



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RESIDUOS DE  
CRUSTÁCEOS: OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA DEL  
CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN POR MÉTODOS ECOLÓGICOS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. I. PAULINA SARABIA BAÑUELOS



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

AÑO: 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

---

## JURADO DESIGNADO

Presidente	Dr. Federico Alfredo García Jiménez
Vocal	Dr. Rafael Herrera Nájera
Vocal	Dr. Jesús Gracia Fadrique
Vocal	Dr. Gabriela Roa Morales
Secretario	M.C. José Manuel Méndez Stivalet

## LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

Laboratorios 301, 302, 303. Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM; con apoyo económico del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, PAIP de la Facultad de Química de la UNAM, México D. F.

## SUSTENTANTE

Q. I. Paulina Sarabia Bañuelos



---

## TUTOR PRINCIPAL

Profa. Dra.-Ing. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa



---

---

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

*A mi tutora: Dra. Carmen Durán Domínguez de Bazúa por su apoyo*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca con número de becario 235582 asignada para realizar los estudios de posgrado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM.*

*A los miembros del jurado:*

*Dr. Federico Alfredo García Jiménez  
Dr. Rafael Herrera Nájera  
Dr. Jesús Gracia Fadrique  
Dra. Gabriela Roa Morales  
M. en C. José Manuel Méndez Stivalet*

*A la Dra. Marisela Bernal Gonzáles y el Dr. Ronny Adrián Flores Ortega por su valioso apoyo a lo largo de esta investigación, ya que como este programa no cuenta con comité tutorial, tuve su asesoría durante los cuatro semestres.*

*A todos los compañeros y personal de los Laboratorios 301, 302 y 303 por su apoyo y solidaridad.*

---

## **LUGAR DE TRABAJO**

*Laboratorios 301-302-303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. Edificio E-3. Facultad de Química. UNAM*

*Laboratorio 312 de Biotecnología y Alimentos. Edificio E-3. Facultad de Química. UNAM*

### ***Presentaciones en congresos y otros eventos:***

*2010. XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: obtención de quitina y quitosana del cefalotórax de camarón por métodos ecológicos. San Francisco de Campeche, Campeche. Agosto 31-Septiembre 3. Presentación en forma oral.*

*2010. Premio al Mejor Cartel en la Mesa Redonda sobre Tecnologías más Limpias. Minisimposio Internacional sobre Remoción de Contaminantes de Agua, Atmósfera y Suelos. Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos, producción verde de quitina y quitosana. UNAM. México. D.F. Septiembre 8-11.*

*2011. Seminarios Académicos de Ingeniería y Química Ambientales. XXX. México D.F. Abril 8. Presentación en forma oral.*

*2011. Primer Congreso de Alumnos de Posgrado. Ciudad Universitaria. México. D.F. 18, 19 y 20 de mayo. Presentación en forma de cartel y oral.*

*2011. IV Congreso Internacional de la Academia Mexicana de Ciencias, Artes, Tecnología y Humanidades. XXX. Querétaro, Querétaro. Junio 29-Julio 2. Presentación en forma oral.*

---

---

## RESUMEN

La producción total mexicana pesquera y de acuacultura se valuó en MXN\$12.9 mil millones en 2001. Dentro de esta producción se encuentra el camarón, ya que aunque proporcionalmente su contribución es menor en términos de la masa total, es mucho más alta en términos de valor económico. Durante la industrialización del camarón, los caparazones y el cefalotórax de los crustáceos son desechados por las embarcaciones en alta mar o por las fábricas empacadoras y se acumulan en enormes basurales que constituyen un serio residuo contaminante, provocando el deterioro ambiental y la proliferación de fauna nociva y representando un impacto ambiental negativo, cuando podrían aprovecharse como un subproducto. Las investigaciones realizadas desde la década de los 70 del Siglo XX demuestran que el cefalotórax y exoesqueleto de camarón (CC) está formado en parte por quitina, polímero con limitada aplicación debido a su baja solubilidad. A partir de éste existe un derivado desacetilado, la quitosana, polímero soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, permitiéndole más aplicaciones en el área alimentaria, farmacéutica, etc., incluso en el tratamiento de aguas residuales, como agente coagulante. Para la obtención de la quitina a partir de CC existen una serie de operaciones unitarias: limpieza del CC fresco, lavado con agua, licuado, filtrado y tamizado para obtener CC parcialmente desproteínizado (CPD) utilizado para la extracción de quitina. En los Laboratorios 301 a 303 de la Facultad de Química de la UNAM se desarrolló un método patentado siguiendo la química verde para la extracción de quitina a partir de CPD y disolvente MAC-141© (1 mol de metanol-4 moles de agua-1 mol de cloruro de calcio), la cual se obtiene en forma líquida. En esta investigación se utilizó la metodología anterior adicionada de una operación unitaria, la sonicación<sup>1</sup>, obteniendo además quitosana parcialmente desacetilada. Las condiciones de sonicación estudiadas fueron 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a tres temperaturas (45, 55, 60°C). Durante el proceso de extracción los grupos amida fueron removidos y los grupos amina fueron cuantificados en el polímero, determinando el grado de desacetilación, empleando el criterio de la primera derivada, espectroscopía de infrarrojo y solubilidad. El porcentaje de desacetilación obtenido a las condiciones estudiadas fue de 8.75, 14.87 y 29.6% a 25°C. Esto indica que la adición de la sonicación ha demostrado ser un método adecuado para desacetilar la quitina a quitosana porque produce un efecto de vibración (efecto de cavitación) sobre los enlaces de los grupos acetamida. Será importante continuar estos estudios para dilucidar el mecanismo preciso que promueve la desacetilación para incrementar su porcentaje sin aumentar el consumo energético.

### Palabras clave:

### RESIDUOS DE CRUSTÁCEOS, QUITINA, QUITOSANA, CEFALOTÓRAX Y EXOESQUELETO DE CAMARÓN, QUÍMICA VERDE

---

<sup>1</sup> Las palabras sonicación y sonicar no existen en el diccionario de la lengua española, 22ª edición. Sin embargo, se usarán en esta tesis ya que son las idóneas (jerga química) para describir esta operación unitaria

---

## ABSTRACT

In Mexico, the total production of fisheries including aquaculture was valued at MXN\$12.9 billions in 2001. In this production, shrimp although relatively smaller in mass is much higher in terms of economic value. During the industrialization of shrimp its cephalothorax and exoskeleton are discarded by capturing ships to the ocean or in the processing factories accumulating in large amounts, and constituting a polluting waste, causing environmental degradation, and the proliferation of harmful fauna. Thus, it represents a negative environmental impact instead of being considered as a valuable by product. Research made since the 70's in the XX Century showed that cephalothorax and skeletons of shrimp (CC) contain chitin, a polymer with limited application due to its low solubility. Thus, a deacetylated derivative of chitin, chitosan, was chemically or enzymatically produced, since it is a more soluble polymer in organic solvents with many applications in the food and pharmaceutical industries, and even for wastewater treatment as a coagulant agent. For obtaining chitin from CC it is necessary to apply several unit operations: cleaning, washing with tap water, blending, and filtering. This intermediate product, partially deproteinized cephalothorax (CPD) is used for the extraction of chitin. In the UNAM Faculty of Chemistry Laboratories 301-302-303 a green chemistry methodology was developed and patented for the extraction of chitin from CPD using a solvent known as MAC-141 © (1 mole of methanol-4 moles of water-1 mole of calcium chloride), with which soluble chitin is obtained. In this research this methodology was applied followed by another operation, sonication, with which partially deacetylated chitosan was obtained besides chitin. Sonication conditions were 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulses per second at four different treatment times (0, 5, 10, 15 minutes) and further heating for 40 minutes at three temperatures (45, 55, 60°C). During the extraction process the amide groups were removed and the amine groups were quantified in the polymer, determining the degree of deacetylation, using the first derivative criterion, as well as infrared spectroscopy and solubility. The percentages of deacetylation were 8.75, 14.87 and 29.6%, 25°C. Thus, sonication has proved to be a suitable method to obtain chitosan from extracted chitin due to the vibration effect (namely cavitation effect) on the links of the acetamide groups and, as a consequence, it is possible to obtain the deacetylated polymer. It will be important to continue these studies to elucidate the precise mechanism that promotes deacetylation in order to increase its percentage without increasing energy consumption.

Key Words:

**CRUSTACEAN RESIDUES, CHITIN, CHITOSAN, SHRIMP CEPHALOTHORAX AND EXOSKELETON, GREEN CHEMISTRY**

---

## SIMBOLOGÍA

AMT	Masa y tiempo exacto por sus siglas en inglés ( <i>accurate mass and time</i> )
ATR	Espectroscopía de Reflectancia total atenuada ( <i>Attenuated total reflectance</i> )
CC	Cefalotórax y exoesqueleto de camarón
CDA;EC 3.5.1.41	Nomenclatura de la enzima quitina desacetilasa por sus siglas en inglés ( <i>chitin deacetylase</i> ). EC es comisión de enzimas. La numeración indica: 3-hidrolasa, 5-acción sobre los enlaces Carbono- Nitrógeno, 1-acción en amidas lineales, 41-quitina desacetilasa.
CPD	Cefalotórax y exoesqueleto parcialmente desproteinizados
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier ( <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
GRAS	Siglas en inglés para definir a una sustancia como “reconocida como segura” ( <i>generally recognized as safe</i> )
IR	Espectroscopía de infrarrojo ( <i>infrared spectroscopy</i> )
kPa	Kilopascal
MAC-141	Disolvente con 1 mol de metanol-4 moles de agua-1 mol de cloruro de calcio
min	Minuto
MXN\$	Pesos mexicanos
PAIP	Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado
psi	Unidad de presión del sistema inglés cuyo valor equivale a 1 libra fuerza ( <i>pound</i> ) por pulgada cuadrada ( <i>square inch</i> ) [14.7 <i>psi</i> en valor absoluto, <i>psia</i> ]. Cuando es manométrica (y debe adicionarse la presión del sitio donde se mide, se conoce como <i>psig</i> [ <i>gauge</i> , medidor]
p/s	Pulsos por segundo para la sonicación
T	Toneladas
USAI	Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación
Tem	Temperatura
Letras griegas	
$\Delta$ pH	Cambio o variación en el potencial de hidrógeno
$\Delta$ V NaOH	Cambio o variación en el volumen de hidróxido de sodio

---

---

## GLOSARIO

<b>Acuicultura</b>	Es el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de cultivo de especies acuáticas vegetales y animales.
<b>Agroquímico</b>	Es una sustancia química o una mezcla de sustancias, destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas.
<b>Antimicrobiana</b>	Dicho de una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios, tales como las bacterias, hongos, parásitos o virus.
<b>Base de Schiff'</b>	Nombrado así en honor a Hugo Schiff, es un grupo funcional que contiene un enlace doble carbono-nitrógeno, con el átomo de nitrógeno conectado a un grupo arilo o alquilo, pero sin hidrógeno. Las bases de Schiff tienen la fórmula general $R_1R_2C=N-R_3$ , donde $R_3$ es un grupo arilo o alquilo que hace que la base de Schiff sea una imina estable.
<b>Biocidas</b>	Son sustancias químicas sintéticas, naturales o de origen biológico o físico y están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier microorganismo considerado nocivo para el hombre.
<b>Biocompatibilidad</b>	Materiales naturales que pueden implementarse y complementarse para ser más útiles y eficientes.
<b>Bioestimulante</b>	Extracto natural que permite procesos metabólicos de las plantas, sin desequilibrarlos.
<b>Biomasa</b>	Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.
<b>Biopolímero</b>	Compuestos con alta masa <sup>2</sup> molecular que pueden extraerse de una materia prima natural. Su principal característica es que pueden degradarse en el ambiente como lo hace la materia orgánica proveniente de seres vivos.
<b>Biosfera</b>	Es el sistema material formado por el conjunto de los seres vivos propios del

---

<sup>2</sup> El peso, en física, es la medida de la fuerza que ejerce la gravedad sobre la masa de un cuerpo. Normalmente, se considera respecto de la fuerza de gravedad terrestre. El peso depende de la intensidad del campo gravitatorio, de la posición relativa de los cuerpos y de la masa de los mismos. La masa es una propiedad característica de los cuerpos: la cantidad de materia y no depende de la intensidad del campo gravitatorio, ni de su posición en el espacio. Por ejemplo, una persona de 60 kg de masa, pesa 60 kg-fuerza en la superficie de la Tierra; pero, la misma persona, en la superficie de la Luna pesaría sólo unos 10 kg-fuerza; sin embargo, su masa seguirá siendo de 60 kg. Las unidades de peso y masa tienen una larga historia compartida, en parte porque su diferencia no fue bien entendida cuando dichas unidades comenzaron a utilizarse. Cotidianamente, el término "peso" se utiliza a menudo erróneamente como sinónimo de masa. La unidad de masa del SI es el kilogramo, kg

---

	planeta. Es incorrecto usar acento ortográfico como palabra esdrújula ya que solamente atmósfera puede escribirse así, además de atmosfera (como palabra con acento prosódico).
<b>Bromatología</b>	Es la ciencia que estudia los alimentos desde varios aspectos, tales como valor nutritivo, sensorial, higiénico, sanitario y de química analítica, incluyendo la higiene, toxicidad y otras alteraciones.
<b>Camaronicultura</b>	Hace referencia al cultivo por el ser humano de camarones.
<b>Cefalotórax</b>	Es la parte del cuerpo de los crustáceos y arácnidos formada por la unión de la cabeza y el tórax en una única unidad funcional.
<b>Celulosa</b>	Polisacárido compuesto de moléculas de glucosa; es pues un homopolisacárido.
<b>Coagulante</b>	Es una sustancia que favorece la separación de una fase insoluble en agua por medio de sedimentación. Un coagulante es un compuesto químico que inestabiliza la materia suspendida en forma coloidal, a través de la alteración de la capa iónica cargada eléctricamente que rodea a las partículas coloidales.
<b>Desacetilación</b>	Es el proceso de eliminación de los grupos acetilo en la molécula de quitina con hidróxido de sodio y temperaturas de hasta 100°C.
<b>Desmineralización</b>	Se entiende la eliminación de las sales disueltas (iones catiónicos y aniónicos).
<b>Elongación</b>	Alargamiento que sufre un cuerpo que se somete a esfuerzos de tracción.
<b>Enzimas</b>	Son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible (pueden hacer que el proceso sea termodinámicamente más favorable).
<b>Exoesqueleto</b>	Es el esqueleto externo continuo que recubre toda la superficie de los animales artrópodos (arácnidos, insectos, crustáceos, miriópodos), donde cumple una función protectora, de respiración y otra mecánica, proporcionando el sostén necesario para la eficacia del aparato muscular. Debido a esta función es muy resistente al ataque de sustancias químicas. Se conoce coloquialmente como caparazón.
<b>Fibrilar</b>	Que tiene la propiedad de contraerse de forma repentina e incontrolada.
<b>Fibroplasia</b>	Formación de carácter fibroso.
<b>Floculación</b>	Es un proceso químico mediante el cual, con la adición de sustancias denominadas floculantes, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación y posterior filtrado.
<b>Glucopiranososa</b>	Formas cíclicas posibles de la D-glucosa. Puede observarse que el ciclo formado

---

---

	es de seis átomos, cinco carbonos y un oxígeno.
<b>Glucanohidrolasa</b>	Enzima que actúan sobre porciones amorfas de las fibras de celulosa y rompen enlaces glucosídicos generando oligosacáridos de distintas longitudes.
<b>Hidrogel</b>	Es un sistema en estado coloidal con apariencia sólida que se hincha y aumenta de volumen por absorción de agua y sustancias disueltas.
<b>Histona deacetilasa</b>	Es un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas. Las histonas deacetilasas eliminan los grupos acetilo de la lisina y arginina, incrementando la carga positiva de las histonas y, por lo tanto, la afinidad de ésta al ADN. Este incremento de la unión condensa la estructura del ADN e impide la transcripción.
<b>Jitomate, tomate</b>	Los tomates ( <i>Physalis angulata</i> L.) y jitomates ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) son frutas obtenidas de plantas originarias de México y sus nombres vienen del náhuatl, la lengua de los aztecas. <i>Tomatl</i> significa gordura y es un fruto verde que sirve para preparar guisos o salsas y <i>xitomatl</i> , tomate con ombligo ( <i>xictli</i> ombligo y <i>tómatl</i> , tomate) se usa para designar al fruto rojo (Cabrera, 2002)
<b>Oligómero</b>	Es una molécula con radicales asociados distintos entre sí. En cambio, un polímero es una molécula con dos o más radicales de la misma especie.
<b>Organolépticas</b>	Conjunto de descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color.
<b>Peptización</b>	Un proceso generalmente indeseado, en el que un precipitado cristalino al entrar en contacto con el disolvente frío, retorna a su primitiva forma coloidal.
<b>Polímero</b>	Es una macromolécula (generalmente orgánicas) formada por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros.
<b>Poliamina</b>	Es una molécula de naturaleza policatiónica presente tanto en plantas, animales y microorganismos. En plantas actúa como fitohormona (reguladora del crecimiento) o como segundo mensajero. Estudios bioquímicos señalan que tiene un importante efecto en el desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta al estrés.
<b>Polielectrolito</b>	Polímero que posee grupos electrolitos (sustancia que contiene iones libres, se comportan como un medio conductor eléctrico).
<b>Polimerización</b>	Es un proceso químico por el que los reactivos, monómeros (compuestos de baja masa molecular) se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de mayor masa, llamada polímero, bien una cadena lineal o una macromolécula tridimensional.

---

---

<b>Proteasa</b>	Enzima proteolítica que fragmenta las proteínas en partes más pequeñas.
<b>Quitina</b>	Es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Éstas están unidas entre sí con enlaces $\beta$ -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa que componen la celulosa.
<b>Quitinasas</b>	Son enzimas que degradan la quitina, hidrolizándola. Estas enzimas se encuentran en una gran variedad de organismos, como: bacterias, virus y hongos, hasta plantas y animales tanto invertebrados como vertebrados. En hongos las quitinasas cumplen funciones autolíticas, nutricionales y morfogenéticas; en las bacterias cumple un papel en la digestión de quitina para la obtención de energía a partir de ésta; en crustáceos e insectos, las quitinasas participan en los procesos de muda, mientras que en las plantas, actúan en la defensa y desarrollo.
<b>Quitosana<sup>3</sup></b>	Es un derivado polimérico desacetilado que se obtiene a partir de la quitina.
<b>Repetibilidad</b>	Incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones, el mismo lugar y repetición dentro de un período de tiempo corto.
<b>Reproducibilidad</b>	Cercanía entre los resultados de las mediciones de la misma magnitud por medir, afectada bajo condiciones de medición diferentes. Las condiciones que cambian pueden ser el principio de medición, el método de medición, el observador, el instrumento de medición, el patrón de referencia, el lugar, las condiciones de uso y el tiempo.
<b>Sonicación</b>	Consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada, se pueden destruir asimismo las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se aplica en frío para evitar el sobrecalentamiento que podría provocar la desnaturalización de las proteínas.

---

<sup>3</sup> Quitosana, también conocida como *quitosano*, *quitosán*, *quitosan*, es una goma derivada sintéticamente de la quitina por desacetilación. De acuerdo con la nomenclatura química, los nombres de las gomas tienen como prefijo el compuesto del que se originan y como sufijo la terminación *ana*. Ejemplos de esta forma de nombrar a estos compuestos son la dextrana, la xantana, la pululana, etc. Siendo una goma derivada de la quitina, debiera haberse llamado quitana, pero por motivos históricos se le ha llamado quitosana, palabra que será usada en este documento

---

**Termogravimetría** (TG) Basada en la medida de la variación de la masa, cuando se somete a un cambio de temperatura en atmósfera controlada. La variación puede ser pérdida o ganancia de masa y dará información sobre si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes.

**Nota:**

**Esta tesis utiliza el PUNTO DECIMAL de acuerdo con la NOM-008-SCFI-2002 modificada en el Diario Oficial de la Federación del jueves 24 de septiembre de 2009, que permite el uso, ya sea del punto o de la coma decimales.**

---

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Simbología	vii
Glosario	viii
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PROBLEMÁTICA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN Y PROPUESTA DE SOLUCIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	6
1.3.1. General	6
1.3.2. Específicos	6
1.4. ALCANCES	6
Capítulo II. FUNDAMENTO TEÓRICO	7
2.1. PRODUCCIÓN DE CAMARÓN	7
2.2. IMPORTANCIA AMBIENTAL DEL APROVECHAMIENTO DEL CEFALOTÓRAX Y EXOESQUELETO DEL CAMARÓN	8
2.3. MERCADO MUNDIAL DE QUITINA Y QUITOSANA	9
2.4. IMPORTANCIA DE LA QUITINA Y LA QUITOSANA	11
2.4.1. Uso de quitina y quitosana como fibra dietética	11
2.4.2. Uso de quitina y quitosana en farmacología	12
2.4.3. Uso de la quitina y la quitosana en el área textil	12
2.4.4. Uso de la quitina y la quitosana en la industria alimentaria	12
2.5. DIFERENTES METODOLOGÍAS PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA	13
2.5.1. Método enzimático	13
2.5.2. Método por biodegradación	15
2.5.3. Métodos físicos	15
2.5.4. Método químico	18
2.6. MÉTODOS QUÍMICOS COMÚNMENTE UTILIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA	19
2.7. CARACTERÍSTICAS DE LA QUITINA Y LA QUITOSANA	21
2.8. DIFERENCIACIÓN ENTRE LA QUITINA Y LA QUITOSANA	22
Capítulo III. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITINA Y SU DESACETILACIÓN PARCIAL	24
3.1.1. Análisis por sonicación: relación tiempo/radiación	24
3.1.2. Análisis por sonicación: relación tiempo / radiación / calentamiento (45, 55 y 60°C)	25

	Pág.
<b>3.2. MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1. Preparación del cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD)</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2. Caracterización del CPD</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3. Preparación del disolvente MAC-141</b>	<b>27</b>
<b>3.2.4. Obtención de quitosana</b>	<b>28</b>
3.2.4.1. Sonicación de CPD con disolvente MAC-141	28
3.2.4.2. Sonicación de CPD con disolvente MAC-141 y calentamiento a 45, 55 y 60°C	28
<b>3.2.5. Procedimiento de purificación</b>	<b>29</b>
<b>3.2.6. Grado de desacetilación: Técnica potenciométrica</b>	<b>29</b>
<b>3.2.7. Pruebas de solubilidad</b>	<b>31</b>
<b>3.2.8. Espectroscopía de infrarrojo (IR)</b>	<b>31</b>
<b>3.2.9. Análisis estadísticos</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>4.1. EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA</b>	<b>32</b>
4.1.1. Datos de los experimentos de CPD con MAC-Sonicación	32
4.1.2. Caracterización de M3	34
4.1.3. Caracterización de M2	39
4.1.4. Caracterización de M1	42
<b>4.2. DATOS EXPERIMENTALES DE CPD CON MAC-141 USANDO SONICACIÓN MÁS CALENTAMIENTO A 45, 55, 60°C</b>	<b>47</b>
4.2.1 Caracterización de M4	48
<b>4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</b>	<b>51</b>
4.3.1. Análisis estadístico relación tiempo/radiación	51
4.3.2. Análisis estadístico por sonicación: relación tiempo/radiación/calentamiento (45, 55 y 60°C)	53
<b>4.4. PROPUESTA DE MECANISMO DE REACCIÓN DE LA DESACETILACIÓN DE LA QUITINA</b>	<b>54</b>
<b>4.5. RESULTADOS DE REPETIBILIDAD OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS IDENTIFICADAS COMO QUITINA PARCIALMENTE DESACETILADA EN EL TRATAMIENTO MAC-141-SONICACIÓN</b>	<b>56</b>
<b>4.6. SOLUBILIDAD DE LAS MUESTRAS DE QUITINA PARCIALMENTE DESACETILADA</b>	<b>58</b>
<b>4.7. POSIBLES USOS DE LAS MEZCLAS DE QUITINA Y QUITOSANA OBTENIDAS EN ESTA INVESTIGACIÓN</b>	<b>61</b>
<b>4.8. DISCUSIÓN FINAL</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>68</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>5.2. RECOMENDACIONES</b>	<b>69</b>

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo A. Materiales y reactivos</b>	<b>71</b>
<b>Anexo B. Espectros de infrarrojo de quitosana Sigma</b>	<b>72</b>
<b>Anexo C. Espectro de infrarrojo de quitina Sigma (Belandria y Morillo, 2008)</b>	<b>73</b>
<b>Anexo D. Grado de desacetilación de quitina Sigma</b>	<b>74</b>
<b>Anexo E. Codificación de toxicidad de los reactivos utilizados en esta investigación</b>	<b>75</b>
<b>Anexo F. Análisis estadístico Statgraphics Plus</b>	<b>77</b>
<b>Anexo G. Grado de desacetilación de la muestra M4 y primera derivada</b>	<b>79</b>
<b>Anexo H. Datos crudos de la muestras que presentaron desacetilación</b>	<b>80</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>89</b>

### **Índice de Figuras y Tablas**

<b>Capítulo I</b>	
Figura 1.1.	Estructura química de la quitina <b>1</b>
Figura 1.2.	Estructura química de la quitosana <b>2</b>
 <b>Capítulo II</b>	
Figura 2.1.	Proporciones de volumen y valor de la producción de pesca y acuicultura <b>8</b>
Figura 2.2.	Mercado mundial de quitina y quitosana <b>10</b>
Figura 2.3.	Proyección estimada (2010) para la producción de quitina y quitosana <b>11</b>
Figura 2.4.	Mecanismo catalítico de la enzima CDA <b>14</b>
Figura 2.5	Representación esquemática de a) Calentamiento Convencional, b) Calentamiento por microondas <b>16</b>
Figura 2.6	Mecanismo de acción del ultrasonido en medio acuoso <b>17</b>
Figura 2.7	Esquema de reacción para la desacetilación alcalina de la quitina para formar quitosana <b>18</b>
 <b>Capítulo III</b>	
Figura 3.1.	Diagrama de bloques de la producción de quitina y quitosana <b>24</b>
Figura 3.2.	Titulación de HCl 0.3N con NaOH 0.1N sin muestra de quitina y quitosana <b>30</b>
 <b>Capítulo IV</b>	
Figura 4.1.	Curva de titulación de la muestra M3 para determinar el % de grupos amino (-NH <sub>2</sub> ) <b>35</b>
Figura 4.2.	Espectro de infrarrojo para caracterización de M3 <b>36</b>

	<b>Pág.</b>	
Figura 4.3.	Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo en la curva de titulación de M3	<b>38</b>
Figura 4.4.	Espectro de infrarrojo para la caracterización de M2	<b>40</b>
Figura 4.5.	Curva de titulación de la muestra M2 para determinar el % de grupos amino (-NH <sub>2</sub> )	<b>41</b>
Figura 4.6.	Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M2	<b>42</b>
Figura 4.7.	Curva de titulación de la muestra M1 para determinar el % de grupos amino (-NH <sub>2</sub> )	<b>43</b>
Figura 4.8.	Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M1	<b>44</b>
Figura 4.9.	Espectro de infrarrojo para la caracterización de M1	<b>45</b>
Figura 4.10.	Espectro de infrarrojo para la caracterización de M4	<b>49</b>
Figura 4.11.	Espectroscopía electrónica de barrido de quitina comercial: 1000x ampliaciones	<b>50</b>
Figura 4.12.	Espectroscopía electrónica de barrido de quitina sonicada: 1000x ampliaciones	<b>50</b>
Figura 4.13.	Análisis estadístico en función del tiempo de los rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos	<b>52</b>
Figura 4.14.	Análisis estadístico de los rendimientos del polímero obtenido en función de pulsos por segundo en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos	<b>52</b>
Figura 4.15.	Análisis estadístico de rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a 45°C	<b>54</b>
Figura 4.16.	Análisis estadístico de rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a 55°C	<b>54</b>
Figura 4.17.	Análisis estadístico de rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a 60°C	<b>54</b>
Figura 4.18.	Extracción de quitina por métodos ecológicos	<b>55</b>
Figura 4.19.	Extracción de quitina parcialmente desacetilada (quitosana) utilizando el método físico de “sonicación”	<b>55</b>
Figura 4.20.	Posibles sitios en que actúa el ultrasonido	<b>56</b>
Figura 4.21.	Propuesta de mecanismo de reacción para la obtención de quitosana por sonicación	<b>57</b>
Figura 4.22.	Película de quitina	<b>63</b>
Figura 4.23.	Película de quitina homogeneizada	<b>63</b>

	<b>Pág.</b>
Capítulo I	
Tabla 1.1. Algunas de las aplicaciones de la quitina y la quitosana	<b>3</b>
Capítulo II	
Tabla 2.1. Exportaciones e importaciones de pescado y productos pesqueros, 2003	<b>7</b>
Tabla 2.2. Diferentes metodologías para la extracción de quitina y sus derivados	<b>20</b>
Tabla 2.3. Solubilidad de la quitina	<b>21</b>
Tabla 2.4. Solubilidad de la quitosana	<b>22</b>
Capítulo III	
Tabla 3.1. Diseño experimental variando tiempo y frecuencia de sonicación a temperatura ambiente y sin agitación	<b>25</b>
Tabla 3.2. Diseño experimental variando tiempo y frecuencia de sonicación con agitación y a diferentes temperaturas	<b>25</b>
Tabla 3.3. Tabla de solubilidad de quitina y quitosana	<b>31</b>
Capítulo IV	
Tabla 4.1. Obtención de quitina (Q) y quitosana (M) por disolución y sonicación simultáneas a diferentes pulsaciones y tiempos de proceso	<b>32</b>
Tabla 4.2. Rendimientos de quitina (Q) y quitosana parcialmente desacetilada (M) en g/g muestra inicial de CPD, obtenidos por sonicación a diferentes pulsaciones y tiempo de proceso.	<b>33</b>
Tabla 4.3. Comparación de los porcentajes de desacetilación obtenidos en esta fase de la investigación, con respecto a los obtenidos en la literatura	<b>46</b>
Tabla 4.4. Datos obtenidos para una muestra de quitina parcialmente desacetilada (M4) obtenida por disolución-sonicación a una temperatura de 60°C	<b>48</b>
Tabla 4.5. Análisis estadístico de los datos: Rendimientos de quitina (Q) y quitina parcialmente desacetilada (M) en g/g muestra inicial de CPD (Proceso: Disolución de CPD con MAC-141 y sonicación a diferentes pulsaciones y tiempos de proceso)	<b>51</b>
Tabla 4.6. Resultados de repetibilidad para tratamientos con MAC-sonicación	<b>58</b>
Tabla 4.7. Pruebas de solubilidad de M4: 0.9p/s, 10min, 60°C	<b>59</b>
Tabla 4.8. Pruebas de solubilidad de M1: 0.5p/s, 10min	<b>60</b>
Tabla 4.9. Pruebas de solubilidad de M3: 0.7p/s, 10min	<b>61</b>
Tabla 4.10. Empleo como recubrimiento, actividad antimicrobiana y antifúngica de la quitina y la quitosana (Tomada de Salas-Osornio, 2011)	<b>62</b>
Tabla 4.11. Conservación de uvas con quitina y quitosana a temperatura ambiente (25°C) (Salas-Osornio, 2011; Velázquez-Solís, 2010)	<b>65</b>
Tabla 4.12. Conservación de fresas con quitina y quitosana a temperatura ambiente (25°C) (Ortega-Granados, 2010; Salas-Osornio, 2011)	<b>66</b>

## CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

## 1.1. PROBLEMÁTICA

En México se producen grandes cantidades de camarón que, al venderse genera alrededor de 60 mil T de desperdicios por año (Pacheco y col., 2009; Pacheco-L., 2010), que es arrojado en las zonas de captura cuando están las embarcaciones en alta mar o en los suelos aledaños a los sitios de “cultivo” (camaronicultura), contaminándolos y provocando la muerte de diferentes especies. Otros lugares de depósito son los puertos cuando son “descabezados” al desembarcar. En el caso de la acuicultura causan un gran impacto ambiental, no solamente por el exoesqueleto y cefalotórax sino por la contaminación del agua que se recambia de los estanques y que contiene residuos del alimento proporcionado (Flores-Ortega, 2008). El cefalotórax y/o exoesqueleto del camarón puede ser aprovechado pues está compuesto, en base seca, de 44.7% de proteína, 26.3% de ceniza, 20.7% de fibra cruda, 5.2% de grasa y 3.1% de otros hidratos de carbono. De esta composición bromatológica destaca la quitina (Figura 1) que representa de un 14 a 27% (Flores-Ortega, 2004), polímero con aplicaciones limitadas por su baja solubilidad.

