegradables para la industria del embalaje son (Amass y col., 1998): 1) Materiales no-tóxicos con productos de degradación no-tóxicos que no deben afectar el agua de drenaje de los sitios de relleno sanitario; 2) Polímeros con apropiadas propiedades mecánicas para usos específicos; 3) Viabilidad económica; 4) Control de la degradación de los plásticos por modificación del polímero y; 5) Procesabilidad.

⁸ Hay que considerar reacciones abióticas (fotodegradación, oxidación e hidrólisis) que pueden también alterar al polímero antes, durante o en lugar de la biodegradación (Amass y col., 1998)

⁹ El 25% aproximadamente del PS producido anualmente se utiliza para el empaquetamiento de comida y constituye el 1% del volumen de los residuos sólidos urbanos. Los críticos señalan que gran parte del empaquetamiento para comida no es necesario e inclusive se ha sugerido la eliminación de los productos de espuma de PS. Las tres estrategias posibles para el manejo de desechos de plásticos son: la incineración, el reciclaje y los rellenos sanitarios. Los diferentes tipos de envases o contenedores de servicio de comidas de PS pueden recuperarse separadamente o juntos. Un proceso típico incluye selección semiautomática, granulación, lavado, secado y *peletización*. La tabla maciza de espuma se procesa de forma distinta; se rompe la espuma sin calor, para formar una mezcla, después se riega con agua y se corta en *pellets*. El PS reciclado se utiliza para fabricar tabla de espuma aislante para cimentación, accesorios de oficina, bandejas para servir comida, recipientes de basura, aislamiento, juguetes y productos de moldeo por inyección (Tchobanoglous y col., 1994)

III METODOLOGÍA

III.1 Extracción de quitina

El cefalotórax de camarón (CC), una matriz formada de proteína químicamente combinada con quitina y mezclada con carbonato de calcio, fue la materia prima para la obtención de quitina. Siguiendo los preceptos de la llamada *Química verde*, la quitina se extrajo del CC de manera menos contaminante que el método tradicional, al evitar el uso de sustancias corrosivas que además son agresivas para la molécula. Se separó la mayor parte de proteínas del CC con agua en sustitución de la solución básica y, en lugar de usar una solución ácida para disolver los carbonatos, se disolvió la quitina en un disolvente a base de cloruro de calcio para su extracción. El disolvente luego de ser utilizado se recuperó y reutilizó. Una ventaja adicional del método fue la obtención de la quitina en disolución lo que facilitó su posterior utilización.

Mucha de la metodología, que se presenta, fue desarrollada específicamente para esta investigación y se describió con mayor detalle para que pueda ser utilizada en futuras consultas.

III.1.1 Materia prima

El cefalotórax de camarón fresco se obtuvo en la Central de pescados y mariscos La Nueva Viga, en México, D.F.¹² Las cabezas de camarón fueron proporcionadas gratuitamente por los comerciantes pues ellos acostumbran arrojarlas a la basura. El CC fresco se colocó en una criba de plástico, se limpió de objetos extraños y se lavó bajo un chorro de agua corriente hasta que ésta se observó limpia. Se dejó escurrir durante 20 minutos. El CC se debe utilizar preferentemente fresco y, en caso contrario, se debe mantener en refrigeración para evitar la descomposición de las proteínas presentes.

¹² La producción nacional de camarón, por captura y acuicultura, fue de 125,576 Ton para el año 2004 (CONAPESCA, 2004). Se estima que sólo 20 a 30% del peso del crustáceo vivo es apropiado para la alimentación humana, el resto –con la quitina incluida– es considerado desecho (Peniston y Johnson, 1980)

III.1.2 Cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD)

La mayor cantidad de proteínas, grasas y pigmentos y parte de los minerales se eliminan cuando se licua el CC¹³ con agua (Singer y Wooten, 2003) y se obtiene CPD.

En una licuadora doméstica, marca Osterizer modelo 10-C de una velocidad, se adicionó el CC lavado (ver III.1.1) y agua en una relación 1:2 en peso (una parte de CC y dos partes de agua)¹⁴ y se licuó durante treinta segundos. Se pasó la pasta obtenida por un tamiz con malla de 1 mm de abertura para separar la parte líquida.¹⁵ Se recogió el CPD retenido en el tamiz y se repitió el proceso de licuado y tamizado una vez más. Se enjuagó el CPD con una parte de agua, se eliminó el exceso de agua y se secó en una estufa eléctrica marca Felisa a 60°C durante 18 horas.¹⁶ El CPD se tamizó para obtener un tamaño de partícula de $149\mu\text{m} < P < 2\text{mm}$ y se conservó en refrigeración dentro de un envase hermético.

La desproteínización se ensayó, también, con un surfactante, el dodecilsulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés), para determinar si la presencia de surfactante mejora la eliminación de proteínas (Akira y col., 1993). Se repitió el procedimiento anterior pero esta vez el primer licuado se realizó con una solución acuosa al 0.1% de SDS. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

III.1.3 Caracterización

Se caracterizó el cefalotórax de camarón y el cefalotórax parcialmente desproteínizado utilizando la metodología descrita por la AOAC (Horwitz, 1980) para cenizas, humedad y grasa. Calcio, magnesio y hierro se determinó en la ceniza por absorción atómica en un equipo Varian SpectrAA 220. La cuantificación de nitrógeno total y quitínico se realizó en un equipo Kjeltex Auto 1030 Analyzer marca Tecator siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de quitina se determinó según el método de Black y Schwartz (1950). A 0.2-0.4 g de quitina cruda o 2 g de desechos de camarón se añadieron 50 mL de HCl 1 N y se calentó a 100°C por una hora. Se filtró, a través de vidrio sinterizado, y se lavó con agua caliente hasta

¹³ El cefalotórax de camarón está constituido principalmente de proteínas, carbonato de calcio y quitina y, en menor cantidad, grasa y pigmentos

¹⁴ Esta proporción, determinada en ensayos preliminares, permite efectuar la extracción con la mínima cantidad de agua

¹⁵ La solución que pasa por el tamiz es una fuente rica en pigmentos y proteínas que se puede aprovechar en otros usos (Peniston y Johnson, 1980; Shahidi y Synowiecki, 1991)

¹⁶ Se seca a baja temperatura para evitar la degradación de la molécula de quitina por el calor (Muzzarelli, 1977). También se prescinde de la molienda en seco del CPD para evitar el calor generado por la fricción durante el proceso

neutralidad. El residuo se regresó al recipiente original y se digirió con 100 mL de NaOH al 5% en un baño de vapor durante una hora. El residuo se filtró en un crisol filtro y se lavó con agua caliente y finalmente con acetona. Se secó a 110°C, se pesó y se calcinó. La diferencia de peso fue el peso de quitina. Los ensayos se realizaron por triplicado.

III.1.4 Disolución de quitina

La quitina presente en el cefalotórax de camarón se disolvió en una mezcla de metanol, agua, cloruro de calcio lo que permitió su extracción (Barrera, 2008; Flores, 2004).

III.1.4.1 Determinación de la viscosidad de soluciones de quitina

Para conseguir una adecuada separación de la quitina disuelta (QUIMAC) del CPD sólido con un filtro prensa manual se determinó la viscosidad de la solución de quitina en función del tiempo de extracción con diferentes relaciones CPD/MAC.

El disolvente MAC (mezcla de **M**etanol-**A**gua-cloruro de **C**alcio) se preparó en un balón de destilación de 250 mL donde se pesaron 100 g de cloruro de calcio anhidro,¹⁷ 65 mL de agua destilada y 35 mL de metanol, fue una reacción exotérmica. Se sometió a reflujo, con calor moderado, hasta que se disolvió completamente el cloruro, se enfrió y se guardó en un recipiente hermético. Con el CPD preparado en III.1.2 se hicieron diferentes mezclas con MAC en viales de 40 mL con tapa hermética (Tabla III-1).

Tabla III-1. Mezcla CPD-MAC para la determinación de la viscosidad de la solución de quitina

Relación p/v	CPD, g	MAC, mL
0.5:10	0.75	15
1.0:10	1.50	15
1.5:10	2.25	15
2.0:10	3.00	15

Se determinó la viscosidad de la mezcla a 25°C, en un viscosímetro Brookfield programable modelo RVDVII+ acoplado un adaptador para muestras pequeñas conectado a un baño termostático Bradender T150, dos veces al día durante cuatro días. Se registró la viscosidad y las r.p.m. del equipo. Las muestras se guardaron a 25°C en una incubadora marca Orbital de Sistemas y Equipos. Al final de los cuatro días de extracción se separó el CPD que no se disolvió de la solución QUIMAC con un filtro prensa manual y se procedió a elaborar una esponja

¹⁷ A menos que se indique lo contrario, el cloruro de calcio es grado comercial utilizado como agente deshumidificador (Cero humedad, Industrias Ralc, México) recristalizado en agua destilada y secado a 160°C durante cinco horas

de quitina como en III.2.1. Se comparó la calidad de las esponjas con las cuatro diferentes relaciones y se determinó la relación p/v-tiempo que proporcionó la mejor extracción.

Adicionalmente, se determinó la estabilidad de las moléculas de quitina en solución en el disolvente MAC en función del tiempo. Para esto se tomó, periódicamente, la viscosidad de la solución QUIMAC, a 25°C, durante 40 días. La solución QUIMAC se guardó en una incubadora a 25°C.

Se construyó una curva de fluidez de la solución de quitina. Se midió la viscosidad de la solución QUIMAC en función de la disminución y posterior aumento de la velocidad de corte (r.p.m. de la aguja del viscosímetro Brookfield).

III.1.4.2 Extracción sólido-líquido de quitina con el disolvente MAC

La disolución de la quitina, en el disolvente MAC, se estudió en un diagrama ternario de solubilidad formado por metanol-agua-cloruro de calcio.

Para localizar la línea de saturación del sistema metanol-agua-cloruro de calcio en el diagrama de solubilidad ternario se siguieron las metodologías descritas por Gennaro (1990) y Connors (1975). Se prepararon soluciones de metanol (grado HPLC, J. T. Baker, México) y agua destilada en sendos viales de 40 mL con tapa hermética (Tabla III-2).

Tabla III-2 Soluciones metanol-agua para la construcción del diagrama de solubilidad

Vial	MeOH, g	H ₂ O, g
1	30	0
2	21	9
3	15	15
4	12	18
5	0	30

En viales de 20 mL, con tapa hermética, se pesaron 10 g de las soluciones preparadas y se adicionó CaCl₂ anhidro (PA, malla 20, Fermont, México), en pequeñas porciones, hasta que se obtuvo una solución saturada, con cristales de CaCl₂ que ya no se disolvieron (alcanzar el equilibrio tomó varios días). Se mantuvieron las soluciones a 25°C dentro de una incubadora. Las disoluciones se prepararon por triplicado. En una caja petri de vidrio de 5 cm de diámetro se pesaron 5-6 g de la disolución saturada de CaCl₂ en una termobalanza marca Ohaus modelo MB200 y se evaporó el disolvente. El programa de evaporación de la termobalanza tuvo tres etapas: 60°C/10 min; 120°C/15 min y 200°C/180 min, para garantizar la total evaporación del disolvente. Se registró el peso de CaCl₂ anhidro obtenido y se calculó la cantidad de cloruro

disuelto en cada disolución. Los gramos de MeOH, H₂O y CaCl₂ se transformaron a número de moles y se construyó el diagrama ternario de solubilidad.

En el diagrama ternario de solubilidad se localizaron ocho puntos con diferentes relaciones molares, cuatro sobre la línea de saturación y cuatro en la zona de disolución completa. Los puntos en la zona monofásica tuvieron el doble de moléculas de disolvente por mol de cloruro de calcio que la serie en la línea de saturación con el fin de poder observar el efecto que tiene, en la disolución de la quitina, la envoltura de solvatación del calcio cuando está completa o incompleta.

En matraces de 100 mL, con tapa hermética, se pesaron las cantidades de MeOH, H₂O y CaCl₂ necesarios para preparar los ocho diferentes disolventes MAC. Los matraces se mantuvieron a 25°C en una incubadora por varios días hasta que se disolvió el cloruro y se alcanzó el equilibrio.

En un vial de 40 mL, con tapa hermética, se pesaron 40 g del MAC preparado con anterioridad y 4 g de CPD, por triplicado. Se homogeneizó y se dejó en reposo a 25°C en una incubadora durante 48 horas para que se forme el complejo soluble quitina-calcio. En el vial, luego del periodo de extracción, se obtuvo principalmente una mezcla de disolvente, proteínas, quitina disuelta y CPD que no se disolvió. Trascurridas las 48 horas se separó la quitina disuelta QUIMAC del CPD sólido, que no alcanzó a disolverse, con un filtro prensa manual¹⁸ utilizando una membrana polimérica formada de fibras (50% rayón y 50% poliéster) distribuidas al azar y tamaño de poro irregular (Magitel, Colgate-Palmolive). Se pesó el filtrado QUIMAC formado por el disolvente, la quitina disuelta y algo de proteínas. Se determinó la densidad en un picnómetro para semisólidos, la viscosidad en un viscosímetro Brookfield programable modelo RVDVII+ acoplado un adaptador para muestras pequeñas. La temperatura se mantuvo a 25°C con un baño termostático Brabender T150. Se repitieron las cuatro extracciones sobre la línea de saturación a 10 y 40°C. Las soluciones QUIMAC obtenidas se emplearon para la formación de esponja de quitina (ver III.2).

¹⁸ La filtración por succión fue ineficiente debido a la alta viscosidad de la solución

III.1.4.3 Superficie de respuesta para la extracción sólido-líquido de quitina del cefalotórax parcialmente desproteinizado

Para apreciar el efecto del agua y el metanol en la disolución de la quitina se utilizó un análisis de superficie de respuesta¹⁹ de un diseño factorial compuesto de segundo orden (Box y col., 1999). Las variables fueron el volumen de agua y de metanol empleados durante la extracción. (Tabla III-3). El punto central del diseño fue la relación metanol-agua que en III.2.1 extrajo mayor quitina del CPD. Se mantuvo constante el contenido de cloruro de calcio La respuesta fue el porcentaje de quitina extraída. El disolvente MAC y la extracción de quitina se realizaron como en III.1.4.2. Se pesaron 0.5 g de CPD y se vertieron 10 mL del MAC que se va a ensayar, la extracción se realizó durante tres días. La cuantificación de quitina se determinó por gravimetría precipitando la quitina en disolución. A la solución QUIMAC se adicionaron 50 mL de agua destilada fría para que precipite la quitina. El precipitado se filtró por succión con una membrana *Millipore*,²⁰ se lavó con 50 mL de agua destilada, se secó (60°C/2 h) y se pesó la película formada.

Tabla III-3. Diseño factorial compuesto de segundo orden para la extracción de quitina con disolvente MAC

ENSAYO	Variables en unidades codificadas	
	MeOH X_1	H ₂ O X_2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	1.414
7	1.414	0
8	0	-1.414
9	-1.414	0

Se calculó el porcentaje de película de quitina extraída del CPD. Con los datos obtenidos se procedió al análisis de superficie de respuesta (Box y col., 1999).

¹⁹ El análisis de superficie de respuesta permite estudiar la relación entre un grupo de variables y una o más respuestas simultáneamente, a diferencia de la técnica clásica, donde sólo se varía un parámetro manteniendo todos los demás constantes

²⁰ La membrana *Millipore* de 0.45 μm (Bedford, MA, EE.UU.) deja que se desprenda fácilmente la película de quitina una vez formada

III.2 Formación de esponja de quitina (SPQ)

III.2.1 Disolución y precipitación

Éste es un método alternativo para obtener esponja de quitina, más sencillo que la liofilización (ver III.2.2).

La solución QUIMAC obtenida en III.1.4.2 se agitó manualmente durante tres minutos, con una varilla de vidrio, hasta que se produjo espuma.²¹ Se midió la densidad y la viscosidad de la espuma formada. Se fotografió la espuma de quitina con un microscopio óptico Olympus modelo BH2-RFCA y se determinó el tamaño promedio de las burbujas con el software *Image Tool 3.00* (The University of Texas Health Science Center). La espuma QUIMAC se colocó dentro de una caja petri pequeña y se guardó en una cámara de humidificación²² con una humedad relativa mayor al 90% para que el cloruro de calcio, que es higroscópico, absorba agua del ambiente y la quitina precipite en forma de esponja. Al día siguiente, con una micropipeta, se extrajo todo el licor formado²³ dejando en la caja petri la esponja de quitina. Se lavó la esponja con agua destilada para eliminar el residuo de disolvente y se secó al ambiente. Se guardó la SPQ en un desecador para posteriores análisis.

Para cuantificar la proteína soluble, presente en la solución QUIMAC, a 10 g de QUIMAC se adicionaron 20 g de agua para que precipite la quitina y se filtró con una membrana Millipore. En el filtrado se determinó el nitrógeno por Kjeldahl.

III.2.2 Esponja de quitina por liofilización

La esponja de quitina producida por liofilización se utilizó como testigo para compararla con la esponja de quitina obtenida por agitación. Se procedió como en III.1.4.2 para obtener la solución QUIMAC. Se vertió en un molde, pero sin agitación, y se colocó dentro de la cámara de humidificación para producir el gel de quitina. El gel se enfrió a -70°C en un frigorífico durante toda la noche. Se liofilizó a -50°C y 0.02 mbar por 18 h en una liofilizadora Labconco.

²¹ La formación de espuma se vio favorecida por la presencia de proteínas, presentes en la solución, que también fueron extraídas del CPD por el MAC

²² La cámara de humidificación fue un desecador de vidrio cubierto el fondo con agua destilada acoplado un termómetro en la tapa y mantenido a temperatura ambiente

²³ El licor se guardó para recuperar el cloruro de calcio que se reutilizó en la formulación de nuevo MAC

III.3 Caracterización de la esponja de quitina

Se caracterizaron, tanto la esponja de quitina obtenida por disolución y precipitación a diferentes temperaturas, como la obtenida por liofilización. La desmineralización (15 min a 20°C con HCl 0.25 M con una relación 1:40) y desproteización (2 h a 70°C con NaOH 1 M con una relación 1:10) de la SPQ se realizó según No y col. (1989) y Percot y col. (2003). Las reacciones se realizaron en tubos de ensayo con tapa hermética dentro de una incubadora.