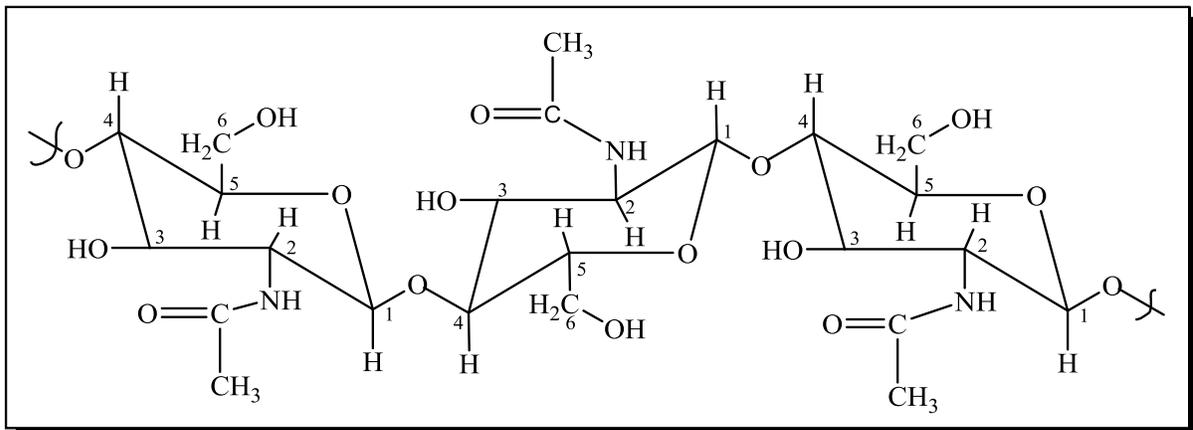


Figura 1.1. Estructura química de la quitina (Flores-Ortega, 2004)

A partir de la desacetilación de la quitina, se obtiene quitosana (Figura 1.2), soluble en la mayoría de los disolventes ácidos orgánicos acuosos como el acético, fórmico, tartárico y cítrico, entre otros (Cartaya y col., 2009) lo que le confiere mayores aplicaciones en el sector alimentario, químico-farmacéutico y agrícola (Flores-Ortega, 2004, 2008).

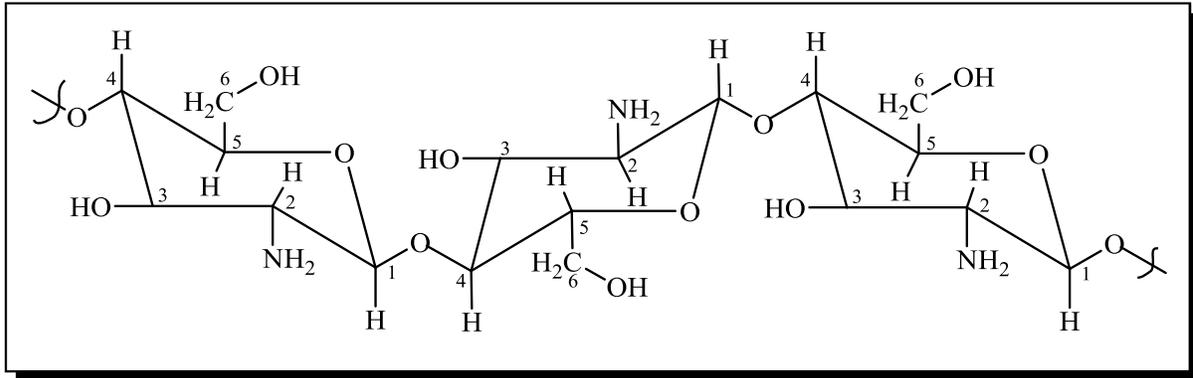


Figura 1.2. Estructura química de la quitosana (Flores-Ortega, 2004)

Durante la extracción química tradicional de la quitina a partir del cefalotórax de camarón se utilizan reactivos químicos no recuperables como el HCl, NaOH, KMnO<sub>4</sub> (permanganato de potasio) y C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ácido oxálico), que causan contaminación en el ambiente. La quitina, una vez extraída, es transformada en quitosana requiriendo reacciones de desacetilación a altas temperaturas (Asgar, 2008), con presión (Kyoon y col., 2000) o con sonicación (Barreto y col., 2001), en presencia de hidróxido de sodio obteniendo quitosana hasta con un 85% de desacetilación (Hidalgo y col., 2009).

La extracción de quitina y quitosana permitirá el aprovechamiento integral de los desechos de crustáceos y, por ende, la disminución de la contaminación que provocan al medio ambiente durante su desecho, dando un valor agregado a este subproducto que beneficiará a los trabajadores de las cooperativas y a los propietarios de las granjas camaronícolas. Es por ello que se busca crear nuevos métodos de extracción de quitina y quitosana que permitan su obtención de manera factible, disminuyendo el uso de reactivos para su obtención.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN Y PROPUESTA DE SOLUCIÓN

Existe una gran diversidad de materiales en las diferentes áreas del quehacer humano. Los biopolímeros pueden constituirse en un buen ejemplo ya que pueden eliminarse una vez que su uso útil ha cesado sin causar efectos perturbadores en el medio ambiente ni efectos perjudiciales como la inducción de resistencia de patógenos o su acumulación en los consumidores humanos que les provoquen enfermedades de efectos irreversibles. Tal es el caso de la quitina y la quitosana (Lárez-Velázquez, 2008; Struszczyk y col., 1989).

Por ello es que existe una extensa investigación sobre la aplicación de métodos para obtener quitina y la quitosana, así como de aplicarlos en muchos procesos útiles (Tabla 1.1) (Barrera-Rodríguez y col., 2007).

Tabla 1.1. Algunas de las aplicaciones de la quitina y la quitosana (Lárez-Velázquez, 2008), adecuando los nombres a los usos en México por la autora (entre paréntesis)

Uso	Biopolímero	Propiedades aprovechadas	Cultivo
Películas para recubrimiento de frutos, hojas, semillas y vegetales frescos	Quitosana	Antimicrobiana	Cítricos, mango, toronja, “lechosa” (papaya), fresa, tomate (jitomate <sup>4</sup> )
Clarificación de jugos de fruta	Quitosana	Coagulante-Floculante	Pera, toronja, limón, manzana
Protección de plántulas	Quitosana	Fungicida	Uva de vino, tomate (jitomate)
Liberación controlada de agroquímicos	Quitina y Quitosana	Formación de Hidrogeles	Arándano
Estimulación del crecimiento	Quitosana	Bioestimulante	Orquídea
Inhibidor del oscurecimiento de frutos y tubérculos	Quitosana	Biocida	Banana, papa
Biocidas	Quitosana	Antimicrobiana	Tomate (jitomate), papa, hortalizas
Corrección de sustratos de crecimiento	Quitina y Quitosana	Fungicida, Nematicida	Lupino blanco o altramuz ( <i>Lupinus albus</i> ), guisantes (chícharos), tomate (jitomate), papa, apio
Inductor de mecanismos de defensa	Oligómeros de quitina y quitosana	Inductor de Resistencia	Soya

<sup>4</sup> Los tomates (*Physalis angulata* L.) y jitomates (*Lycopersicon esculentum*) son frutas obtenidas de plantas originarias de México y sus nombres vienen del náhuatl, la lengua de los aztecas. *Tomatl* significa fruto que sirve de agraz para en los guisos o salsas y *xitomatl*, tomate con ombligo (*xictli* ombligo y *tómatl*, tomate) (Cabrera, 2002). No pertenecen a la misma familia y, de hecho, el primero es verde y al llegar a la madurez se torna amarillo, mientras que el otro al estar maduro es rojo. Por ello, es un error llamar tomate al jitomate, desafortunadamente generalizado en el mundo, aunque en México sí debiera usarse su nombre correctamente

La quitosana tiene ya importantes aplicaciones y la quitina si se logra disolver también puede tenerlas (Arias-Torres y Mendoza-Márquez, 2010; Bárcenas-Ochoa, 2010; Barrera-Rodríguez y col., 2007), por lo que se ha intentado manipular su extracción para obtener rendimientos más altos, mayor grado de pureza y bajos costos para su extracción. La utilización de la química verde, es decir, emplear la menor cantidad de reactivos posible, que esos reactivos sean de bajo impacto ambiental, hasta el uso de enzimas o microorganismos, han sido las líneas más empleadas en las últimas décadas.

A principios del siglo XXI, en los Laboratorios 301, 302 y 303 del Edificio E-3 de la Facultad de Química de la UNAM se desarrolló un procedimiento basado en la química verde para la obtención de quitina, que fue patentado (Durán-Domínguez-de-Bazúa y col., 2004), a partir de exoesqueletos y cefalotórax parcialmente desproteinizados (CPD). Estos subproductos, más que residuos, son mezclados con un disolvente preparado con metanol-agua-cloruro de calcio, en proporciones molares de 1:4:1, conocido como MAC-141© (1 mol de metanol-4 moles de agua-1 mol de cloruro de calcio) y los reactivos son de bajo impacto ambiental (Anexo E). Esta disolución o extracción de quitina en su forma líquida es ecológica, ya que el disolvente puede recuperarse y volverse a utilizar (Flores y col., 2006a, b, 2007). Por esta razón, ahora se probará con una operación unitaria adicional que ya ha sido probada con la química tradicional para obtener quitosana. Esta operación unitaria es la sonicación (Barreto y col., 2001).

Para la desacetilación de la quitina se ha reportado que la quitina cruda es suspendida en agua (4.6g de quitina con 80mL de agua) y sometida a sonicación con una duración de pulso ajustada a 0.5 por segundo por el tiempo deseado. Para verificar que el tratamiento por radiación ultrasónica contribuye al cambio en la reactividad de la quitina para la desacetilación, la suspensión acuosa es sometida a agitación magnética durante 60 minutos a temperatura ambiente y 55°C, temperatura máxima alcanzada por la suspensión de la quitina en el tratamiento de sonicación. Por último, la suspensión es filtrada y secada para desacetilarla completamente con hidróxido de sodio. Los 4.6g de quitina fueron mezclados con 220mL de hidróxido de sodio al 40% y se mantuvieron en agitación mecánica (350rpm) a una temperatura de 115°C.

Después de 6h, la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se filtró el sólido y se lavó con agua hasta la neutralidad, seguido de un lavado con metanol. Al producto obtenido se le secó en condiciones ambientales (Barreto y col., 2001).

También se ha reportado la obtención de quitosana a presiones altas. Por ejemplo, se tomaron 15 g de quitina y se adicionó hidróxido de sodio al 40-50% (sólido/solvente 1:10 o 1:15 (w/v)). La mezcla se puso en la autoclave a una presión de 103.42 kPa por arriba de la presión atmosférica (15 *psi*) de 5 a 30 minutos a 121°C. El autoclave fue precalentado a 100°C antes de introducir las muestras. La quitosana obtenida se lavó y enjuagó con agua destilada, se filtró y secó a 60°C por 4 horas en una estufa marca Felisa (Kyoon y col., 2000).

Tomando algunas de las condiciones antes mencionadas para la obtención de la quitosana y sabiendo que el disolvente MAC-141 tiene propiedades alcalinas, se probó en esta investigación la obtención de quitina y su deacetilación parcial o deseablemente total mediante el empleo de CPD-MAC más sonicación.

## 1.3. OBJETIVOS

### 1.3.1. *General*

- Obtener quitina y quitosana (quitina desacetilada) por química verde a partir de residuos del camarón.

### 1.3.2. *Específicos*

- Obtener exoesqueletos y cefalotórax parcialmente desproteinizados (CPD) de residuos de camarón para la extracción de quitina y su desacetilación.
- Utilizar disolvente MAC-141, considerado de bajo impacto ambiental, para la obtención de quitina y su desacetilación parcial por sonicación.
- Utilizar técnicas como la sonicación a diferentes pulsos por segundo (p/s) para lograr la extracción de quitina y simultáneamente su desacetilación.
- Caracterizar el polímero, obtenido por química verde de los residuos de camarón, mediante espectroscopía de infrarrojo, grado de desacetilación, empleo del criterio de la primera derivada y solubilidad.

## 1.4. ALCANCES

Se estudiaron solamente los efectos de la sonicación y el disolvente MAC-141 sobre el residuo sólido obtenido denominado CPD (cefalotórax parcialmente desproteinado), considerando como variables controladas a la temperatura, el tiempo y los pulsos por segundo (p/s) durante tratamiento con sonicación, como variable no controlada la pérdida de agua por evaporación del disolvente MAC durante la sonicación. Toda esta fase experimental fue a escala de laboratorio. No se estudiaron condiciones óptimas.

## CAPÍTULO II

## FUNDAMENTO TEÓRICO

## 2.1. PRODUCCIÓN DE CAMARÓN

México siempre ha sido un exportador neto de alimentos provenientes del mar y la balanza de comercio de pescado en términos de la relación de exportación/importación fue de cerca de 2:1 en 2003. Más de 60% del valor total de las exportaciones en 2003 correspondió a sólo dos productos, el camarón (47%) y el atún (16%) (Tabla 2.1) (OCDE, 2007).

Tabla 2.1. Exportaciones e importaciones de pescado y productos pesqueros, 2003 (OCDE, 2007)

Producto	Exportaciones		Importaciones	
	Volumen Toneladas	Valor MXN	Volumen Toneladas	Valor MXN
Pescado fresco	16,113	1,175,302	2,538	42,614
Atún	5,544	796,566	10	1,054
Pescado congelado	74,428	494,154	26,498	314,604
Atún	29,797	261,451	32	2,068
Sardinas	35,155	170,985	125	1,268
Filete y otra carne de pescado	1,814	134,005	20,237	632,441
Pescado, salado y ahumado	369	79,777	2,260	198,693
<b>Crustáceos</b>	<b>29,219</b>	<b>3,700,608</b>	<b>7,624</b>	<b>369,916</b>
<b>De los cuales el camarón representa</b>	<b>26,280</b>	<b>3,249,123</b>	<b>7,450</b>	<b>342,554</b>
Moluscos	14,399	404,500	5,077	129,730
Algas marinas y otras algas	18,539	6,863	1,761	30,814
Aceite de pescado	2,179	9,145	834	9,756
Pescado en conserva	6,776	106,397	8,693	269,617
Crustáceos en conserva	12,559	564,423	5,404	318,143
Harina de pescado	19,021	119,693	14,169	91,136
<b>TOTAL</b>	<b>195,418</b>	<b>6,794,872</b>	<b>95,095</b>	<b>2,407,468</b>

Existen dos pesquerías principales de camarón en el Golfo de México, las cuales están en la Ciudad del Carmen (Campeche), otra más pequeña se encuentra al norte del Golfo hacia Tampico y Matamoros (Tamaulipas), consideradas como principales áreas para el desarrollo de larvas de camarón (OCDE, 2007).

Los principales estados productores son Sinaloa, Sonora, Baja California, Nayarit y Chiapas, estos estados ofertan el 80% de camarón del país.

La explotación de este crustáceo ya sea en altamar o por medio de la acuicultura es alta debido a que en términos de valor económico es elevado a comparación de su volumen (Figura 2.1).

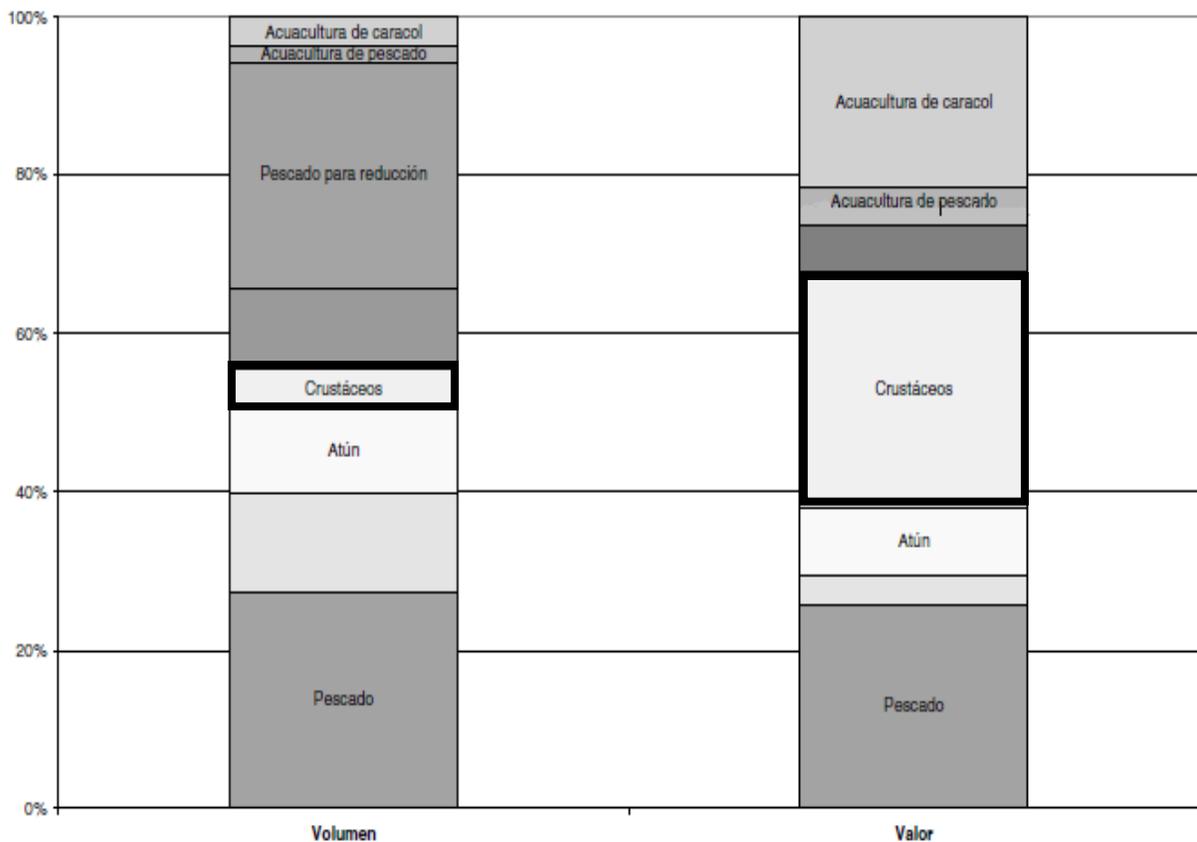


Figura 2.1. Proporciones de volumen y valor de la producción de pesca y acuicultura, 2004 (OCDE, 2007)

### 2.2. IMPORTANCIA AMBIENTAL DEL APROVECHAMIENTO DEL CEFALOTÓRAX Y EXOESQUELETO DEL CAMARÓN

Debido a los grandes problemas ambientales actuales, como es la generación de desechos en el área industrial, se observa un creciente interés en el uso de materiales naturales como la quitina (Shirai-Matsumoto, 1999); extraída del cefalotórax de camarón.

Éste es un residuo de la industria camaronera, una de las que son consideradas como importantes fuentes de contaminación superficial en las áreas costeras, por lo que resulta ambientalmente necesario evitarlo (García, 2006) y aprovecharlo. En México se generan cerca de 35,000 toneladas anuales de desperdicios que, de no ser aprovechados, son una fuente de contaminación hasta 10 veces mayor que la que aportan los desperdicios domésticos (Flores-López, 2008).

Sólo en el estado de Sonora, en el 2009, de 76,000 T de camarón, se generaron 26,600 T de residuos y de éste 3,675 T de quitina (López y col., 2010). Con referencia a lo anterior, se esperaría que en México de las 196 mil toneladas de camarón producidas anualmente (Aquahoy, 2010) se generarán de 60,000 a 68,600 T de residuos y, por tanto, 9473 T de quitina para ser utilizada en diferentes áreas.

Lamentablemente, el costo de conversión del cefalotórax de camarón es demasiado alto, lo que ha promovido que quienes se interesan por la explotación de la quitina busquen fórmulas que la hagan económicamente viable (Shirai-Matsumoto, 1999). Para ello la extracción de la quitosana para el aprovechamiento integral de los residuos de camarón debe hacerse con la utilización de la menor cantidad de reactivos.

### **2.3. MERCADO MUNDIAL DE LA QUITINA Y LA QUITOSANA**

La quitina es, después de la celulosa, el polímero natural más cuantioso (Gacén y Gacén, 1996). Aún cuando la celulosa es el polímero natural más abundante en la naturaleza en términos de ocurrencia estática, la tasa de regeneración de la quitina en la biosfera es de  $2.3 \times 10^9$  toneladas/año solamente en crustáceos, lo que es casi el doble de la tasa de celulosa de  $1.3 \times 10^9$  toneladas/año (Goycoolea y col., 2004).

Debido a esta abundancia y a su amplia utilización, el mercado mundial de oferentes de quitina y quitosana está formado por diferentes actores. Liderando el mercado se encuentran Estados Unidos y Japón. Según un estudio realizado por la Sociedad Asiática de Quitina, desde 1996, el mercado mundial de quitosana en 1994 era de 1000 T de las cuales 800 T eran utilizadas en Japón.

Esto demuestra la gran importancia de este país como productor y consumidor ya que inició esta actividad en la década de los setenta del Siglo XX. Actualmente, el panorama mundial se ha visto modificado, aunque EEUU y Japón siguen siendo los mayores productores (Figura 2.2). La producción y el consumo se encuentran descentralizados con respecto a la situación anteriormente mencionada, ya que no sólo ha aumentado el volumen de producción con la participación de nuevos actores globales, sino también los nuevos campos de aplicación han encontrado mercados florecientes que poseen un potencial de desarrollo futuro muy promisorio (Caprile, 2010).

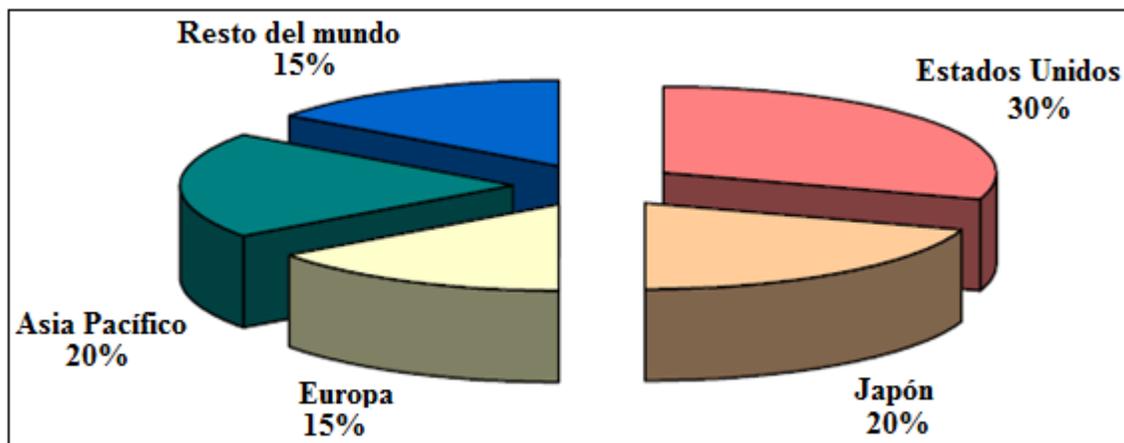


Figura 2.2. Mercado mundial de quitina y quitosana (Caprile, 2010)

Un estudio de investigación realizado por Global Industry Analyst, Inc., de la producción mundial de quitina y quitosana proyectada para el 2010, arroja como resultado una tasa de crecimiento anual del 16% (Figura 2.3) (Caprile, 2010).

En México, el polímero quitina y su derivado la quitosana no se producen, sino que se importan del extranjero a costos elevados, por ejemplo, la quitosana se cotiza actualmente en unos \$4,000 pesos mexicanos el kilogramo en su forma de grado técnico (Ortega y Francisco, 2010).

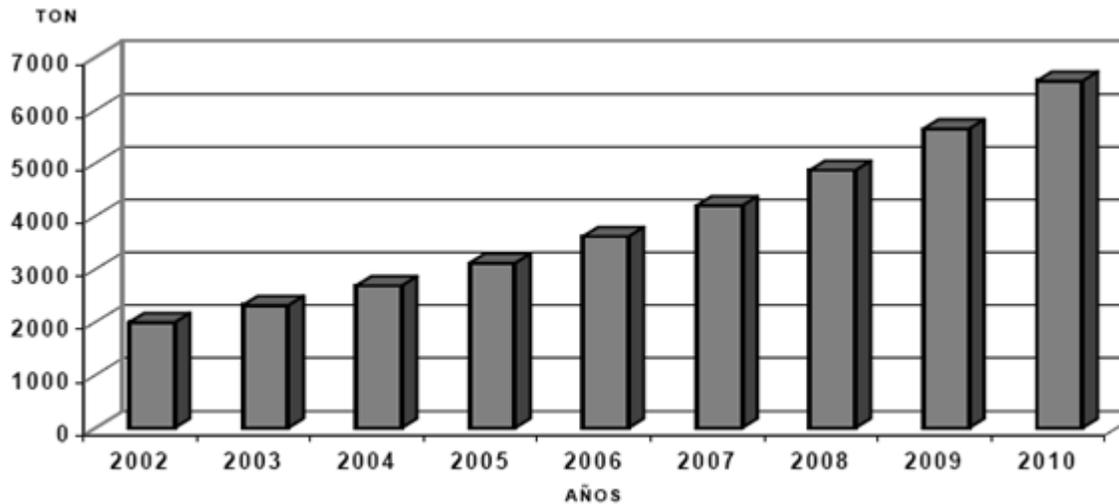


Figura 2.3. Proyección estimada (2010) para la producción de quitina y quitosana (Caprile, 2010)

## 2.4. IMPORTANCIA DE LA QUITINA Y LA QUITOSANA

### 2.4.1. *Uso de quitina y quitosana como fibra dietética*

La quitina y la quitosana han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) y la EPA (Environmental Protection Agency) para su uso como agentes precipitantes de materiales proteicos durante el procesado de alimentos y como complementos alimenticios en niveles de incorporación que no excedan el 0.1% (Caprile, 2010).

Específicamente, la quitina se utiliza como fuente de fibra dietética en la alimentación humana y animal. La quitina se puede encontrar en alimentos comunes como granos, plátano, levadura y champiñones formando parte de la dieta diaria a lo largo de la vida. La quitina provee fibra al organismo, elemento clave para una dieta saludable y anticancerígena.

Hoy en día, más de 2 millones de individuos toman quitina y quitosana como suplemento nutricional, principalmente en los Estados Unidos y Japón. Se le conoce como la fibra milagrosa pues ayuda a perder masa corporal y a disminuir el colesterol (Caprile, 2010).

### ***2.4.2. Uso de quitina y quitosana en farmacología***

En farmacología el polvo de quitina se evaluó en lesiones dermatológicas y traumatológicas, así como en úlceras de la piel, mostrando resultados altamente positivos. Otras formas del polímero como ungüento resultaron favorables en pacientes con quemaduras. Recientemente se utilizaron supositorios del polímero para el tratamiento de fisuras anales y se obtuvieron excelentes tiempos de cicatrización (García, 2006). Con la finalidad de introducir la quitina en la industria médica, se han realizado ensayos de toxicidad y genotoxicidad, comprobando la inocuidad del producto. En medicina se utiliza como fibra, droga, membrana, así como en órganos artificiales (García, 2006).

### ***2.4.3. Uso de la quitina y la quitosana en el área textil***

Los vendajes a base de fibra de quitina o de quitosana pueden acelerar la curación de las heridas hasta un 75% (Gacén y Gacén, 1996) por:

- Una controlada liberación de N-acetilglucosamina o glucosamina, vía degradación enzimática.
- La estructura micropolisacárida del colágeno.
- La inhibición de la fibroplasia y generación del tejido selectivo.
- La estimulación de los componentes antiinflamatorios del curado de las heridas.

Con fibras de estos polímeros se fabrican telas no tejidas y tejidos de alta tecnología (Gacén y Gacén, 1996).

### ***2.4.4. Uso de la quitina y la quitosana en la industria alimentaria***

Dentro de los usos de estos polímeros destacan:

- Recubrimiento de semillas y frutas (filmes o biopelículas), fertilizante, fungicida, antiviral. Remoción de colorantes, conservantes, estabilizante de color, exaltador o

“potenciador” del sabor natural, preservante, antioxidante, emulsionante, aditivo de alimentos (Caprile, 2010)

- La quitosana se ha empleado en la industria de la alimentación para prevenir la turbidez y como conservante de los tejidos de fruta (Gacén y Gacén, 1996).
- La quitosana se ha probado en pan, huevo, frutas y vegetales, mayonesa, carne, leche, fideos, pastel de arroz, salchicha, cuajado de soya, germinado de soya (No y col., 2007).
- La quitosana con masas moleculares elevadas no es tóxica, es un agente bioactivo con efectos anti-fúngicos e incide mecanismos de defensa en tejidos de plantas de utilidad alimentaria (Bautista-Baños y col., 2006).
- Se ha estudiado la actividad fungicida de la quitosana en estudios *in vitro* e *in vivo*. La inhibición de hongos por la quitosana es importante considerando la concentración que es adicionada (Bautista-Baños y col., 2006).
- La naturaleza policatiónica y el grado de desacetilación es la que le confiere propiedades antifúngicas (Hirano y col., 1989).
- Su principio es que altera la síntesis de ciertas enzimas fúngicas, induce cambios morfológicos, alteraciones estructurales y desorden de la célula del hongo.

### **2.5. DIFERENTES METODOLOGÍAS PARA LA EXTRACCIÓN DE LA QUITINA Y LA QUITOSANA**

La fuente principal en el laboratorio para la preparación de quitina son los exoesqueletos y cefalotórax de crustáceos. En éstos, la quitina está estrechamente relacionada con proteínas, material orgánico principalmente pigmentos,  $\text{CaCO}_3$  y lípidos. Se han adoptado varios procedimientos para remover estos componentes.

#### ***2.5.1. Método enzimático***

Se puede realizar usando microorganismos proteolíticos, fúngicos o enzimas resultando la producción de oligómeros con un óptimo grado de polimerización de la quitina. Las enzimas utilizadas para la extracción de quitina son las quitinasas, las celulasas, las desacetilasas y las

proteasas. La extracción por enzimas puede ser altamente específica, con altos rendimientos y con ventajas ambientales comparada con el método químico, pues elimina el riesgo por el uso de reactivos químicos. Sin embargo, quedan en la quitina remanentes (pequeñas cantidades) de proteínas y sales inorgánicas (Tröger y Niranján, 2010).

La principal ventaja de este método respecto del proceso químico es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, hecho muy apreciado para aplicaciones biomédicas (Maldonado, 2005). La quitina-desacetilasa (CDA; EC 3.5.1.41) es la enzima responsable de la conversión de quitina a quitosana. Está definida como una hidrolasa que cataliza los grupos GlcNAc en la quitina. Esta enzima muestra un valor de pH óptimo de 5.5 y es inhibida notablemente por la presencia de iones acetato. La CDA cataliza la hidrólisis de los enlaces C1 y C2 de dos unidades consecutivas de GlcNAc de la quitina para producir quitosana (Figura 2.4). La presencia de la actividad de esta enzima ha sido reportada en varios hongos y especies de insectos. La limitación de este método es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de quitina insoluble y, por lo tanto, es necesario un pretratamiento (Ramos-Ponce, 2009).

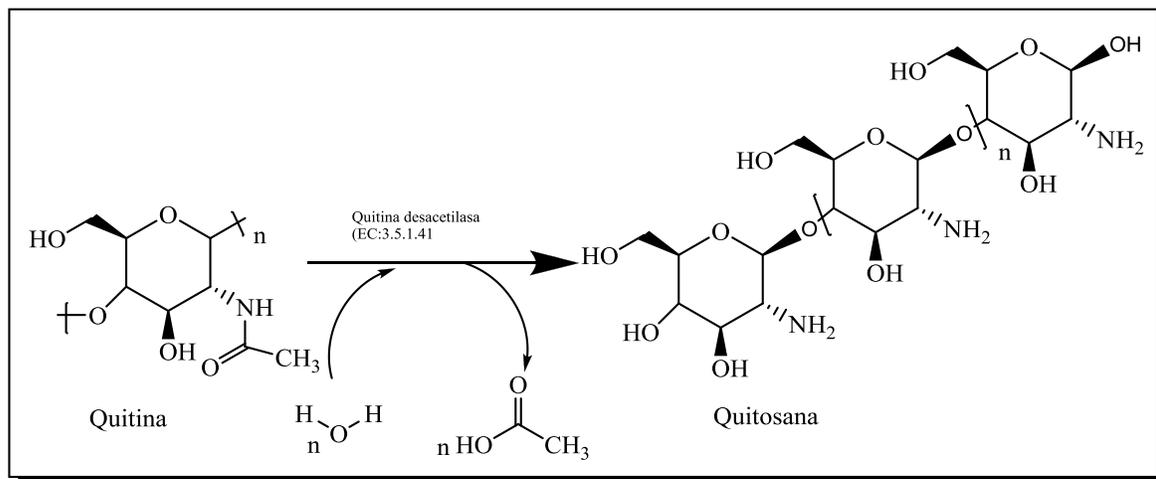


Figura 2.4. Mecanismo catalítico de la enzima CDA: La quitina es desacetilada por la acción de la CDA para producir quitosana y una molécula de acetato, que inhibe la actividad de la enzima (Ramos-Ponce, 2009)

### 2.5.2. Método por biodegradación

En la extracción por biodegradación (“fermentativa”<sup>5</sup>, en la referencia) se usan microorganismos para producir enzimas proteolíticas. Por otra parte, pocos microorganismos producen ácidos. Esto abre la posibilidad de llevar a cabo la desproteínización y desmineralización en un solo paso. Comparando esta tecnología con el método enzimático, el método biodegradativo es menos caro y promueve el uso de enzimas comerciales. La extracción de proteínas y de minerales en este método es usada como fuente para los microorganismos. También permite la extracción de quitina y biomasa. Algunos microorganismos usados para extraer quitina por medio de esta biorreacción son *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus pentosaseus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* (Tröger y Niranján, 2010).

Otro tipo de microorganismos proteolíticos son *Pseudomonas maltophila*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Aspergillus oryzae*) en desechos de crustáceos, u hongos productores de quitina desacetilasas son *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus* y *Aspergillus niger* (Shirai-Matsumoto, 1999).

### 2.5.3. Métodos físicos

#### *Microondas*

El método de radiación por microondas utiliza sistemas cerrados, los cuales son directamente calentados por microondas, permitiendo la descomposición por las altas presiones y temperatura por arriba del punto de ebullición de los reactivos usados. Esto acorta drásticamente el tiempo requerido para la preparación de la muestra mejorando la calidad de la extracción, síntesis o hidrólisis.

---

<sup>5</sup> Louis Pasteur descubrió que *Saccharomyces cerevisiae* convertía en condiciones anaerobias a la glucosa en alcohol etílico y dióxido de carbono. Él fue quien llamó a esta biorreacción fermentación. De forma errónea, muchos microbiólogos y biotecnólogos han denominado a todas las biorreacciones fermentaciones. La única biorreacción que debe llevar ese nombre es la de *S. cerevisiae* produciendo etanol y CO<sub>2</sub>

En el calentamiento convencional, el material es calentado por una fuente externa de calor, lo que provoca que el calor deba penetrar al sólido o propagarse por convección en un líquido, dando como resultado que el calor no sea uniforme en el material. En otras palabras, la tendencia de calentamiento es a partir de la parte externa a la interna, como se muestra en la Figura 2.5 (Ramos-Ponce, 2009).

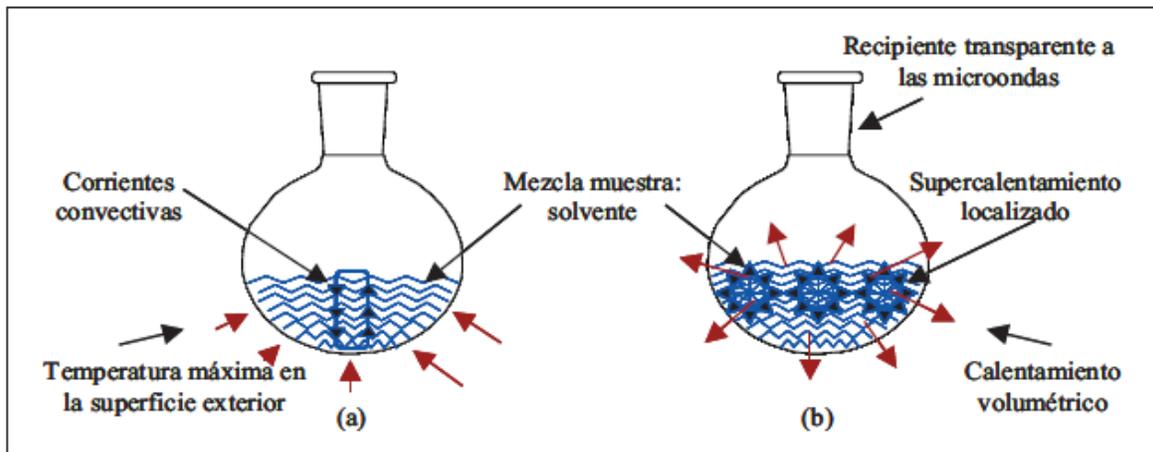


Figura 2.5. Representación esquemática de a) Calentamiento convencional, b) Calentamiento por microondas (Ramos-Ponce, 2009)

En el calentamiento por microondas (radiofrecuencia), las moléculas del material vibran con la misma intensidad y al mismo tiempo lo que produce un calentamiento más uniforme. El fenómeno del calentamiento por microondas se basa en la interacción del campo eléctrico con los compuestos de un material.

El uso del microondas se ha utilizado a nivel de laboratorio para acelerar la reacción de desacetilación de la quitina e incrementar su reactividad durante la producción de quitosana. Un efecto del tratamiento por microondas es la aparente peptización de la quitina parcialmente desacetilada, esto es, la formación de una masa gelatinosa del producto obtenido en un medio alcalino. Este efecto se manifiesta aún a bajos grados de desacetilación (de 15 a 20%) y se incrementa a medida que aumenta esta desacetilación (Ramos-Ponce, 2009).

### *Ultrasonido*

El ultrasonido es una técnica que ha surgido como una alternativa ecológica y ha incursionado en varios campos de aplicación como: biotecnología, ingeniería, ortodoncia, medicina, geología, polímeros e industria. El mecanismo de acción del ultrasonido es a través de burbujas de cavitación. Este fenómeno resulta cuando se emite una onda acústica en un líquido, generando altas temperaturas y presiones en puntos definidos del mismo. Cuando la presión disminuye lo suficiente en un punto dado, el líquido ya no puede mantener su estructura crítica molecular y entonces se crean burbujas microscópicas de vapor o gas (Fig. 2.6 y ciclo A) que van creciendo mientras se encuentran en la fase de depresión de onda (presión negativa). Durante el siguiente ciclo de compresión (Fig. 2.6 y ciclo B), aumenta la temperatura del gas contenido en las burbujas debido a la compresión de la enorme presión ejercida sobre ellas (Fig. 2.6 y ciclo C), hasta que se ven obligadas a colapsarse y explotan con una enorme cantidad de energía (Fig. 2.6 y ciclo D) generando presiones de más de 100 bar y temperaturas de más de 1000 K, en un micropunto del líquido, provocando ondas de choque que se dispersan por todo el líquido, suficiente para desencadenar reacciones químicas (Ramos-Ponce, 2009).

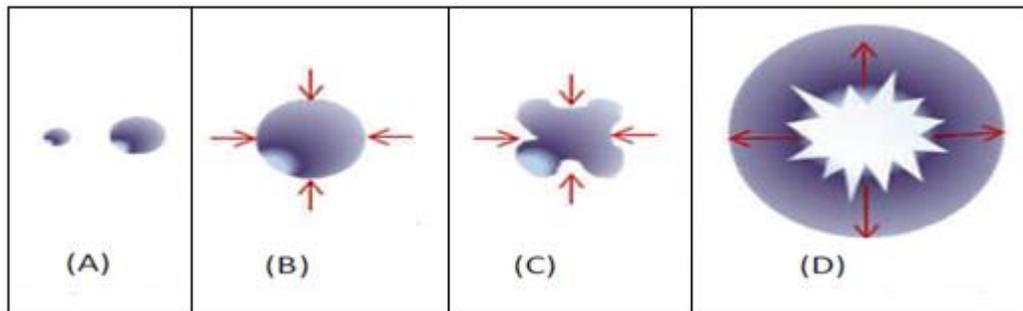


Figura 2.6. Mecanismo de acción del ultrasonido en medio acuoso (Ramos-Ponce, 2009)

La extracción de quitosana utilizando la técnica de sonicación se probó en soluciones de quitosana+ácido clorhídrico, quitosana+ácido acético, quitosana+agua, observando que la desacetilación por sonicación conduce a la degradación de la cadena del polímero y una desacetilación detectable después de prolongados tiempos de reacción a pH de 1 (Muzzarelli, 1985).

Cuando se sonica quitosana con un alto grado de desacetilación (>90%) aumenta el grado de desacetilación en un 2% pero sufre una degradación o despolimerización (Liu y col., 2007).

**2.5.4. Método químico**

Existen métodos químicos en donde se usan ácidos inorgánicos para la desmineralización, álcali para la desproteinización, solventes orgánicos para la eliminación de lípidos y colorantes. Estos métodos, comúnmente, conduce a la formación de monómeros, trímeros o la posible desnaturalización de la quitina. Por otra parte, el uso de solventes orgánicos, los cuales pueden ser tóxicos, corrosivos, degradadores o mutagénicos, hacen que resulte una quitina inadecuada para aplicaciones en la industria médica y alimentaria (Tröger y Niranján, 2010).

En el método químico la principal reacción para modificar la estructura de la quitina es la hidrólisis de los grupos acetamida para generar el polímero desacetilado quitosana (Figura 2.7). Para esta reacción se utilizan condiciones alcalinas muy severas debido a la resistencia de tales grupos a la hidrólisis por razones conformacionales. La reacción puede ocurrir preferentemente en las zonas amorfas del polímero, dejando prácticamente intactas las regiones cristalinas nativas de la quitina donde el acceso del reactivo alcalino es muy limitado.

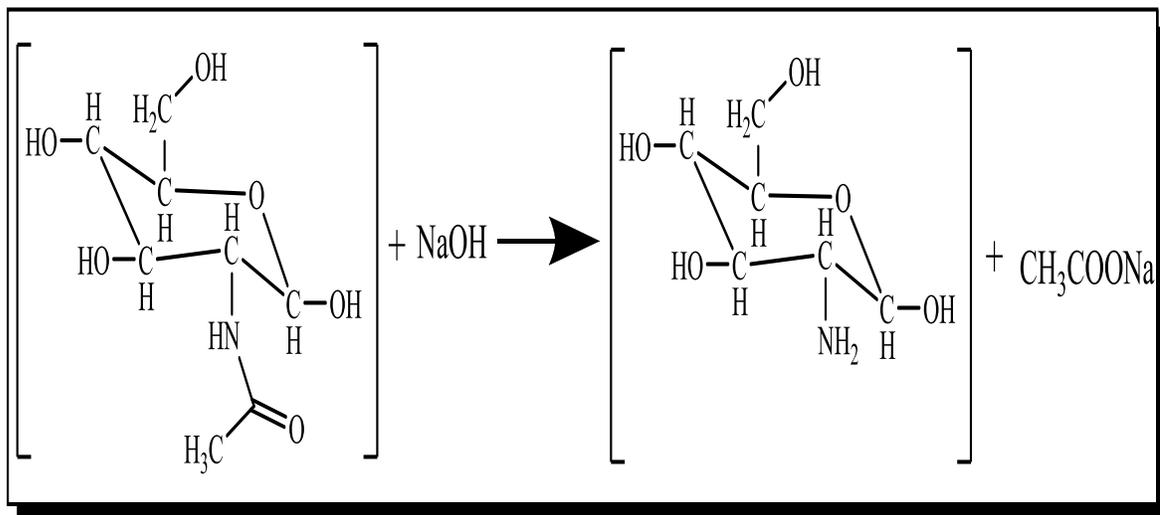


Figura 2.7. Esquema de reacción para la desacetilación alcalina de la quitina para formar quitosana (Ramos-Ponce, 2009)

Alternativamente, la modificación de la estructura de la quitina bajo condiciones homogéneas se lleva a cabo empleando soluciones de NaOH moderadamente concentradas ( $\approx 13\%$ ) sobre la quitina previamente hidratada. Después se somete a desacetilación a una temperatura cercana a la del ambiente durante lapsos largos de tiempo. Ésto facilita el acceso del álcali a los grupos GlcNAc y, por ende, una desacetilación más uniforme (Ramos-Ponce, 2009).

En la reacción alcalina, los factores que afectan al grado de desacetilación son la temperatura y la concentración del álcali, en donde se afecta directamente la cinética de la reacción. Igual que en los tratamientos previos, el tamaño de partícula, la densidad y, por lo tanto, la porosidad de la quitina afectan la velocidad de penetración del álcali en las regiones amorfas y cristalinas del polímero (Ramos-Ponce, 2009).

### **2.6. MÉTODOS QUÍMICOS COMÚNMENTE UTILIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA**

El tipo de método y las condiciones de proceso dependen del tipo de quitina que se necesite, por ejemplo:

- La desacetilación parcial de la quitina no es una desventaja si se requiere posteriormente para ser convertida en quitosana.
- La formación del polímero en tetrámeros o heptámeros es deseable desde el punto de vista de actividad biológica (Flores-López, 2008).

De acuerdo con el método y reactivos a utilizar existen diferentes metodologías utilizando bases, ácidos, disolventes con diferente polaridad y microorganismos degradadores de materia orgánica. La Tabla 2.2 presenta algunas de ellas.

Tabla 2.2. Diferentes metodologías para la extracción de quitina y sus derivados

Procedimiento (Autor)	Metodología	Reactivos utilizados
Aislamiento de la quitina de cáscara (exoesqueleto) de crustáceo (Gacén y Gacén, 1996)	1. Desmineralización 2. Desproteización 3. Desacetilación 4. No despolimerización de quitosana	1. HCl 1M, 12h y temperatura ambiente 2. NaOH 1M, 4h, 90°C 3. NaOH 50%, 1-3h, 110-130°C 92% de desacetilación 4. Tiofenol y borohidruro de sodio, atmósfera inerte
Obtención de quitina (García, 2006)	1. Desproteización 2. Desmineralización 3. Decoloración	1. NaOH (1-10%), 65-100°C, .5-6h 2. HCl, 2-24h, agitación 3. Etanol-éter, etanol-acetona, éter, cloroformo
Extracción de quitina (Shahidi y Synowiecki, 1991)	1. Decoloración 2. Desproteización 3. Desmineralización	1. Aceite 2. KOH 2% p/v, 90°C, 2 h 3. 2.5 YO p/v, HCl, 20°C, 1 h
Extracción de quitina (Shimahara y Takiguchi, 1988)	1. Desmineralización 2. Desproteización	1a. HCl 2N, 2días, 25°C. 1b. 6 días, EDTA, 25°C 2. NaOH, uso de <i>Pseudomonas maltophil.</i> 60% de desproteización
Obtención de quitina (Parada y col., 2004)	1. Preparación de la materia prima 2. Despígmentación 3. Desmineralización 4. Desproteización	1. Moler y tamizar los exoesqueletos de camarón 2. Utilizar mezcla de solventes: éter de petróleo, agua y acetona (15/10/75) 3. HCl 1M 4. NaOH 4.5%, 3h, 65°C
Obtención de quitina a partir de residuos de calamar (McLean, 2000)	1. Extracción de quitina	1. Solución de 0.1 mol L <sup>-1</sup> NaOH 2. Extracto crudo de actinidina de la fruta kiwi 3. AMT Endoproteasa 4. Pepsina 5. Catepsina
Obtención de quitosana (Barreto y col., 2001)	Pasos: 1, 2 y 3 para aumentar la reactividad de la quitina 4. Desacetilación	1. Quitina comercial es tratada con ultrasonido. 2. Agitación magnética por 60min en agua a 25 y 55°C 3. Sonicación 0.5p/s 4. Secar y desacetilar NaOH 40%,110°C 5. Lavar con metanol
Obtención de quitosana (Kyoon y col., 2000)	1. Desacetilación de quitina comercial	1. Mezclar quitina más NaOH 40-50% en relación 1:10 o 1:15 (m/v) y poner en una autoclave a presión de 15psi, 121°C, 5-30min
Quitosana completamente desacetilada sin disminución excesiva de la masa molecular (Domard y Rinaudo, 1983)	1. Desmineralización 2. Desproteización 3. Desacetilación	1. HCl 2. NaOH 3. NaOH, tiofenol, 1h, 100°C
Obtención de quitosana (Benjakul y Wisitwuttikul, 1993)	Desacetilación	NaOH al 50%, al vacío durante 30, 45 y 60 min a 100°C. Repetir dos veces
Obtención de quitosana (Rodríguez-Pedroso y col., 2009)	Proceso termoquímico	Someter la quitina a 230°C en una solución alcalina al 10% durante 1 min a presión reducida. Una descompresión repentina en el proceso y posterior tratamiento durante 24 h, a una temperatura de 4°C permite alcanzar una desacetilación completa de la quitina

2.7. CARACTERÍSTICAS DE QUITINA Y QUITOSANA

*Quitina*

Esta marcada diferencia entre la quitina y la quitosana que ha favorecido las aplicaciones de esta última se debe a la estructura química, que causa la diferencia de solubilidades, pues la quitina o  $\alpha$ -quitina comúnmente encontrada en artrópodos como los cangrejos tiene cadenas de disacáridos antiparalelas, con un enlace de hidrógeno intramolecular e intermolecular (grupos -OH, -C=O y =NH). Todos los grupos hidroxilo están totalmente enlazados por puentes de hidrógeno que son importantes desde el punto de vista técnico y químico pues son los que le confieren a la quitina la alta insolubilidad (Tabla 2.3) que protege a los organismos que poseen exoesqueletos de la hostilidad del ambiente (Flores-Ortega, 2008).

A diferencia de la celulosa y otros polisacáridos, la quitina es un polisacárido básico y dentro de sus propiedades se incluye una elevada hidrofobicidad (Majeti y Ravi, 2000). Su contenido de nitrógeno varía entre un 5 y un 8%, en dependencia del grado de desacetilación (García, 2006).

Tabla 2.3 Solubilidad de la quitina

Quitina	<b>Insoluble</b>	Ácidos, álcalis diluidos, alcoholes, disolventes inorgánicos (García, 2006) Agua, disolventes orgánicos (Gacén y Gacén, 1996)
	<b>Dispersión</b>	Soluciones acuosas concentradas de algunas sales de litio y calcio, como el tiocianato de litio (García, 2006)
	<b>Soluble</b>	Hexafluoroacetona y la N,N-dimetilacetamida (DMAc) conteniendo 5-8 % LiCl, metanol saturado con el cloruro de calcio dihidratado (Pacheco-L., 2010)

*Quitosana*

La quitosana, como ya se mencionó, es un polímero derivado de la quitina. Es ampliamente producido de los residuos del camarón y otros crustáceos con diferentes grados de desacetilación y distintas masas moleculares y, por lo tanto, con propiedades químicas y funcionales diferentes (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Solubilidad de la quitosana

<b>Quitosana</b>	<b>Soluble</b>	Ácidos orgánicos como acético, fórmico, tartárico y cítrico (Cartaya, 2009).
	<b>Insoluble</b>	Agua a pH cercano a la neutralidad (No y col., 2007)
Quitosana derivada en forma de acetato, lactato y malato	Solubles en agua (No y col., 2007)	

La quitosana es también mucho más reactiva que la quitina, ya que sus grupos amino pueden ser acilados, alcoholados y reaccionar con las bases de Schiff. Puede ser definida como una poliamina lineal de alta masa molecular con grupos amino e hidroxilo reactivos. Se comporta como un polielectrolito catiónico y, por debajo de un valor de pH de 6.5, presenta una alta densidad de carga (Gacén y Gacén, 1996). Generalmente la quitosana no está totalmente desacetilada, por lo que en realidad lo que se produce es un copolímero lineal formado por unidades de D (+)-glucosamina y N-acetil-D (+)-glucosamina. Hasta hace poco era aceptado que estos grupos se encontraban distribuidos a lo largo de la cadena polimérica al azar o en bloques, dependiendo del método de obtención del biopolímero (homogéneo o heterogéneo) (Kurita y col., 2000).

Sin embargo, estudios publicados han demostrado que la quitosana presenta una distribución aleatoria de los residuos acetilados y desacetilados, independientemente de si la reacción se condujo de forma homogénea o heterogénea.

## 2.8. DIFERENCIACIÓN ENTRE LA QUITINA Y LA QUITOSANA

Los nombres quitina y quitosana son en ocasiones indistintamente empleados en la literatura, pero ninguno de ellos representa una estructura química única. La quitina contiene en sus cadenas, mayoritariamente, el grupo N-acetilo y en menor proporción grupos amino libres. Generalmente, la quitina presenta grados de desacetilación menores al 60% y en la quitosana el grado de acetilación es inferior al 40% (Pastor-de-Abraham e Higuera, 2004).

El grado de acetilación o desacetilación es uno de los parámetros estructurales más importantes de la quitina y de la quitosana. La quitina pura (100% acetilada) y la quitosana (100% desacetilada) son productos que apenas se presentan como tales. Por ello es frecuente referirse a la quitina como producto en que la mayoría de los grupos amino están libres. Se ha señalado que la quitosana comercialmente disponible contiene entre un 15-20% de grupos acetilados. Por la gran diferencia de propiedades entre los grupos amino y acetamido, el grado de acetilación de estos polímeros puede determinarse a través de una gran variedad de métodos químicos y físicos (titulación, espectroscopía de infrarrojo, análisis elemental, termogravimetría, etc.) (Gacén y Gacén, 1996).

En su forma natural, la quitina se presenta parcialmente desacetilada. La diferencia entre la quitina y la quitosana es, de hecho, arbitraria ya que las formas completamente acetiladas o desacetiladas no existen en la naturaleza ni como productos finales de un proceso. Por ello, en la práctica, al polímero que presenta mayor acetilación se le denomina quitina y al más desacetilado quitosana (Cartaya y col., 2009; Hansen y Llanes, 1994).

En la literatura científica no existe un criterio único para discriminar a la quitina de la quitosana. En ese sentido, la mayoría de los investigadores diferencian a la quitosana y a la quitina atendiendo a su solubilidad. Por ejemplo, la quitosana se disuelve en ácido acético 0.1 mol/L mientras que la quitina no (Cartaya y col., 2009).

La quitosana tiene un contenido de nitrógeno (N) mayor al 7% y posee una distribución regular de los grupos aminos libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos cargándose positivamente, lo que le confiere un comportamiento de policación (Rodríguez-Pedroso y col., 2009).

A continuación y con base en esta revisión de la literatura, se presenta el desarrollo experimental seguido en esta investigación para obtener quitina y quitosana solubles empleando el disolvente MAC-141© y la sonicación.

## CAPÍTULO III

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Figura 3.1 se presenta el diagrama de bloques del desarrollo experimental que se siguió en esta investigación.

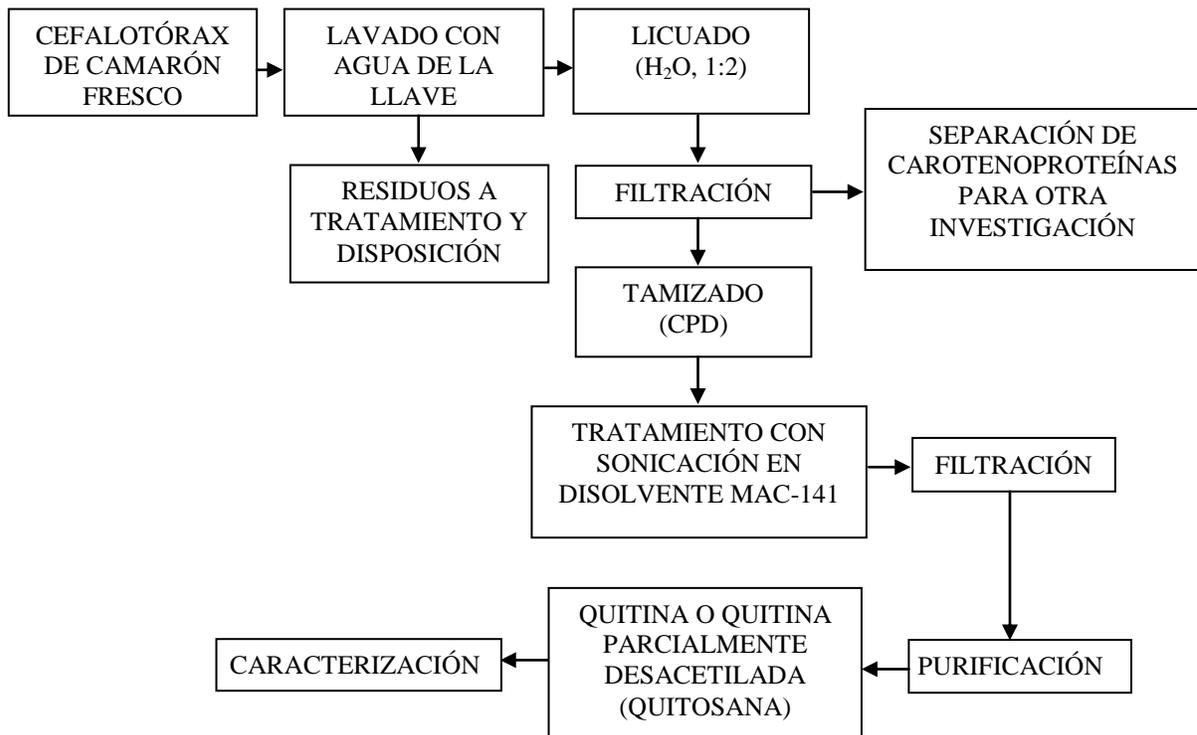


Figura 3.1. Diagrama de bloques de la producción de quitina y quitosana

### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN DE QUITINA Y SU DESACETILACIÓN PARCIAL

#### 3.1.1 Análisis por sonicación: relación tiempo/radiación

Para realizar esta investigación se aplicó un diseño experimental tomando en cuenta tiempo, 5, 10 y 15 minutos, y la frecuencia de sonicación 0.5, 0.7, 0.9 pulsos por segundo (p/s). Cada experimento se realizó por triplicado. A continuación se pone en forma tabular (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Diseño experimental variando tiempo y frecuencia de sonicación a temperatura ambiente y sin agitación

Tiempo, min	Sonicación (Pulsos/segundo) de CPD con disolvente MAC-141		
	0.5	0.7	0.9
5	X-1	X-2	X-3
10	Y-1	Y-2	Y-3
15	Z-1	Z-2	Z-3

### 3.1.2 Análisis por sonicación: relación tiempo/radiación/calentamiento (45, 55 y 60°C)

Si el tratamiento por radiación ultrasónica no contribuye al cambio en la reactividad de la quitina para la desacetilación, entonces las muestras (CPD-MAC-141) son sometidas a agitación magnética durante 40 minutos a diferentes temperaturas: 45, 55 y 60°C, que es menor a 64.7°C, donde se tiene el punto de ebullición del metanol que se encuentra presente en el disolvente MAC y así evitar la evaporación de este solvente (Tabla 3.2). Se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se identifica por IR.

Tabla 3.2. Diseño experimental variando tiempo y frecuencia de sonicación con agitación y a diferentes temperaturas

Muestras (quitina-MAC)	Agitación 40 minutos		
	45°C	55°C	60°C
0.5 p/s (5,10,15minutos)	X-1	X-2	X-3
0.7 p/s(5,10,15minutos)	Y-1	Y-2	Y-3
0.9 p/s(5,10,15minutos)	Z-1	Z-2	Z-3

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Preparación del cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD)

Para preparar las muestras se siguieron los siguientes pasos:

#### *Paso 1: Obtención del cefalotórax y caparazones de camarón fresco*

Las cabezas de camarón y caparazones (CC) se obtienen a un costo de \$10/kg de estos residuos en la zona de pescados y mariscos de la Central de Abastos de La Nueva Viga, en México, DF. Los residuos de camarón (CC) se obtienen después de que la parte abdominal o carnosa del camarón es desprendida del exoesqueleto o cefalotórax. De esta manera se obtienen ganancias de los residuos obtenidos (exoesqueleto y cefalotórax) y aumenta el valor económico del camarón al venderse pelado.

### ***Paso 2: Lavado con agua de la llave***

Los subproductos del camarón (CC) fresco se colocaron en una criba de plástico, se limpiaron de objetos extraños y se lavaron bajo un chorro de agua corriente hasta que ésta se observó limpia. Se dejaron escurrir durante 30 minutos. Los subproductos del camarón se deben utilizar preferentemente frescos. En caso contrario se deben mantener en refrigeración para evitar la descomposición de las proteínas presentes y utilizarse a la brevedad posible.

### ***Paso 3: Licuado***

En una licuadora doméstica, marca Osterizer modelo 10-C de una velocidad se adicionó el CC (paso 1) y agua en una relación 1:2 en masa (una parte de CC y dos partes de agua) y se licuó durante 30 segundos. La mayor parte de proteínas, grasas y pigmentos y parte de los minerales se eliminan cuando se licua el CC con agua y se obtienen subproductos parcialmente desproteinizados (CPD).