Se estudió la morfología interna y el tamaño de poro de la esponja mediante Microscopía Electrónica de Barrido (Chow y Khor, 2000). Las muestras se recubrieron de oro y se utilizó un equipo marca Jeol modelo JSM-5900LV. Se determinó el tamaño promedio de los poros con el software *Image Tool 3.00* (The University of Texas Health Science Center).

El índice de cristalización de la esponja se determinó por Difracción de Rayos X (Yusof y col., 2004) en un equipo Siemens D-5000, con una radiación Cu-K α (35 kV-30 mA) a 0.020°/0.6 segundos y una λ de 1.5406 Å. Las muestras se pulverizaron y luego tamizaron por malla 100 (149 μ m).

Para determinar el grado de acetilación de las moléculas de quitina se utilizó la Resonancia Magnética Nuclear de Carbono en estado sólido (¹³C CP-MAS NMR) (Heux y col., 2000; Van de Velde y Kiekens, 2004). La desmineralización y desproteización de la SPQ se realizó según No y col. (1989) y Percot y col. (2003). La quitina se pulverizó en un mortero de ágata y se tamizó por malla 100 (149 μ m). Los experimentos se realizaron en un equipo Varian modelo Unity 300.

El diámetro hidrodinámico de la quitina en solución de disolvente MAC se estableció por dispersión dinámica de luz (Einbu y col., 2004). Las muestras de SPQ se desmineralizaron y desproteizaron según No y col. (1989) y Percot y col. (2003). Luego se molieron en un mortero de ágata y se tamizaron para tener un tamaño de partícula <149 μ m. Se prepararon soluciones de 1 mg/mL, y se midió, a 25°C, el índice de refracción, en un refractómetro Carl Zeiss y la viscosidad, en un viscosímetro Ubbelohde. El equipo de dispersión de luz fue un Malvern modelo Zetasizer Nano-S. Se emplearon 200 μ L de muestra a 25°C.

Se analizó por FT-IR quitina pura (Sigma), malla 100, y quitina disuelta en disolvente MAC. 0.1 g de quitina pura se disolvieron en 10 g de disolvente MAC, se dejó toda la noche en la cámara de humidificación. Al día siguiente se recuperó la quitina precipitada (sin lavar) y se secó en un desecador al vacío. Se molió y se secó a 100°C durante dos horas. Se guardó en un recipiente hermético (fue muy higroscópico) y se analizó por FT-IR. Se utilizó un equipo Nico-

let modelo Impact 410, en un rango de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Los espectros se recolectaron por acumulación de 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras se prepararon en forma de pastillas con KBr.

Se calculó la absorción de agua en la SPQ según el método ASTM D 570-98 (ASTM, 2003a). Las dimensiones de las muestras se midieron con un Vernier de 150x0.02 mm.

III.4 Pruebas mecánicas

Se estudiaron las propiedades mecánicas de la esponja de quitina entera, desmineralizada y desproteïnizada y de esponja de quitina liofilizada de acuerdo al método ASTM D 882-02 (ASTM, 2003b), se compararon con una esponja de PS de un envase desechable. Se utilizó un equipo Instron 5500R modelo 1125, una velocidad de 2 mm/min y distancia inicial de 25 mm. La humedad fue de 50% y la temperatura de 23°C. Se determinaron la tensión de ruptura, el porcentaje de elongación de ruptura, el módulo de elasticidad, el límite elástico y la energía de tensión de ruptura. La elaboración de esponja de quitina se procedió como en III.2; en lugar de la caja petri se utilizó un molde de espuma de PS de 130x20x5 mm y se vertieron 10 g de espuma QUIMAC. Para las muestras que fueron liofilizadas se utilizó una solución QUIMAC sin agitar. Una vez obtenidas las tiras de esponja de quitina, se desmineralizaron y desproteïnizaron como en III.3 y con ellas se elaboraron las probetas para las pruebas mecánicas, las dimensiones de las probetas se midieron con un Vernier de 150x0.02 mm.

En la Figura III-1 se presenta un diagrama de bloques del proceso de obtención de esponja de quitina, por el método de disolución, a partir de cefalotórax de camarón fresco.

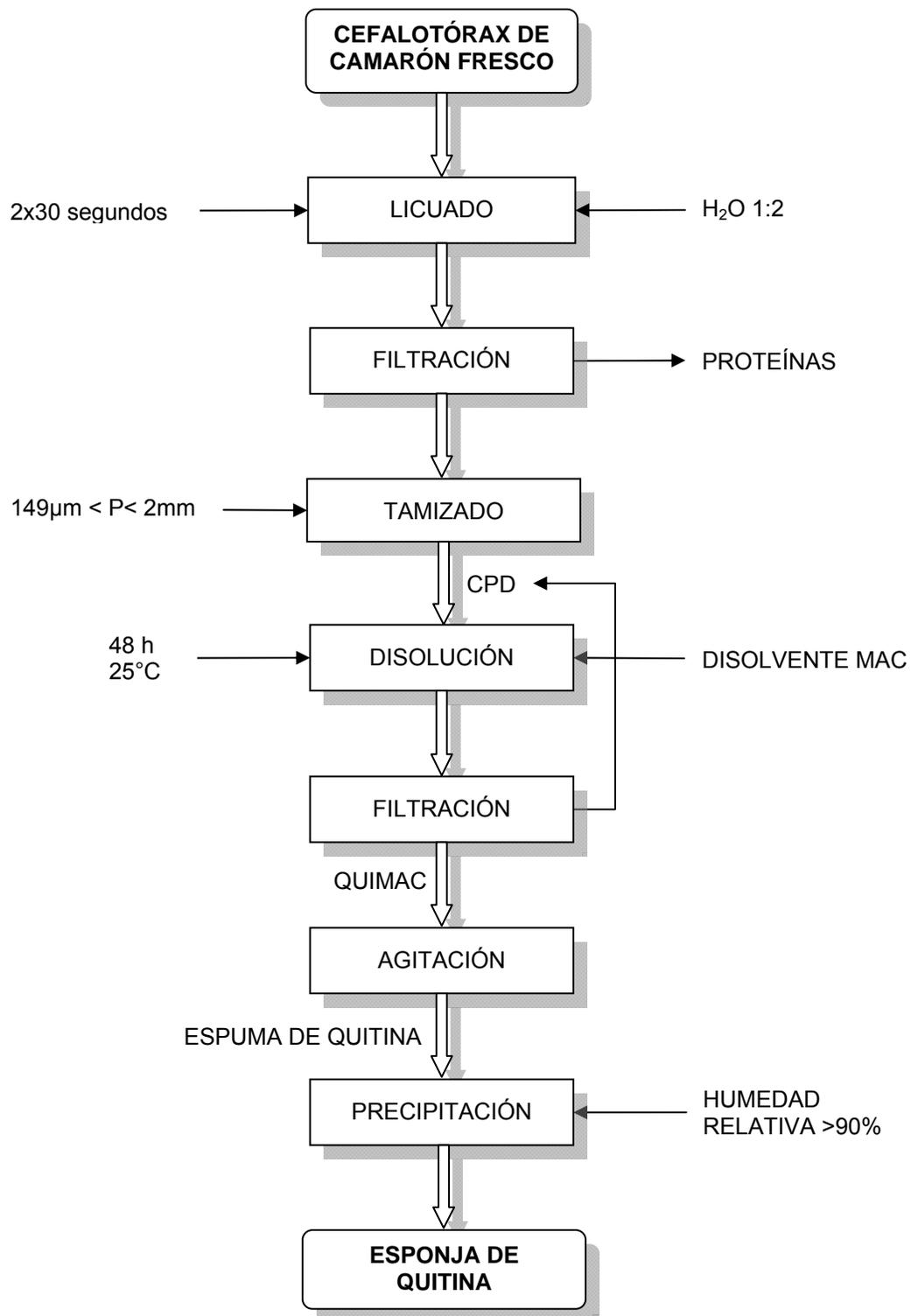


Figura III-1. Diagrama de bloques para la obtención de esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón. CPD: Cefalotórax parcialmente desproteínizado, MAC: Disolvente metanol-agua-cloruro de calcio, QUIMAC: Solución de quitina en disolvente MAC

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Caracterización y desproteínización de cefalotórax de camarón fresco

Los desechos de camarón fresco se trataron como se indica en III.1.1, III.1.2 y III.1.3. Los resultados de la caracterización se presentan en las Figuras IV-1 y IV-2 y en la Tabla IV-1, humedad a 60°C/18 h.

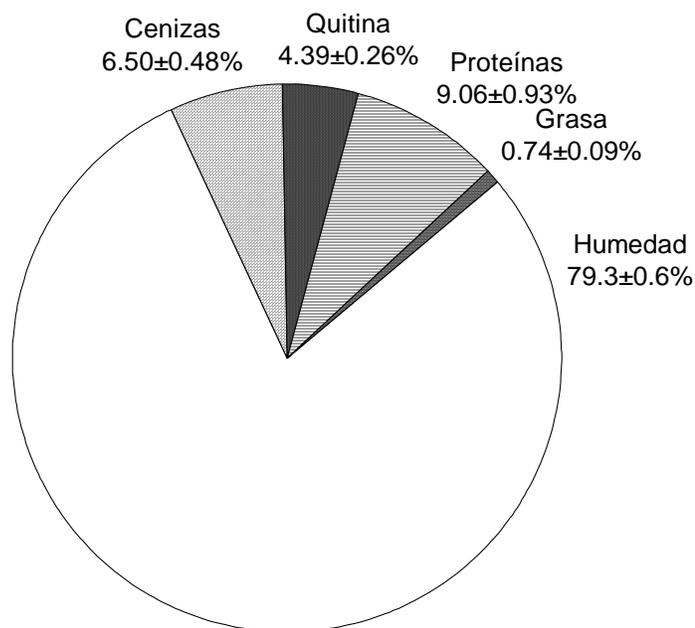


Figura IV-1. Caracterización de cefalotórax de camarón fresco, promedio de tres determinaciones

El cefalotórax de camarón fresco estuvo constituido principalmente de agua, la quitina estuvo presente en un 4%. En el cefalotórax de camarón, CC, el mayor componente fueron las proteínas. El contenido de quitina, en CC, estuvo acorde a lo reportado por Cárdenas y col. (2004) y Singer y Wooten (2003). Con el licuado y posterior secado se consiguieron eliminar

principalmente las proteínas y la humedad. El cefalotórax de camarón parcialmente desproteínizado, CPD, aumentó el contenido de quitina de 18% en el CC a 28%. Mientras que las proteínas disminuyeron a un 20%. Las proteínas solubles y las débilmente asociadas fueron esencialmente las eliminadas, permaneciendo las que estaban fuertemente enlazadas, por enlaces covalentes, con la quitina. Con el licuado las grasas fueron eliminadas casi completamente. El contenido de minerales aumentó en un 8%. Singer y Wooten (2003) con un procedimiento de licuado similar aumentaron la concentración de quitina de 17% a 60%, debido a que en la etapa de filtración utilizaron una malla de 30 μm , con lo que se pudo retener mayor cantidad de quitina de pequeño tamaño de partícula.

Tabla IV-1. Pérdida de peso, contenido de cenizas y nitrógeno total de cefalotórax de camarón después de licuar por 2x30 segundos. Determinación promedio de tres replicas en base seca

Licuado	Pérdida de peso, %	Cenizas, %	Nitrógeno total, %
Agua	60.9±6.1	37.3±0.6	4.85±0.24
SDS 0.1%	59.4±3.4	36.5±0.4	4.91±0.16

Se observó, en la pérdida de peso, que no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre licuar con agua o con SDS por lo que se prefirió, por ahorro de reactivos, utilizar sólo agua para las desproteínizaciones posteriores. Akira y col. (1993) reportaron desproteínizar cefalotórax con una solución al 1% de surfactante; en este estudio no se ensayaron concentraciones mayores de SDS, teniendo en mente que el licor que se obtuvo de la desproteínización, rico en proteínas y pigmentos, puede llegar a ser usado como alimento animal (Torres, 2007).

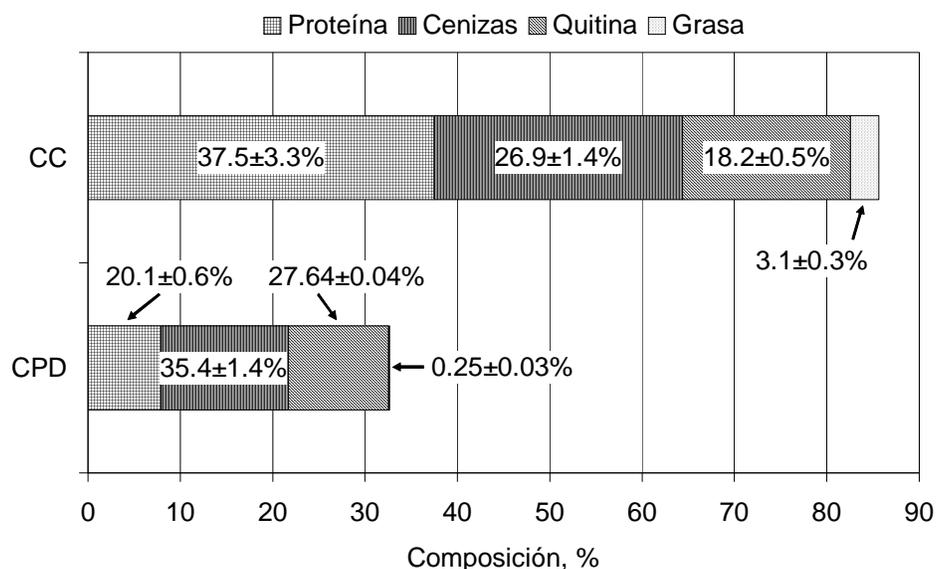


Figura IV-2. Composición de cefalotórax de camarón entero (CC) y cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD), promedio de tres repeticiones

Con el proceso de licuado, también, hubo una pérdida de quitina, alrededor de un 40% debido a que para recuperar la quitina de la solución de proteínas se utilizó un tamiz de 1 mm de apertura de malla (ver III.1.2), y toda partícula de quitina con un diámetro menor no pudo ser retenida. Se debió utilizar un tamiz de malla más pequeño que permita que sólo la parte líquida filtre y se retengan las partículas pequeñas de quitina presentes.

IV.2 Viscosidad de la solución de quitina en disolvente MAC

La Figura IV-3 presenta el incremento de la viscosidad de la mezcla CPD-MAC, a diferente concentración, conforme aumenta el tiempo de extracción. Se observó que a mayor concentración de CPD y a mayor tiempo de extracción, se tuvo mayor viscosidad, lo que representó una mayor disolución de quitina. Como la separación del CPD, que no se disolvió, de la solución de quitina se realizó con un filtro prensa manual, la viscosidad del sistema no debe ser muy alta para facilitar la filtración. El sistema que presentó una viscosidad moderada (30 Pa.s), adecuada para la filtración, fue con la relación 1:10 con 48 horas de extracción. Con más tiempo de extracción la viscosidad no aumentó apreciablemente lo que indicó que no mejoró la extracción. Este sistema, además, produjo una excelente espuma para la formación de esponja. Las mezclas con mayor concentración de CPD poseyeron las viscosidades más altas lo que indicó que contuvieron una importante cantidad de quitina disuelta, pero fueron difíciles de filtrar. La espuma que se produjo con la relación 0.5:10, en cambio, no tuvo una buena consistencia debido a la poca cantidad de quitina disuelta y no fue adecuada para la formación de esponja. El tiempo de extracción se puede acortar a un 30% aumentando la concentración de CPD de 1:10 a 1.5:10.

La viscosidad de una solución de quitina está en función de la concentración de la quitina y de su peso molecular. Si la concentración permanece constante una variación en la viscosidad de la solución puede atribuirse a un cambio en el peso molecular. Se puede, entonces, determinar la estabilidad de las moléculas de quitina, en solución MAC, registrando los cambios de viscosidad del sistema en función del tiempo, como se aprecia en la Figura IV-4.

La viscosidad inicial de una solución de quitina al 0.4% en disolvente MAC-141 fue baja debido a que después de la filtración aún no se habían formado los agregados de quitina. Transcurridas 24 horas la viscosidad de la solución de quitina aumentó apreciablemente gracias a la formación de los grandes agregados. Posteriormente, la viscosidad permaneció constante

en el lapso de tiempo estudiado. La viscosidad (η) de la solución QUIMAC, en un periodo de 40 días a 25°C, permaneció estable ($\Delta\eta < 5\%$), lo que indicó que el peso molecular, de las moléculas quitina en solución, no disminuyó. Las soluciones de quitina en disolvente MAC fueron estables en el periodo de tiempo estudiado.

Para la construcción de la curva de fluidez (Figura IV-5) de la solución de quitina se determinó la viscosidad de la solución de quitina en función de la disminución y posterior aumento de la velocidad de corte (r.p.m. de la aguja del viscosímetro Brookfield).

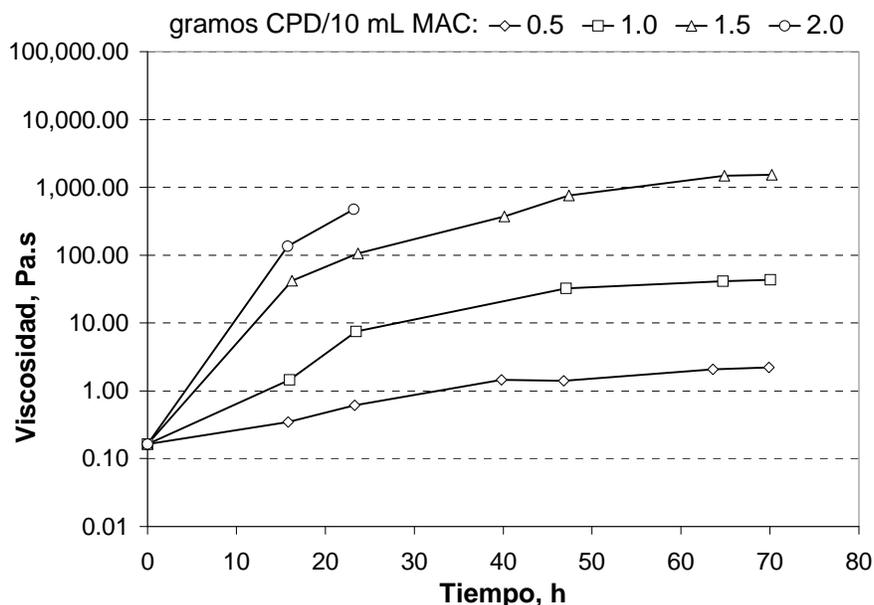


Figura IV-3. Aumento de la viscosidad de la mezcla CPD-MAC en función del tiempo de extracción a 25°C. Aguja S28 (0.3-120 r.p.m.)

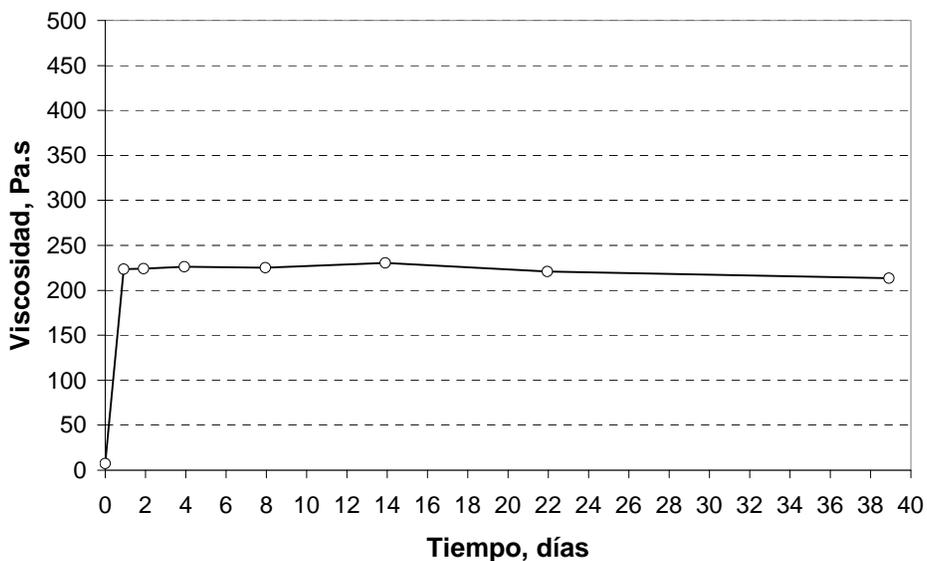


Figura IV-4. Viscosidad, a 25°C, de la solución de quitina ($0.43 \pm 0.04\%$) en función del tiempo. Aguja S28 (30 y 1 r.p.m.)

El comportamiento de la solución de quitina correspondió a un fluido turbulentoseudoplástico donde la viscosidad aparente disminuyó gradualmente conforme aumentó la velocidad de corte²⁴ (Romo, 1981). Este comportamiento indicó que la solución de quitina estaba formada de agregados por adhesión que ocupaban un gran volumen en la solución. A una baja velocidad de corte, los agregados pueden ser deformados pero se mantienen, esencialmente, intactos. Cuando la velocidad de corte se incrementó los agregados se disgregaron, disminuyendo la fricción y, por lo tanto, la viscosidad aparente. La viscosidad de la solución tiende a ser más baja si el volumen del agregado es más pequeño. Esto es debido a que se requiere menos fuerza para disipar el componente sólido de la solución. La agregación es causada por un efecto hidrofóbico. Los grupos hidrofóbicos del polímero tienden a adherirse unos a otros y las molécula se enredan sobre sí mismas (Mathur y col. 1997). Cuando las r.p.m. de la aguja disminuyeron a los mismos valores previos se observó que los datos de viscosidad fueron similares a los medidos con anterioridad (no presentó histéresis) lo que indicó que la ruptura de los agregados fue reversible y que la velocidad de formación de nuevos agregados fue alta.

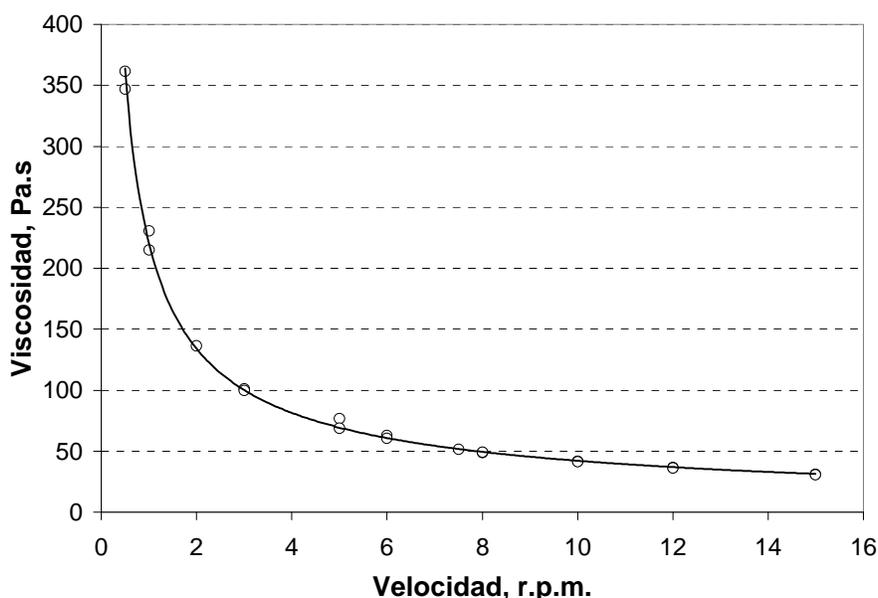


Figura IV-5. Viscosidad, a 25°C, de la solución de quitina ($0.43 \pm 0.04\%$) en función de la velocidad de rotación de la aguja S28 del viscosímetro Brookfield

²⁴ La velocidad de corte, S (s^{-1}), se relaciona con las r.p.m. de la aguja con la siguiente igualdad, $S = [2Rc^2 / (Rc^2 - Rb^2)] (2\pi / 60) N$. N: r.p.m., Rc: radio del contenedor (cm) y Rb: radio de la aguja (cm) (Anónimo, 1999)

III.3 Extracción sólido-líquido de quitina con disolvente metanol-agua-cloruro de calcio (MAC)

En primer lugar se construyó el diagrama de solubilidad del sistema ternario metanol-agua-cloruro de calcio, a 25°C (ver Tabla III-2), para determinar la línea de saturación. El resultado se muestra en la Figura IV-6.

Arriba de la línea de saturación **A-B** el sistema es heterogéneo, formado de cloruro de calcio sólido en equilibrio con la solución saturada. Bajo la línea de saturación el sistema es monofásico, homogéneo, líquido con los tres compuestos en solución. El punto **A** es la solución saturada de CaCl_2 en agua en ausencia de MeOH ($\text{CaCl}_2 \cdot 6.6\text{H}_2\text{O}$) y el punto **B** es la solución saturada de CaCl_2 en MeOH en ausencia de H_2O ($\text{CaCl}_2 \cdot 10.8\text{MeOH}$). Hay mayor disolución de cloruro de calcio en agua que en metanol y el diagrama presenta, en la línea de saturación, un máximo de disolución del cloruro de calcio en 3.6 moles de agua y 1.2 moles de metanol.

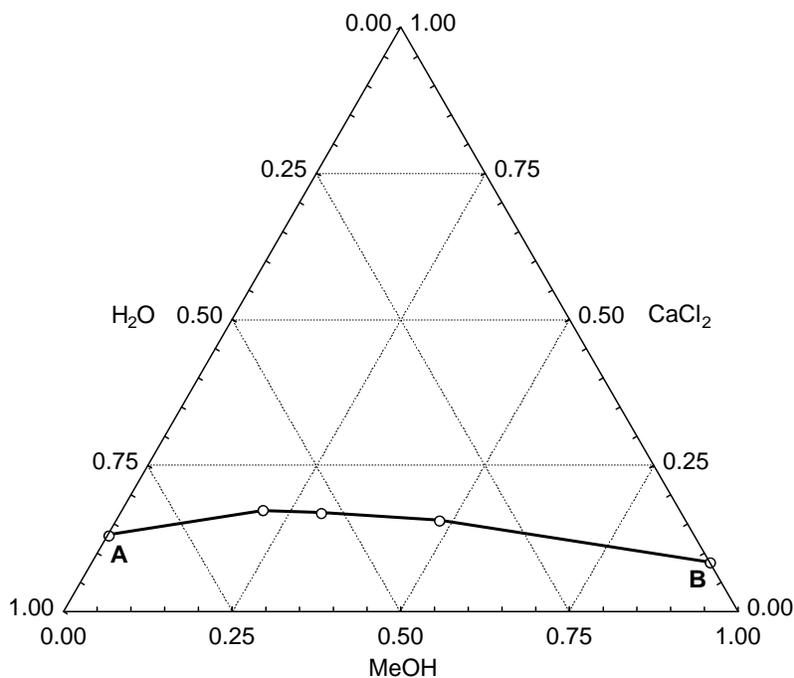


Figura IV-6. Diagrama de solubilidad del sistema ternario metanol-agua-cloruro de calcio (MAC) a 25°C

Para ver el efecto de la solvatación del calcio con metanol y agua sobre la disolución de la quitina se ensayaron diferentes relaciones molares agua-metanol como se muestra en la Figura IV-7 y en la Tabla IV-2.

Tabla IV-2. Disolvente MAC a varias relaciones molares

MAC*	MOLES			GRAMOS		
	MeOH	H ₂ O	CaCl ₂	MeOH	H ₂ O	CaCl ₂
141	1	4	1	12.66	28.48	43.86
231	2	3	1	23.77	20.05	41.17
552	2.5	2.5	1	28.84	16.21	39.95
321	3.6	2	1	37.37	11.67	35.96
281	2	8	1	17.07	38.38	29.55
461	4	6	1	31.37	26.46	27.17
551	5	5	1	37.69	21.19	26.11
741	7.2	4	1	47.40	14.80	22.80

*Los dígitos indican el número de moles de metanol, agua y cloruro de calcio, respectivamente

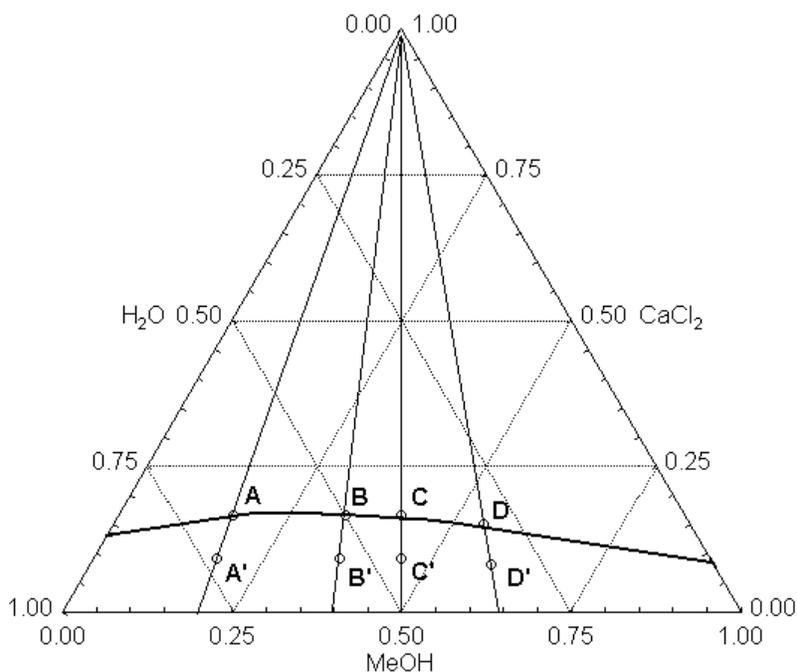


Figura IV-7. Diagrama ternario de solubilidad para la quitina en el sistema metanol-agua-cloruro de calcio a 25°C. Los círculos representan cuatro soluciones sobre la línea de saturación y cuatro en la zona monofásica. A=MAC-141, B=MAC-231, C=MAC-552, D=MAC-321, A'=MAC-281, B'=461, C'=551, D'=741

En estos puntos se realizó la extracción de quitina a 10, 25 y 40°C. Los resultados se muestran en las Figuras IV-8 y 9 y en las Tablas IV-3 a la 9. Como se determinó en la curva de fluidez (Figura IV-5) al comparar datos de viscosidad hay que tener en cuenta las r.p.m. de la aguja del viscosímetro que se utilizó.

Se obtuvo una baja extracción de SPQ a 10°C, con todos los disolventes probados, debido a que en el disolvente MAC a baja temperatura, el cloruro de calcio se encuentra, en parte, cristalizado por lo que no estaba disponible para unirse a la quitina y formar el complejo soluble. Las mejores extracciones de SPQ se obtuvieron con los disolventes con mayor proporción

de agua con respecto al metanol (MAC-141 y MAC-231) a 25°C. Con MAC-552 se consiguió una buena extracción a 25°C pero no produjo espuma. Sólo con MAC-141 y MAC-231, a 25°C, se obtuvo SPQ. A 40°C se extrajo un mayor porcentaje con MAC-231, sin embargo, no produjo espuma. En cuanto a la extracción de SPQ en la zona de insaturación se obtuvo una baja extracción en comparación con los porcentajes obtenidos en la línea de saturación. Esto está de acuerdo al mecanismo planteado para la disolución de la quitina con el disolvente MAC: el calcio en soluciones insaturadas tiene completa su envoltura de solvatación y no necesita unirse a la quitina para completarla y, por lo tanto, no forma el complejo soluble con la quitina. Se prefirió la extracción con disolvente MAC-141, a 25°C, porque utiliza menor cantidad de metanol con respecto a los otros disolventes, la producción de SPQ es adecuada y la extracción se efectúa a temperatura ambiente. Ha y col. (2003) determinaron que para disolver fibroína de seda es crítica la relación molar del nitrato de calcio, agua y metanol. La relación óptima es 1:4:2, al menos tres moléculas de agua por un mol de calcio son necesarias para comenzar la disolución de la fibroína de seda, similar a lo encontrado en este estudio para el sistema cloruro de calcio, agua y metanol para disolver a la quitina. Parece que las moléculas de agua actúan como agente de hinchamiento facilitando el ingreso del calcio y como componentes en el enlace de coordinación.

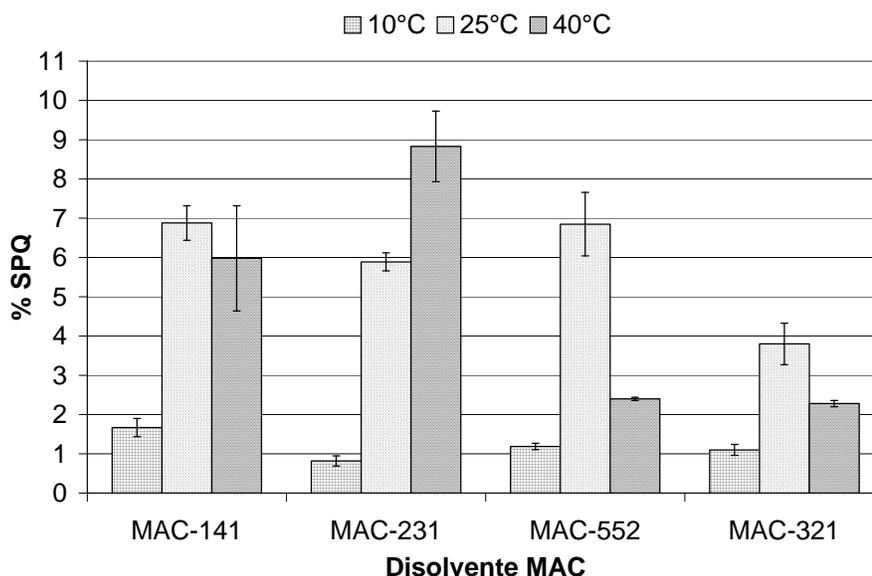


Figura IV-8. Porcentaje de extracción de esponja de quitina (SPQ), en la línea de saturación, con diferentes disolventes MAC a tres temperaturas, promedio de tres determinaciones

Debido a la alta viscosidad de las soluciones QUIMAC la filtración, con un filtro prensa manual, fue poco eficiente y no se logró extraer toda la solución de quitina formada. En la Tabla IV-3 se compara el porcentaje de SPQ recuperada con el filtro prensa manual y el porcentaje real de SPQ extraída.

Tabla IV-3. Porcentaje de esponja de quitina recuperada y extraída del cefalotórax parcialmente desproteínizado a diferentes temperaturas y con diferentes disolventes MAC, promedio de tres determinaciones

MAC	% S P Q					
	10°C		25°C		40°C	
	recuperada	extraída	recuperada	extraída	recuperada	extraída
141	1.00±0.10	1.67±0.23	4.04±0.71	6.88±0.44	3.72±0.89	5.98±1.34
231	0.53±0.07	0.82±0.13	2.76±0.16	5.89±0.23	2.62±0.55	8.83±0.90
552	0.73±0.05	1.19±0.08	3.29±0.46	6.85±0.81	1.16±0.13	2.40±0.04
321	0.64±0.13	1.10±0.14	2.12±0.31	3.80±0.53	1.41±0.07	2.28±0.08
281	-	-	1.19±0.37	1.58±0.50	-	-
461	-	-	0.80±0.11	1.15±0.18	-	-
551	-	-	1.25±0.10	1.73±0.16	-	-
741	-	-	1.23±0.14	1.63±0.20	-	-

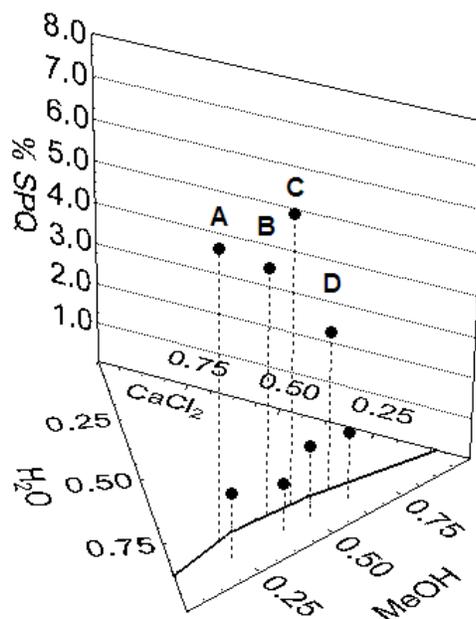


Figura IV-9. Porcentaje de extracción de esponja de quitina (SPQ), a 25°C, en la línea de saturación y en la zona de instauración. A=MAC-141, B=MAC-231, C=MAC-552, D=MAC-321

En la espuma de quitina se determinó el diámetro promedio de las burbujas de aire presentes en un área de 0.32 mm². Los resultados se presentan en las Figuras IV-10 y 11.