### ***Paso 4: Filtración***

La pasta obtenida en el paso 3 se pasó por un tamiz con malla de 1mm de abertura para separar la parte líquida. Se recogió la parte sólida del 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 y se eliminó el exceso de agua.

### ***Paso 5: Secado***

Una vez eliminada el agua al CPD obtenido se puso a secar en una estufa eléctrica marca Felisa a 60°C durante 18 horas.

### ***Paso 6: Tamizado***

El CPD obtenido se tamizó para obtener un tamaño de partícula de 0.2 mm (149µm) <math>P</math> <math>2\text{mm}</math> y se conservó en refrigeración dentro de un envase hermético.

### ***3.2.2. Caracterización del CPD***

Esta caracterización se hizo con la finalidad de saber si el cefalotórax parcialmente desproteínizado había sido tratado correctamente, ya que es la principal y única materia prima con la que se trabajó y de donde se extrajeron los polímeros de interés (quitina y quitina parcialmente desacetilada o quitosana) y para disminuir el error en las pruebas propuestas que más adelante se mencionan en esta metodología de trabajo. La caracterización del CPD se hizo en una investigación preliminar a partir de las metodologías descritas en la literatura (Ríos-de-los Ríos y Ramírez-Morales, 2010).

### ***3.2.3. Preparación del disolvente MAC-141***

Los pasos seguidos para la preparación del disolvente MAC-141 fueron los siguientes (Flores-Ortega, 2004, 2008):

### ***Paso 1: Mezcla de reactivos***

En un balón de destilación de 500 mL se agregaron 277.5 g de cloruro de calcio, 180 mL de agua destilada y 99 mL de etanol. Al realizar esta técnica el matraz debe estar en un baño de hielo, pues la reacción es exotérmica.

### ***Paso 2: Reflujo***

A la mezcla hecha en el paso 1, se le pone a reflujo, con calor moderado, hasta que se disuelva completamente el cloruro, es decir hasta que llegue al equilibrio para obtener el disolvente MAC-141. Al disolvente MAC-141 obtenido se le enfría y se guarda en un recipiente hermético.

### ***3.2.4. Obtención de quitosana***

#### ***3.2.4.1. Sonicación de CPD con disolvente MAC-141***

Para el tratamiento de sonicación se utiliza un sonicador Fisher Scientific Dismembrator 550 con punta fina apropiada para el tratamiento de cantidades pequeñas de muestra pues se utiliza 1g de CPD más 10g de disolvente MAC-141, que son colocadas en un vial para sonicar, marca Falcon cónico, apropiado para la sonicación de la muestra pues debe cubrir la mayor superficie de la punta del sonicador. La muestra se homogeneiza y se lleva a sonicación con factores establecidos en un tiempo dado y a diferentes pulsos por segundo (Tablas 3.1 y 2) con objeto de encontrar la relación tiempo/radiación adecuada para la obtención de los polímeros. A cada muestra se le tomó la temperatura después de la sonicación y se observó si había pérdida visible de disolvente por incrustaciones de calcio en la punta del equipo. Las muestras obtenidas se filtraron con un equipo Millipore para separar el CPD del complejo polímero-disolvente.

#### ***3.2.4.2. Sonicación de CPD con disolvente MAC-141 y calentamiento a 45, 55 y 60°C***

Después de que las muestras fueron homogeneizadas y sonicadas con factores de tiempo y pulsos establecidos (Sección 3.1.2, Tabla 3.2), se vaciaron en un vaso de precipitado y se pusieron en agitación por 40 minutos a temperaturas de 45, 55 y 60°C. Una vez que la muestra estuvo completamente viscosa, se filtró con un equipo Millipore usando un medio filtrante *ad hoc* (Durán-Moreno, 2010). Se hidrató en “desecadores” herméticos, para recuperar el disolvente MAC-141 (recuperando el calcio como líquido y el metanol como vapor) y se identificó por IR, como se detalla más abajo.

### ***3.2.5. Procedimiento de purificación***

Las muestras se colocaron en un desecador hermético saturado de vapor de agua durante 24 horas para separar la mayor cantidad de calcio y metanol presentes debido al disolvente MAC-141. Pasado este tiempo las muestras se sacaron del desecador. El sobrenadante que se formaba se retiraba con una pipeta Pasteur y el precipitado se ponía a secar a 95°C durante 18 horas en una estufa marca Felisa para retirar los excedentes de agua y metanol. Después se lavaron con metanol y éter para quitar el agua ligada al polímero y permitir su identificación por espectroscopía de infrarrojo (IR) y se dejaron secar por otras 18 horas. Las muestras fueron caracterizadas por IR, solubilidad y grado de desacetilación.

Si las muestras no eran viscosas, esta característica indicaba que contenían una mayor cantidad de calcio. Para retirar éste, las muestras se pusieron en un desecador hermético saturado de vapor de agua durante 18 horas. Después de este tiempo las muestras se sacaron del desecador y se pasaron a un vial para lavar con agua destilada a pH de 6.4, precipitando el polímero obtenido. Durante el lavado se forma un precipitado y el agua es retirada con una micropipeta para facilitar el secado. El precipitado se seca en una estufa marca Felisa durante 18 horas a 95°C para retirar el excedente de metanol y agua. Una vez seco el producto (se formó un polvo blanco), se lavó con metanol y éter para retirar la mayor cantidad de agua ligada y se puso a secar por otras 18 horas. Las muestras fueron identificadas por grado de desacetilación, IR y solubilidad.

### ***3.2.6. Grado de desacetilación: Técnica potenciométrica***

Se pesaron 0.5 g de muestra y se disolvieron a una temperatura de 55°C, con agitación durante 15 minutos en 20 mL de HCl 0.3 N para la mayor disolución del polímero. Se añadieron 400 mL de agua destilada para permitir una buena dispersión del precipitado que se iba formando. Se tituló la disolución obtenida con NaOH 0.1 N leyendo las variaciones del pH con un potenciómetro, agitando constantemente. La curva de titulación se trazó en función de los mL de NaOH añadidos.

Gráficamente se determinaron los volúmenes  $a$  y  $b$  de la solución de NaOH gastada en la titulación del polímero, correspondientes a dos puntos de inflexión, los cuales se sustituyeron en la Ecuación 3-1 para obtener el porcentaje de grupos amino (%NH<sub>2</sub>) contenidos en el polímero.

$$\%NH_2 = ((16.1)(b-a)(.1))/m \quad (3-1)$$

$a$  = punto de inflexión menor

$b$  = punto de inflexión mayor

$m$  = masa de la muestra.

Para tener una referencia se realizó el procedimiento anterior, pero con una solución que no contenía muestra del polímero en estudio como se muestra en la Figura 3.2, así como otra muestra con quitina comercial Sigma (Anexo D).

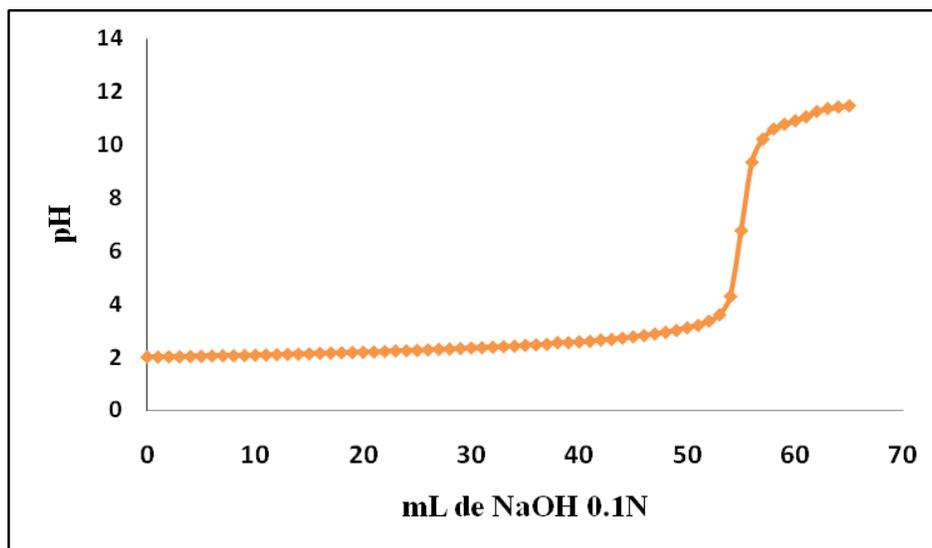


Figura 3.2. Titulación de HCl 0.3N con NaOH 0.1N sin muestra de quitina y quitosana

### 3.2.7. Pruebas de solubilidad

En un vial de 2mL se colocan 0.001g de muestra y 0.5mL del disolvente característico para solubilizar quitina o quitosana que, de acuerdo con su solubilidad, se compara con los datos de la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Tabla de solubilidad de quitina y quitosana (Flores-López, 2008)

Polímero	HCl (Diluido)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Diluido)	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ácido fórmico)	CH <sub>3</sub> -COOH-2% (ácido acético)	Agua
Quitina	insoluble	insoluble	soluble	insoluble	insoluble
Quitosana	soluble	insoluble	soluble	soluble	soluble

### 3.2.8. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

El análisis espectroscópico para cada una de las muestras obtenidas, se realizó en el Laboratorio de Espectroscopía de Infrarrojo de la USAI en un equipo FTIR 1605, de acuerdo con las metodologías estandarizadas en ese laboratorio.

### 3.2.9. Análisis estadísticos

Se empleó el paquete Statgraphics Plus 5.1 para analizar los datos experimentales y evaluar su confiabilidad, exactitud, precisión y determinar si hay diferencias entre ellos, de acuerdo con el instructivo del fabricante (Statgraphics, 2010).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANA

##### 4.1.1. Datos de los experimentos de CPD con MAC-Sonicación

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, sobre la extracción de quitina con disolvente MAC, la mezcla debe homogeneizarse por sonicación, con una duración de pulso ajustada a 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo durante el tiempo necesario haciendo un seguimiento con IR (infrarrojo) para observar las bandas características para formación de quitosana. Todas se hicieron a temperatura ambiente ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ).

En la primera propuesta se probaron muestras con 0.5 pulsos/segundo, estudiando después el efecto de las variaciones en las ondas ultrasónicas con intervalos de 0.2 para determinar la relación tiempo/radiación ultrasónica más eficiente en el intervalo de las condiciones de estudio para la solubilización de la quitina y la formación de quitosana a través de la desacetilación parcial de la quitina (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Obtención de quitina (Q) y quitosana (M) por disolución y sonicación simultáneas a diferentes pulsaciones y tiempos de proceso

Tiempo (min)	Sonicación de CPD con disolvente MAC-141, p/s			
	0.3	0.5	0.7	0.9
5	Q	Q	Q	Q
10	Q	(M1)	(M3)	Q
15	Q	(M2)	Q	Q

Q= quitina

M1, M2, M3: Muestras de quitina parcialmente desacetilada (quitosana)

En la Tabla 4.2 se presentan los rendimientos de quitina y quitosana para los tratamientos más efectivos.

Tabla 4.2. Rendimientos de quitina (Q) y quitosana parcialmente desacetilada (M) en g/g muestra inicial de CPD, obtenidos por sonicación a diferentes pulsaciones y tiempo de proceso

Tiempo, min	Sonicación de CPD con disolvente MAC-141, p/s			
	0	0.5	0.7	0.9
0	Q*	N.a.	N.a.	N.a.
5	N.a.	Q= 0.2375	Q= 1.00	Q= 0.7746
10	N.a.	<b>0.2719 (M1)</b>	<b>0.7352 (M3)</b>	Q= 0.2528
15	N.a.	<b>0.4330 (M2)</b>	Q= 0.4045	Q= 0.3305

N.a. No aplicable. Q=quitina. \*Obtenido con el proceso original sin sonicación. M1, M2, M3: Muestras que presentan desacetilación a partir del método descrito en el inciso 3.2.6

En esta primera parte se pudieron caracterizar por espectroscopía de infrarrojo cada una de las muestras en el diseño de experimentos de la Tabla 4.2, pues cada uno de los productos obtenidos de los tratamientos presenta un espectro de infrarrojo diferente como se explicará más adelante.

Además, para cada muestra se midió el grado de desacetilación, pues la caracterización por IR no es totalmente confiable, ya que las bandas de quitina y quitosana son muy similares por sus grupos funcionales, además de que el contenido de agua presente en el polímero no permite se defina la frecuencia de los grupos funcionales de ambos polímeros (sección 4.1.2. Caracterización de M3).

Por otro lado, el grado de desacetilación da la pauta para saber si se está formando quitosana a partir de quitina por la identificación grupos amino libres formados a partir de los grupos amida presentes en la quitina.

A las muestras representadas como Q y M (1, 2, 3) (Tabla 4.2) se les determinó el grado de desacetilación y se obtuvo un gráfico de pH *versus* el volumen añadido de NaOH.

Como se mencionó en el capítulo anterior, se realizó un blanco para el grado de desacetilación que no contenía ningún tipo de muestra del polímero a identificar (Figura 3.2, sección 3.2.6), otro blanco con quitina Sigma (Anexo D) y otro con quitosana Sigma. De la Tabla 4.2 se tomaron las muestras designadas como M1, M2 y M3 ya que, de acuerdo con la caracterización, IR y grado de desacetilación, fueron las que presentaron resultados esperados para la obtención de quitosana a partir de la reacción de CPD y sonicación.

### 4.1.2. Caracterización de M3

De acuerdo con los tratamientos realizados (Tabla 4.2) se pudieron obtener resultados para la obtención de quitosana con las siguientes condiciones:

Muestra	Tiempo máximo expuesta al sonicador, min	Sonicación, p/s	Rendimiento, g de muestra/g CPD
M3	10	0.7	0.7352

Antes de que la muestra M3 fuera identificada por grado de desacetilación o IR, ésta se puso en un desecador saturado de vapor de agua para que el disolvente MAC-141 en el que se encontraba disuelto el polímero, absorbiera la mayor cantidad de agua y solubilizara los iones calcio del complejo polímero-calcio y así retirar la mayor cantidad de calcio, para que éste no interfiriera en su caracterización (grado de desacetilación, Figura 4.1).

Debido a que los polímeros quitina y quitosana contienen grupos hidrofílicos, como los grupos -OH o -NH<sub>2</sub>, estos polímeros tenderían a presentar gran cantidad de agua ligada con picos característicos en 1640.3 cm<sup>-1</sup> o agua libre con vibraciones correspondientes en el IR en 1655.8 cm<sup>-1</sup> (Velázquez-de-la-Cruz y Martín-Polo, 2000). Esto no permitiría la identificación de las bandas de -NH<sub>2</sub> principalmente, que son características del polímero a identificar. Por ello, se realizaron lavados con metanol y éter para quitar la mayor cantidad de agua ligada al polímero y visualizar las bandas de quitina o quitosana. Así, en el espectro de la Figura 4.2 sólo se aprecian 4 bandas con mayor intensidad en la región de 3449.12 cm<sup>-1</sup>, asignadas al grupo OH característico de ambos polímeros pues aparece en 3444.0 cm<sup>-1</sup> (Cañipa y col.,

1994). La banda en  $1613$  y  $1629\text{ cm}^{-1}$  se asigna al grupo  $-\text{NH}_2$  grupo presente en el polímero quitosana, característico en  $1656$  (Cañipa y col., 1994) o en  $1621\text{ cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009). La diferencia entre las bandas obtenidas experimentalmente y las encontradas en la bibliografía se puede deber a que las muestras fueron caracterizadas con una cantidad residual de calcio presente en la muestra. Además, aunque el contenido de agua ligada y agua libre es teóricamente cercano a cero, aparece un desplazamiento distinto al mostrado en la quitosana comercial Sigma (Anexo B).

La banda en  $3489.72\text{ cm}^{-1}$  se asigna al grupo N-H característico entre  $3400$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  (Mármol y col., 2004) del grupo amida de la quitina. A mayor frecuencia, se asigna al grupo N-H teniendo un enlace sencillo que le permite más vibraciones entre sus átomos y, por tanto, aparece a mayor frecuencia en el espectro de infrarrojo. En el espectro de la Figura 4.2 aparecen los grupos característicos de quitina y quitosana pero no se puede definir con precisión, por lo que se decidió obtener el grado de desacetilación para determinar el porcentaje de grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), característicos del polímero quitosana.

### Grado de desacetilación de M3

Los  $0.7352\text{g}$  obtenidos de M3 se titularon según el procedimiento 3.2.6, para determinar el grado de desacetilación, como se muestra en el Figura 4.1.

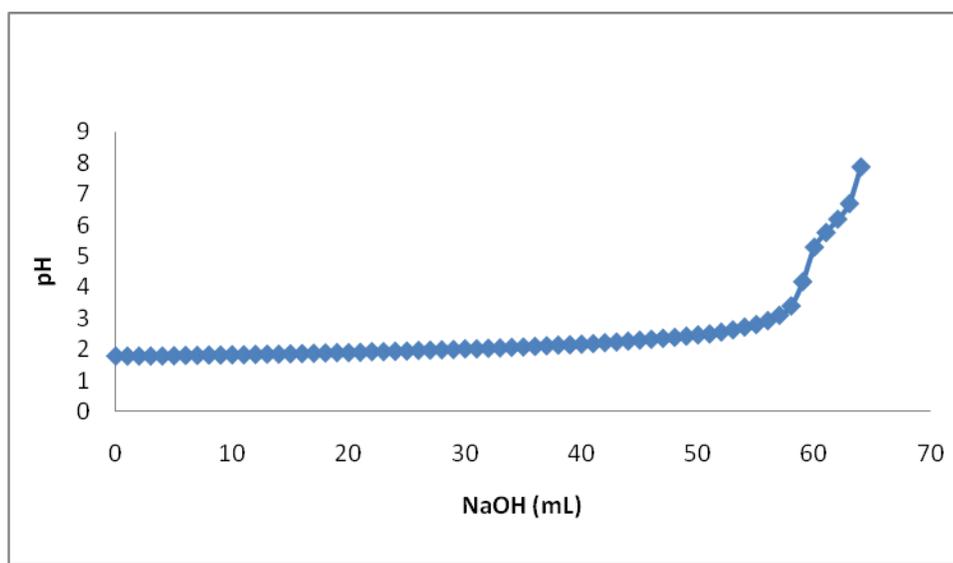


Figura 4.1. Curva de titulación de la muestra M3 para determinar el % de grupos amino

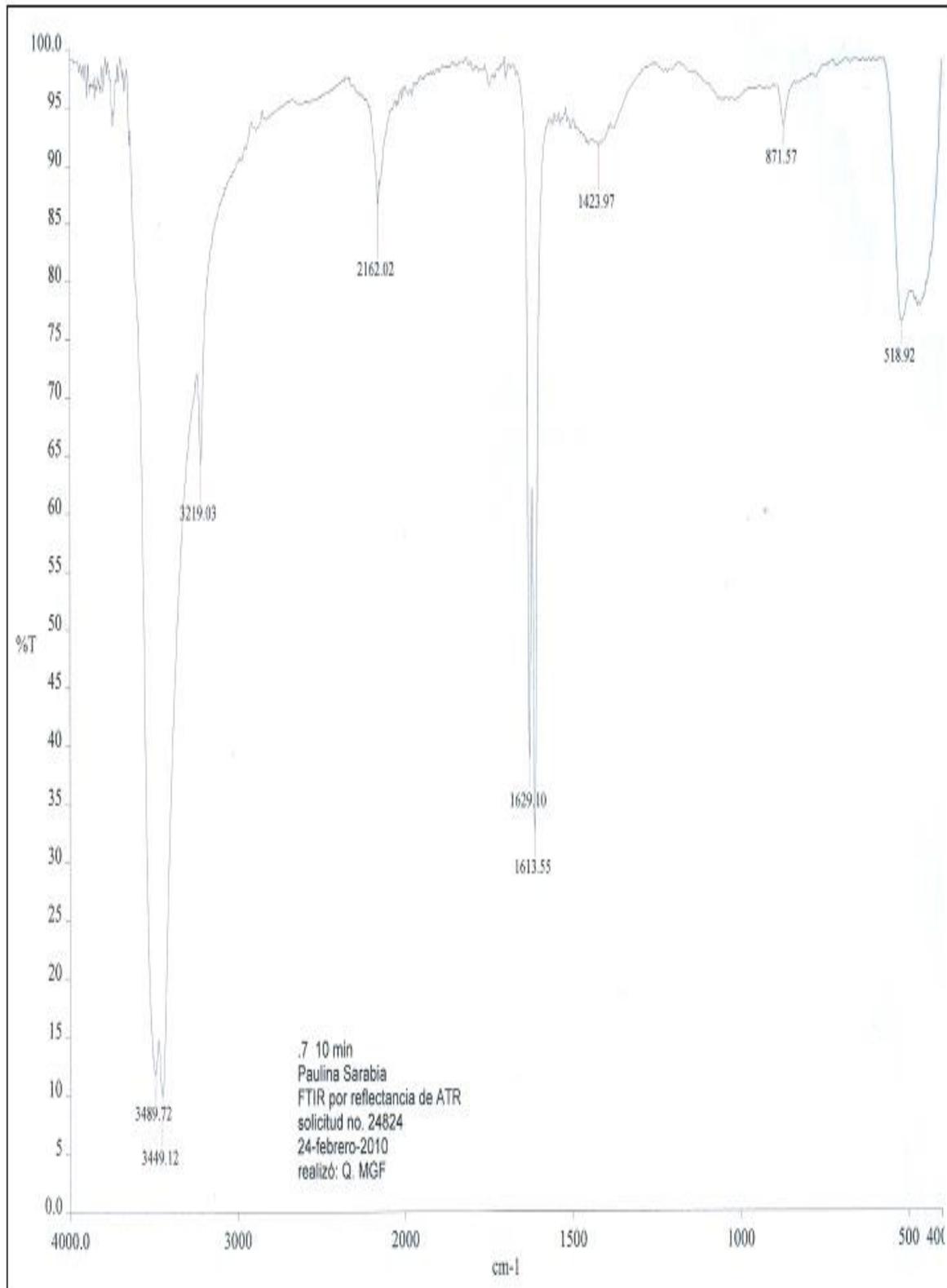


Figura 4.2. Espectro de infrarrojo para caracterización de M3

El % de grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) se determina por la cantidad de solución de NaOH gastada que reacciona, primero, con el ácido libre en la disolución y, después, dado que debe desplazarse de la molécula de quitosana el anión cloruro unido al grupo amino libre. La quitosana precipita para quedar libre en un medio neutro, por lo que puede registrarse la diferencia de pH ente estos dos puntos y obtener una curva de pH *versus* el volumen de NaOH añadido, con dos puntos de inflexión. El primer (a) y segundo (b) puntos de inflexión son equivalentes a la titulación del exceso de ácido clorhídrico y al de la titulación de la quitosana protonada, respectivamente. La diferencia del volumen entre estos dos puntos se corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permite la determinación del grado de desacetilación (Hidalgo y col., 2008).

En el procedimiento del grado de desacetilación se encontró un punto máximo (b) y mínimo (a). Aunque esto no indica que existen grupos amino presentes en la muestra M3, pueden ser los que estén ligados a la quitosana parcialmente desacetilada o aminoácidos que no se retiraron en el procedimiento de desproteínización de CPD. Si estos aminoácidos de proteínas estuvieran presentes, entonces se observarían en el espectro de infrarrojo (Figura 4.2) en  $1204\text{-}1224\text{ cm}^{-1}$ , y no se observaría precipitación del polímero quitosana al aumentar el pH de la solución, pero si se observó este fenómeno. Para determinar los grupos amino presentes en la quitosana parcialmente desacetilada se decidió obtener la primera derivada correspondiente a la titulación de la Figura 4.3.

### **Primera derivada de M3**

La tendencia mostrada en el Figura 4.3, se encuentran los puntos de inflexión cuyos valores se determinaron por el criterio de la primera derivada, graficando  $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$  de NaOH contra el promedio de solución de NaOH gastada.

Los picos representan el punto mínimo en 59.5 y máximo en 63.5 de la cantidad de solución de NaOH gastada, los cuales pueden ser identificados en la curva de titulación (Figura 4.1) que corresponden al % de grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) presentes en la muestra.

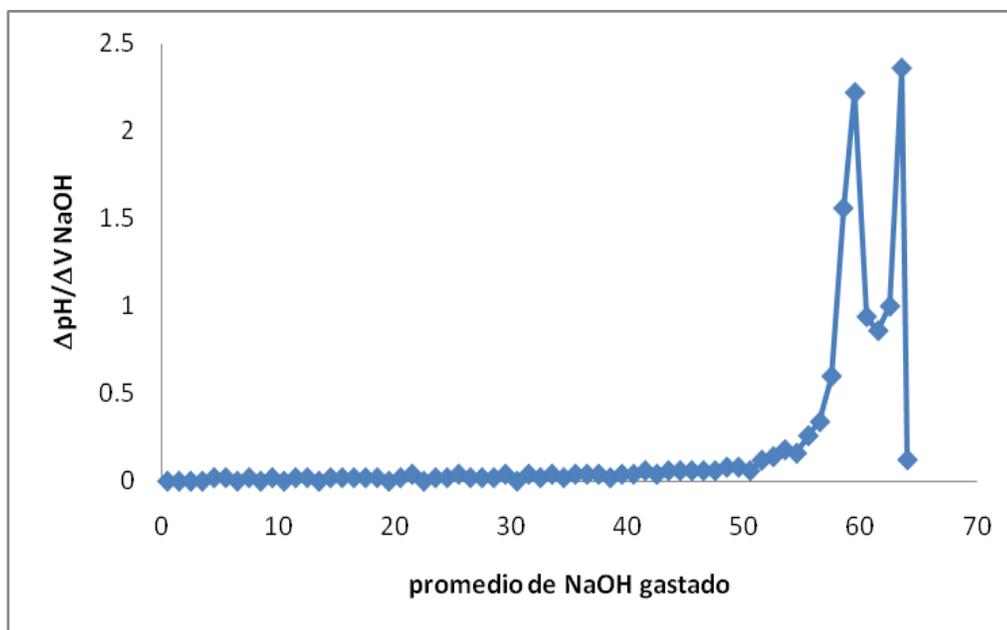


Figura 4.3. Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo en la curva de titulación de M3

Si se toman los puntos máximo y mínimo como  $b=63.5$  y  $a=59.5$  y la masa de M3 = 0.7352g, entonces el % de grupos amino ( $-NH_2$ ) =  $[(16.1)(b-a)(0.1)]/M3 = 8.75\%$  que es igual al porcentaje de desacetilación.

El porcentaje de grupos amino es muy bajo, lo que hace difícil la caracterización del polímero por espectroscopía de infrarrojo, aunque esta técnica permite observar que no hay grupos amino de proteínas que se pueden confundir con el grado de desacetilación.

En la muestra M3 se encontraron por IR grupos característicos de quitina y  $-NH_2$  característicos de quitosana parcialmente desacetilada. También se observó una relación entre el grado de desacetilación y el criterio de la primera derivada para identificar sólo y específicamente quitosana parcialmente desacetilada.

Se observó durante la titulación de la muestra (M3) un precipitado a pH básico. Según Hidalgo y col. (2008), la quitosana precipita en medios ligeramente ácidos a neutros, indicando que probablemente era quitosana.

### 4.1.3. Caracterización de M2

El procedimiento de sonicación y gramos obtenidos para la muestra designada como M2 se muestra a continuación:

Muestra	Tiempo máximo expuesta al sonicador, min	Sonicación, p/s	Rendimiento g de muestra/g CPD
M2	15	0.5	0.4330

La muestra M2 caracterizó por espectroscopía de infrarrojo y el gráfico se muestra en la Figura 4.4. En ella, la banda presente en  $3453.73\text{ cm}^{-1}$  se compara con bandas en  $3434\text{ cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009) y  $3444$  (Cañipa y col., 1994), que corresponden al grupo OH. El desplazamiento en  $3502.90\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con el grupo N-H, el cual se caracteriza en  $3400$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  (Mármol y col., 2004).

La banda en  $1629\text{ cm}^{-1}$  es característica el grupo  $-\text{NH}_2$ . Cuando está ligado al polímero quitosana aparece en  $1621\text{ cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009),  $1647\text{ cm}^{-1}$  (quitosana Sigma, Anexo B) y  $1656\text{ cm}^{-1}$  (Cañipa y col., 1994). En la muestra M2 aparece la banda característica del anillo piranósico en  $1065\text{ cm}^{-1}$  el cual aparece en  $1060\text{ cm}^{-1}$  (quitosana Sigma, Anexo B),  $1070\text{ cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009) y  $1074\text{ cm}^{-1}$  (Cañipa y col., 1994). En la muestra de M2 las bandas para quitina y el grupo  $\text{NH}_2$  correspondiente a la desacetilación de la quitosana son visibles al igual que las bandas del anillo aromático. Además, no se encuentran bandas características de aminoácidos.

### Grado de desacetilación de M2

A la muestra de M2 con masa de  $0.4330\text{ g}$ , se le determinó el grado de desacetilación, el cual se muestra en el Figura 4.5.

De los datos obtenidos en la Figura 4.5, que representa la titulación de la muestra M2, se obtuvo la primera derivada, para determinar los puntos de inflexión máximo y mínimo.

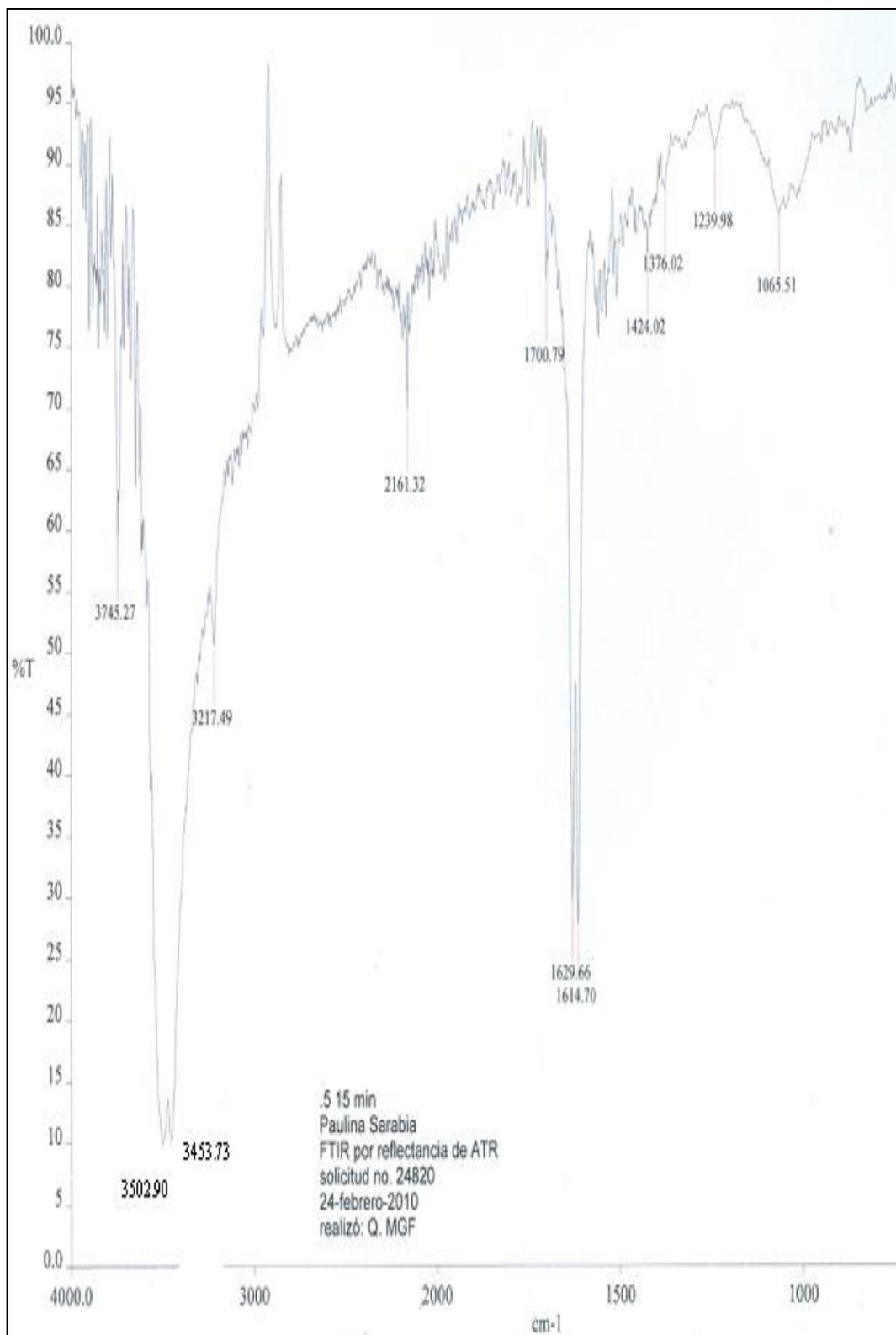


Figura 4.4. Espectro de infrarrojo para la caracterización de M2

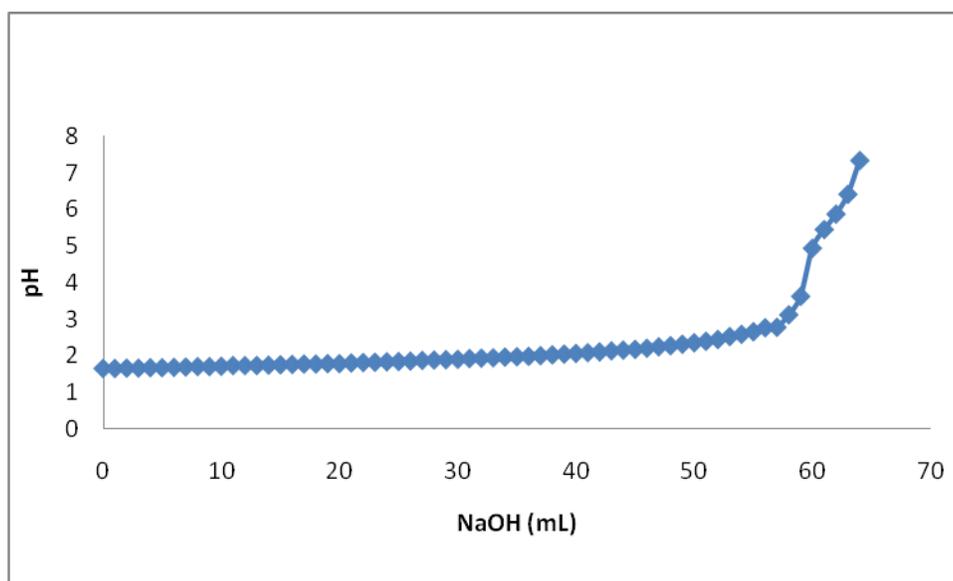


Figura 4.5. Curva de titulación M2 para determinar % de grupos amino ( $-NH_2$ )

Con estos puntos, por su diferencia entre ellos, se puede determinar la cantidad de HCl consumido para protonar grupos amino (Parada y col., 2004) unidos al polímero de quitosana parcialmente desacetilada, lo cual se puede asegurar ya que, como se mostró en la Figura 4.4 de espectroscopía de infrarrojo, no hay bandas correspondientes a aminoácidos de proteínas.

Al igual que con la muestra M3 se buscó una coincidencia entre el grado de desacetilación y el criterio de la primera derivada.

### Primera derivada de M2

La Figura 4.6 presenta la primera derivada de la curva de titulación (Figura 4.5) de la muestra M2. Localizando los puntos de  $b=63.5$  y  $a=59.5$  que, al igual que en la curva de titulación, corresponden al máximo y mínimo, respectivamente. Y tomando a 0.4330g como la masa de la muestra considerada pura, pues durante el proceso de humidificación de la película obtenida se retiró la mayor cantidad de calcio posible, es posible llevar a cabo el procedimiento para determinar el porcentaje de grupos amino ( $-NH_2$ ) en la titulación.

Tomando los valores de  $a$  y  $b$ , así como la masa de la muestra para sustituirse en  $(-\text{NH}_2) = [(16.1)(b-a)(0.1)]/m$ , se obtiene 14.87% de grupos  $(-\text{NH}_2)$ . En M2, el porcentaje de desacetilación aumentó prácticamente al doble del obtenido para M3 (8.75%).

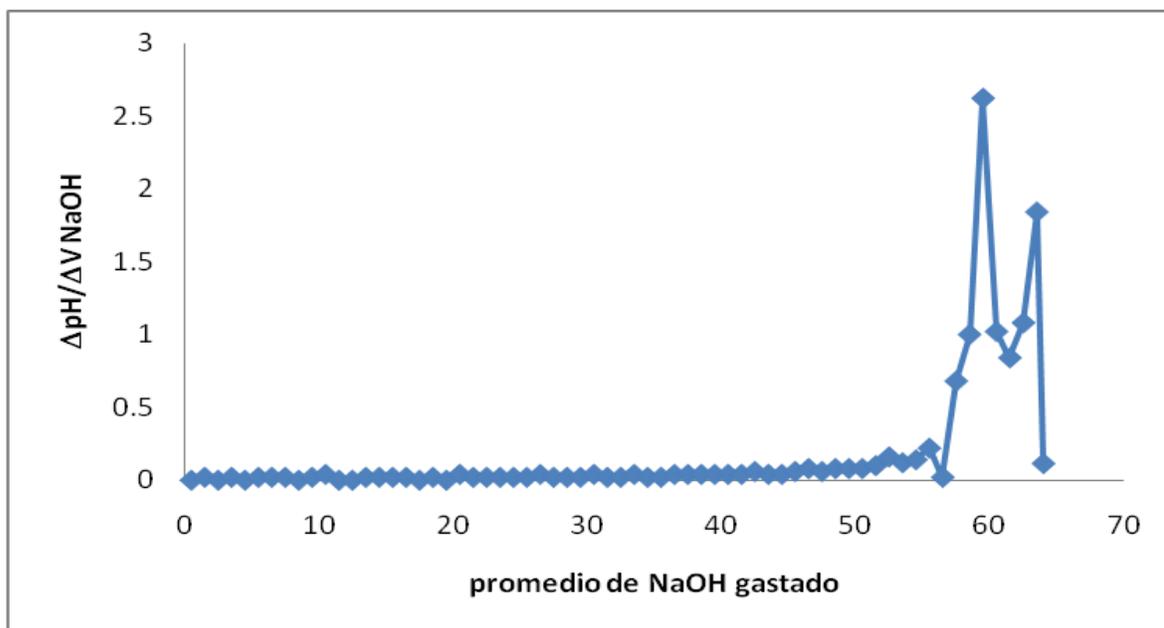


Figura 4.6. Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M2

### 4.1.4. Caracterización de M1

El tratamiento en la muestra M1 es el siguiente:

Muestra	Tiempo máximo expuesta al sonicator, min	Sonicación, p/s	Rendimiento, g de muestra/g CPD
M1	10	0.5	0.2719

La muestra M1, al igual que las dos anteriores, fue caracterizada midiendo su grado de desacetilación (Figuras 4.7 y 8) y por espectroscopía de infrarrojo (Figura 4.9).

### Grado de desacetilación de M1

Se determina el porcentaje de grupos amino de M1 por el método de titulación, obteniendo los datos de la Figura 4.7.

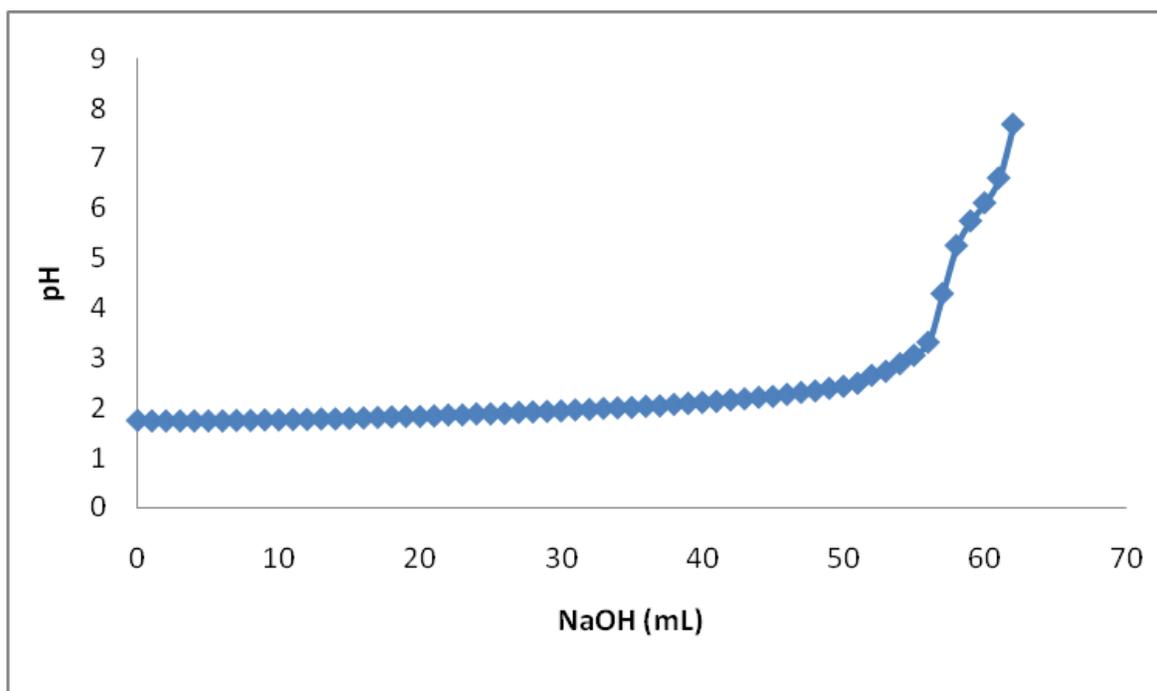


Figura 4.7. Curva de titulación de la muestra M1 para determinar el % de grupos amino (-NH<sub>2</sub>)

De acuerdo con el criterio de la primera derivada se pueden obtener el punto máximo = 61.5 y mínimo = 56.5 de la curva de titulación, empleando el criterio de la primera derivada como se muestra en la Figura 4.8.

Si se toman los puntos  $b=61.5$  y  $a= 56.5$  y  $M1 = 0.2719g$ , entonces, el porcentaje de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) =  $[(16.1)(b-a)(0.1)]/\text{masa de M1} = 29.6\%$ .

El porcentaje de desacetilación de la muestra M1 fue mayor que para M2 y M3, indicando un mayor grado desacetilación de la quitina, lo cual también se pudo comprobar al comparar el espectro de infrarrojo de M1, obtenido experimentalmente, con el del Anexo B,

correspondiente a la quitosana Sigma. De las tres muestras caracterizadas se pudo observar que, a mayor grado de desacetilación, el espectro de infrarrojo de quitosana parcialmente desacetilada se parece más a un espectro de quitosana comercial.

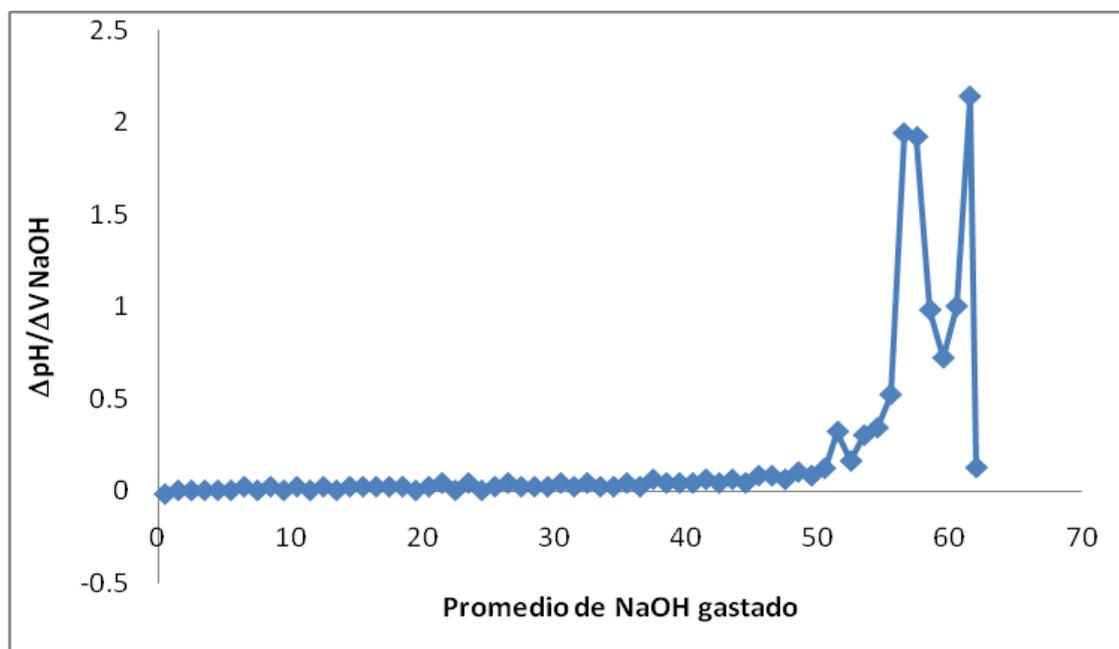


Figura 4.8. Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M1

El espectro de infrarrojo de M1 presenta una banda muy ancha en  $3438.36\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo OH (Cañipa y col., 1994; Hernández y col., 2009) (quitosana Sigma, Anexo B), lo que impide observar bandas de N-H y C-H. Aparece una señal en  $1628\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $-\text{NH}_2$ .

Se observan señales del anillo piranósico en  $1050\text{ cm}^{-1}$ , características en  $1060\text{ cm}^{-1}$  (quitosana Sigma, Anexo B) y  $1006\text{ cm}^{-1}$  del enlace C-O-C, identificados también en  $1014\text{ cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009),  $1026\text{ cm}^{-1}$  (quitosana Sigma, Anexo B) y  $1030\text{ cm}^{-1}$  (Cañipa y col., 1994). Aparece una banda en  $1551.56\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a una amida secundaria, grupo presente en el polímero quitina.

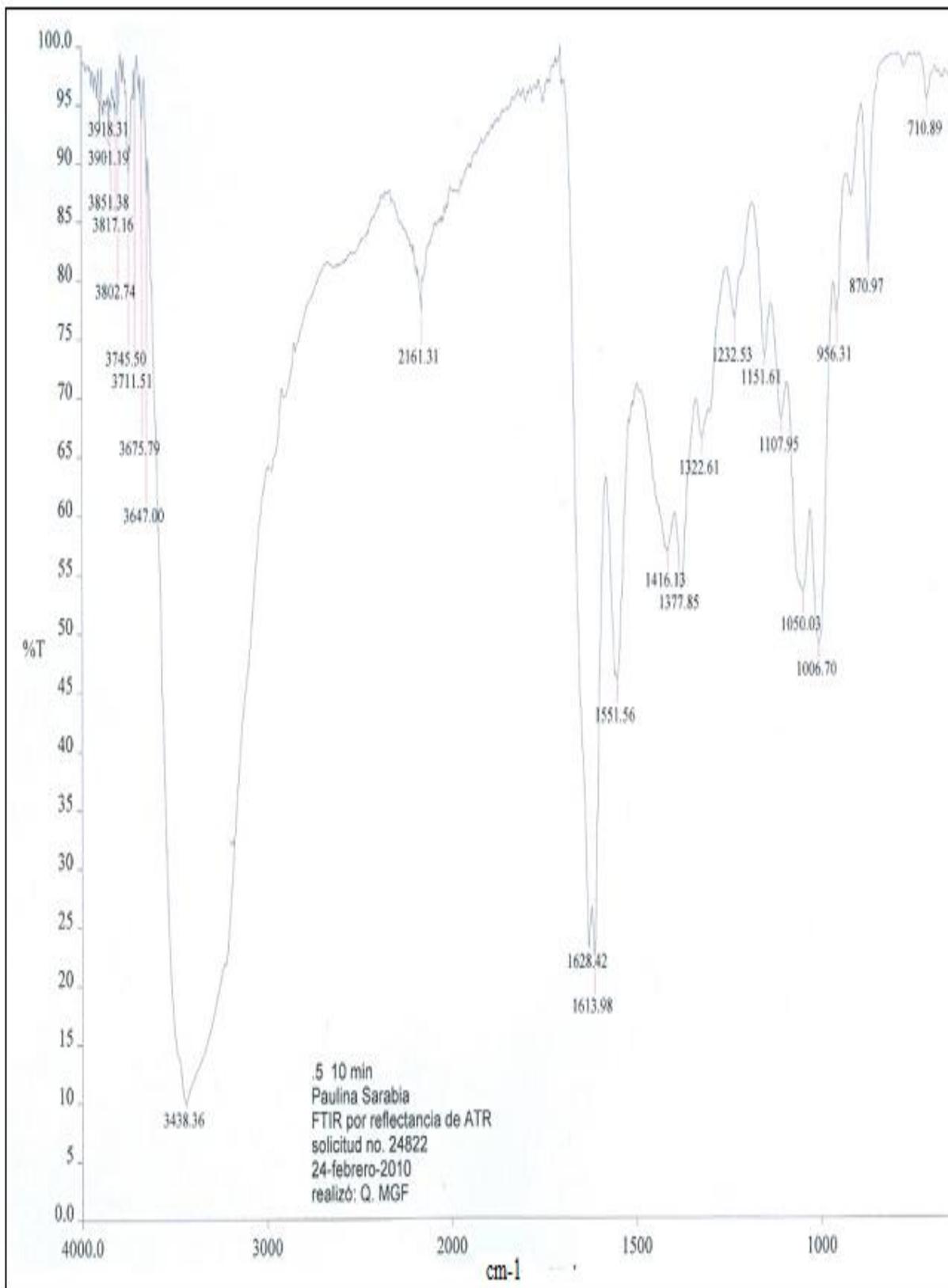


Figura 4.9. Espectro de infrarrojo para caracterización de M1

La Tabla 4.3 presenta una comparación entre las muestras obtenidas en esta investigación con las de otros grupos de investigación.

Tabla 4.3. Comparación de los porcentajes de desacetilación obtenidos en esta fase de la investigación, con respecto a los obtenidos en la literatura

Metodología seguida en ésta y otras investigaciones	Grado de desacetilación		
En esta investigación Procedimiento usado: cefalotórax parcialmente desproteínizado en disolvente MAC-141, 1:10 m/m, reacción en sonicación con pulsos de 0.5 a 0.9 durante 5, 10 y 15min	M3= 8.7% de (-NH <sub>2</sub> )	M2= 14.8% de (-NH <sub>2</sub> )	M1= 29.6% de (-NH <sub>2</sub> )
Barreto y col. (2001) Procedimiento usado: Tratamiento previo de sonicación (30 a 90 minutos) de quitina en agua, agitación magnética durante 60 minutos a 55°C y posteriores tratamientos con hidróxido de sodio al 40% a temperatura de 115°C	Contribuye al aumento de la desacetilación de la quitina de 8 a 15% (7%)		
Ramos-Ponce (2009) Procedimiento usado: desacetilación de la quitina vía enzimática [quitindesacetilasa (Ec. 3.5.1.41)]	La desacetilación de la quitina se aumenta de 0.5 hasta 9.5% (9%)		
Ramos-Ponce (2009) Procedimiento usado: quitina de cangrejo en condiciones severas de álcali (40 y 50%) y tiempos de residencia cortos de 12 y 15min en microondas	Acelera la reacción de desacetilación de quitina. En este tratamiento hay peptización de la quitina con aumento de la desacetilación de 15 a 20% (5%)		
Muzzarelli (1985) Procedimiento usado: disoluciones de quitosana seca 57.4% de desacetilación (42.6% de acetilación) en soluciones de ácido acético 0.1M a pH=1, son sonicadas a temperatura ambiente por 40 minutos	El grado de desacetilación del polímero de quitosana era de 57.4 y pasa a 81.6% (24.2%)		
García (2006) Procedimiento usado: extracción de quitina usando ácidos (relación 1:30 p/v): ácido oxálico > ácido cítrico > agua > NaOH (en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0%) y tiempo de reacción en la autoclave 5 y 10min	Valores de grado de desacetilación para la quitina son de 8.6% y aumenta a 24.7% (16.1%)		
García (2006)	Esta autora plantea que la nomenclatura de quitina debe darse a polímeros cuyo grado de desacetilación es inferior al 60% y nombrar quitosanas a los polímeros con grados de desacetilación mayores al 60%		

De acuerdo con los resultados presentados en las secciones 4.1.2, 3 y 4, se obtuvo un cambio en la reactividad de la quitina para ciertas condiciones de tiempo y radiación por ultrasonido M3= 8.7%, M2= 14.8%, M1= 29.6%, pues en comparación con el blanco de quitina, obtenido de Sigma Aldrich, éste presenta un grado de desacetilación de 1.4%, porcentaje de grupos amino detectado por la misma técnica potenciométrica (Anexo D, Figura D1 y D2) con la que se identificaron a los grupos amino de M1, M2, M3.

El cambio en la reactividad de la quitina o su desacetilación parcial, se logró, pues en la Tabla 4.3, Barreto y col. (2001) reportaron que por el método de sonicación la desacetilación cambió de 8% a 15%, es decir hubo un aumento de 7% de grupos  $-NH_2$ . Ramos-Ponce (2009) consideró que por el método enzimático el grado de desacetilación cambió de 0.5% a 9.5% (aumento de grupos  $-NH_2$  de 8.5%) y por tratamiento de microondas de la quitina, aumentó la desacetilación de 15 a 20% (incremento de grupos  $-NH_2$  de 5%). Muzzarelli (1985) utilizó la sonicación y a pH ácido obtuvo un cambio en la desacetilación de 57.4 a 81.6% (incremento de grupos  $-NH_2$  de 24.2%). Y, por último, García (2006) obtuvo un cambio en la desacetilación de 8.6 a 24.7% (incremento de grupos  $-NH_2$  de 16.1%) usando como energía de reacción para la reactividad de la quitina presión en autoclave y disolventes ácidos, bases y agua.

El cambio en el grado de desacetilación de la quitina se logró en buenas proporciones en comparación con las técnicas descritas por otros autores, utilizando tratamientos similares como la sonicación y tiempo de tratamiento (5, 10 y 15 min)

### **4.2. DATOS EXPERIMENTALES DE CPD CON MAC-141 USANDO SONICACIÓN Y CALENTAMIENTO A 45, 55, 60°C**

Después de llevar a cabo el procedimiento descrito en la Tabla 4.1, cada una de las muestras se someten a diferentes temperaturas, considerando que la temperatura podría dar la energía de activación que permitiría romper los enlaces N-C=O del grupo amida de la molécula de quitina, al igual que en el apartado anterior la sonicación era la que rompía los enlaces del

grupo amida. En el tratamiento a 60°C, 0.9 p/s, 10 min, la muestra considerada como M4 (Tabla 4.4) presentó desacetilación.

Tabla 4.4. Datos obtenidos para una muestra de quitina parcialmente desacetilada (M4) obtenida por disolución-sonicación a una temperatura de 60°C

Muestra	Masa, g	Sonicación, p/s	Grado de desacetilación (Anexo H)	Tiempo, min	Temperatura de calentamiento, °C
M4	0.8804	0.9	36.5	10	60

### 4.2.1 Caracterización de M4

La Tabla 4.4 indica que, con el procedimiento de disolución-sonicación más calentamiento a 60°C, se pudo obtener quitina con un porcentaje de desacetilación de 36.5%. Durante el procedimiento de determinación del grado de desacetilación se observó un precipitado al titular la muestra M4 con hidróxido de sodio. Esto sugiere que es quitosana, la cual precipita a valores de pH básicos. Este precipitado se filtró y secó para ser identificado por espectroscopía de infrarrojo (Figura 4.10). En el espectro de la Figura 4.10 se observan bandas características en 3262.31  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo N-H que aparece en 3254  $\text{cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009) y comparado con un espectro de quitosana comercial Sigma (Anexo B) en 3293.8  $\text{cm}^{-1}$ , la banda en 2879.18  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo C-H de la quitosana que comúnmente aparece en 2873.62 (espectro de quitosana Sigma, Anexo B) y en 2892  $\text{cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009). El grupo amino  $\text{NH}_2$ , característico para quitosana en 1626.17  $\text{cm}^{-1}$ , el cual según Hernández y colaboradores (2009) aparece en 1621  $\text{cm}^{-1}$ , comparado con el espectro de quitosana sigma aparece en 1647.10  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas que se presentan en 1066.89 y 1025  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al grupo piranósico y C-O-C, respectivamente. Éstos aparecen en 1070 y 1014  $\text{cm}^{-1}$  (Hernández y col., 2009) y 1060 y 1026  $\text{cm}^{-1}$  (espectro Sigma, Anexo B). En este último procedimiento se pueden apreciar bandas características de quitosana comparado con espectros de la bibliografía (Hernández y col., 2009) y quitosana Sigma. En cada una de las muestras hasta M4 aparecen bandas características de quitosana ( $-\text{NH}_2= 1626\text{cm}^{-1}$ ) y que en un espectro de quitina no se observan estos desplazamiento (Anexo C).

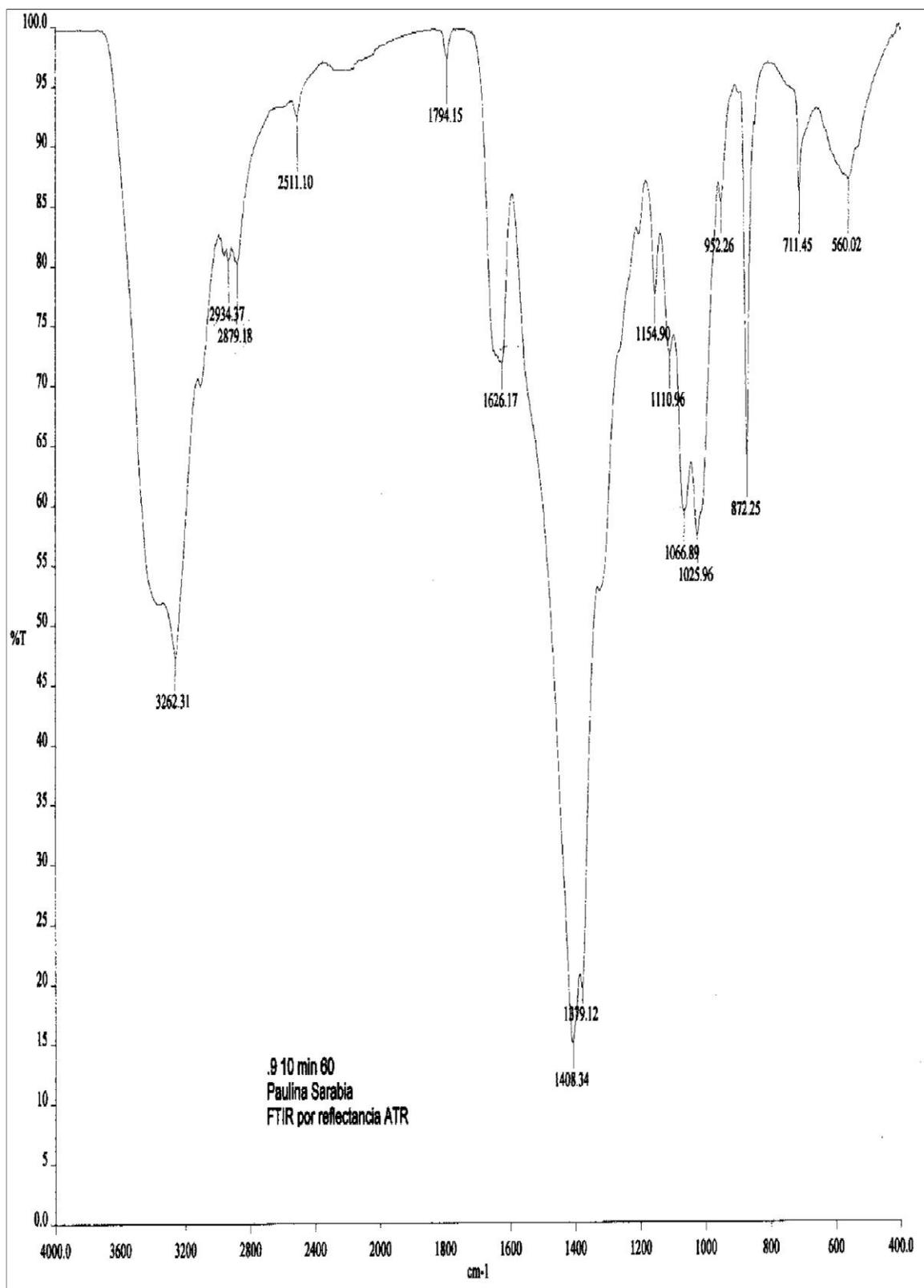


Figura 4.10. Espectro de infrarrojo para la caracterización de M4

En procedimientos tradicionales para la desacetilación de la quitosana con hidróxido de sodio se requiere de poner la quitina a temperatura de 100°C (Tabla 2.2). En el caso de la muestra M4, cuando fue sometida a temperatura de 60°C se detectó desacetilación, el aumento de la temperatura en comparación con M1 (temperatura ambiente) contribuyó al aumento del grado de desacetilación. La desacetilación de la quitina a menor temperatura podría deberse a un cambio en la morfología de la quitina debido a la sonicación ya que, según Barreto y col. (2001), la quitina tiene una superficie lisa (Figura 4.11) y después de la sonicación el área superficial de la quitina es áspera debido a canales formados en el polímero (Figura 4.12). Apoyando esta idea, la sonicación incrementa la accesibilidad de reactivos y, por tanto, una menor cantidad de energía para la desacetilación.

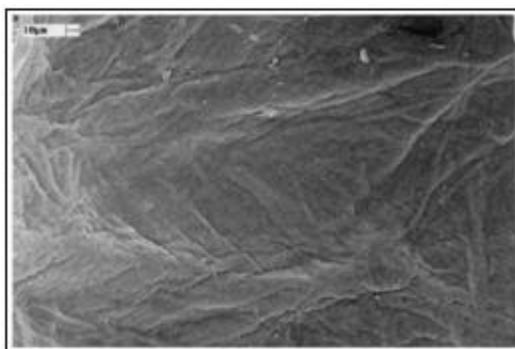


Figura 4.11. Espectroscopía electrónica de barrido de quitina comercial: 1000x ampliaciones

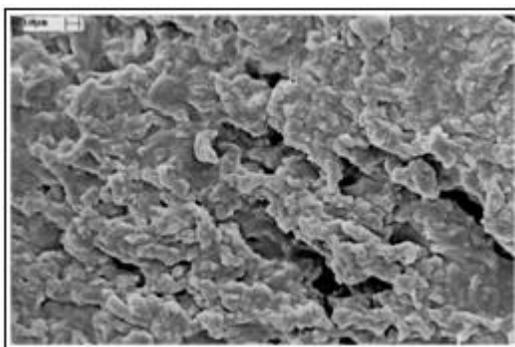


Figura 4.12. Espectroscopía electrónica de barrido de quitina sonicada: 1000x ampliaciones

Estos resultados experimentales permiten decir que los tratamientos de las muestras M1 (10 min, 0.7 p/s, MAC) y M4 (10 min, 0.9 p/s, 60°C, MAC), producen quitina desacetilada con porcentajes de desacetilación de 29.6 y 36.57%, respectivamente. Aunque se obtienen porcentajes de desacetilación menor al 60%, en análisis por espectroscopía de infrarrojo de cada uno de los tratamientos donde se obtiene quitina parcialmente desacetilada (quitosana) es significativamente diferente del espectro de infrarrojo de quitina Sigma (Anexo C).