Tabla IV-4. Viscosidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 10°C

MAC	Viscosidad*, Pa.s			
	r.p.m	líquido	r.p.m.	espuma
141	100	0.6435±0.0757	100	0.7425±0.0601
231	100	0.5225±0.0035	100	0.5275±0.0177
552	120	0.4229±0.0030	120	0.4354±0.0030
321	-	-	-	-

*Medición realizada a 25°C por triplicado

Tabla IV-5. Densidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 10°C y porcentaje de aire de la espuma

MAC	Densidad*, g/mL		% (v/v) aire
	líquido	espuma	
141	1.40±0.02	1.29±0.03	7.71±3.47
231	1.33±0.00	1.32±0.01	0.62±1.04
552	1.27±0.00	1.27±0.01	0
321	1.22±0.01	-	-

*Medición realizada a 25°C por triplicado

Tabla IV-6. Viscosidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 25°C

MAC	Viscosidad*, Pa.s			
	r.p.m	líquido	r.p.m.	espuma
141	2.0	130±15	1.5	317±0
231	2.0	52.9±0	2.0	75.208±3.005
552	2.0	104.709±21.625	2.0	142±15
321	100	1.511±0.053	100	2.075±0.123

*Medición realizada a 25°C por triplicado

Tabla IV-7. Densidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 25°C y porcentaje de aire de la espuma

MAC	Densidad*, g/mL		% (v/v) aire
	líquido	espuma	
141	1.23±0.00	0.93±0.18	24.5±14.1
231	1.25±0.00	1.15±0.05	7.9±4.0
552	1.23±0.02	1.16±0.05	5.5±5.0
321	1.21±0.02	1.15±0.04	5.5±1.9
281	1.24±0.01	-	-
461	1.16±0.01	-	-
551	1.14±0.01	-	-
741	1.07±0.00	-	-

*Medición realizada a 25°C por triplicado

Tabla IV-8. Viscosidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 40°C

MAC	Viscosidad*, Pa.s			
	r.p.m	líquido	r.p.m.	espuma
141	50	6.625±1.252	10	40.425±12.410
231	2.5	129.000±8.485	1.0	452.500±19.092
552	50	6.030±0.099	50	7.375±0.488
321	100	0.4925±0.0601	100	0.5317±0.0330

*Medición realizada a 25°C por triplicado

Tabla IV-9. Densidad de la solución de quitina y de la espuma obtenida a 40°C y porcentaje de aire de la espuma

MAC	Densidad*, g/mL		%(v/v) aire
	líquido	espuma	
141	1.20±0.02	0.78±0.01	34.8±1.94
231	1.17±0.01	0.99±0.01	15.2±1.55
552	1.17±0.04	1.10±0.04	5.42±7.27
321	1.20±0.00	1.18±0.01	1.29±1.11

*Medición realizada a 25°C por triplicado

La variación de tamaño de las burbujas se ajustó a una curva de distribución normal. Una curva con un número grande de observaciones indica que la espuma tiene mayor cantidad de burbujas que una espuma que presenta, para la misma área, una curva con poco número de observaciones. Una espuma con una curva ancha indica que posee un rango más amplio de tamaño de burbujas que una espuma con una curva más estrecha. Algunas curvas presentaron valores negativos en el diámetro debido a la normalización de los datos.

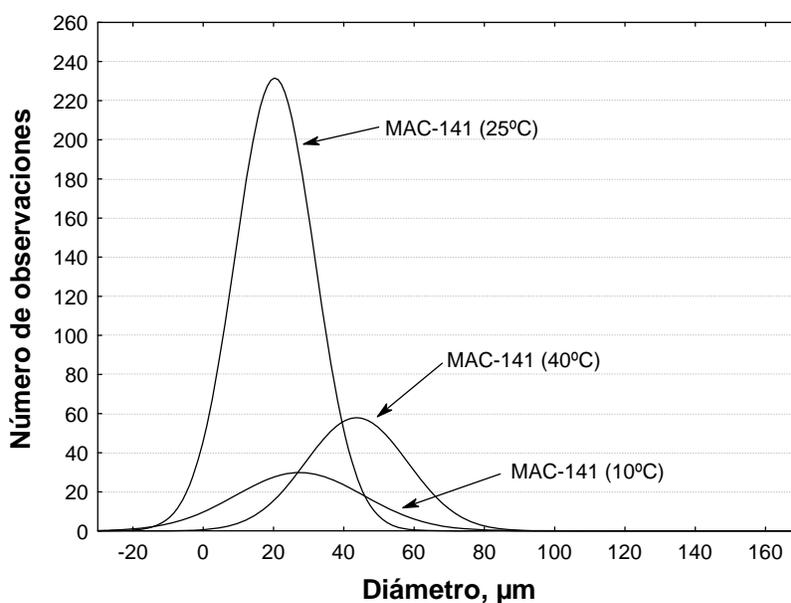


Figura IV-10. Curva de distribución normal del diámetro de burbujas de aire en espuma de quitina en un área de 0.32 mm². Extracción con disolvente MAC-141 a diferentes temperaturas

En la Figura IV-10, con la extracción a 10°C, se tuvo la espuma de quitina con la menor cantidad de burbujas, con un diámetro promedio de 27.14±18.17 μm. Fue la espuma con mayor densidad y menor porcentaje de aire. También fue la espuma con la menor viscosidad y menor porcentaje de extracción de SPQ. La espuma extraída a 25°C tuvo un diámetro promedio de 20.11±11.27 μm. Aproximadamente, hubo tres veces más aire en la espuma extraída a 25°C que en la extraída a 10°C y su diámetro fue más homogéneo, lo que se aprecia por la des-

viación estándar más angosta (una desviación estándar grande con respecto al valor promedio indica una variación amplia en el tamaño de las burbujas). La viscosidad fue la más alta, la densidad fue menor a la unidad y se extrajo el mayor porcentaje de SPQ. La extracción a 40°C produjo burbujas de tamaño grande $43.23 \pm 14.48 \mu\text{m}$ y la espuma con menor densidad pero no produjo esponja. La temperatura a la que se realiza la extracción sí influye en las características de la espuma de quitina que se obtiene debido a las cantidades de quitina y proteínas que se encuentran disueltas.

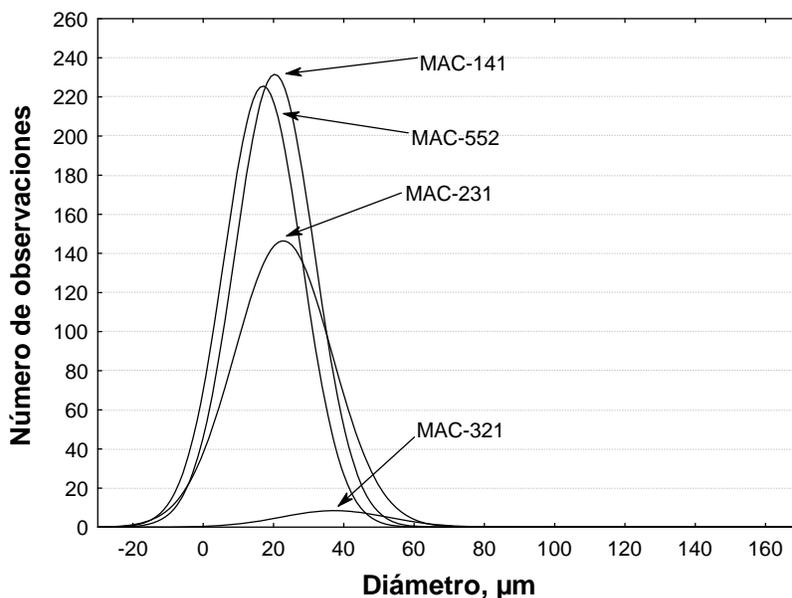


Figura IV-11. Curva de distribución normal del diámetro de burbujas de aire en espuma de quitina en un área de 0.32 mm^2 . Extracción a 25°C con diferentes disolventes MAC

La solución de quitina en el disolvente MAC-321 (Figura IV-11) originó la espuma con menor número de burbujas por área, tuvo la más baja viscosidad y el menor porcentaje de SPQ. El diámetro promedio de las burbujas de aire fue de $36.95 \pm 15.05 \mu\text{m}$. Es el disolvente que posee la mayor proporción de metanol con respecto al agua, por lo que, se conjetura, como ya se mencionó, que se necesita el agua, tanto para solvatar el calcio, como agente de hinchamiento. La extracción con MAC-141 dio un alto porcentaje de burbujas de aire, la mayor viscosidad y densidad menor a uno. Con MAC-552 no se llegó a obtener SPQ. El porcentaje de aire fue casi 5 veces menor que en MAC-141 y la viscosidad fue la mitad. El diámetro promedio de las burbujas de aire fue de $16.78 \pm 11.07 \mu\text{m}$. La solución QUIMAC que se extrajo con MAC-231 presentó menor número de burbujas de aire (diámetro promedio $22.52 \pm 13.79 \mu\text{m}$) que con MAC-141, baja viscosidad y bajo porcentaje de aire.

La espuma de quitina debe poseer un área superficial muy grande para que facilite el ingreso de agua, desde la cámara de humidificación, para precipitar la quitina. En las soluciones QUIMAC, que no formaron una espuma adecuada (Figura IV-12), el agua sólo estuvo en contacto con la superficie de la solución lo que dificultó la precipitación de toda la quitina. Las espumas que no precipitaron en la cámara de humidificación se tuvieron que precipitar como en III.1.4.3.

En pruebas de disolución de quitina grado técnico (exoesqueleto de cangrejo, Sigma, St. Louis EE.UU.), en disolvente MAC-141, no se obtuvo espuma cuando se agitó la solución. Esta prueba demuestra que la presencia de las proteínas extraídas junto con la quitina del CPD son las que ayudan a la formación de la espuma pues se sabe que tienen propiedades surfactantes. Las proteínas al contener grupos hidrofílicos e hidrofóbicos son sustancias emulsionantes anfotéricas (Romo, 1993). Se cuantificó, por triplicado, la cantidad de proteínas solubles en la solución QUIMAC de MAC-141 a 25°C (ver III.2.1) y fue de 0.41 ± 0.01 % (p/p).

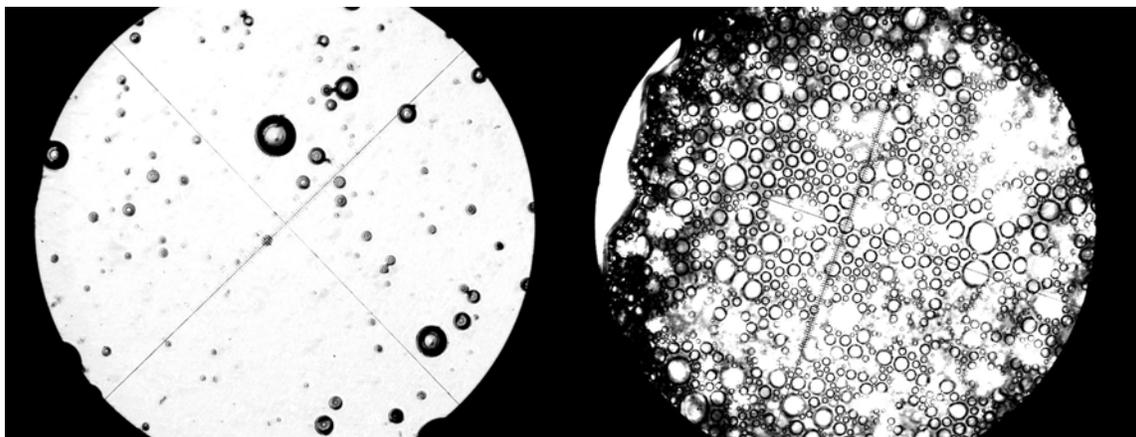


Figura IV-12. Microfotografía óptica, aumento X10, de solución de quitina extraída a 10°C (porosidad estimada = 18%) y a 25°C (porosidad estimada = 43%). La porosidad se estimó sumando las áreas de todas las burbujas de aire y restando del área total de la solución en observación

Se analizó la composición de las SPQ obtenidas (No y col., 1989; Percot y col., 2003) con los disolventes MAC-141 y 231 a las tres temperaturas de extracción. Los resultados se muestran en la Figura IV-13. Las SPQ que se obtienen por disolución con el disolvente MAC, además de quitina, contienen proteínas y carbonato de calcio provenientes del cefalotórax de camarón. A 25°C se obtuvo la mayor concentración de quitina en la SPQ para los dos disolventes. Las extracciones más bajas se obtuvieron a 10°C. Como ya se mencionó, es debido a que el calcio se encuentra en forma cristalina. Como la separación del CPD, que no se disolvió,

de la solución de quitina se realizó con un filtro prensa manual, no se puede trabajar con soluciones muy viscosas, porque entonces, la filtración se vuelve prácticamente imposible. Es por eso que, aunque, con el MAC-231 a 40°C se obtuvo una buena extracción de SPQ, debido a su viscosidad alta, se tuvo un bajo recobro.

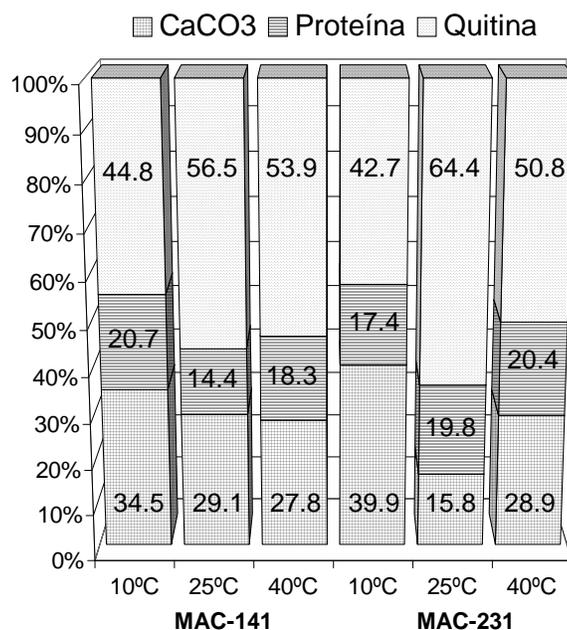


Figura IV-13. Composición de las esponjas de quitina obtenidas con los disolventes MAC-141 y 231 a 10, 25 y 40°C

Para el análisis de superficie de respuesta, para la extracción de SPQ, se tomó como punto central la relación molar 1:4 para la mezcla metanol-agua, que fue el disolvente que extrajo mayor cantidad de SPQ. Los resultados se presentan en la Tabla IV-10 y en la Figura IV-14. En el gráfico de contorno de la Figura IV-14 se aprecia el efecto positivo que tienen el agua y el metanol, en el disolvente MAC, para la disolución de la quitina. De acuerdo con la función polinómica de segundo orden, el efecto positivo del agua fue el doble del efecto del metanol. Hubo un pequeño efecto positivo entre la interacción del agua y el metanol. Como se determinó con anterioridad, la función del agua, en el disolvente MAC (además de formar la envoltura de solvatación del calcio) es la de actuar como agente de hinchamiento de la quitina para facilitar el ingreso de los reactivos. El metanol tiene una porción hidrofílica (-OH) y una hidrofóbica (-CH₃) que ayudan en el balance entre las interacciones repulsivas y atractivas de la molécula de quitina con el medio. La región donde se obtuvo la mayor disolución de quitina

está entre 6.5-7.0 mL de agua, 3.5-4.2 mL de metanol y 10 g de cloruro de calcio para 0.5 g de cefalotórax parcialmente desproteínizado. El gráfico de contorno presentó un máximo de extracción de SPQ lo que confirma que se está en la zona de mayor extracción.

Tabla IV-10. Diseño factorial compuesto de segundo orden para la extracción de quitina con disolvente MAC

ENSAYO	Variables en unidades originales			Variables en unidades codificadas	
	CaCl ₂ , g	MeOH, mL	H ₂ O, mL	x ₁	x ₂
1	10	3.0	6.0	-1	-1
2	10	3.0	7.0	-1	+1
3	10	4.0	6.0	+1	-1
4	10	4.0	7.0	+1	+1
5	10	3.5	6.5	0	0
6	10	3.5	7.2	0	1.414
7	10	4.2	6.5	1.414	0
8	10	3.5	5.8	0	-1.414
9	10	2.8	6.5	-1.414	0

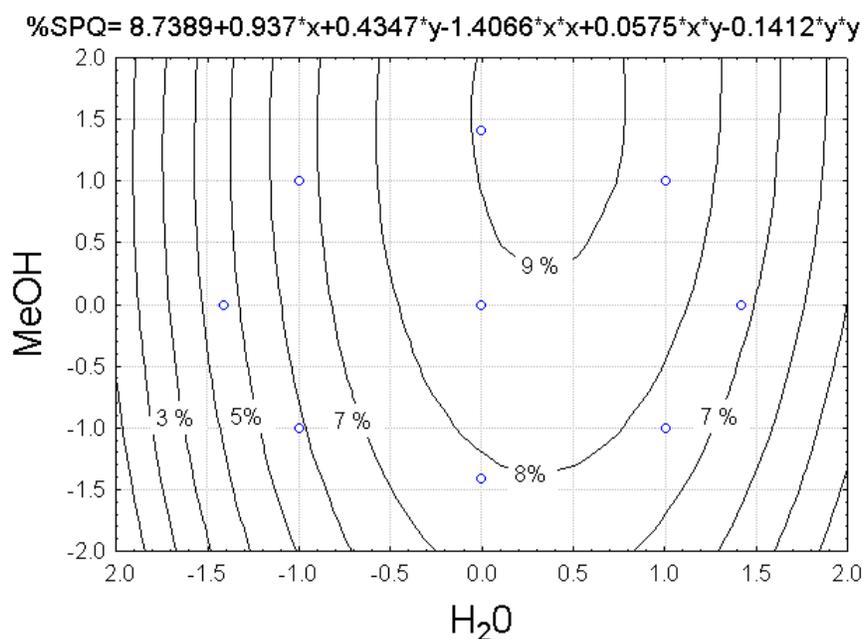


Figura IV-14. Gráfico de contorno para la extracción de esponja de quitina, a 25°C, durante tres días, del cefalotórax parcialmente desproteínizado, con diferentes relaciones de disolvente MAC. Las variables están en unidades codificadas y los círculos pequeños muestran los datos experimentales

III.4 Caracterización de la esponja de quitina

Se determinó el grado de acetilación (DA) de las moléculas de quitina, en las SPQ obtenidas, mediante RMN de ¹³C con la fórmula (Van de Velde y Kiekens, 2004):

$$DA = I_{CH_3} / [(I_{C_1} + I_{C_2} + I_{C_3} + I_{C_4} + I_{C_5} + I_6) / 6]$$

(donde I es intensidad del pico). Los desplazamientos químicos se presentan en la Tabla IV-11. La correspondencia de los picos en el espectro y los átomos de carbono en la molécula de quitina se muestra en la Figura IV-15.

Tabla IV-11. Desplazamiento químico para los átomos de carbono de la molécula de quitina. Datos obtenidos en esta investigación y referidos en la literatura

Átomo	Desplazamiento químico, ppm	
	Este trabajo	Literatura (Cárdenas y col., 2004)
C-1	104.1	104.4
C-2	55.6	57.7
C-3	73.8	73.7
C-4	83.2	83.6
C-5	75.3	75.6
C-6	61.4	61.5
C=O	173.5	173.7
CH ₃	23.2	23.2

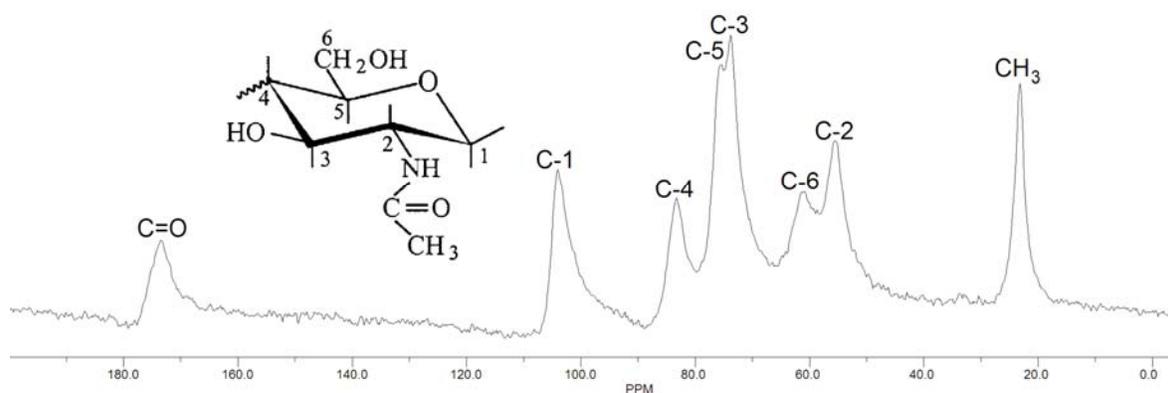


Figura IV-15. Espectro de RMN de ¹³C para la molécula de quitina. Quitina extraída del cefalotórax de camarón parcialmente desproteínizado con disolvente MAC-141

Los desplazamientos químicos encontrados en la molécula de quitina, que se extrajó del cefalotórax de camarón con disolvente MAC, corresponden a los desplazamientos encontrados en la literatura. El DA para la quitina extraída a 25°C con los disolventes MAC-141 y 231 fue de 0.77 y 0.75, respectivamente. Para la quitina extraída a 40°C fue de 0.88 con el MAC-231 y 1.17 con el MAC-141. La quitina extraída a 40°C no precipitó en la cámara de humidificación por lo que fue necesario adicionar agua para que precipite y luego filtrar (ver III.1.4.3) por lo que pudieron quedar atrapadas impurezas durante la precipitación que, probablemente, originaron un DA alto (ver Figura IV-21). Con el tratamiento alcalino al que suele someterse a la quitina para desproteínizar pierde parte de los grupos acetilos. Cuando la quitina alcanza un grado de desacetilación de 50% se vuelve soluble en medio acuoso ácido y se llama quitosana

(Rinaudo, 2006). Las muestras analizadas tuvieron porcentajes de acetilación mayores al 70% lo que confirma que con el método alternativo de extracción se obtuvo quitina y no quitosana. Cárdenas y col. (2004) calcularon, por RMN de ^{13}C , un %DA de 78.9% para quitina extraída de exoesqueleto de camarón obtenida por el tratamiento normal ácido-base. Similar a los valores encontrados en este trabajo. Se sabe que el DA puede variar dependiendo del método que se utilice para determinarlo (Ahmad y col., 2002).

El diámetro hidrodinámico y el peso molecular estimado de la quitina se resolvió por dispersión dinámica de luz en soluciones con disolvente MAC-141. Los resultados se muestran en las Tablas IV-12, 13 y 14.

Tabla IV-12. Tamaño de partícula y peso molecular (PM) de quitina, por dispersión dinámica de luz, en esponja de quitina extraída a 10°C para dos disolventes

Extracción 10°C	Tamaño de partícula d, nm	Índice de polidispersión	% Intensidad	PM, kDa	$\overline{\text{PM}}$, kDa
MAC-231	273.6	0.734	74.6	1.24×10^{05}	3.39×10^{05}
			25.4	9.69×10^{05}	
MAC-141	469.7	0.588	78.9	1.40×10^{06}	1.14×10^{06}
			21.1	1.57×10^{05}	

Todos los tamaños de partículas encontrados están polidispersos, la menor polidispersión se encontró para MAC-141 a 10 y 40°C. Con el disolvente MAC-141 se obtuvo pesos moleculares más altos que con MAC-231 para todas la temperaturas. La quitina con el peso molecular más alto se obtuvo con el disolvente MAC-141 a 40°C. Los PM encontrados para la quitina extraída con disolvente MAC fueron más altos, excepto para MAC-231 a 10 y 25°C, que el peso molecular de la quitina Sigma. Para MAC-231 a 25°C y para quitina Sigma la distribución de tamaño dio un solo pico (Figura IV-16). Se obtuvieron tres picos para la extracción a 40°C para los dos disolventes y para MAC-141, a 25°C. El peso molecular de peso promedio para quitina se ha reportado que puede variar de 1.03×10^6 a 2.5×10^6 (Ravi Kumar, 2000); los valores tan altos encontrados para el tamaño de partícula como para el peso molecular estimado indican que la quitina en el disolvente MAC está formando agregados de diferentes tamaños lo que se corrobora con las medidas de viscosidad. Se ha reportado (Roberts, 1992) que con

dispersión de luz se puede obtener un sobreestimado del peso molecular debido a la formación de agregados, en especial, en presencia de iones divalentes.

Tabla IV-13. Tamaño de partícula y peso molecular (PM) de quitina, por dispersión dinámica de luz, en esponja de quitina extraída a 25°C para dos disolventes y quitina comercial Sigma

Extracción 25°C	Tamaño de partícula d, nm	Índice de polidispersión	% Intensidad	PM, kDa	\overline{PM} , kDa
SIGMA	461.0	0.879	100	9.04×10^{05}	9.04×10^{05}
MAC-231	423.2	1.000	100	5.93×10^{05}	5.93×10^{05}
MAC-141	676.7	0.771	60.5 33.0 6.6	3.19×10^{06} 4.29×10^{05} 3.51×10^{04}	2.07×10^{06}

Tabla IV-14. Tamaño de partícula y peso molecular (PM) de quitina, por dispersión dinámica de luz, en esponja de quitina extraída a 40°C para dos disolventes

Extracción 40°C	Tamaño de partícula d, nm	Índice de polidispersión	% Intensidad	PM, kDa	\overline{PM} , kDa
MAC-231	937.5	0.841	58.6 21.1 20.3	2.72×10^{06} 6.62×10^{04} 3.22×10^{05}	1.67×10^{06}
MAC-141	364.3	0.586	80.0 14.6 5.4	6.32×10^{05} 5.32×10^{04} 2.96×10^{08}	1.65×10^{07}

No se pudo saber el efecto real que tuvo el método de obtención de SPQ, con el disolvente MAC, en el grado de acetilación y el peso molecular de las moléculas de quitina, debido a que la SPQ retuvo cierta cantidad de proteínas y carbonatos y fue necesario purificar las muestras. Se utilizó una adaptación de los procedimientos descritos por No y col. (1989) y Percot y col. (2003), que son los métodos que utilizan las condiciones más suaves para desmineralizar y desproteínizar, para evitar la desacetilación y el acortamiento de la cadena debido a estas operaciones. Sin embargo, la desmineralización y desproteínización pudieron haber afectado a las moléculas de quitina en el proceso. Debido a que todas las muestras fueron tratadas de forma idéntica sí se pudieron hacer comparaciones entre muestras.

Para calcular el índice de cristalinidad (IC) de la SPQ se utilizó difracción de rayos X. Se analizaron muestras de SPQ, SPQ desmineralizada y SPQ desmineralizada y desproteínizada. El IC se calculó con la fórmula (Kajartansson y col., 2006):

$$IC = [(I_{110} - I_{am}) / I_{110}] 100$$

donde I_{110} es la máxima intensidad de la difracción (110) a $2\theta = 19.28^\circ$ e I_{am} es la intensidad de la difracción amorfa $2\theta = 16^\circ$. Los resultados se encuentran en la Tabla IV-15 y Figura IV-17.

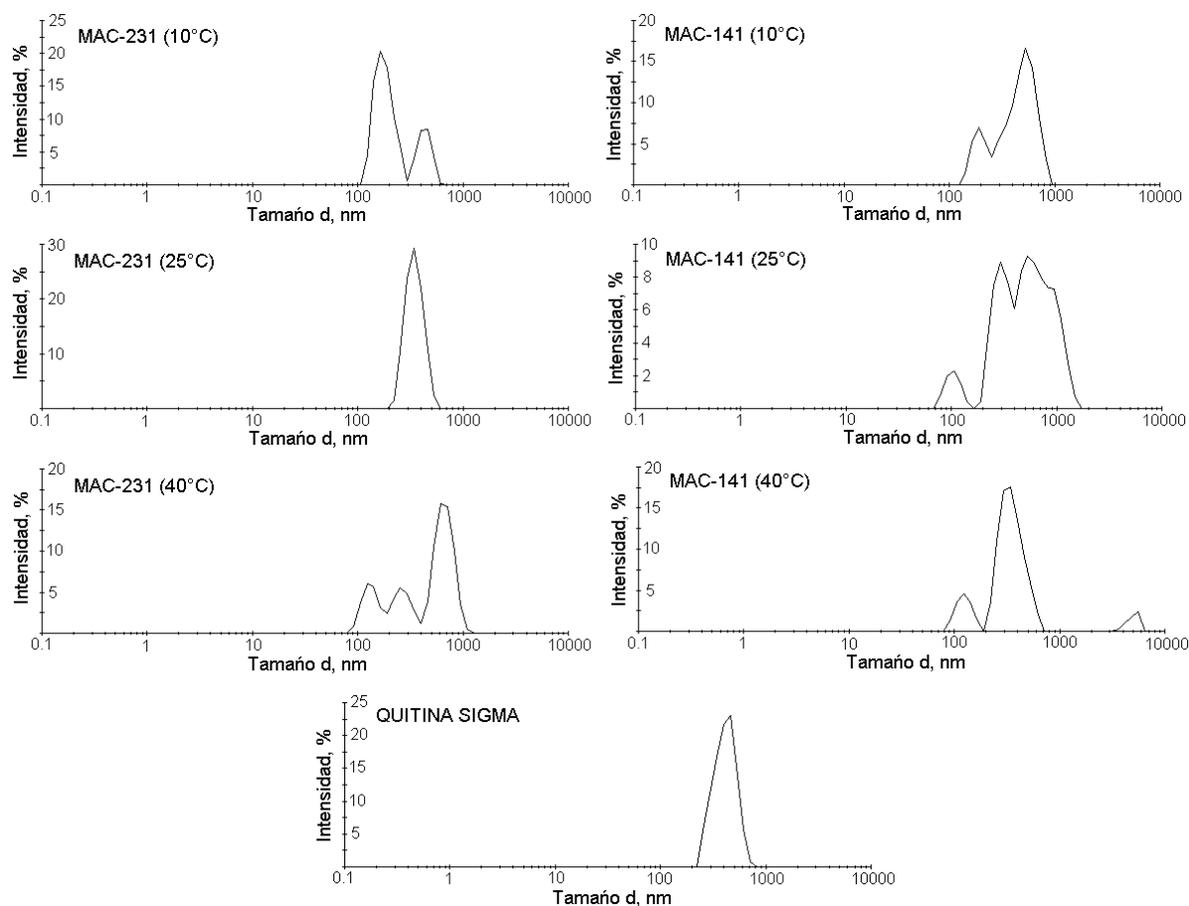


Figura IV-16. Distribución de tamaño de agregados de quitina en disolvente MAC-141 y de quitina Sigma, promedio de cinco determinaciones

Tabla IV-15. Ángulo 2θ para los planos característicos de la quitina cristalina. Datos de esta investigación y referidos en la literatura

Plano cristalino	2θ	
	Este trabajo	Literatura (Cárdenas y col., 2004)
(020)	9.36	9.22
(101)	12.80	12.76
(040), (110)	19.28	19.18
(130)	23.24	22.98
(013)	26.38	26.18

En el difractograma de rayos X se identificaron los cinco picos característicos de la quitina cristalina. Los principales picos son el $2\theta=9.36^\circ$ que corresponde al plano (020) y el

$2\theta=19.28^\circ$ que es una mezcla de los planos (040) y (110). Los cinco picos que están presentes concuerdan con lo reportado en la literatura.

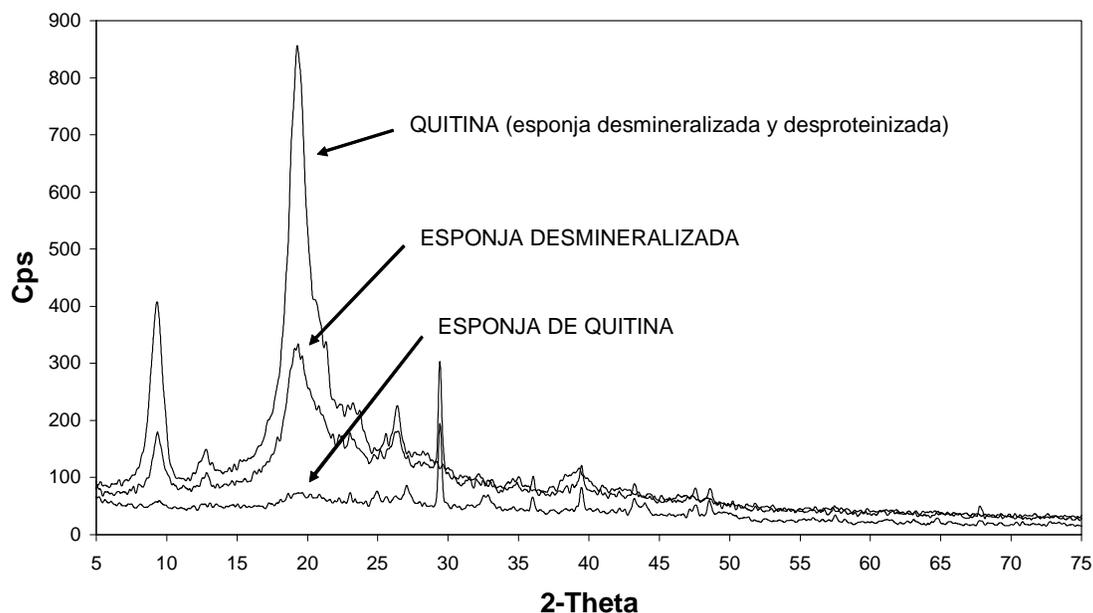


Figura IV-17. Espectro de difracción de rayos X para esponja de quitina, esponja desmineralizada y quitina

La quitina pura tiene una estructura cristalina ortorrómbica y por la presencia de minerales y proteínas, en la SPQ, se vuelve amorfa. La SPQ es altamente amorfa se aprecia únicamente el pico correspondiente para el carbonato de calcio ($2\theta=29.42^\circ$), el IC es de 35%. Cuando la SPQ se trató con HCl se eliminó el carbonato, haciendo a la estructura mucho más cristalina (IC=72%). Con el tratamiento ácido el pico para el calcio pasó de un máximo en la SPQ hasta desaparecer en la quitina pura. Finalmente, con la desproteínación con NaOH, se obtuvo quitina pura con un alto IC de 84%. De acuerdo a los valores de IC, remover el calcio tuvo un efecto mucho mayor, en la estructura cristalina de la quitina, que remover las proteínas. El carbonato de calcio, en la SPQ, está en mayor porcentaje que las proteínas (ver Figura IV-13) lo que podría explicar esta observación. Kjartansson y col. (2006) también observaron un aumento en el IC cuando desmineralizaron y desproteínizaron con ácido y base, respectivamente, exoesqueletos de gamba (crustáceo semejante al langostino). De un IC de 68.9%, en la quitina desmineralizada, se aumentó a un 84.1% luego de la desproteínización.