### 4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Para el análisis de los datos experimentales, se empleó el programa Statgraphics v. 5.1. Esto permitió determinar cuál de los tratamientos obtuvo el mayor rendimiento.

#### 4.3.1. *Análisis estadístico relación tiempo/radiación*

La Tabla 4.5 presenta el análisis estadístico de los rendimientos obtenidos por triplicado, las muestras fueron sujetas a los procedimientos señalados en los experimentos anteriores: disolución-sonicación.

Tabla 4.5. Análisis estadístico de los datos: Rendimientos de quitina (Q) y quitina parcialmente desacetilada (M) en g/g muestra inicial de CPD (Proceso: Disolución de CPD con MAC-141 y sonicación a diferentes pulsaciones y tiempos de proceso)

Tiempo, min	Sonicación (p/s) de CPD con disolvente MAC			
	0	0.5	0.7	0.9
0	0	0	0	0
5	0	0.1204±0.1655 (Q)	0.5065± 0.7006 (Q)	0.4723± 0.4275 (Q)
10	0	0.3400±0.096 (M1)	0.839±0.1470 (M3)	0.236±0.3050 (Q)
15	0	0.322±0.156 (M2)	0.214±0.268 (Q)	0.170±0.2269 (Q)

De acuerdo con las Figuras 4.13 y 4.14, la relación de variables pulsos por segundo en función del tiempo de tratamiento en la sonicación muestra que con el tratamiento con 0.7 pulsos por segundo en un tiempo de 10 minutos se obtuvo el mayor rendimiento. En la Tabla 4.5, con este mismo tratamiento se obtuvo quitina parcialmente desacetilada (M3). Se realizó el

análisis de medias (Anexo F) para saber si existía diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos de los diferentes tratamientos, pero mostraron que los rendimientos son similares ya que para cualquier tratamiento se puede obtener aproximadamente el mismo rendimiento.

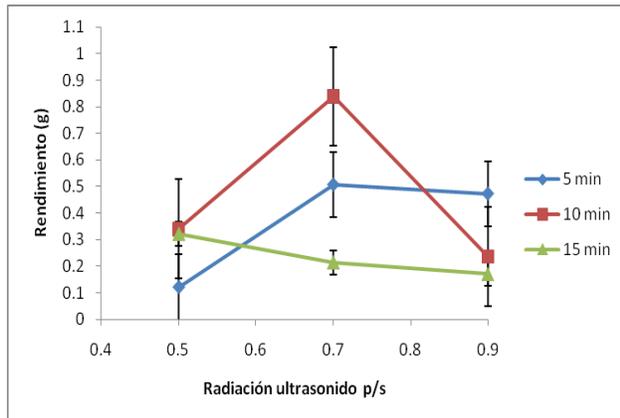


Figura 4.13. Análisis estadístico en función del tiempo de los rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos.

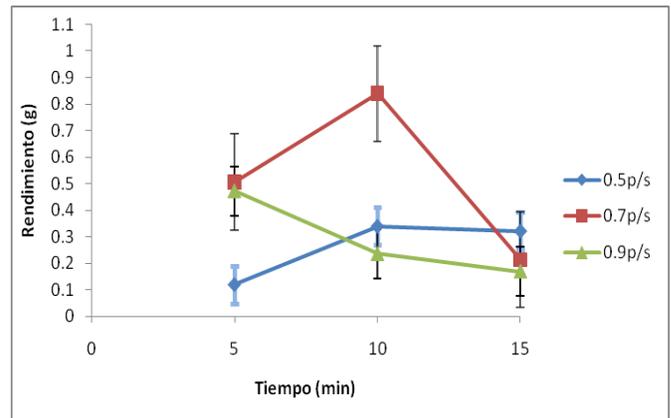


Figura 4.14 Análisis estadístico de los rendimientos del polímero obtenido en función de pulsos por segundo en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos

La variación para el tratamiento con 0.7 p/s en 10 minutos consiste en obtener quitina parcialmente desacetilada -quitosana- (Capítulo 4, sección 4.1.2). A partir del análisis de medias se decide hacer un análisis de varianza, andeva (*ANOVA* por su nombre en inglés) (Anexo F, F1, F2) para continuar con el análisis estadístico, donde  $F(\text{andeva}) = 0.46$  y  $P(\text{andeva}) = 0.64$ , indicando que no hay diferencia significativa en el rendimiento, es decir, se obtienen cantidades similares del polímero desacetilado en todos los tratamientos.

También se puede observar en la Figura 4.13 que, después de 0.7p/s de sonicación, empieza a disminuir la cantidad de polímero íntegro. Esto puede deberse al incremento en el tiempo de sonicación (Figura 4.14) y a que se da una mayor degradación del polímero a cadenas de menor masa molecular (Chen y col., 1997).

Para la relación tiempo-rendimiento en función de los pulsos por segundo se observa que existe un mayor rendimiento del polímero obtenido, utilizando el tratamiento de 0.7 pulsos por

segundo, durante 10 minutos (Figura 4.13). Para saber si existía una diferencia significativa entre estos tratamientos con respecto a los pulsos por segundo se realizó una comparación de medias (Anexo F, F1). Aparentemente se observa que no existe una diferencia significativa en el rendimiento. Para corroborarlo se realiza un análisis de varianza, *andeva* (*ANOVA* en inglés), el valor de  $P(0.53)$  y  $F(0.68)$ . Este análisis indica que, no hay diferencia significativa entre los tratamientos (Anexo F, F1).

### **4.3.2. Análisis estadístico por sonicación relación tiempo/radiación/calentamiento (45, 55 y 60°C)**

Se encontró en la Figura 4.15 que la muestra obtenida con 0.7p/s durante 5 minutos y después calentada a 45°C por 40 minutos, es la que tuvo el mayor rendimiento, a la mínima temperatura y menor tiempo de sonicación. El análisis estadístico de medias y *andeva* (Anexo F, F3) señala que los tratamientos de sonicación a diferentes tiempos a la temperatura de 45°C no mostraron diferencia significativa. También se pudo observar que el aumento de la temperatura de 25 a 45°C no favorece en ninguno de los casos el tratamiento de disolución-desacetilación del polímero (Figura 4.15).

En la Figura 4.16 el tratamiento por sonicación a 0.7 p/s tiene el mayor rendimiento para obtener el polímero quitina y se observa también que al aumentar el tiempo de sonicación de 5 a 15 minutos se obtiene un mayor rendimiento. Al contrario de lo que ocurre con el tratamiento de 45°C, en este caso, a 55°C, no hay una disminución del rendimiento, no hay una despolimerización del polímero o existe una mayor cantidad de calcio residual debida al disolvente MAC-141, que no pudo ser solubilizado completamente en la atmósfera saturada de agua.

Si se lleva a cabo un tratamiento por sonicación de 0.9 p/s por 10 minutos se obtiene el polímero quitina sin ningún grado de desacetilación. Al calentar esta muestra hasta 60°C por 40 minutos, se vuelve a identificar la muestra y se observa por titulación con NaOH, quitosana parcialmente desacetilada, es decir la contribución de calentamiento a 60°C permite que se lleve a cabo la desacetilación. Al aumentar la temperatura a 60°C el rendimiento es más alto

para el tratamiento de 0.9 p/s (Figura 4.17) que, para 0.7 p/s a las temperaturas de 45 y 55°C, era más alto (Figura 4.15 y 4.16).

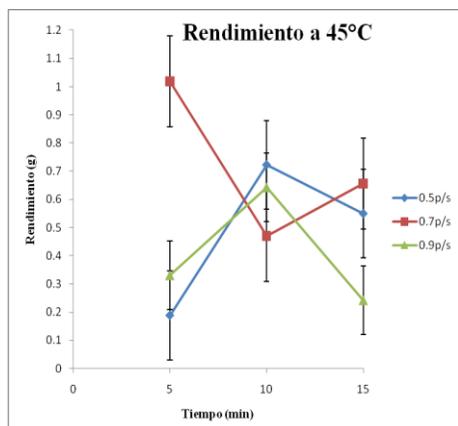


Figura 4.15. Análisis estadístico de rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a 45°C

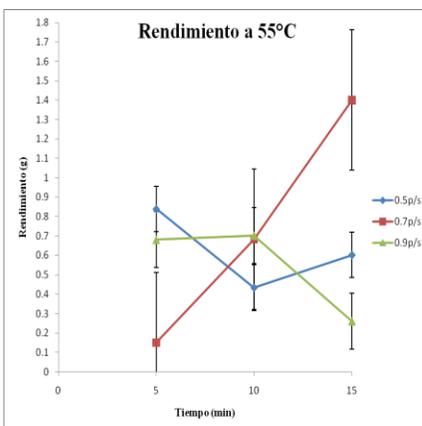


Figura 4.16. Análisis estadístico de rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a 55°C

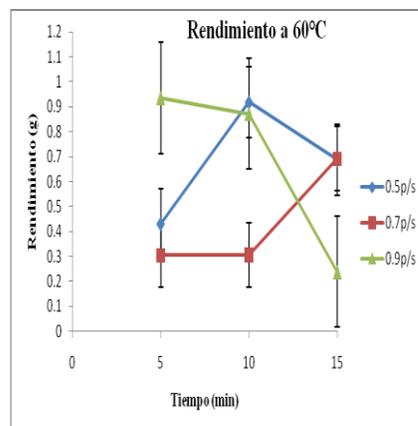


Figura 4.17. Análisis estadístico de rendimientos del polímero obtenido en g/g muestra inicial de CPD, con tratamiento de sonicación de 0.0, 0.5, 0.7 y 0.9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos y posterior calentamiento por 40 minutos a 60°C

#### 4.4. PROPUESTA DE MECANISMO DE REACCIÓN DE LA DESACETILACIÓN DE LA QUITINA

En la investigación precedente, Flores-Ortega (2004) extrajo quitina desarrollando un procedimiento de química verde mezclando CPD con disolvente MAC-141 (Figura 4.18). Al continuar con su investigación dio algunas hipótesis sobre el mecanismo de disolución (Flores-Ortega, 2008).

Por ello, a partir de la anterior propuesta, buscando ahora obtener quitina parcialmente desacetilada, se llevó a cabo la misma reacción pero ahora utilizando una operación unitaria adicional, la sonicación (Figura 4.19).

Como se muestra en la Figura 4.19, se mezcló 1 g de CPD con 10g de disolvente MAC-141 y se emplearon diferentes pulsos por segundo durante diferentes tiempos, de los cuales, se encontró desacetilación en: 0.5 (10 y 15 min), 0.7 (10 min) y 0.9 (10 min). En este último se

obtuvo, a una temperatura de calentamiento de 60°C, quitina parcialmente desacetilada (quitosana).

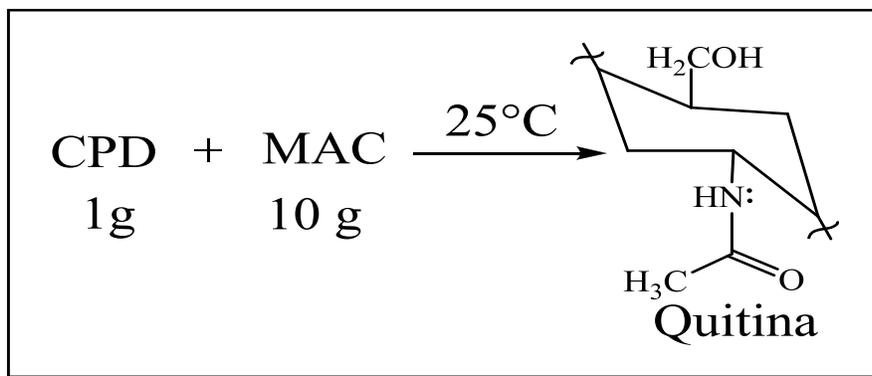


Figura 4.18. Extracción de quitina por métodos ecológicos (Flores-Ortega, 2004)

Esto parece indicar que la sonicación sí tiene un efecto sobre los enlaces C-N del grupo amida de la quitina (Figura 4.20b), como lo han señalado Tsaih y Chen (2003).

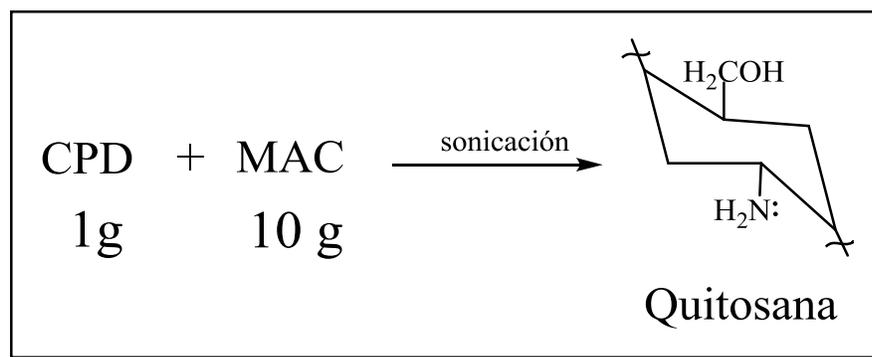


Figura 4.19. Extracción de quitina parcialmente desacetilada (quitosana) utilizando el método de “sonicación”

La energía de sonicación es específica sobre algunos enlaces de los grupos funcionales presentes en la quitina y si la reacción de hidrólisis de amidas se lleva a cabo por el ataque de un nucleófilo como lo es el grupo OH y la subsiguiente eliminación del ión amina ( $\bar{\text{N}}\text{H}_2$ ), se propone el siguiente mecanismo de reacción (Figura 4.21): En el primer paso ocurre un ataque nucleofílico del OH del metanol al carbono del grupo amida presente en la quitina y forma un catión inestable del oxígeno. En el paso 2, el oxígeno recupere su estabilidad, pues la densidad electrónica regresa al carbono del grupo amida y, debido a la energía generada por la cavitación de las burbujas del mismos disolvente, el enlace C-N se rompe, para formar

posiblemente acetato de metilo y el catión  $\text{NH}^-$  que posteriormente es protonado para formar el grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) característico de la quitosana (Figura 4.21).

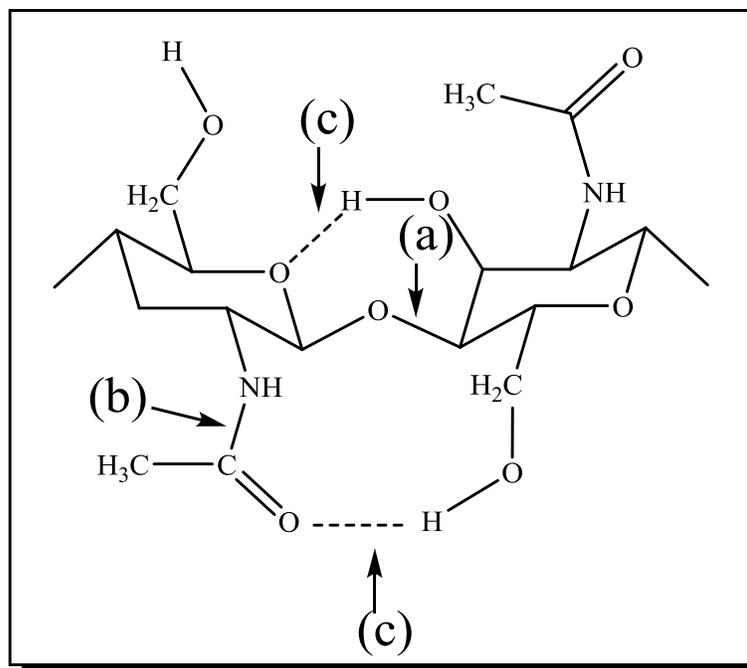


Figura 4.20. Posibles sitios en que actúa el ultrasonido: (a)  $\beta$ -1,4-enlace glucosídico, (b) acetamido y (c) enlace de hidrógeno, por energía de cavitación durante la reacción de ultrasonido (Tsaih y Chen, 2003)

#### 4.5. RESULTADOS DE REPETIBILIDAD OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS IDENTIFICADAS COMO QUITINA PARCIALMENTE DESACETILADA EN EL TRATAMIENTO MAC-141-SONICACIÓN

Durante la evaluación de la repetibilidad de los procedimientos para la desacetilación parcial de la quitina se obtienen valores bajos de los porcentajes ya que, durante el procedimiento de sonicación, el disolvente MAC-141 presenta evaporación y se da la incrustación de las sales de cloruro de calcio. Es decir, el agua o el metanol que tiene un menor punto de ebullición se evaporan lo cual no permite que el grupo  $-\text{OH}$  del metanol protone al grupo amida de la quitina, como lo hace el átomo de hidrógeno de la disolución de  $\text{NaOH}$  en el método químico para la desacetilación de la quitina (Apartado 2.5.4).

La Tabla 4.6 Presenta los resultados de repetibilidad, en este caso el grado de desacetilación es bajo a comparación de los anteriormente descritos, pero en rendimiento en la extracción del polímero es similar en masa.

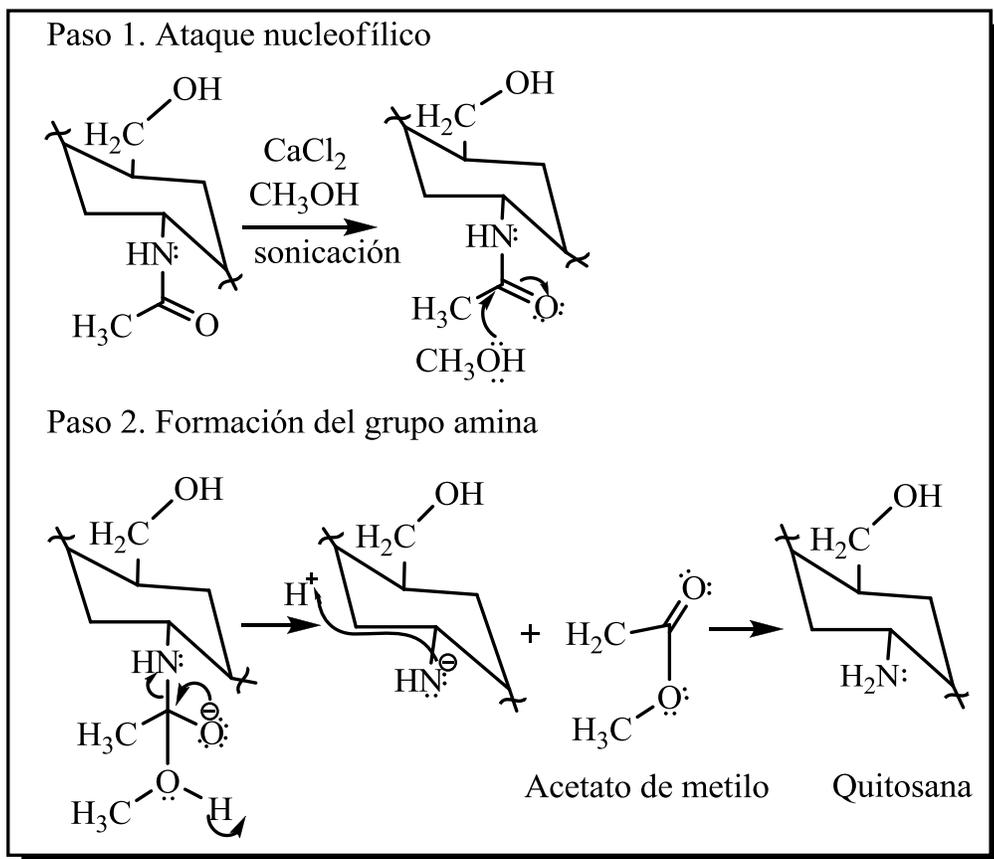


Figura 4.21. Propuesta de mecanismo de reacción para la obtención de quitosana por sonicación

Por ello, se deben buscar las condiciones necesarias como la recuperación del disolvente durante la reacción de sonicación. Esto podría hacerse por medio de condensación en columnas de reflujo, para evitar su evaporación.

Tabla 4.6. Resultados de repetibilidad para tratamientos con MAC-141-Sonicación

Muestra	Masa, g	Sonicación, p/s	Grado de desacetilación	Tiempo, min
1	0.9434	0.7	3.4132	10
2	1.5000	0.7	3.2200	10
3	1.4545	0.5	3.3207	10
4	0.4082	0.5	7.8882	10
5	0.9434	0.7	3.4000	10
6	0.8338	0.7	3.8618	10

Las pruebas de repetibilidad mostradas en la Tabla 4.5 dan grados de desacetilación de 3 a 8% y, aunque estos valores son aparentemente bajos (Tabla 4.3), si se cuantifica el porcentaje de grupos amino presentes en la quitina parcialmente desacetilada, se considera que sí existe desacetilación pues en el método enzimático se obtienen porcentajes similares, que van de 0.5-9.5%, debido a la poca accesibilidad de la enzima al sustrato de quitina (Ramos-Ponce, 2009).

#### **4.6. SOLUBILIDAD DE LAS MUESTRAS DE QUITINA PARCIALMENTE DESACETILADA**

Para caracterizar o diferenciar la “quitina” de la “quitosana” es importante saber en qué disolventes son solubles. Por ejemplo, la quitosana es soluble en soluciones ácidas y la quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes. Se determinó la solubilidad de las muestras obtenidas en esta investigación con objeto de evaluar la semejanza de los polímeros obtenidos con la quitosana con alto grado de desacetilación y quitina (Tablas 4.7 a 9).

Para M4 se determina la solubilidad en ácidos concentrados y diluidos. La solubilidad en ácidos concentrados sí corresponde a la solubilidad característica de la quitosana mostrada en la Tabla 3.3, a excepción del ácido acético concentrado. Los ácidos están en su forma concentrada por lo que la M1 podía estar solubilizada o desintegrada por lo que también se realizan pruebas de solubilidad en ácidos diluidos (Tabla 4.7). Cuando se realizan pruebas de solubilidad para M4 con soluciones ácidas diluidas, la quitina parcialmente desacetilada (quitosana) es parcialmente soluble en HCl, lo cual es favorable pues la quitosana es soluble

en HCl y parcialmente soluble en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La solubilidad en ácido fórmico no corresponde a lo reportado en la Tabla 3.3, pero existe insolubilidad de M4 en ácido acético, lo cual es contradictorio, pues la quitosana es soluble en ácidos diluidos, principalmente el ácido acético. Esta disparidad de la solubilidad del polímero se debe a que éste no está completamente desacetilado lo que provoca cambios en su reactividad y, por lo tanto, en su solubilidad en los diferentes disolventes. Por esto queda claro que la solubilidad va a depender del grado de desacetilación.

Tabla 4.7. Pruebas de solubilidad de M4: 0.9, 10min, 60°C. Masa: 0.0411 g

Tubo	Masa, g	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
1	0.0014	HCl	Concentrado	Soluble	Se observa una sola fase, no presenta turbidez, se disolvió completamente la muestra, no hay cambio de color en el disolvente
2	0.0011	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Concentrado	Soluble	Se observa un cambio de color en el disolvente, se ve opaco (no permite el libre paso de la luz), muestra una sola fase, se disolvió completamente la muestra
Continuación. Tabla 4.7					
Tubo	Masa, g	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
3	0.0014	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Concentrado	Parcialmente soluble	Se ve turbio el tubo, presenta dos fases, una líquida y una de grumos gelatinosos, se disolvió parcialmente
4	0.0014	CH <sub>3</sub> COOH	Concentrado	Insoluble	Se ven dos fases, una sólida y una líquida, no solubilizó la muestra
5	0.0015	HCl	2%	Parcialmente soluble	Se ven dos fases, una sólida y una líquida, la muestra sólida inicial era mayor antes de la agitación, por lo que se considera parcialmente soluble
6	0.0011	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2%	Parcialmente soluble	Se ven dos fases, una sólida y una líquida, reducción del contenido de la fase sólida después de la agitación, es parcialmente soluble
7	0.0012	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2%	Insoluble	Se ven dos fases, una sólida y una líquida, muestra insoluble
8	0.0013	CH <sub>3</sub> COOH	2%	Insoluble	Se ven dos fases, una sólida y una líquida, muestra insoluble

La muestra M1 presenta solubilidad en ácidos concentrados como el HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Tabla 4.8), de acuerdo a la Tabla 3.3 la quitosana es soluble en estos ácidos, esta semejanza en la solubilidad es debida a que la quitina parcialmente desacetilada ya presenta un grado de desacetilación o la muestra está siendo descompuesta por el ácido empleado, que está en su

forma concentrada. En comparación con el ácido acético concentrado la quitina es insoluble y la quitosana es soluble, en este caso la M1 tiene un porcentaje de desacetilación de 29.6% por lo que es parcialmente soluble en este disolvente.

Si los ácidos usados están concentrados podrían descomponer la muestra y no solubilizarla por lo que se decide utilizar ácidos diluidos en un porcentaje v/v del 2% (Tabla 4.8). La muestra M1 es parcialmente soluble en ácidos como HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%; no presenta solubilidad total como la quitosana con altos grados de desacetilación (Tabla 3.3). La quitina es insoluble en ácido acético y si M1 tiene un porcentaje de grupos amino del 29.6% y un porcentaje de grupos acetilo de 70%, las características de solubilidad se asemejan a la quitina que es insoluble en ácido acético.

Tabla 4.8. Pruebas de solubilidad de M1: 0.5p/s, 10min. Filtración. Masa: 0.0127g

Tubo	(g)	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
1	0.0016	HCl	Concentrado	Soluble	Se observa una sola fase, se disolvió completamente, no hay cambio de color en el disolvente.
2	0.0019	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Concentrado	Soluble	Se disolvió completamente, alteró aparentemente la viscosidad del disolvente, se ve opaco el disolvente.
3	---	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Concentrado	---	No se realizó por falta del reactivo.
4	0.0011	CH <sub>3</sub> COOH	Concentrado	Parcialmente insoluble	Cambió el color del disolvente de transparente a translúcido, pero el cambio no es muy evidente, por lo que se considera casi insoluble.
5	0.0012	HCl	2%	Parcialmente insoluble	Parcialmente soluble, disminución del tamaño de la muestra sólida, dos fases (líquida/sólida), fase líquida transparente.
6	0.0018	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2%	Parcialmente insoluble	Parcialmente soluble, pero menos que el tubo 5 y más que el tubo 4.
7	0.0016	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2%	Parcialmente insoluble	Similar al tubo 5.
8	0.0018	CH <sub>3</sub> COOH	2%	Insoluble	Totalmente insoluble, no muestra cambios después de adicionar el disolvente, la muestra permaneció intacta.

La muestra M3 que tiene un porcentaje de desacetilación del 8.7%, presenta solubilidad en HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados (Tabla 4.9) y es característico de quitosana con un alto grado de desacetilación.

En ácido acético M3 es insoluble y de acuerdo a la Tabla 3.3 la quitina es insoluble en este ácido, esto es correcto si M1 tiene un porcentaje de grupos  $-NH_2$  de 8.7 y un 91% de grupos amida, característico de quitina, por lo tanto la solubilidad se asemeja a la quitina.

Tabla 4.9. Pruebas de solubilidad de M3: 0.7p/s, 10min. Filtración. Masa: 0.4710g

Tubo	(g)	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
1	0.0010	HCl	Concentrado	Soluble	Se observa una fase, se disolvió completamente, transparente, no hay cambio de color en el disolvente.
Continuación. Tabla 4.9					
Tubo	(g)	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
2	0.0015	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Concentrado	Soluble	Se observa una fase opaca, se disolvió completamente, cambio de color el disolvente de transparente a translúcido.
3	---	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Concentrado	---	No se realizó por falta del reactivo.
4	0.0018	CH <sub>3</sub> COOH	Concentrado	Insoluble	No se disolvió, se ven dos fases (líquida/sólida), la sólida pertenece a la muestra que no solubilizó, la líquida al disolvente.
5	0.0015	HCl	2%	Parcialmente soluble	Se observó una disminución de la muestra, lo que hace suponer que una fracción se disolvió, dos fases (líquida/sólida).
6	0.0012	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2%	Parcialmente soluble	Parcialmente soluble, pero en menos cantidad que el tubo 5, existe una disminución de muestra sólida.
7	0.0012	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2%	Parcialmente soluble	Parcialmente soluble, similar al tubo 5.
8	0.0010	CH <sub>3</sub> COOH	2%	Insoluble	Insoluble, dos fases (líquida/sólida) no hay disminución de la muestra sólida.

En ácidos diluidos como el HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M3 presenta solubilidad parcial (Tabla 4.9). Si la muestra M1 contiene 8.7% de grupos  $-NH_2$  entonces presenta solubilidad parcial y no total como la quitosana con grados de desacetilación del 60% (Tabla 3.3). En ácido acético diluido M1 presenta insolubilidad, característico de quitina.

#### 4.7. POSIBLES USOS DE LAS MEZCLAS DE QUITINA Y QUITOSANA OBTENIDAS EN ESTA INVESTIGACIÓN

Hasta la fecha, en la literatura se presentan aplicaciones del derivado desacetilado de la quitina, la quitosana. Según los autores consultados, cuando se aplica en forma de película sobre frutas presenta buenas características de conservación. Se han reportado sus usos para la

conservación de uvas, fresas, cerezas, mangos, jitomates, duraznos, mandarinas, peras japonesas, kiwis y papayas (Asgar, 2008; Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004; Du y col., 1997; Hernández-Muñoz y col., 2008; Romanazzi, 2010; Romanazzi y col., 2002, 2007; Salvador y col., 2003; Zhu y col., 2008), ya que según los autores promueve la inhibición de microorganismos, pero no se ha reportado nada acerca de las características nutricionales y físicas de la fruta con la biopelícula de quitosana o la capacidad de conservación de la quitina, sino solamente para impedir el oscurecimiento de rebanadas de plátano por oxidación (Waliszewski y col., 2002) como se muestra en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Empleo como recubrimiento, actividad antimicrobiana y antifúngica de la quitina y la quitosana (Tomada de Salas-Osornio, 2011)

Polímero en soluciones acuosas aciduladas	Efectos	Alimento	Referencia
Quitosana en concentración 0.5, 1.0 y 2.0%	Reducción de la respiración Inhibe: <i>Botrytis cinérea</i> , <i>Penicillium digitatum</i>	Uva de mesa	Romanazzi et al., 2007
1.5% Quitosana 1.0% Quitosana+0.5% gluconato de calcio	Inhibe el desarrollo del hongo durante el almacenamiento, disminución en la tasa de respiración La adición de calcio a la solución de quitosana al 1% aumentó la firmeza del fruto Inhibe: <i>Botrytis cinérea</i>	Fresa	Hernández-Muñoz et al., 2008
Quitosana 1.0%	Reducción significativa de la infección. Aumento significativo de la actividad fenilalanina amonioliasa (PAL) Inhibe : <i>Botrytis cinérea</i>	Uva de mesa	Romanazzi et al., 2002
Quitosana en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0%	La tasa de respiración, pérdida de firmeza y el cambio de color se inhibió de manera eficiente durante el almacenamiento por la capa de quitosana. La concentración al 2% fue la más efectiva Inhibe: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Mango	Zhu et al., 2008
Concentraciones de quitosana al 1.0, 1.5, 2.0% de alta, mediana y baja masa molecular	La aplicación de biopelículas de quitosana retrasó el desarrollo de la pudrición blanda aunque no hubo diferencia en la actividad antifúngica entre las concentraciones de quitosana aplicada Inhibe: <i>Rhizopus stolonifer</i> .	Tomate (jitomate)	Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004
Quitosana en concentraciones de 0.4-2.0%	Durazno: reducción en el área de lesión; pera japonesa: menor porcentaje de infección en frutos tratados (0.4%); kiwi: reducción en la pudrición (1%) Inhibe : <i>Botrytis cinerea</i>	Durazno, pera japonesa y kiwi	Du et al., 1997
Quitosana en concentraciones de 0.6 y 1.25%	Podría ser una alternativa en el uso de ceras de polietileno ya que mantiene mejor firmeza en la fruta	Mandarina	Salvador et al., 2003
Quitina en concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1% m/v	La quitina al 0.01% m/v ayuda a prevenir oscurecimiento no deseado por acción de la oxidación	Banana (plátano tipo Tabasco)	Waliszewski et al., 2002

La quitina contiene grupos amida en su estructura, lo que la hace insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y, por lo tanto, con aplicaciones limitadas ya que no existe un disolvente que permita aplicar la quitina para la conservación de frutas como se hace con la quitosana y que, además, sea comestible.