La fibroína, una proteína, y el nylon 6, un polímero sintético, se disuelven en soluciones metanólicas de nitrato de calcio o cloruro de calcio, respectivamente (Ha y col. 2003; Nakajima y Tanaami, 1973). El calcio forma un complejo soluble con los polímeros, a través del grupo carbonilo, rompiendo los puentes de hidrógeno intermoleculares. En el nylon 6, para estabilizar el momento bipolar grande del grupo amida, el catión Ca^{2+} y el anión Cl^- pueden localizarse aproximadamente en el plano de la amida en la dirección del dipolo. Se supone que el calcio se localiza de igual manera cuando disuelve a la quitina. Se analizaron, por FT-IR, quitina pura y quitina precipitada con disolvente MAC y se observó, en la quitina precipitada, un desplazamiento en la absorción que corresponde al grupo $\text{C}=\text{O}$ que podría atribuirse a la unión de calcio con la quitina. En el espectro FT-IR (Figura IV-18) se aprecian los picos característicos de la quitina (Cárdenas y col., 2004).

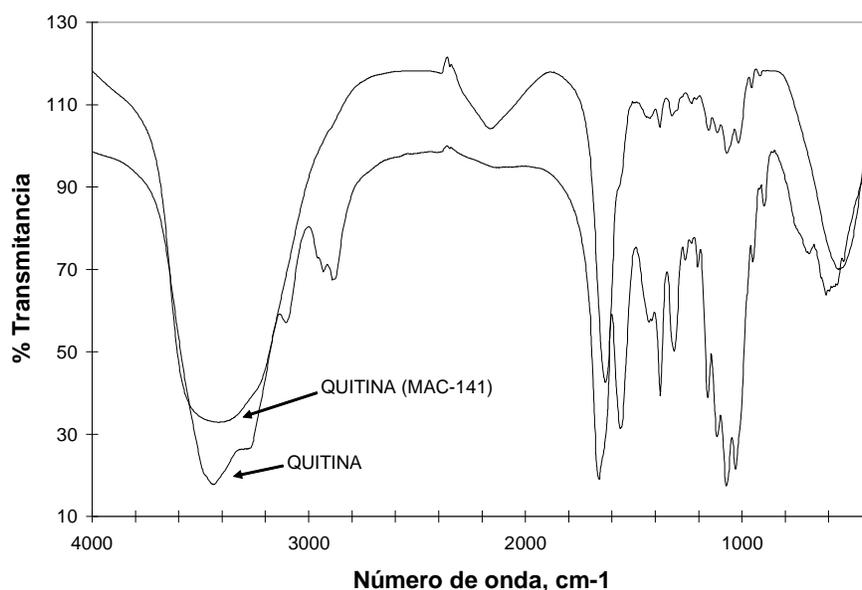


Figura IV-18. Espectro infrarrojo de quitina y quitina precipitada del disolvente MAC

Cuando a la quitina precipitada, con el disolvente MAC-141, se calentó a 100°C se eliminaron el metanol y el agua quedando sólo la quitina con el cloruro de calcio en forma sólida. En el espectro infrarrojo de la quitina precipitada algunos de los picos de la quitina quedaron ocultos por la presencia de la sal higroscópica. En la quitina pura se observó un pico que absorbe a 3439.47 cm^{-1} que se asigna al grupo OH y corresponde al puente de hidrógeno intramolecular $\text{C}(3')\text{-OH}\cdots\text{O}(5)$ del anillo (ver Figura II-6). En la quitina con la sal se apreció, en cambio, una banda ancha de absorción a 3413.38 cm^{-1} . En la quitina el pico a 1660.38 cm^{-1} se

asigna al grupo C=O unido por puente de hidrógeno al N-H de la molécula vecina (Rinaudo, 2006). En la quitina precipitada el pico de la amida I apareció a 1631.17 cm^{-1} y desapareció el pico a 1561.98 cm^{-1} de amida II.

Por mucho, el principal metal presente en la SPQ es el calcio, en forma de carbonato de calcio. Mediante medidas de absorción atómica se determinó el contenido de calcio, magnesio y hierro en muestras de cefalotórax de camarón (CC), cefalotórax parcialmente desproteinizado (CPD) y esponja de quitina (SPQ). Los resultados se presentan en la Figura IV-19.

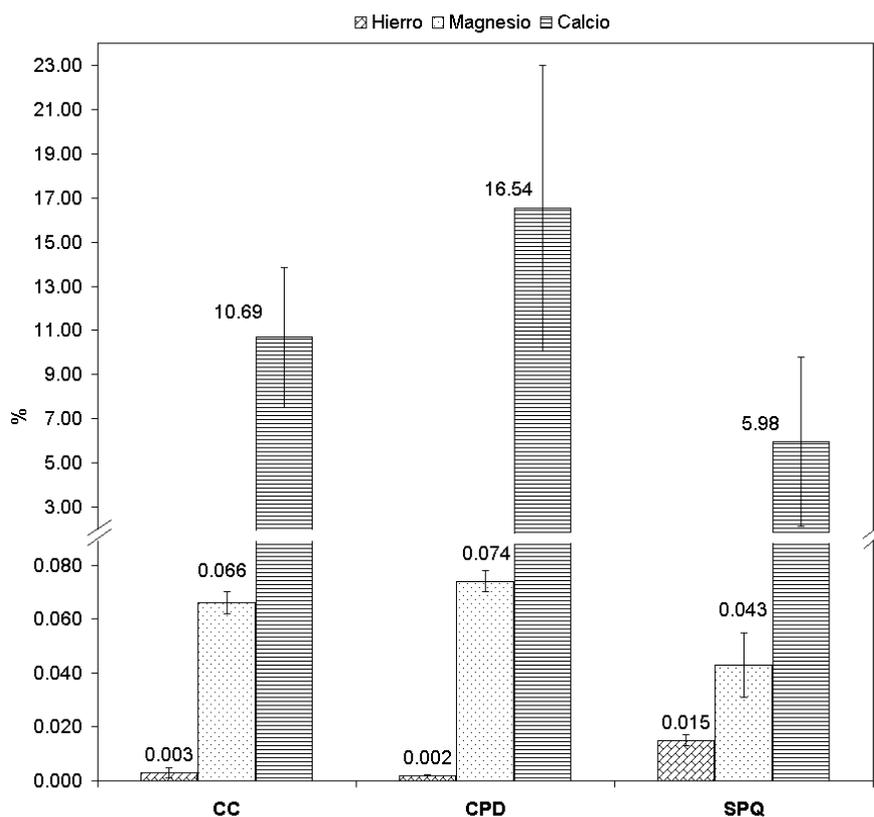


Figura IV-19. Contenido de calcio, magnesio y hierro en cefalotórax de camarón (CC), cefalotórax parcialmente desproteinizado (CPD) y esponja de quitina (SPQ) por absorción atómica, promedio de tres determinaciones

El licuado del CC, para obtener CPD, aumentó, aunque no significativamente, el contenido de calcio debido a la eliminación de proteínas. Este comportamiento está en concordancia con lo observado en la Figura IV-2 en donde el contenido de cenizas aumentó después del licuado del CC. El hierro se encuentra en trazas; en la SPQ tuvo un valor mayor debido seguramente a contaminación por el filtro prensa durante la filtración. El magnesio también

estuvo presente en pequeñas cantidades. El calcio, en forma de carbonato de calcio, encontrado en la SPQ es el que da la característica de amorfa a la esponja.

La microscopía electrónica de barrido permitió analizar la estructura interna de las SPQ obtenidas y compararlas con espumas comerciales. Por su estructura las SPQ se asemejan más a la espuma de poliuretano que a una espuma de PS. La espuma de PS tiene celdas cerradas hexagonales mientras que la SPQ y de poliuretano presentan celdas abiertas (Figura IV-20).

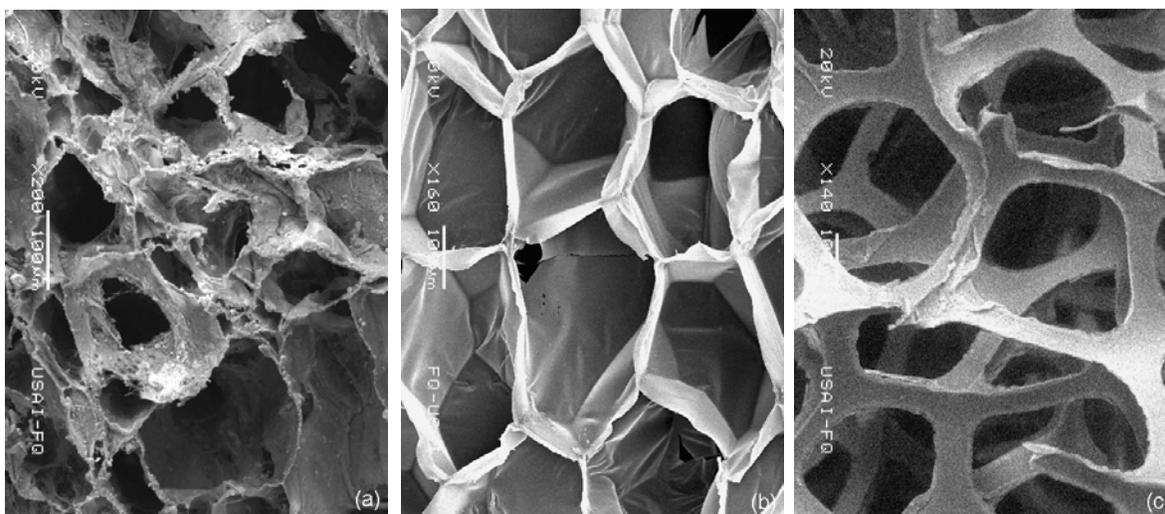


Figura IV-20. Microscopía electrónica de barrido de (a) Esponja de quitina (X200), (b) Espuma de poliestireno (X160) y (c) Espuma de poliuretano (X140)

Hay una gran diferencia de tamaño de celda entre los materiales analizados. La espuma de poliuretano tiene celdas grandes de $693 \pm 57 \mu\text{m}$ de diámetro que están en contacto entre sí y que originan espacios pequeños de $280 \pm 53 \mu\text{m}$. Las celdas hexagonales de la espuma de PS tienen, en promedio, $268 \pm 65 \mu\text{m}$ de diámetro. La SPQ tiene celdas abiertas de forma y tamaño muy variable, con diámetro promedio de $158 \pm 131 \mu\text{m}$.

Cuando la extracción se realizó a 10 y 40°C no se obtuvo una espuma adecuada para crear la esponja de quitina. Se adicionó agua para que precipite la quitina extraída y forme una película de quitina. En la Figura IV-21 se observa la diferencia en la estructura microscópica interna entre una esponja de quitina y una película de quitina, con el mismo poder de aumento. La SPQ presenta cavidades interconectadas mientras que la película es un aglomerado irregular de partículas.

El tratamiento para desproteinizar y desmineralizar a la SPQ homogenizó el tamaño de poro al desaparecer los poros de tamaño más pequeño. El diámetro promedio se redujo debido al aumento de cristalinidad de la quitina como se puede apreciar en las Figuras IV-22 y 23.

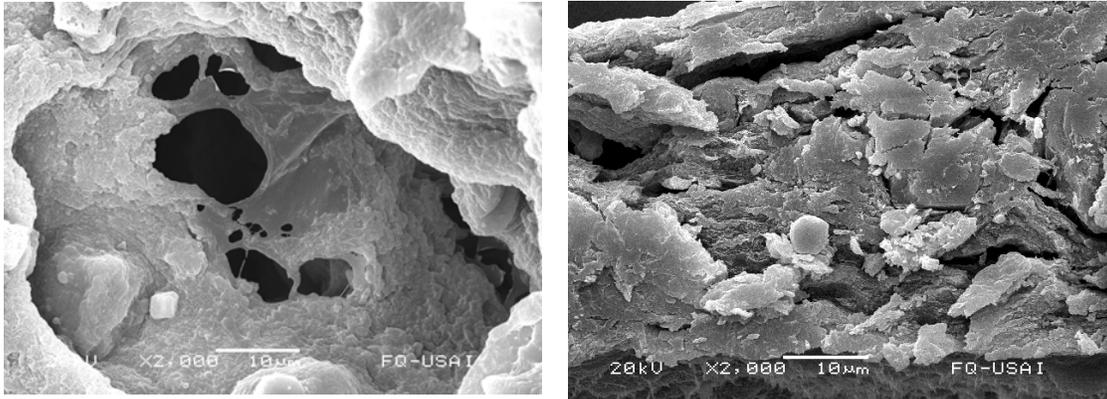


Figura IV-21. Microestructura interna de esponja de quitina y película de quitina, aumento X2000

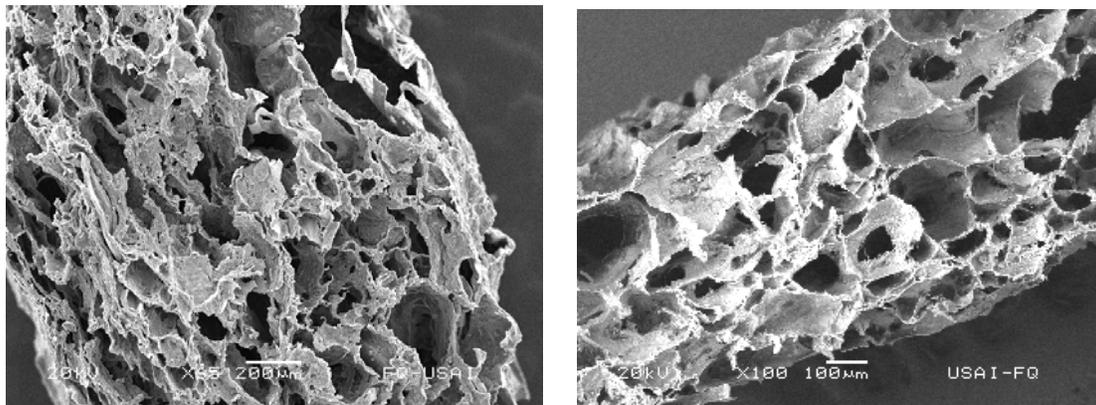


Figura IV-22. Corte transversal de una esponja de quitina obtenida a 25°C con disolvente MAC-231, antes (X200) y después de desmineralizar y desproteinizar (X100). Espesor de la película, antes, $1715 \pm 22 \mu\text{m}$ y después $715 \pm 134 \mu\text{m}$

La esponja de quitina obtenida por liofilización presentó celdas de tamaño promedio de $77 \pm 35 \mu\text{m}$. Las paredes de las celdas no son muy rígidas pues se observó que están aplanadas a lo ancho de la esponja (Figura IV-24). Tiene una estructura laminar más regular que la SPQ obtenida por precipitación de la espuma de quitina. Con el tratamiento ácido-base el espesor de la esponja disminuyó de $523 \pm 33 \mu\text{m}$ a $440 \pm 32 \mu\text{m}$.

En la Figura IV-25 se compara la distribución del diámetro de las celdas de las diferentes esponjas de quitina obtenidas a 25°C. Las celdas más pequeñas se obtuvieron con MAC-141 ($33 \pm 20 \mu\text{m}$) y las más grandes con MAC-231 ($143 \pm 117 \mu\text{m}$). Con MAC-231 se obtuvo,

también, la mayor dispersión. Con la liofilización se obtuvo un tamaño medio de poro de $77 \pm 35 \mu\text{m}$. Debido a la normalización de los datos se observa valores negativos en el diámetro.

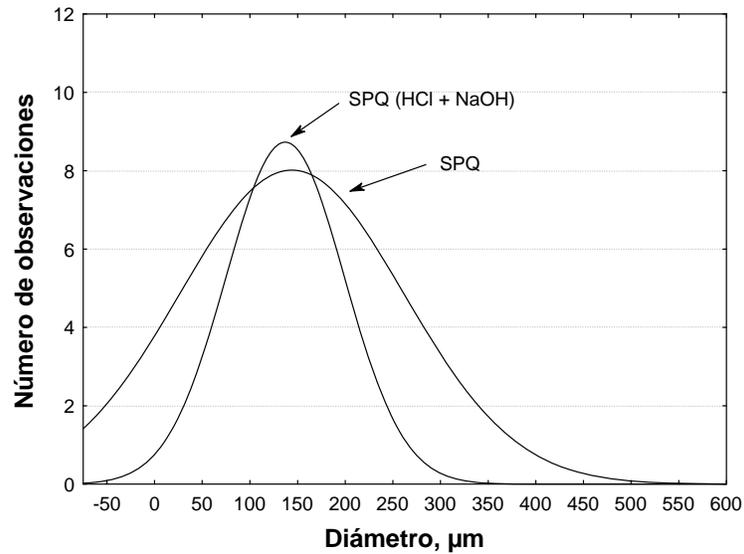


Figura IV-23. Distribución normal para el diámetro de las celdas de la esponja de quitina antes ($143 \pm 117 \mu\text{m}$) y después del tratamiento ácido-base ($136 \pm 62 \mu\text{m}$)

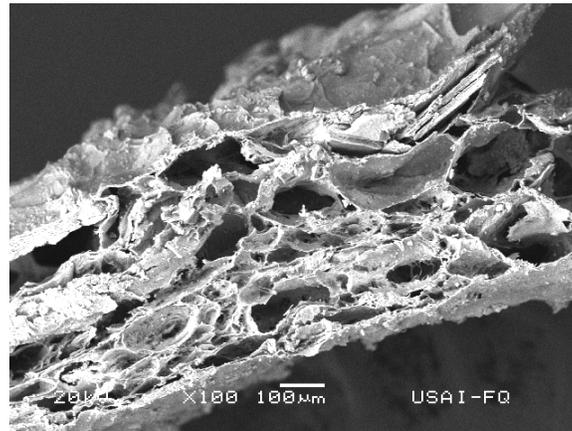


Figura IV-24. Corte transversal de una esponja de quitina obtenida por liofilización, espesor $523 \pm 33 \mu\text{m}$, aumento X100

Chow y Khor (2000) obtuvieron quitina porosa de celdas abiertas, sin liofilizar, de 100 a 500 y de 500 a 1000 μm de diámetro controlando el tamaño de poro con la cantidad de carbonato, adicionado al gel de quitina, que reacciona con HCl. Los tamaños de poro son similares a los encontrados en la SPQ de esta investigación. Chow y col. (2001) determinaron que para la quitina porosa obtenida por liofilización el tamaño de poro varía dependiendo del

método utilizado para enfriar la muestra antes de liofilizar. Obtuvieron quitina porosa de 10 hasta 500 μm de poro. Una alta concentración del polímero da estructuras no porosas y el tamaño de poro afecta a las propiedades mecánicas, a la toma de agua y a la transmisión de vapor.

La densidad de la SPQ MAC-141 a 25°C (se midió cada uno de los lados de la SPQ con un vernier y luego se pesó, por triplicado) fue de 0.31 ± 0.09 g/mL para la obtenida a partir de espuma y para la liofilizada fue de 0.11 ± 0.01 g/mL. Con el tratamiento ácido, la densidad bajó un 6% para SPQ y un 30% para la esponja liofilizada. Luego del tratamiento ácido-base la densidad subió, de la original, un 18 y 37% para la SPQ obtenida a partir de la espuma y para la liofilizada, respectivamente.

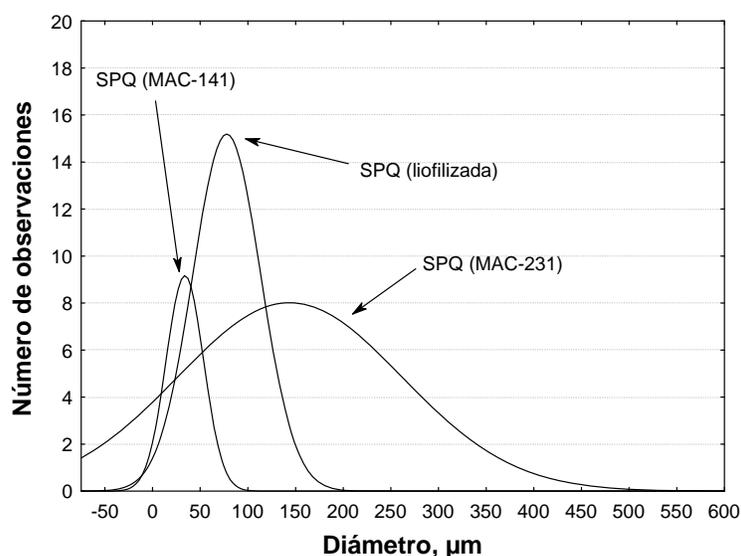


Figura IV-25. Distribución normal para el diámetro de las celdas de esponja de quitina obtenidas, a 25°C, por precipitación de la espuma y por liofilización

La esponja de quitina obtenida por liofilización tuvo una densidad menor que la obtenida a partir de la espuma de quitina ($P < 0.05$). Esto indica que el proceso de liofilización produce espumas con una estructura más porosa. Con la eliminación de las sales minerales, por la acción del ácido, la esponja perdió peso y se apreció una disminución de la densidad de las SPQ. El efecto fue mayor para la SPQ liofilizada lo que puede indicar que la estructura de la esponja se mantuvo después del tratamiento ácido. Luego del tratamiento ácido-básico la quitina se volvió altamente cristalina y hubo un mayor empaquetamiento de las moléculas por lo que aumentó la densidad de las esponjas.

El contenido de humedad de un plástico está íntimamente relacionado a propiedades como fuerza mecánica, apariencia y dimensión. El análisis de absorción de agua de un polímero permite saber la proporción de agua que absorbe el material y, consecuentemente, sirve como guía de los efectos que tendrá la exposición a la humedad sobre sus propiedades. La difusión ideal de un líquido dentro de un polímero es una función de la raíz cuadrada del tiempo de inmersión y el tiempo de saturación es fuertemente dependiente del espesor de la muestra (ASTM, 2003a). Para determinar la absorción de agua por la esponja de quitina se utilizó una SPQ extraída con MAC-141/25°C/48 h de aproximadamente 20x20x0.30 mm. Se sumergió en agua, a 25°C, durante dos horas. Se midió y pesó la esponja antes y después de la inmersión. Con el agua, la SPQ aumentó un 28 ± 6 % de volumen y un 152 ± 5 % de peso. La esponja perdió la rigidez y se volvió flexible. Con la evaporación del agua la SPQ recobró sus dimensiones originales. La SPQ absorbió agua una vez y medio su propio peso. Chow y Khor (2000) prepararon quitina porosa que absorbe agua dos veces su propio peso y determinaron que la absorción de agua depende del tamaño de poro y de la capacidad de retener el agua ganada.

En la α -quitina pura el agua y el alcohol no pueden penetrar la estructura cristalina y se necesitan fuertes agentes de hinchamiento como diaminas alifáticas (Rinaudo, 2006). En la SPQ, la quitina no está completamente cristalina, por la presencia de sales y proteínas, y el agua puede ingresar. La SPQ es altamente insoluble en agua y sólo consigue hincharse. La α -quitina tiene enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilos de cadenas adyacentes, a lo largo del parámetro b de la celda unitaria (figura II-7). Esencialmente, durante el hinchamiento, el parámetro b se expande lateralmente mientras a y c permanecen constantes. Esta propiedad del agua, de hinchar a la quitina, es la que favorece el ingreso del calcio a la estructura cristalina para la disolución de la quitina.

La espuma de quitina al reemplazar el disolvente MAC por agua, y convertirse en hidrogel, disminuyó el volumen en un 67% (ver Tabla IV-16). El cloruro de calcio, una sal higroscópica, absorbe el vapor de agua de la cámara de humidificación y se disuelve, formando un exudado que sale de la espuma, liberando los puentes de hidrógeno de la quitina. La espuma disminuye el volumen y la quitina reconstruye sus puentes de hidrógeno originando un hidrogel. Como resultado del reordenamiento y asociación de cadenas poliméricas, las microrregiones cristalinas actúan como puntos de entrecruzamiento o gelación formando una estructura

tridimensional. Es significativa la destrucción y reordenamiento de puentes de hidrógeno durante la formación del gel originando una red a través de interacciones atractivas segmento-segmento de puentes de hidrógeno intra e intermolecular. Se forma un entramado físico como resultado de las interacciones de los puentes de hidrógeno. Simultáneamente, se desarrollan dominios cristalinos que sirven como elemento adicional en la formación de la red. Hay una concentración mínima para formar un gel que está relacionada con la mínima densidad de entrecruzamiento necesaria. Con una concentración baja de polímero no pueden formarse geles macroscópicos y sólo ocurre una dispersión de microgeles o agregados (Yılmaz y Bengisu, 2003). Esto explica que no se haya podido formar un gel de quitina con todos los disolventes MAC ensayados a 10°C debido a la baja cantidad de quitina extraída (ver Figura IV-8). El hidrogel de quitina se considera un gel físico (formado por uniones reversibles como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas a diferencia del gel químico formado por uniones irreversibles covalentes) (Berger y col., 2004). Posteriormente, el hidrogel formado sufre un proceso de sinéresis.²⁵ Hay una reorganización de la red macromolecular con rompimiento y formación de puentes de hidrógeno que incrementan la densidad de entrecruzamiento, endurecimiento del material y disminución de volumen. Se considera un proceso cinético y termodinámico que permite un estado más estable que el inicial. Depende de un balance entre las interacciones segmento-segmento y segmento-disolvente y de un proceso de relajación. La sinéresis, también, depende de la concentración y grado de acetilación de la quitina. El hidrogel pierde peso por la eliminación de agua, hasta un 70% en 200 h (Vachoud y col., 2000). Cuando la disminución del volumen del hidrogel es muy alta se forman uniones irreversibles y el gel se comporta como gel químico. Finalmente, el gel de quitina se deshidrata y se seca, para convertirse en SPQ sólida. El volumen disminuye en un 91%. Cuando la SPQ pierde el agua se forman nuevos puentes de hidrógeno entre las cadenas de polímero y la estructura se compacta pero conserva el arreglo poroso original de la espuma de quitina.

Tabla IV-16. Disminución de volumen, en porcentaje, durante el proceso de elaboración de esponja y densidad de esponja de quitina (SPQ)

	Solución-Gel %	Gel-Esponja %	Solución-Esponja %	Densidad SPQ g/mL
Agitación sin liofilización	67	91	97	0.31±0.09
Sin agitación con liofilización	75	44	86	0.11±0.01

²⁵ La sinéresis es la contracción del gel provocando la separación del líquido

Para evitar la contracción de las películas de quitina después del secado Yusof y col. (2004) utilizan un proceso de prensado con lo que disminuyen la contracción a un 30%. La utilización de este procedimiento en una SPQ podría dañar su estructura porosa. La disminución neta de volumen de solución de quitina a esponja de quitina fue de 97%. La solución de quitina sin agitación, también, experimenta disminución de volumen en todos los pasos del proceso. La liofilización del gel sólo disminuyó el volumen en un 44%, la mitad del volumen perdido en el gel de espuma. Al eliminar, por sublimación, el agua del hidrogel se evitó que la estructura tridimensional del gel se destruya y se produzca una disminución importante de volumen. Esto se vio reflejado en la densidad de la esponja liofilizada que es casi un tercio de la esponja obtenida a partir de la espuma.

III.5 Propiedades mecánicas de la esponja de quitina

Se analizaron las propiedades mecánicas (ASTM, 2003b) de las SPQ obtenidas por el método de formación de espuma y por liofilización, además de espuma de PS comercial. Los resultados se resumen en las Figuras IV-26 y 27 y en la Tabla IV-17.

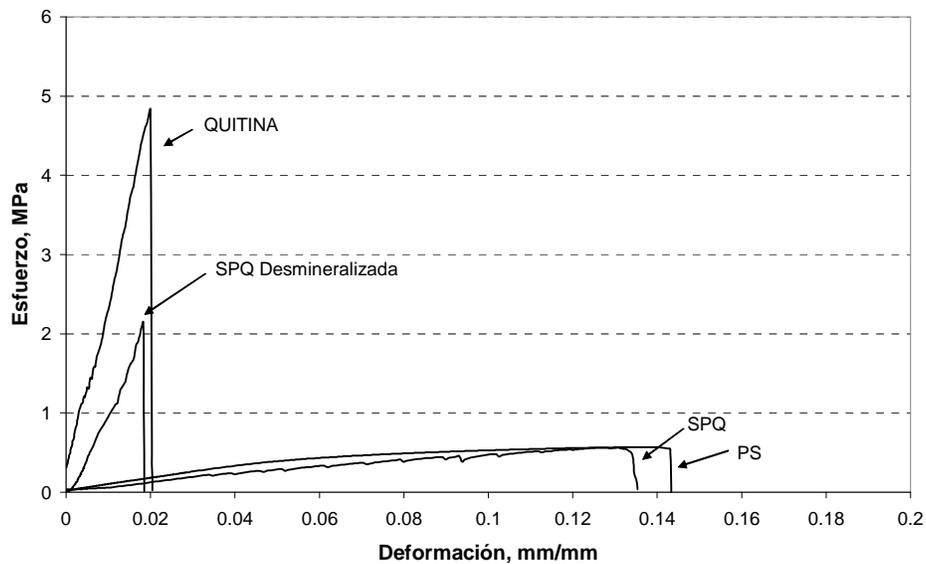


Figura IV-26. Análisis de tensión de esponja de quitina (SPQ: 57% quitina, 14% proteína y 29% carbonato), esponja desmineralizada, quitina y espuma de poliestireno (PS)

El perfil de tensión de la SPQ fue similar al obtenido con la espuma de poliestireno. La tensión de ruptura y el porcentaje de elongación fueron parecidos. El módulo de elasticidad, que hace referencia a la rigidez del material, fue un poco menor en la SPQ. En cambio, en la SPQ obtenida por liofilización, la tensión a la ruptura y el módulo de elasticidad fueron mucho menores. La SPQ está formada de quitina, proteínas y carbonato de calcio que le dan a la esponja una estructura amorfa. Cuando se trató con HCl se eliminaron las sales presentes, aumentando el grado de cristalinidad, cambiando las propiedades mecánicas de la esponja. La tensión a la ruptura y el módulo de elasticidad aumentaron y el porcentaje de elongación disminuyó apreciablemente. Luego de un tratamiento con NaOH se eliminaron las proteínas presentes y se obtuvo quitina pura. La quitina pura tiene un alto grado de cristalinidad, lo que se aprecia por el módulo de elasticidad y tensión a la ruptura altos y porcentaje de elongación bajo.

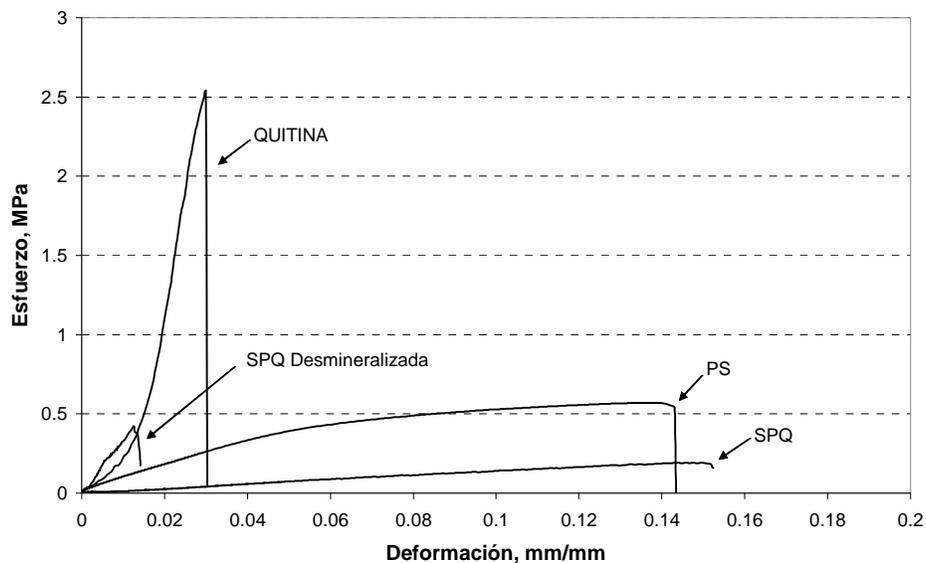


Figura IV-27. Análisis de tensión de esponja de quitina liofilizada (SPQ: 57% quitina, 14% proteína y 29% carbonato), esponja liofilizada y desmineralizada, quitina liofilizada y espuma de poliestireno (PS)

El módulo de elasticidad es la pendiente en la región elástica de la curva de tensión. Tiene una relación estrecha con la energía de enlace de las moléculas. Una pendiente pronunciada (módulo de elasticidad grande) indica que se requieren grandes fuerzas para separar las moléculas del polímero y hacer que el material se estire en forma elástica. La deformación desaparece cuando se elimina el esfuerzo aplicado (es la porción lineal de la curva de tensión). El módulo de elasticidad depende de factores como la orientación de un material monocristalino, la mag-

nitud de los poros en el material y los componentes del material. Un material rígido con módulo de elasticidad grande presenta cambios dimensionales mucho menores cuando el esfuerzo aplicado es relativamente pequeño y, en consecuencia, sólo causa deformación elástica.

El límite elástico tanto en la SPQ y la espuma de PS tuvo valores parecidos; en cambio, para la SPQ obtenida por liofilización fue bajo. Este valor para todas las muestras aumentó con la desmineralización y desproteínización. Al aplicar una fuerza a la esponja, primero, sufre una deformación elástica. Sin embargo, al continuar aumentando el esfuerzo aplicado empieza a presentarse deformación elástica y plástica (deformación permanente). Al final, el material *cede* al esfuerzo aplicado. El límite elástico indica el valor del esfuerzo arriba del cual la relación entre esfuerzo y deformación no es lineal (deformación plástica). Este esfuerzo corresponde al desenredo de las cadenas moleculares en el polímero o al deslizamiento de las cadenas entre sí (Askeland y Phulé, 2004). En la quitina este valor fue alto y cercano al esfuerzo de ruptura. Los puentes de hidrógeno de la quitina no permiten que las moléculas se muevan con facilidad por lo que se necesita un gran esfuerzo para deformarla. En la SPQ amorfa hay menos puentes de hidrógeno formados y la esponja puede deformarse con mayor facilidad.

La energía de tensión a la ruptura es el área bajo la curva de la curva de tensión y representa la energía que absorbe el material antes de fracturarse. La espuma de PS fue el material que más energía absorbió antes de romperse. La SPQ, también tuvo un valor alto, casi tres veces más que la SPQ obtenida por liofilización. Las energías de tensión a la ruptura de la SPQ y de la quitina sin liofilizar resultaron de la misma magnitud. La SPQ necesita un esfuerzo pequeño para una deformación grande, en cambio, la quitina se deforma muy poco con un gran esfuerzo.

Tabla IV-17. Propiedades mecánicas de esponja de quitina (SPQ), esponja desmineralizada (SPQ-D), quitina y espuma de poliestireno (PS)

ESPONJA		Tensión de ruptura MPa	% elongación de ruptura	Módulo de elasticidad MPa	Límite elástico MPa	Energía de tensión de ruptura kJ/m ³
SIN LIOFILIZAR	SPQ	0.566	12.48	6.96	0.22	46.07
	SPQ-D.	2.14	1.64	133.22	0.75	17.22
	Quitina	4.82	1.88	263.86	4.5	47.09
LIOFILIZADA	SPQ	0.192	14.02	1.58	0.085	16.30
	SPQ-D	0.423	1.16	45.40	0.205	2.65
	Quitina	2.53	1.68	162.05	2.15	23.68
PS		0.571	13.51	9.14	0.322	58.60

Chow y col. (2001) obtuvieron una esponja de quitina disolviendo quitina pura en DMAc/LiCl y luego liofilizando. El porcentaje de elongación fue de 4.46%, la tensión a la ruptura de 2.28 MPa y el módulo de elasticidad de 60.30 MPa. La tensión de ruptura es similar con el valor obtenido, en este trabajo, para la esponja por liofilización. El porcentaje de elongación es mayor y el módulo de elasticidad es mucho menor. Esto indica que la esponja de quitina de Chow y colaboradores es más amorfa. Ellos liofilizaron una quitina pura previamente desmineralizada y desproteínizada, mientras que en este trabajo, se desproteínizó y desmineralizó una vez obtenida la esponja por liofilización. Esto originó que las moléculas de quitina se reordenaran y formaran nuevos puentes de hidrógeno, haciendo a la esponja más cristalina. Las propiedades mecánicas se ven afectadas por el tratamiento que pueda recibir la esponja antes o después de formada.