Si se utilizara el disolvente MAC-141 (metanol, agua y cloruro de calcio) para formar soluciones de quitina (Figura 4.22) y este disolvente se retira de manera completa de la quitina por hidratación en cámaras saturadas de vapor de agua, homogeneizando las películas (Figura 4.23) para poder aplicarlas sobre este tipo de alimentos frescos, podría compararse con su derivado desacetilado, la quitosana y con lotes control sin película.



Figura 4.22. Película de quitina



Figura 4.23. Película de quitina homogeneizada

De esta manera, por medio de pruebas fisicoquímicas y sensoriales, podría evaluarse la efectividad de la quitina para la conservación de estos alimentos frescos, como se ha hecho en estas investigaciones reportadas en la literatura con su derivado desacetilado, la quitosana.

En investigaciones paralelas, dentro del mismo grupo de investigación, se iniciaron estas pruebas empleando dos tipos de frutas, de superficie lisa como las uvas (*Vitis vinifera*) y de

superficie rugosa como la fresas (*Fragaria × ananassa*) (Ortega-Granados, 2010; Salas-Osornio, 2011; Sánchez, 2011; Velázquez-Solís, 2010).

De estas investigaciones se presentan en las Tablas 4.11 y 4.12 algunas fotografías de los resultados de algunos de los lotes en estudio para estas dos frutas.

En la Tabla 4.11 se observa que al día 1 el lote de uvas con la película de quitosana Sigma al 2% en solución acuosa con ácido acético confiere brillo a la uva en comparación con las frutas del lote control. La quitina parcialmente desacetilada preparada en esta investigación arruga la piel y deshidrata la uva debido al calcio residual que está presente en el polímero por el disolvente MAC-141©, ya que la separación del disolvente no fue 100% efectiva, como ocurre con cualquier proceso de separación real. Después de 5 días de anaquel el lote de uvas sin película continuó en buen estado mientras que los lotes de fruta con película de quitosana Sigma al 2% y de la quitina parcialmente desacetilada mostraban la piel arrugada. Hasta el día 11 las uvas sin película y las del resto de los lotes presentaba arrugas en la piel y ya no eran visiblemente atractivas para el consumo.

La aplicación de quitina en frutos rugosos como las fresas presenta mejores características de conservación, tanto en la inhibición de microorganismos como en las características físicas (Tabla 4.12).

En el día 1 los lotes de las fresas recubiertas con quitina y quitosana Sigma al 2% y control tienen características físicas y nutricionales (este parámetro medido por el contenido de vitamina C) similares. En el día 3 el lote de fresa control ya presentaba crecimiento de microorganismos, el lote de fresas con película de quitosana Sigma al 2% presentaba arrugas en la piel, pero el lote de fresas con película de quitina conservaba características nutricionales y físicas adecuadas para el consumo. Al día 6 todas las fresas del lote control estaban cubiertas de microorganismos, el lote de las fresas con película de quitosana Sigma al 2% presentaba arrugas y ya no era aceptable visiblemente para el consumo y el lote de fresas con película de quitina parcialmente desacetilada sólo presentaba deshidratación pero las características físicas

como el color permanecían en la fruta y no presentaba desarrollo de microorganismos o pudrición.

Tabla 4.11. Conservación de uvas con quitina y quitosana a temperatura ambiente (25°C)  
(Salas-Osornio, 2011; Velázquez-Solís, 2010)

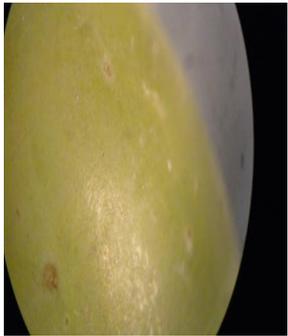
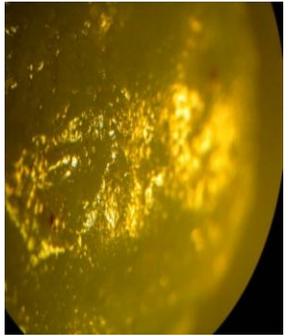
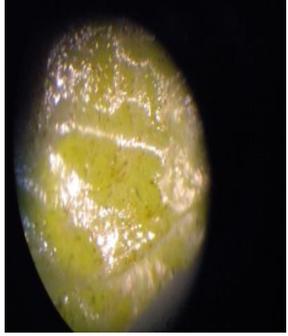
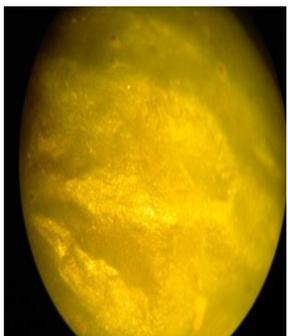
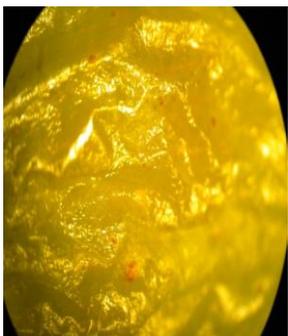
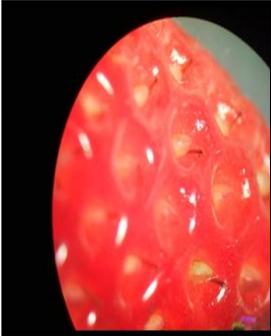
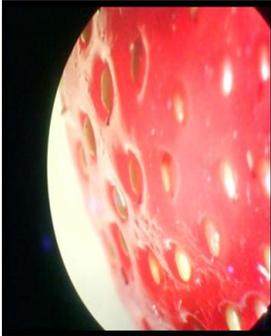
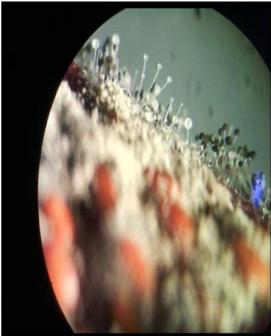
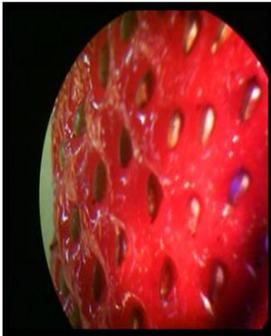
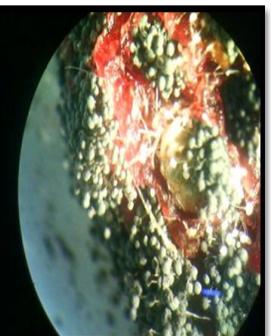
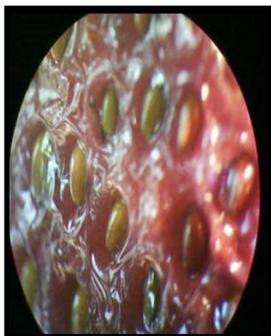
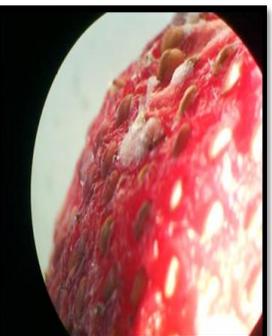
Temperatura ambiente	Control	Quitosana 2%	Quitina parcialmente desacetilada
Día 1			
Día 5			
Día 11			

Tabla 4.12. Conservación de fresas con quitina y quitosana a temperatura ambiente (25°C)  
(Ortega-Granados, 2010; Salas-Osornio, 2011)

Temperatura ambiente	Control	Quitosana 2%	Quitina
Día 1			
Día 3			
Día 6			

Por tanto, a la luz de estos experimentos, se puede considerar que la película de quitina parcialmente desacetilada preparada con el disolvente MAC-141© conserva a la fruta, principalmente a aquellos frutos rugosos como la fresa.

### 4.8. DISCUSIÓN FINAL

De acuerdo con el objetivo de esta investigación, que era el de obtener quitina y quitosana (quitina desacetilada) por química verde, a partir de exoesqueletos y cefalotórax de camarón parcialmente desproteinizados (CPD) utilizando el disolvente MAC-141©, considerado de bajo impacto ambiental, para la obtención de quitina y su desacetilación parcial por sonicación, los resultados obtenidos indicaron que:

Fue posible utilizar la operación unitaria de sonicación de manera simultánea a la solubilización empleando diferentes pulsos por segundo (p/s) a diferentes tiempos y temperaturas para lograr, además de la extracción de quitina simultáneamente su desacetilación parcial.

Asimismo, se pudo caracterizar el polímero obtenido por química verde de los residuos de camarón, mediante espectroscopía de infrarrojo, grado de desacetilación, empleo del criterio de la primera derivada y solubilidad.

Finalmente, se planteó un mecanismo en el que se basa la desacetilación usando sonicación, la cual deberá ser corroborada en estudios posteriores.

Con base en estos hallazgos, en el siguiente capítulo se presentan las conclusiones derivadas de esta investigación y las preguntas que siguen pendientes de ser contestadas en investigaciones futuras.

### CAPÍTULO V

#### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

##### 5.1. CONCLUSIONES

Con base en el objetivo de esta investigación, que era el de obtener quitina y quitosana por química verde a partir de residuos del camarón, al utilizar disolvente MAC-141 © y la sonicación a diferentes pulsos por segundo (p/s) caracterizando el polímero resultante mediante espectroscopía de infrarrojo, grado de desacetilación, criterio de la primera derivada y solubilidad, con la información obtenida experimentalmente, puede concluirse lo siguiente:

- El aprovechamiento integral de los residuos de camarón fue logrado mediante la obtención de una mezcla polimérica de quitina y quitosana en disolución empleando una técnica químico-mecánica, con la utilización de reactivos de bajo impacto ambiental como el disolvente MAC-141 (mezcla molar de metanol-agua-cloruro de calcio) © y la sonicación
- La obtención de la quitosana se pudo medir mediante el grado de desacetilación de la solución, el cual fue de aproximadamente 3 a 30% (0.5-0.7 p/s, 10-15 min, operando a temperatura ambiente). Aunque comúnmente se considera que la mezcla polimérica es quitosana cuando el grado de desacetilación es mayor al 60% (García, 2006), se encontró que, con las condiciones de operación empleadas en esta investigación, fue posible obtener una mezcla razonable de ambos polímeros
- Si la temperatura de operación se incrementa hasta 60°C durante 40 minutos, sube ligeramente el grado de desacetilación a casi 37% pero incrementando las pulsaciones por segundo a 0.9 y manteniendo el tiempo a 10 min. No se hizo en esta investigación un estudio de costo-beneficio pero el incremento en el grado de desacetilación no parece indicar conveniente incrementar el suministro de energía calentando y aumentando radiación (pulsaciones/segundo)

## Conclusiones y recomendaciones

---

- El mecanismo de reacción propuesto para la sonicación de CPD con el disolvente MAC-141 considera que el grupo -OH del metanol influye en la formación de aminas unidas al polímero, por medio del efecto de cavitación de la sonicación. Esto deberá ser corroborado en una nueva fase de la investigación

### 5.2 RECOMENDACIONES

Para continuar esta investigación se propone las siguientes líneas:

- Es conveniente optimizar las condiciones de disolución-sonicación para alcanzar grados de desacetilación mayores a 60%. Se deberá hacer un estudio de superficie de respuesta con los datos de esta parte de la investigación con objeto de determinar en qué intervalos es conveniente experimentar para que, con un número mínimo de experimentos, pueda alcanzarse este objetivo
- Se mencionó en este texto que, a través de la revisión bibliográfica, se tiene otra opción para sustituir la sonicación, el uso de las microondas. Se podría hacer nuevamente un diseño experimental que planteara tiempos de irradiación versus potencia de las ondas electromagnéticas para determinar los intervalos más idóneos
- También se mencionó el método enzimático en el que se puede emplear la enzima quitina desacetilasa pero, dado que ésta no es específica y la quitina es poco soluble, tal vez no funcionara muy eficientemente. Afortunadamente, dado que la quitina es soluble en disolvente MAC-141©, sería conveniente utilizar este disolvente simultáneamente con la enzima para desacetilar la quitina y poder obtener quitosana
- Con los resultados de estas tres investigaciones podría hacerse un análisis costo-beneficio para evaluar la mejor opción entre ellas con objeto de obtener un grado de desacetilación mayor a 60%
- Finalmente, y la más importante desde el punto de vista de la investigación básica, es la corroboración de la hipótesis propuesta para explicar el efecto de la radiación emitida por el sonicador que permite la desacetilación y lo mismo podría decirse para el uso de las microondas o de las enzimas quitinolíticas.

## Conclusiones y recomendaciones

---

Considerando la opción de que no es necesario desacetilar a la quitina disuelta con la mezcla MAC-141, se pueden buscar nuevos usos para la quitina en disolución:

- Formación de esponjas (Arias-Torres y Mendoza-Márquez, 2010; Bárcenas-Ochoa, 2010) para su empleo en la medicina o para sustituir a polímeros sintéticos en la elaboración de empaques desechables para la comida rápida hechos de poliestireno espumado que causan problemas ambientales por este polímero biodegradable
- Formación de películas (Barrera-Rodríguez y col., 2007), que tienen la característica de no ser transparentes por la presencia del calcio residual en ellas. Su utilidad nuevamente en la medicina es clara.

Respecto de los métodos analíticos empleados para su caracterización destaca una línea interesante:

- La determinación del nitrógeno total pues la quitina tiene un contenido de nitrógeno mayor a 7% que pudiera complementar los datos sobre el grado de desacetilación.

## Anexo A. Materiales y reactivos

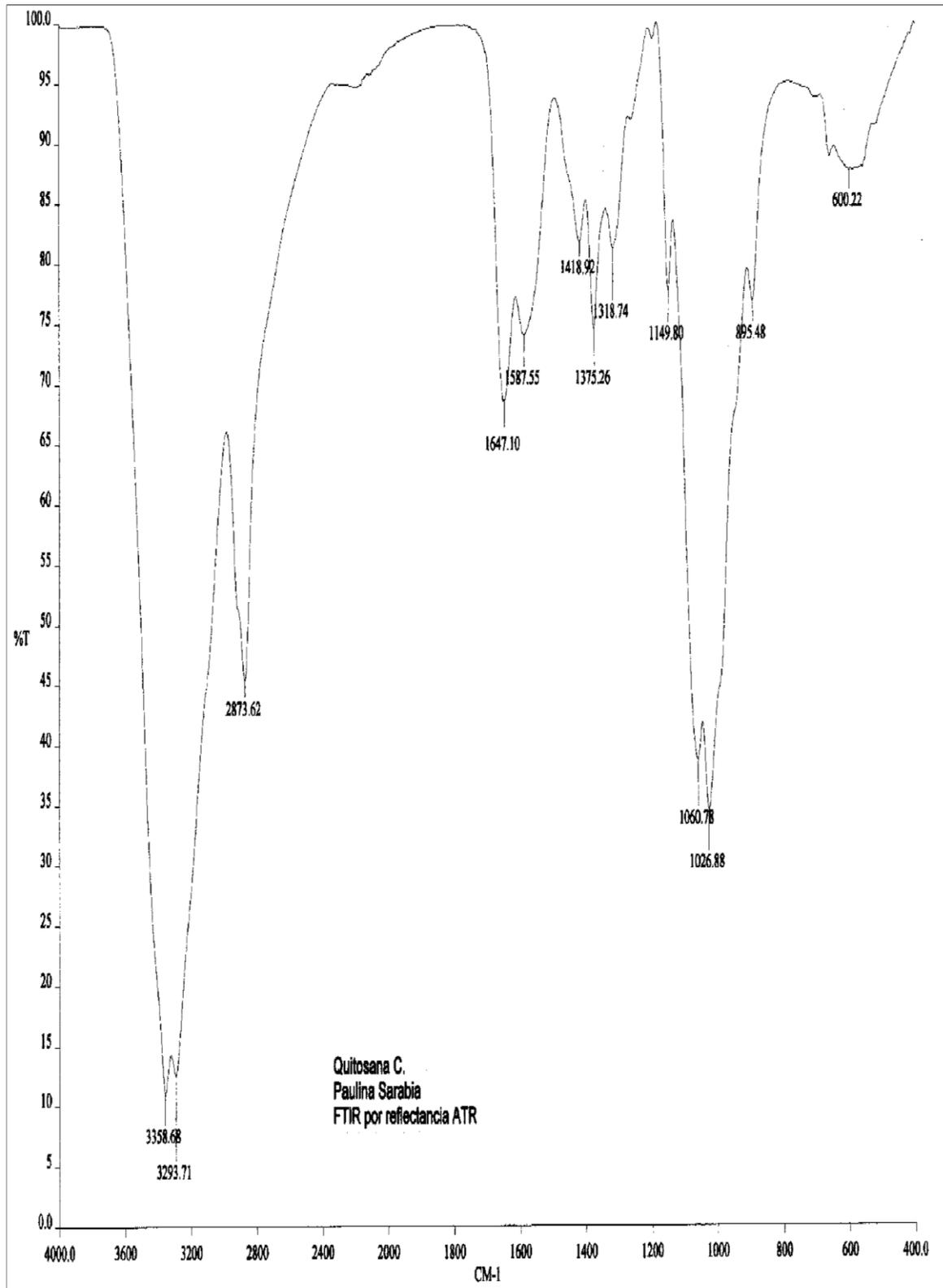
### REACTIVOS

- Metanol: J. T. Baker, 99.97% pureza, N° CAS: 67-56-1.
- Ácido sulfúrico: J. T. Baker, 97.9% pureza, N° CAS: 7664-93-9
- Ácido acético 2%: ácido acético glacial. J.T. Baker, 99.7%, N° CAS 64-19-7
- Acido fórmico: J.T. Baker, N° CAS 64-18-6
- Cloruro de calcio anhidro: marca “desecador”
- Ácido clorhídrico 0.3N, J.T. Baker, N° CAS 7647-01-0
- Hidróxido de sodio 0.1N, J.T. Baker, N° CAS 1310-73-2
- Indicador rojo de metilo: J.T. Baker, N° CAS 845-10-3 (Rojo de Metilo) - 64-17-5 (Alcohol etílico)
- Quitina: grado práctico, C7170-100G , N° CAS 1398-61-4, Sigma-Aldrich
- Quitosana: C3646-100G,  $\geq 75\%$  de desacetilación, N° CAS 9012-76-4, Sigma-Aldrich
- Agua destilada

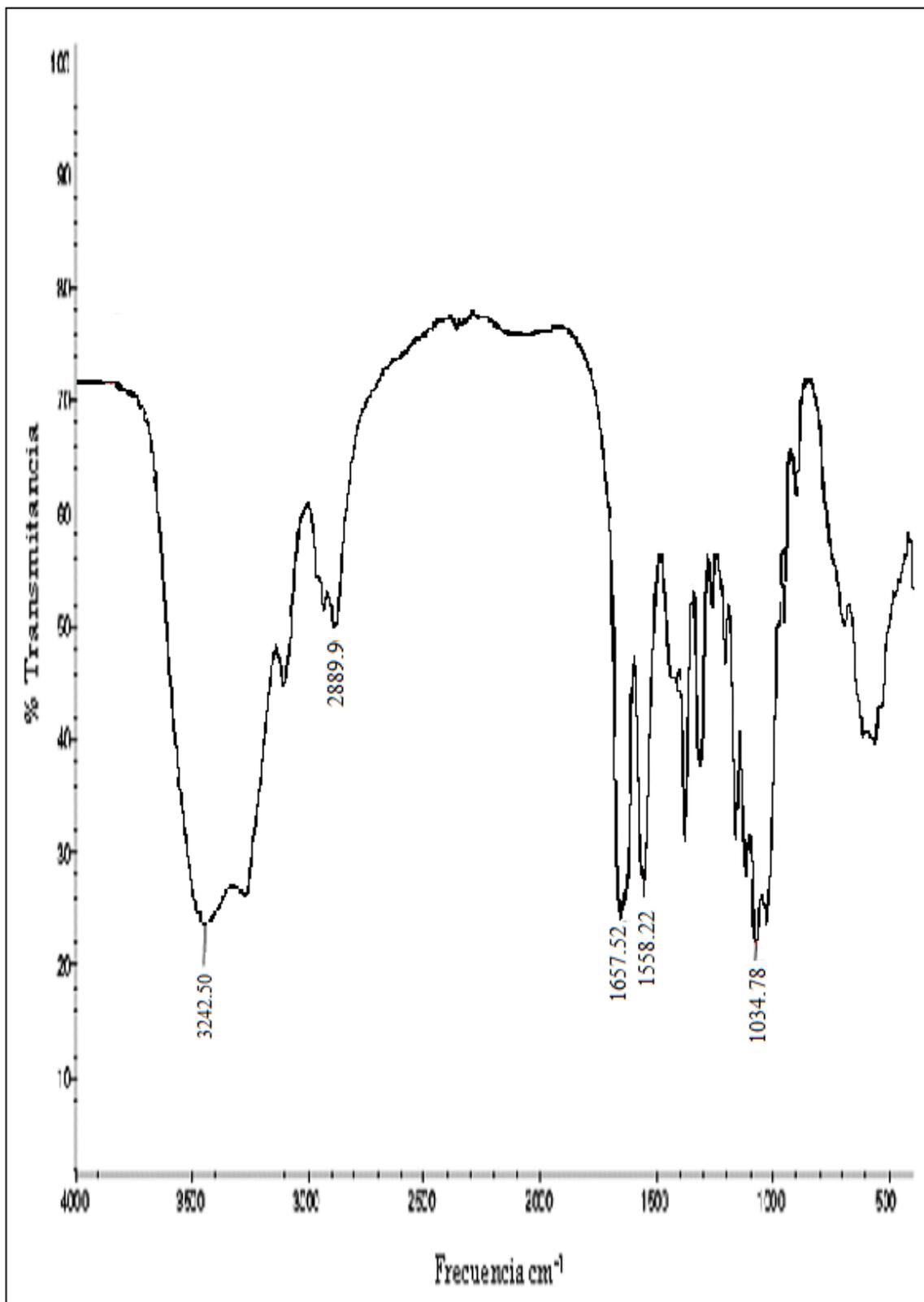
### EQUIPO

- Equipo de IR: equipo FTIR 1605
- Sonicator Fisher Scientific Dismembrator 550
- Autoclave
- Potenciómetro
- Parrillas de agitación

Anexo B. Espectro de infrarrojo de la quitosana Sigma-Aldrich



## Anexo C. Espectro de infrarrojo de la quitina Sigma (Belandria y Morillo, 2008)



## Anexo D. Grado de desacetilación de la quitina Sigma

Figura D1. Grado de desacetilación de la quitina Sigma

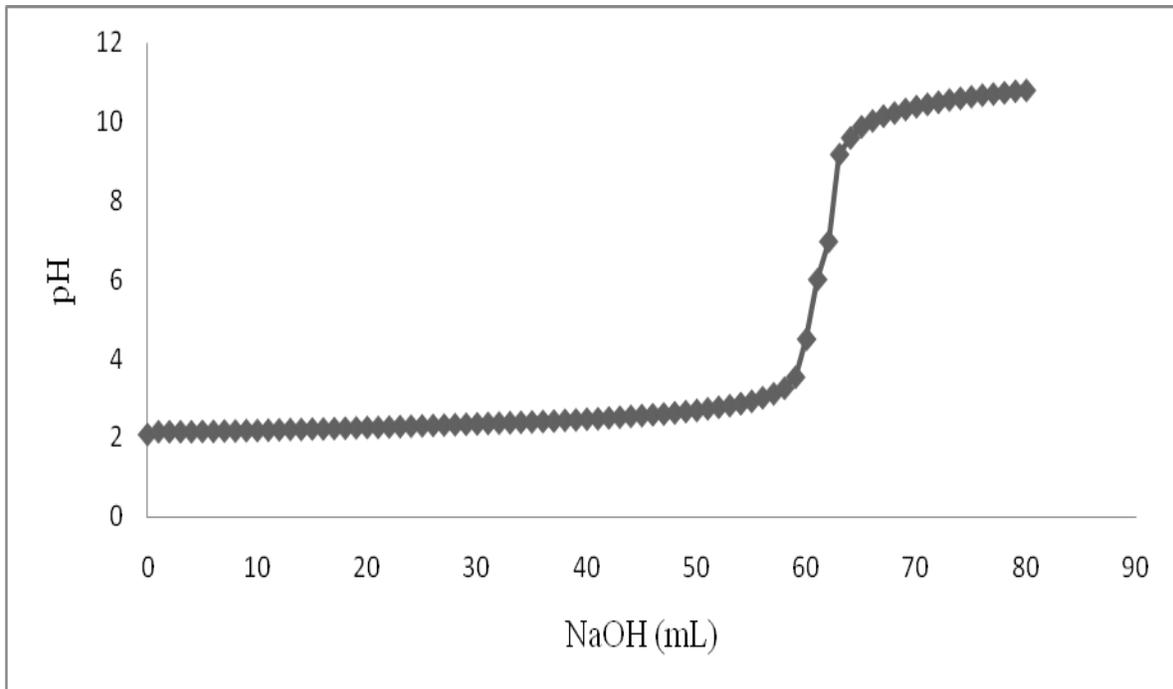
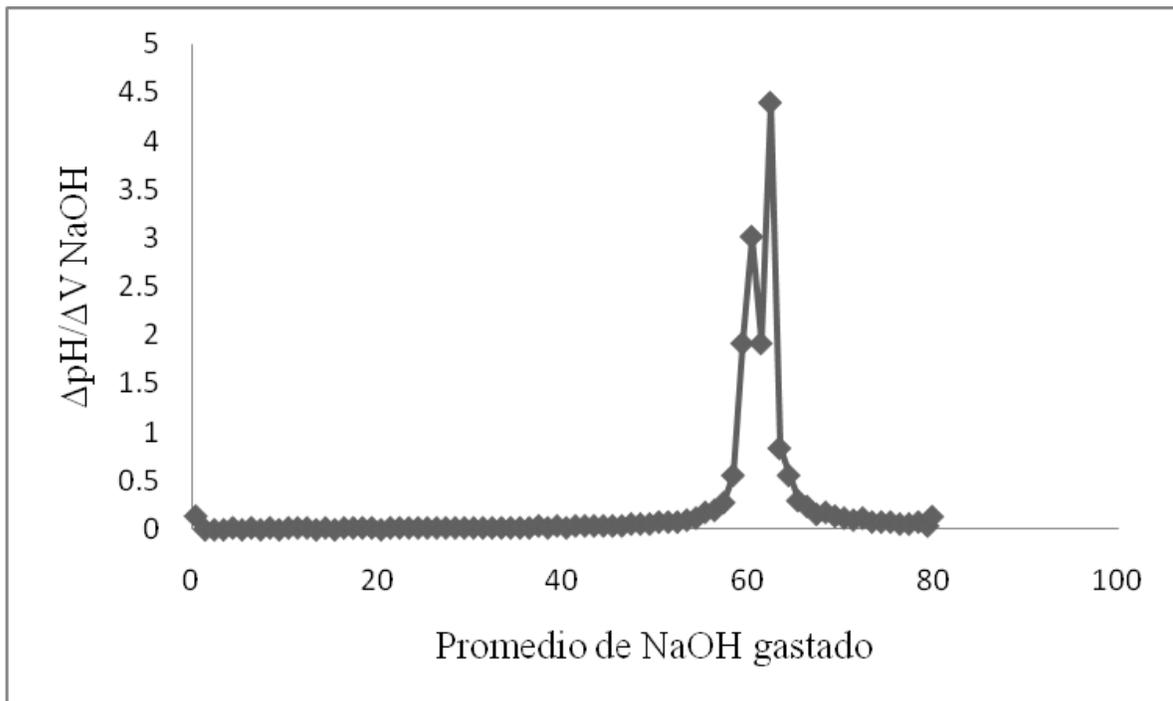


Figura D2. Primera derivada de la quitina Sigma



**Anexo E. Codificación de toxicidad de los reactivos utilizados en esta investigación**

E1. Escala numérica de reactividad

0	ninguno
1	leve
2	moderado
3	severo
4	extremo

E2. Norma de SAF-T-DATA (Sistema de Identificación de Peligros)

Rojo	Riesgo de inflamabilidad, reductora, fuente de ignición
Amarillo	Peligro de reactividad, son oxidantes y explosivos, generan gases y calor, alejar de la luz solar y de materiales combustibles e inflamables
Blanco	Riesgo de contacto, presenta peligro al contacto por corrosión, peligroso para los ojos y vías respiratorias, puede liberar gases
Azul	Riesgo para la salud, son tóxicos y peligrosos para la salud, son irritantes para la piel, ojos y sistema digestivo. La toxicidad aguda generalmente es reversible, por exposición corta
Verde	Sin riesgo específico. Son menos peligrosos, los riesgos en las categorías de salud, inflamabilidad, reactividad y contacto no son mayores a 2

E3. Toxicidad de los reactivos utilizados en esta investigación

<b>Etiqueta:</b>	<b>Blanca</b>			
	Salud	Inflamabilidad	Reactividad	Contacto
HCl	3	0	2	3
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	0	2	4
HNO <sub>3</sub>	4	0	3	4
NaOH	3	0	1	
KOH	3	0	1	
NaCl	1	0	0	Ninguna
Hipoclorito de sodio	2	0	2	
Ácido acético	3	2	0	Ninguna

<b>Etiqueta</b>	<b>Verde</b>			
	Salud	Inflamabilidad	Reactividad	Contacto
KCl	1	0	0	ninguna
CaCl <sub>2</sub>	1	0	1	2

<b>Etiqueta</b>	<b>Roja</b>			
	Salud	Inflamabilidad	Reactividad	Contacto
Acetona	2	3	0	3
Alcohol etílico	0	3	0	Ninguna

Alcohol metílico	3	3	1	3
------------------	---	---	---	---

#### E4. Disposición controlada de los residuos

##### Disposición controlada de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )

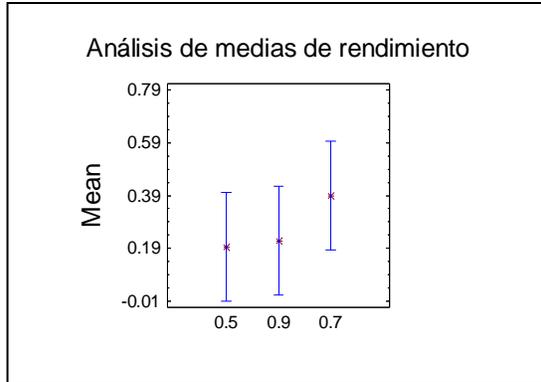
El cloruro de calcio utilizado en el disolvente al tener un exceso de agua después de ser usado, se poner a calentar en un horno marca Felisa el tiempo necesario hasta que la apariencia cristalina se observe blanca, esto quiere decir que se evapora la mayor cantidad de agua, se recupera en frascos de vidrio y reutiliza posteriormente en la preparación de más disolvente MAC-141.