Las propiedades mecánicas son diferentes para una esponja de quitina o una película de quitina. Si en lugar de liofilizar el gel de quitina, disuelto originalmente en DMAc/LiCl, se seca al ambiente se obtiene una película de quitina. Yusof y col. (2004) midieron las propiedades mecánicas de películas de quitina y obtuvieron valores altos para la tensión a la ruptura (38.34 MPa) y para el módulo de elasticidad (1240.74 MPa). La película de quitina no es una estructura porosa como la esponja y sus moléculas están más juntas, por lo tanto, hay más puentes de hidrógeno que aumentan la cristalinidad del material.

La SPQ obtenida por liofilización utilizando el disolvente MAC fue más bien un material poco rígido que se fractura con facilidad. La SPQ que se obtuvo mediante la formación de espuma es, por sus propiedades mecánicas, el material más parecido a una espuma de PS comercial utilizada en recipientes desechables. La desmineralización de la SPQ cambia apreciablemente las propiedades mecánicas de la esponja, con una desmineralización controlada se podría dar a la esponja las características mecánicas deseadas.

V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

De acuerdo con el objetivo planteado, de obtener una esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón utilizando una técnica de bajo impacto ambiental, las conclusiones y recomendaciones que se obtienen de esta investigación son:

Licuar el cefalotórax de camarón con agua consigue eliminar parte de las proteínas presentes aumentando la proporción de quitina de 18%, en el cefalotórax de camarón, a 27%, en el cefalotórax parcialmente desproteinizado, evitando el uso de soluciones alcalinas para desproteinizar.

La mezcla metanol, agua y cloruro de calcio es un buen disolvente para quitina. Se prefiere la formada por un mol de metanol, cuatro moles de agua y un mol de cloruro de calcio (disolvente MAC-141). La extracción de quitina, del cefalotórax de camarón, se realiza a 25°C durante 48 horas con una relación 1:10.

La quitina se disuelve cuando el calcio rompe los puentes de hidrógeno de la quitina. En la solución saturada de metanol-agua-cloruro de calcio, el calcio tiene su envoltura de solvatación iónica incompleta. Para completarla se une a la quitina, formando un complejo soluble, rompiendo los puentes de hidrógeno de la quitina.

La solución de quitina, en la mezcla metanol-agua-cloruro de calcio, es estable; evidenciado por la pequeña disminución de la viscosidad de la solución (<5%) durante el periodo de estudio de 40 días. El grado de acetilación (0.77) de las moléculas de quitina, en la esponja de quitina, in-

dica que el método utilizado para la formación de la esponja no es agresivo con la molécula de quitina.

La solución de quitina, por la presencia de proteínas disueltas, puede formar espuma que, al perder el disolvente, origina una esponja. La esponja de quitina se obtiene sin necesidad de liofilizar.

La esponja de quitina, que se obtiene del cefalotórax de camarón por disolución y precipitación, en disolvente MAC-141 a 25°C y 48 horas de extracción, está compuesta de 57% de quitina, 14% de proteínas y 29% de carbonato de calcio.

La esponja de quitina, obtenida por disolución y precipitación, posee propiedades mecánicas parecidas a las propiedades de una esponja de poliestireno comercial. La esponja de quitina podría ser un sustituto de la espuma de poliestireno en la elaboración de recipientes desechables para comida. A diferencia del poliestireno la esponja de quitina es biodegradable (Barrera, 2008; Flores, 2004).

La esponja de quitina se puede obtener por métodos poco contaminantes. En la metodología empleada los residuos generados se pueden reaprovechar. El disolvente se puede reciclar²⁶. Todas las operaciones se realizan a temperatura ambiente. La materia prima es un desecho de la industria de alimentos y el producto final, luego de su vida útil, es fácilmente biodegradable.

A *grosso modo* se estimó el precio que tendría fabricar una bandeja de esponja de quitina. Se consideró, para el cálculo, el costo de los reactivos empleados. Es decir, los componentes del disolvente MAC. Estos reactivos se recuperan después del uso, para elaborar más disolvente, con una eficiencia estimada de 98%. El cálculo de costo está en función del 2% de reactivos que no se recuperan. Se parte de un kilogramo de cefalotórax de camarón fresco, con un 79% de humedad. La extracción sólido-líquido se repite tres veces. La cantidad de MAC-141 que no se recupera es de 49 g (25 g de CaCl₂, 9 mL de MeOH y 16 mL de H₂O). Se escala luego a una tonelada de cefalotórax de camarón fresco (ver Tabla V-1). La materia prima, el cefalotórax, es un residuo de la industria de alimentos y no tiene ningún costo. Un gramo de PS cuesta 0.01

²⁶ El cloruro de calcio es un subproducto en la elaboración de carbonato de sodio por el proceso Solvay

MXN y en forma de bandeja cuesta 0.12 MXN el gramo. La SPQ cuesta 10 veces más, el mayor gasto se traduce en ahorro al evitar contaminar el ambiente, alargar la vida útil de los rellenos sanitarios y reemplazar el uso de derivados del petróleo.

Tabla V-1. Estimación del costo de una bandeja de esponja de quitina a nivel laboratorio (reactivos grado ACS) y nivel industrial (reactivos grado técnico)

Nivel:	Laboratorio (1 kg CC fresco)	Industrial (1 Ton CC fresco)
SPQ	17 g	17 kg
CaCl ₂	118 MXN	19958 MXN
MeOH	2.4 MXN	1184 MXN
Costo de un gramo de SPQ	7 MXN	1.24 MXN

Precios obtenidos de las redes internacionales, internet, al mes de enero de 2008

Recomendaciones

Para obtener una mayor concentración de quitina en el cefalotórax de camarón parcialmente desproteínizado, el licuado se debe filtrar con una malla de tamaño de poro pequeño (~100µm) para poder retener las pequeñas partículas de quitina producidas.

Se debe ensayar realizar la extracción sólido-líquido con el cefalotórax parcialmente desproteínizado fresco en lugar de secar previo a la extracción. Se ahorraría energía y probablemente mejore la extracción.

Se debe optimizar (mecanizar) el proceso de filtración por prensado, pues debido a la alta viscosidad de la solución de quitina y cefalotórax, no se logra separar totalmente la solución, reduciendo la eficiencia del proceso de separación.

Con la desmineralización controlada de la esponja de quitina se pueden variar sus propiedades mecánicas y obtener una esponja con las propiedades mecánicas deseadas.

Se debe experimentar la disolución de quitina con otras sales con cationes de diferente radio iónico y valencia y, también, con otros alcoholes, para una mejor comprensión del fenómeno de disolución.

En la espuma de quitina se debe probar cambiar el agua, en etapas, por otro disolvente o mezcla de disolventes para tratar de disminuir la pérdida de volumen durante el secado.

Para mejorar la resistencia de la esponja de quitina al agua se debe ensayar la adición de agentes de entrecruzamiento (Berger y col., 2004) o recubrir la esponja con un sellador biodegradable (Benyus, 1997).

Si la espuma de quitina se liofiliza, en lugar de secar al ambiente, se lograría obtener una esponja de quitina muy ligera que podría servir como aislante.

La quitina está presente en la Tierra desde hace 580 millones de años –en el exoesqueleto de los trilobites (Margulis y Sagan, 2001)– tiempo suficiente para que la naturaleza aprendiera a degradarle, en cambio, los polímeros sintéticos no tienen más de 100 años en uso y la naturaleza aún no sabe como tratar con ellos. Es cuestión de tiempo para que suceda, pero no podemos esperar. Debemos estar dispuestos a consumir productos amigables con el ambiente aunque estos tengan un costo inmediato más elevado pero el costo a largo plazo será menor.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, T., Chiang, K., Seng, H.** 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 205-212
- Akimasa, K., Kazushirou, A.** 1998. Biodegradable resin molded product. Patente No. JP10-152567, Japón
- Akira, H., Yuji, N., Tetsuya, A.** 1993. Production of chitin, chitosan and calcium salt thereof. Patente No. JP5271303, Japón
- Amass, W., Amass, A., Tighe, B.** 1998. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer international* 47, 89-144
- Anastas, P., Warner, J.** 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, Nueva York, EE.UU.
- Anónimo.** 1999. More solutions to sticky problems. Brookfield Engineering Labs. Ma., EE.UU.
- Askeland, D., Phulé, P.** 2004. *Ciencia e ingeniería de los materiales*. 4ta Ed., pp. 235-253, Thomson, México
- ASTM.** 2003a. Standard test method for water absorption of plastics. *Annual Book of ASTM Standards*. Vol 08.01, pp. 32-34, Filadelfia, EE.UU.
- ASTM.** 2003b. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 08.01, pp. 161-169, Filadelfia, EE.UU.
- Austin, P.** 1977. Chitin solution. Patente No. US4059457, EE.UU.
- Barrera, S.** 2008. *Extracción de quitina del cefalotórax de camarón fresco para la elaboración de películas*. Tesis de Ingeniería en Alimentos, UNAM, FES Cuautitlán, Edo. de México (en prensa)

- Benyus, J.** 1997. *Biomimicry: Innovation inspired by nature*. P. 126, Morrow and Company, Nueva York, EE.UU.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Felt, O., Peppas, N., Gurny, R.** 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 19-34
- Black, M., Schwartz, H.** 1950. Estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst* 75, 185-189
- Blackwell, J.** 1988. Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Methods in enzymology* 161, 435-442
- Box, G., Hunter, W., Hunter, J.** 1999. *Estadística para investigadores*. Ed. Reverté, México D.F., México
- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., Miranda, P.** 2004. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C Cross polarization/Mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science* 93, 1876-1885
- Chang, K., Tsai, G.** 1997. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from Pink Shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1900-1904
- Chow, K., Khor, E.** 2000. Novel fabrication of open-pore chitin matrix. *Biomacromolecules* 1, 61-67
- Chow, K., Khor, E., Aun, A.** 2001. Porous chitin matrices for tissue engineering: Fabrication an *in vitro* cytotoxic assessment. *Journal of Polymer Research* 8, 27-35
- Cira, L., Huerta, S., Hall, G., Shirai, K.** 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37, 1359-1366
- CONAPESCA.** 2004. *Anuario estadístico de acuacultura y pesca*. Ed. 2004, Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, Sinaloa, México
- Connors, K.** 1975. *A Textbook of Pharmaceutical Analysis*. 2da Ed., pp. 319, 320, Wiley Interscience Pub. EE.UU.
- Einbu, A., Nahum, S., Elgsaeter, A., Vårum, K.** 2004. Solution properties of chitin in alkali. *Biomacromolecules* 5, 2048-2054
- Flores, R.** 2004. *Bioplástico de quitina*. Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM, México D.F., México

- Flores, R., Barrera, S., Durán, C.** 2004. Extracción ecológica de quitina y subproductos. Solicitud de Registro de Patente, IMPI. PA/a/2004/009517, México
- Gennaro, A.** (Ed). 1990. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 18a Ed., p. 212, Mack Publishing Company, Penn. EE.UU.
- Glicksman, M.** (Ed.) 1982. *Food Hydrocolloids*. Vol. 1, CRC Press, Florida, EEUUA, citado por Lewis, M. 1993. *Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado*. Ed. Acribia, p. 156. Zaragoza, España
- Ha, S., Park, Y., Hudson, S.** 2003. Dissolution of *Bombix mori* silk fibroin in the calcium nitrate tetrahydrate-methanol system and aspects of wet spinning of fibroin solution. *Biomacromolecules* 4, 488-496
- Hao, B.** 2003. Compositions for photodegradable and biodegradable plastic product and use thereof. Patente No. EP1359190, Unión Europea
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M., Rinaudo, M.** 2000. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 1, 746-751
- Horwitz, W.** (Ed.). 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13a Ed., Pub. AOAC Intl. Washington, DC, EE.UU.
- ICSC 0259.** 1994. International Chemical Safety Cards (en línea). N,N-Dimetilacetamida. <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspn0259.htm> última actualización 1994 (citado el 9 de septiembre de 2005)
- Khor, E.** 2002. Chitin: A biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 6, 313-317
- Kifune, K., Tanae, H., Yamaguchi, Y., Motosugi, K.** 1986. Porous chitin shaped article and production thereof. Patente No. US4575519, EE.UU.
- Kjartansson, G., Zivanovic, S., Kristbergsson, K., Weiss, J.** 2006. Sonication-assisted extraction of chitin from shells water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3317-3323
- Kurita, K.** 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science* 26, 1921-1971
- Margulis, L., Sagan, D.** 2001. *Microcosmos*. 2da Ed., p. 198, Tusquets Editores, Barcelona, España

- Mathur, A., Tonelli, A., Rathke, T., Hudson S.** 1997. The dissolution and characterization of *Bombyx mori* silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films. *Biopolymer* 42, 61-74
- Megyes, T., Grósz, T., Radnai, T., Bakó, I., Pálincás G.** 2004. Solvation of calcium ion in polar solvents: an X-ray diffraction and ab initio study. *The Journal of Physical Chemistry A* 108, 7261-7271
- Mitsunori, I., Toshihisa, K.** 1995. Preparation of chitin sponge, chitin paper and chitin film. Patente No. JP7316202, Japón
- Morrison, R.** 1994. Biofoam II. Patente No. US5360828, EE.UU.
- Morrison, R.** 1995. Biofoam. Patente No. US5382285, EE.UU.
- Motoyasu, N.** 2001. Cellulose acetate based resin foam with biodegradability and also excellent mechanical property and heat moldability, and cellulose acetate based resin foam molded article with biodegradability and also excellent mechanical property and dimensional stability. Patente No. JP2001-200084, Japón
- Muralidhara, H.** 1981. Recovery of active chitin and enhanced protein meal. Patente No. US4293098, EE.UU.
- Muzzarelli, R.** 1977. *Chitin*. Pergamon Press, Londres, Reino Unido
- Nakajima, A., Tanaami, K.** 1973. Dissolution and chain dimensions of nylon 6 in metal halide-alcohol systems. *Polymer Journal* 5, 248-254
- No, H., Meyers, S., Lee, K.** 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 575-579
- Okada, M.** 2002. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* 27, 87-133
- Peniston, Q., Johnson, E.** 1980. Process for the recovery of chemicals from the shells of crustacean. Patente No. US4199496, EE.UU.
- Percot, A., Viton, Ch., Domard, A.** 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* 4, 12-18
- Petersen, K., Nielsen, P., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M., Nilsson, N., Mortensen, G.** 1999. Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 10, 52-68

- Raabe, D., Al-Sawalmih, A., Yi, S., Fabritius, H.** 2007. Preferred crystallographic texture of α -chitin as a microscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Acta Biomaterialia* 3, 882-895
- Raabe, D., Sachs, C., Romano, P.** 2005. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia* 53, 4281-4292
- Ravi Kumar, M.N.V.** 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 46, 1-27
- Reeves W., Chen, L.** 2003. Regenerated carbohydrate foam composition. Patente No. US2003/0143388, EE.UU.
- Rinaudo, M.** 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632
- Roberts, G.** (Ed). 1992. *Chitin chemistry*. Macmillan Press Ltd. Londres, Reino Unido
- Romo, L.** 1981. *Coloideofísica, coloidoquímica y fenómenos de superficie*. Ed. Universitaria, Quito, Ecuador
- Romo, L.** 1993. *Emulsiones: Fundamentos fisicoquímicos, formulación y aplicaciones*. Ed. Universitaria, Quito, Ecuador
- Ryogo, H., Masa, I.** 1995. Preparation of composite porous body made of vegetable fiber and chitosan. Patente No. JP7179649, Japón
- Seiichi, T., Yutaka, T.** 2005. Simple method for producing chitin gel from shell of crustacea. Patente No. JP2005-036109, Japón
- Seol, Y., Lee, J., Park, Y., Lee, Y., Ku, Y., Rhyu, I., Lee, S., Han, S., Chung, Ch.** 2004. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters* 26, 1037-1041
- Shahidi, F., Synowiecki, J.** 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1527-1532
- Shahidi, F., Vidana, J., Jeon, Y.** 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10, 37-51
- Singer, N., Wooten, J.** 2003. Method of extracting chitin from the shells of exoskeletal animals. Patente No. US2003/0060610, EE.UU.
- Stieg, F.** 1966. Method of forming a cellulose sponge. Patente No. US3261704, EE.UU.

- Striegel, A.** 1997. Theory and applications of DMAc/LiCl in the analysis of polysaccharides. Carbohydrate Polymer 34, 267-274
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S.** 1994. *Gestión integral de residuos sólidos*. P. 825, McGraw-Hill, Madrid, España
- Torres, L.** 2007. *Extracción de caroteno-proteínas de cefalotórax de camarón con aceites comestibles*. Tesis de Química de Alimentos, UNAM, Facultad de Química, México D. F.
- Vachoud, L., Zydowicz, N., Domard, A.** 2000. Physicochemical behaviour of chitin gels. Carbohydrate Research 326, 295-304
- Van de Velde, K., Kiekens, P.** 2004. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. Carbohydrate Polymers 58, 409-416
- Wahab, A., Mahiuddin, S.** 2001. Isentropic compressibility and viscosity of aqueous and methanolic calcium chloride solutions. Journal of Chemical and Engineering Data 46 1457-1463
- Yilmaz, E., Bengisu, M.** 2003. Preparation and characterization of physical gel and beads from chitin solutions. Carbohydrate Polymers 54, 479-488
- Yusof, N., Lim, L., Khor, E.** 2004. Flexible chitin films: structural studies. Carbohydrate Research 339, 2701-2711