##### Residuo de CPD

La materia orgánica se deposita en el área de desechos orgánicos del Edificio E, Facultad de Química UNAM

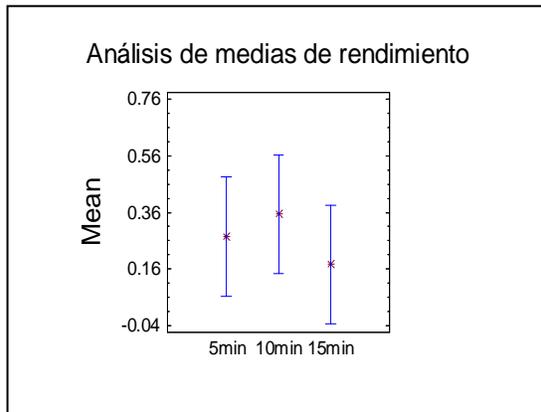
**Anexo F. Análisis estadístico Statgraphics Plus**

**F1. Análisis de medias en función de pulsos por segundo**



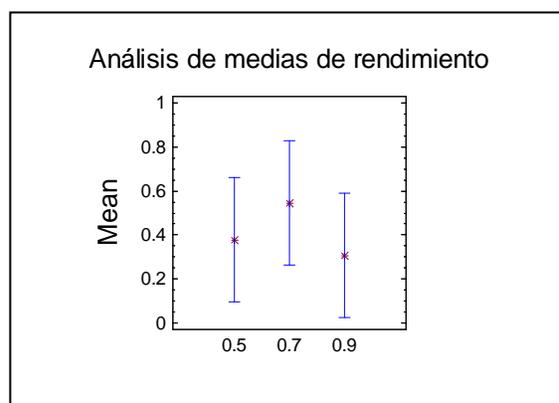
ANOVA Table pulsos					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0897596	2	0.0448798	0.68	0.5307
Within groups	0.593802	9	0.0659781		
Total (Corr.)	0.683562	11			

**F2. Análisis de medias en función del tiempo**



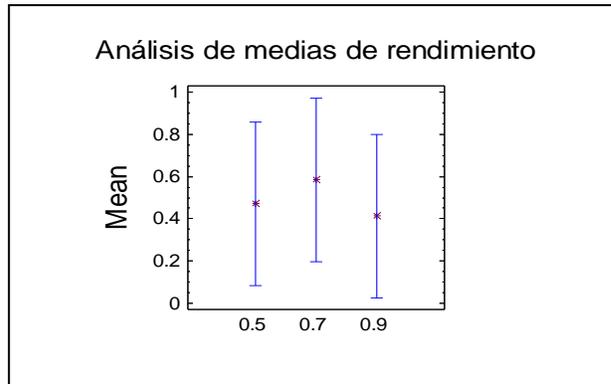
ANOVA Table tiempo					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0630847	2	0.0315424	0.46	0.6468
Within groups	0.620477	9	0.0689419		
Total (Corr.)	0.683562	11			

**F3. Análisis estadístico: relación tiempo/radiación/calentamiento (45°C)**



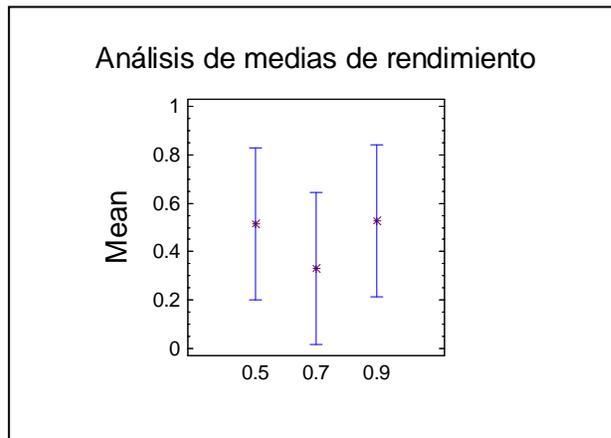
ANOVA Table					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.120247	2	0.0601237	0.48	0.6321
Within groups	1.12052	9	0.124502		
Total (Corr.)	1.24077	11			

F4. Análisis estadístico: relación tiempo/radiación/calentamiento (55°C)



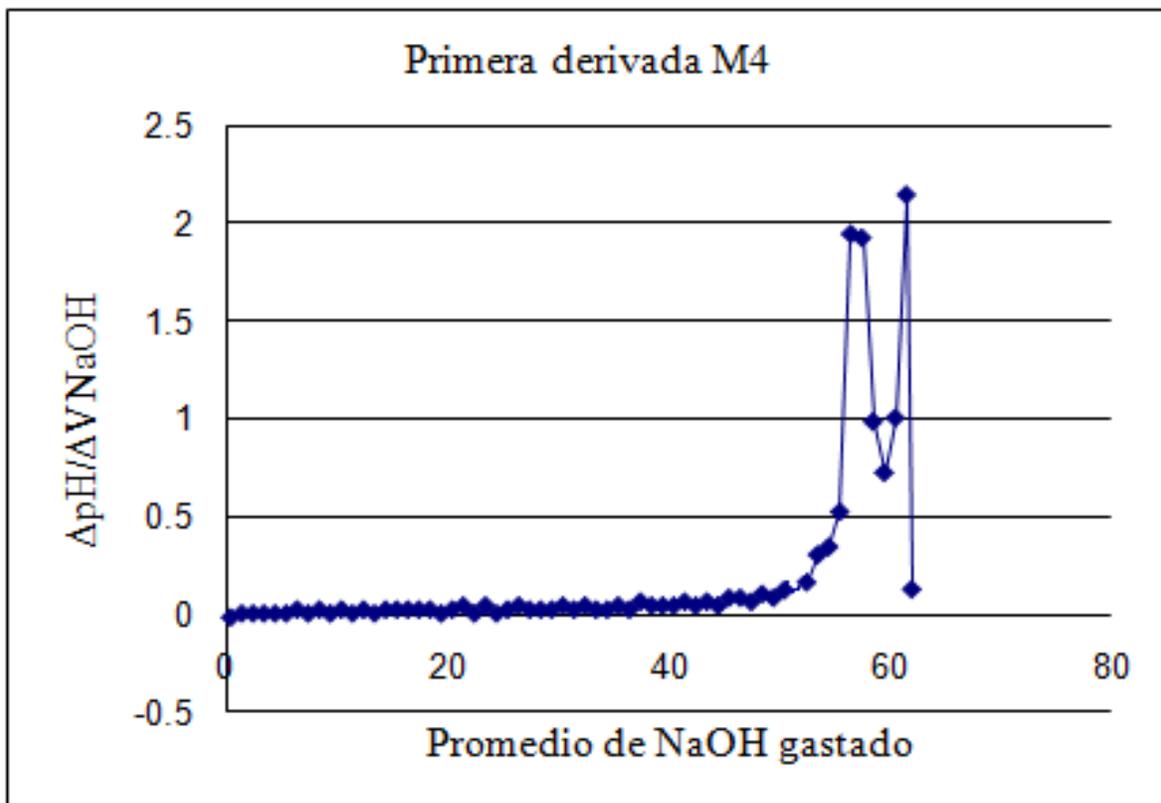
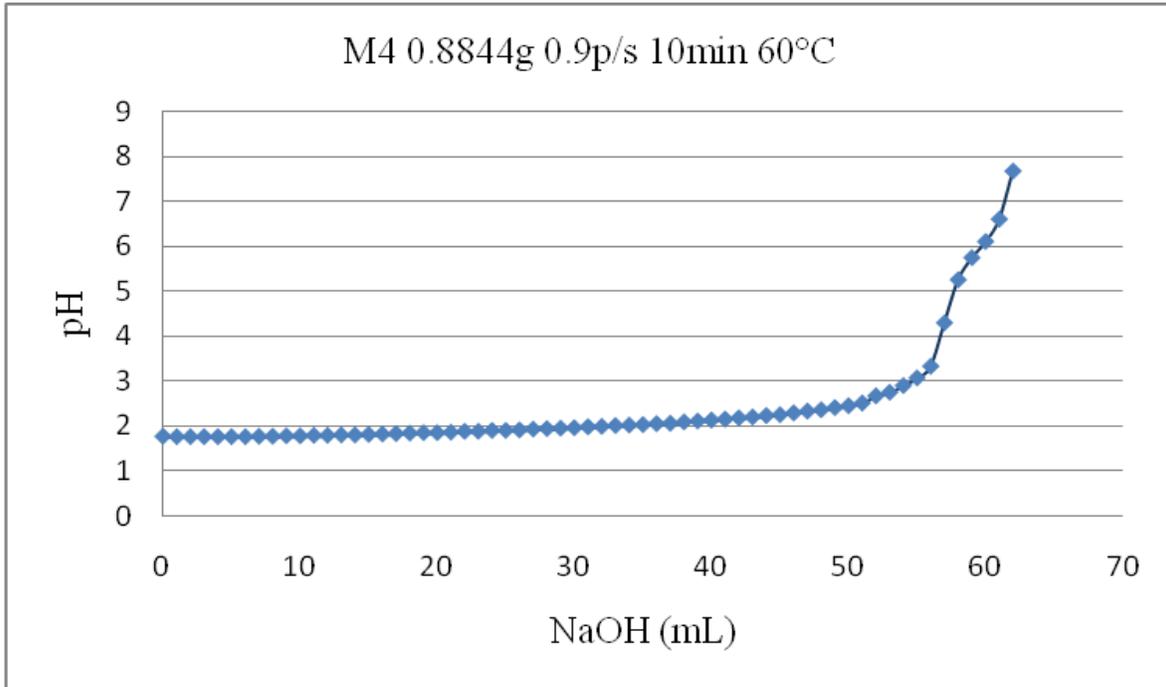
ANOVA Table					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0606288	2	0.0303144	0.13	0.8803
Within groups	2.10901	9	0.234334		
Total (Corr.)	2.16964	11			

F5. Análisis estadístico: relación tiempo/radiación/calentamiento (60°C)



Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0962125	2	0.0481062	0.31	0.7402
Within groups	1.39144	9	0.154604		
Total (Corr.)	1.48765	11			

Anexo G. Grado de desacetilación de la muestra M4 y primera derivada



**Anexo H. Datos crudos de las muestras que presentaron desacetilación**

M3: 0.7352g, 0.7p/s, 10 min								
NaOH (mL)	pH	Promedio de NaOH gastado	$\Delta p$	$\Delta V$				
0	1.77	0.5		0	36	2.08	36.5	0.04
1	1.77	1.		0	37	2.1	37.5	0.04
2	1.77	2.5		0	38	2.12	38.5	0.02
3	1.7	3.5		0	39	2.13	39.5	0.04
4	1.77	4.5		0.02	40	2.15	40.5	0.04
5	.78	5.5		0.02	41	2.17	41.5	0.06
6	1.79	6.5		0	42	2.2	42.5	0.04
7	1.79	7.5		0.02	43	2.22	43.5	0.06
8	1.8	8.5		0	44	2.25	44.5	0.06
9	1.8	9.5		0.02	45	2.28	45.5	0.06
10	1.81	10.5		0	46	2.31	46.5	0.06
11	1.81	11.5		0.02	47	2.34	47.5	0.06
12	1.82	12.5		0.02	48	2.37	48.5	0.08
13	1	3.5		0	49	2.41	49.5	0.08
14	1.83	4.5		0.02	50	2.45	50.5	0.06
15	1.84	.5		0.02	51	2.48	51.5	0.12
16	1.85	16.5		0.02	52	2.54	52.5	0.14
17	1.86	17.5		0.02	53	2.61	53.5	0.18
18	1.87	18.5		0.02	54	2.7	54.5	0.16
19	1.88	19.5		0	55	2.78	55.5	0.26
20	1.88	20.5		0.02	56	2.91	56.5	0.34
21	1.89	21.5		0.04	57	3.08	57.5	0.6
22	1.91	22.5		0	58	3.38	58.5	1.56
23	1.91	23.5		0.02	59	4.16	59.5	2.22
24	1.92	24.5		0.02	60	5.27	60.5	0.94
25	1.93	25.5		0.04	61	5.74	61.5	0.86
26	1.95	26.5		0.02	62	6.17	62.5	1
27	1.96	27.5		0.02	63	6.67	63.5	2.36
28	1.97	28.5		0.02	64	7.85	64	0.12265625
29	1.98	29.5		0.04				
30	2	30.5		0				
31	2	31.5		0.04				
32	2.02	32.5		0.02				
33	2.03	33.5		0.04				
34	2.05	34.5		0.02				
35	2.06	35.5		0.04				

M2: 0.4330g, 0.5p/s, 15 min							
NaOH (mL)	pH	Promedio de NaOH gastado	$\Delta\text{pH}/\Delta V$				
0	1.67	0.5	0				
1	1.67	1.5	0.02				
2	1.68	2.5	0				
3	1.8	3.5	0.02				
4	1.69	4.5	0				
5	1.69	5.5	0.02				
6	1.7	6.5	0.02				
7	1.71	7.5	0.02				
8	1.72	8.5	0				
9	1.72	9.5	0.02				
10	1.73	10.5	0.04				
11	1.75	11.5	0				
12	1.75	12.5	0				
13	1.75	13.5	0.02				
14	1.76	14.5	0.02				
15	1.77	15.5	0.02				
16	1.78	16.5	0.02				
17	1.79	17.5	0				
18	1.79	18.5	0.02				
19	1.8	19.5	0				
20	1.8	20.5	0.04				
21	1.82	21.5	0.02				
22	1.83	22.5	0.02				
23	1.84	23.5	0.02				
24	1.85	24.5	0.02				
25	1.86	25.5	0.02				
26	1.87	26.5	0.04				
27	1.89	27.5	0.02				
28	1.9	28.5	0.02				
29	1.91	29.5	0.02				
30	1.92	30.5	0.04				
31	1.94	31.5	0.02				
32	1.95	32.5	0.02				
33	1.96	33.5	0.04				
34	1.98	34.5	0.02				
35	1.99	35.5	0.02				
36	2	36.5	0.04				
37	2.02	37.5	0.04				
38	2.04	38.5	0.04				
39	2.06	39.5	0.04				
40	2.08	40.5	0.04				
41	2.1	41.5	0.04				
42	2.12	42.5	0.06				
43	2.15	43.5	0.04				
44	2.17	44.5	0.04				
45	2.19	45.5	0.06				
46	2.22	46.5	0.08				
47	2.26	47.5	0.06				
48	2.29	48.5	0.08				
49	2.33	49.5	0.08				
50	2.37	50.5	0.08				
51	2.41	51.5	0.1				
52	2.46	52.5	0.16				
53	2.54	53.5	0.12				
54	2.6	54.5	0.14				
55	2.67	55.5	0.22				
56	2.78	56.5	0.02				
57	2.79	57.5	0.68				
58	3.13	58.5	1				
59	3.63	59.5	2.62				
60	4.94	60.5	1.02				
61	5.45	61.5	0.84				
62	5.87	62.5	1.08				
63	6.41	63.5	1.84				
64	7.33	64	0.11453125				

M1: 0.2719g, 0.5 p/s, 10 min							
NaOH (mL)	pH	Promedio de NaOH gastado	$\Delta p/\Delta V$				
0	1.76	0.5	-0.02				
1	1.75	1.5	0				
2	1.75	2.5	0				
3	1.75	3.5	0				
4	1.5	4.5	0				
5	1.75	5.5	0				
6	.75	6.5	0.02				
7	1.76	7.5	0				
8	1.76	8.5	0.02				
9	1.77	9.5	0				
10	1.77	10.5	0.02				
11	1.78	11.5	0				
12	1.78	12.5	0.02				
13	1.79	13.5	0				
14	1.79	14.5	0.2				
15	1.8	15	0.02				
16	1.81	16.5	0.02				
17	1.82	17.5	0.02				
18	1.83	18.5	0.02				
19	1.84	19.5	0				
20	1.84	20.5	0.02				
21	1.85	21.5	0.04				
22	1.87	22.5	0				
23	1.87	23.5	0.04				
24	1.89	24.5	0				
25	1.89	25.5	0.02				
26	1.9	26.5	0.04				
27	1.92	27.5	0.02				
28	1.93	28.5	0.02				
29	1.94	29.5	0.02				
30	1.95	30.5	0.04				
31	1.97	31.5	0.02				
32	1.98	32.5	0.04				
33	2	33.5	0.02				
34	2.01	34.5	0.02				
35	2.02	35.5	0.04				
36	2.04	36.5	0.02				
37	2.05	37.5	0.06				
38	2.08	38.5	0.04				
39	2.1	39.5	0.04				
40	2.12	40.5	0.04				
41	2.14	41.5	0.06				
42	2.17	42.5	0.04				
43	2.19	43.5	0.06				
44	2.22	44.5	0.04				
45	2.24	45.5	0.08				
46	2.28	46.5	0.08				
47	2.32	47.5	0.06				
48	2.35	48.5	0.1				
49	2.4	49.5	0.08				
50	2.44	50.5	0.12				
51	2.5	51.5	0.32				
52	2.66	52.5	0.16				
53	2.74	53.5	0.3				
54	2.89	54.5	0.34				
55	3.06	55.5	0.52				
56	3.32	56.5	1.94				
57	4.29	57.5	1.92				
58	5.25	58.5	0.98				
59	5.74	59.5	0.72				
60	6.1	60.5	1				
61	6.6	61.5	2.14				
62	7.67	62	0.12370968				

0.9434g, 0.7p/s 10 min			
mL NaOH	pH	Promedio de NaOH gastado	$\Delta\text{pH}/\Delta V$
0	1.86	0.5	-0.04
1	1.84	1.5	0
2	1.84	2.5	0.02
3	1.85	3.5	0
4	1.85	4.5	0.02
5	1.86	5.5	0
6	1.86	6.5	0.02
7	1.87	7.5	0.02
8	1.88	8.5	0
9	1.88	9.5	0.02
10	.89	10.5	0.02
11	1.9	11.5	0.02
12	1.91	12.5	0.02
1	1.92	13.5	0.02
14	1.93	14.5	.02
15	1.94	15.5	0.02
16	1.95	16.5	0
17	1.95	17.5	0.04
18	1.97	18.5	0
19	1.97	19.5	0.02
20	1.98	20.5	0.02
21	1.99	21.5	0.02
22	2	22.5	0.02
23	2.01	23.5	0.04
24	2.03	24.5	0
25	2.03	25.5	0.02
26	2.04	26.5	0.02
27	2.05	27.5	0.04
28	2.07	28.5	0.02
29	2.08	29.5	0.02
30	2.09	30.5	0.04
31	2.11	31.5	0.02
32	2.12	32.5	0.02
33	2.13	33.5	0.04
34	2.15	34.5	0.04
35	2.17	35.5	0.02
36	2.18	36.5	0.04
37	2.2	37.5	0.04
38	2.22	38.5	0.04
39	2.24	39.5	0.04
40	2.26	40.5	0.04
41	2.28	41.5	0.06
42	2.31	42.5	0.04
43	2.33	43.5	0.08
44	2.37	44.5	0.04
45	2.39	45.5	0.08
46	2.43	46.5	0.08
47	2.47	47.5	0.08
48	2.51	48.5	0.12
49	2.57	49.5	0.16
50	2.65	50.5	0.24
51	2.77	51.5	0.24
52	2.89	52.5	0.48
53	3.13	53.5	1.36
54	3.81	54.5	2.5
55	5.06	55.5	1.96
56	6.04	56.5	5.22
57	8.65	57.5	0.96
58	9.13	58.5	0.96
59	9.61	59.5	0.82
60	10.02	60.5	0.48
61	10.26	61.5	0.4
62	10.46	62.5	0.26
63	10.59	63.5	0.18
64	10.68	64.5	0.18
65	10.77	65.5	0.14
66	10.84	66.5	0.12
67	10.9	67.5	0.1
68	10.95	68.5	0.1
69	11	69.5	0.08
70	11.04	70.5	0.08
71	11.08	71.5	0.08
72	11.12	72.5	0.08
73	11.16	73.5	0.06
74	11.19	74.5	0.06
75	11.22	75.5	0.06
76	11.25	76.5	0.06
77	11.28	77.5	0.04
78	11.3	78.5	0.04
79	11.32	79.5	0.04
80	11.34	80.5	0.06
81	11.37	81.5	0.02
82	11.38	82.5	0.06
83	11.41	83.5	0.02
84	11.42	84.5	0.04
85	11.44	85.5	0.06
86	11.47	86.5	0.02
87	11.48	87.5	0.04
88	11.5	88.5	0.04
89	11.52	89.5	0.04
90	11.54	90.5	0.02
91	11.55	91.5	0.02

0.7p/s, 10 min, 1.500g							
Muestra opaca en solución (precipitado) suspensión homogénea							
mL NaOH	pH	Promedio NaOH gastado	$\Delta$ pH/ $\Delta$ V NaOH				
0	1.924	0.5	0.02	41	2.546	41.5	0.058
1	1.934	1.5	0.03	42	2.575	42.5	0.053
2	1.951	2.5	0.014	43	2.6015	43.5	0.095
3	1.958	3.5	0.04	44	2.649	44.5	0.068
4	1.97	4.5	0.02	45	2.683	45.5	0.102
5	1.98	5.5	0.02	46	2.734	46.5	0.084
6	1.99	6.5	0.024	47	2.776	47.5	0.104
7	2.002	7.5	0.024	48	2.828	48.5	0.132
8	2.014	8.5	-0.0232	49	2.894	49.5	0.122
9	2.0024	9.5	0.03	50	2.955	50.5	0.182
10	2.034	10.5	0.02	51	3.046	51.5	0.22
11	2.044	11.5	0.016	52	3.156	52.5	0.248
12	2.052	12.5	0.028	53	3.28	53.5	0.438
13	2.066	13.5	0.026	54	3.499	54.5	0.6
14	2.079	14.5	0.024	55	3.799	55.5	2.474
15	2.091	15.5	0.024	56	5.036	56.5	2.024
16	2.103	16.5	0	57	6.048	57.5	1.778
17	2.103	17.5	0.03	58	6.937	58.5	3.07
18	2.118	18.5	0.018	59	8.472	59.5	1.322
19	2.127	19.5	0.026	60	9.133	60.5	1.2
20	2.14	20.5	0.032	61	9.733	61.5	0.588
21	2.156	21.5	0.03	62	10.027	62.5	0.538
22	2.171	22.5	0.024	63	10.296	63.5	0.334
23	2.183	23.5	0.032	64	10.463	64.5	0.252
24	2.199	24.5	0.028	65	10.589	65.5	0.188
25	2.213	25.5	0.03	66	10.683	66.5	0.132
26	2.228	26.5	0.038	67	10.749	67.5	0.152
27	2.247	27.5	0.024	68	10.825	68.5	0.152
28	2.259	28.5	0.034	69	10.901	69.5	0.112
29	2.276	29.5	0.03	70	10.957	70.5	0.082
30	2.291	30.5	0.038	71	10.998	71.5	0.088
31	2.31	31.5	0.04	72	11.042	72.5	0.066
32	2.33	32.5	0.03	73	11.075	73.5	0.058
33	2.345	33.5	0.054	74	11.104	74.5	0.068
34	2.372	34.5	0.04	75	11.138	75.5	0.064
35	2.392	35.5	0.044	76	11.17	76.5	0.048
36	2.414	36.5	0.058	77	11.194	77.5	0.054
37	2.443	37.5	0.04	78	11.221	78.5	0.046
38	2.463	38.5	0.064	79	11.244	79.5	0.042
39	2.495	39.5	0.042	80	11.265	80	0.1408125
40	2.516	40.5	0.06				

0.5p/s, 10min, 1.4545		Al final de la titulación se observa una solución turbia (precipitado)	
mL NaOH	pH	Promedio de NaOH	$\Delta pH/\Delta V$
0	1.97	0.5	0.02
1	1.98	1.5	0.02
2	1.99	2.5	0.02
3	2	3.5	0.02
4	2.01	4.5	0.02
5	2.02	5.5	0.02
6	2.03	6.5	0.02
7	2.04	7.5	.02
8	2.05	8.5	0.02
9	2.06	9.5	0.02
10	2.07	10.5	0.02
11	2.08	11.5	0.02
12	2.09	12.5	0.02
13	2.1	13.5	0.02
14	2.11	14.5	0.02
15	2.12	15.5	0.02
16	2.13	16.5	0.02
17	2.14	17.5	0.04
18	2.16	18.5	0.02
19	2.17	19.5	0.02
20	2.18	20.5	0.04
21	2.2	21.5	0.02
22	2.21	22.5	0.02
23	2.22	23.5	0.04
24	2.24	24.5	0.02
25	2.25	25.5	0.04
26	2.27	26.5	0.02
27	2.28	27.5	0.04
28	2.3	28.5	0.04
29	2.32	29.5	0.02
30	2.33	30.5	0.04
31	2.35	31.5	0.04
32	2.37	32.5	0.04
33	2.39	33.5	0.04
34	2.41	34.5	0.04
35	2.43	35.5	0.04
36	2.45	36.5	0.04
37	2.47	37.5	0.06
38	2.5	38.5	0.04
39	2.52	39.5	0.08
40	2.56	40.5	0.06
41	2.59	41.5	0.06
42	2.62	42.5	0.04
43	2.64	43.5	0.1
44	2.69	44.5	0.08
45	2.73	45.5	0.06
46	2.76	46.5	0.12
47	2.82	47.5	0.1
48	2.87	48.5	0.12
49	2.93	49.5	0.18
50	3.02	50.5	0.16
51	3.1	51.5	0.22
52	3.21	52.5	0.3
53	3.36	53.5	0.5
54	3.61	54.5	1.06
55	4.14	55.5	2.76
56	5.52	56.5	1.18
57	6.11	57.5	1.12
58	6.67	58.5	2.1
59	7.72	59.5	1.92
60	8.68	60.5	0.8
61	9.08	61.5	0.72
62	9.44	62.5	0.62
63	9.75	63.5	1
64	10.25	64.5	0.08
65	10.29	65.5	0.34
66	10.46	66.5	0.22
67	10.57	67.5	0.22
68	10.68	68.5	0.14
69	10.75	69.5	0.14
70	10.82	70.5	0.12
71	10.88	71.5	0.1
72	10.93	72.5	0.08
73	10.97	73.5	0.08
74	11.01	74.5	0.08
75	11.05	75.5	0.06
76	11.08	76.5	0.06
77	11.11	77.5	0.06
78	11.14	78.5	0.04
79	11.16	79.5	0.06
80	11.19	80	0.139875

0.5p/s, 10min, 0.4082g			
mL NaOH	pH	promedio de NaOH gastado	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$
0	1.99	0.5	0
1	1.99	1.5	0.02
2	2	2.5	0.02
3	2.01	3.5	0.02
4	2.02	4.5	0.02
5	2.03	5.5	0.02
6	2.04	6.5	0.02
7	2.05	7.5	0.02
8	2.06	8.5	0.02
9	2.07	9.5	0.02
10	2.08	10.5	0.02
11	2.09	11.5	0.02
12	2.1	12.5	0.02
13	2.11	13.5	0.02
14	2. 2	4.5	0.04
15	2.14	15.5	0.02
16	2.15	16.5	0.02
17	2.16	17.5	0.02
18	2.17	18.5	0.02
19	2.18	19.5	0.04
20	2.2	20.5	0.02
21	2.21	21.5	0.04
22	2.23	22.5	0.02
23	2.24	23.5	0.04
24	2.26	24.5	0.02
25	2.27	25.5	0.04
26	2.29	26.5	0.02
27	2.3	27.5	0.04
28	2.32	28.5	0.04
29	2.34	29.5	0.04
30	2.36	30.5	0.04
31	2.38	31.5	0.02
32	2.39	32.5	0.06
33	2.42	33.5	0.04
34	2.44	34.5	0.04
35	2.46	35.5	0.04
36	2.48	36.5	0.06
37	2.51	37.5	0.04
38	2.53	38.5	0.08
39	2.57	39.5	0.08
40	2.61	40.5	0.04
41	2.63	41.5	0.06
42	2.66	42.5	0.08
43	2.7	43.5	0.1
44	2.75	44.5	0.12
45	2.81	45.5	0.06
46	2.84	46.5	0.12
47	2.9	47.5	0.14
48	2.97	48.5	0.16
49	3.05	49.5	0.22
50	3.16	50.5	0.28
51	3.3	51.5	0.4
52	3.5	52.5	0.82
53	3.91	53.5	3.88
54	5.85	54.5	1.54
55	6.62	55.5	4.12
56	8.68	56.5	1.64
57	9.5	57.5	0.86
58	9.93	58.5	0.62
59	10.24	59.5	0.42
60	10.45	60.5	0.24
61	10.57	61.5	0.24
62	10.69	62.5	0.16
63	10.77	63.5	0.16
64	10.85	64.5	0.12
65	10.91	65.5	0.08
66	10.95	66.5	0.12
67	11.01	67.5	0.08
68	11.05	68.5	0.08
69	11.09	69.5	0.06
70	11.12	70.5	0.08
71	11.16	71.5	0.04
72	11.18	72.5	0.06
73	11.21	73.5	0.04
74	11.23	74.5	0.06
75	11.26	75.5	0.06
76	11.29	76.5	0.04
77	11.31	77.5	0.04
78	11.33	78.5	0.04
79	11.35	79.5	0.04
80	11.37	80	0.142125

0.7p/s, 10 min, 0.8338g solución turbia			
mL NaOH	pH	Promedio de NaOH gastado	$\Delta\text{pH}/\Delta V$
0	2	0.5	0
1	2	1.5	0.02
2	2.01	2.5	0.02
3	2.02	3.5	0.02
4	2.03	4.5	0.02
5	2.04	5.5	0.02
6	2.05	6.5	0.02
7	2.06	7.5	0.02
8	2.07	8.5	0.02
9	2.08	9.5	0.02
10	2.09	10.5	0.02
11	2.1	11.5	0.02
12	2.11	12.5	0.04
13	2.13	13.5	0.02
14	2.14	14.5	0.02
15	2.15	15.5	0.02
16	2.16	16.5	0.02
17	2.17	17.5	0.04
18	2.19	18.5	0.02
19	2.2	19.5	0.02
20	2.21	20.5	0.04
21	2.23	21.5	0.02
22	2.24	22.5	0.04
23	2.26	23.5	0.02
24	2.27	24.5	0.04
25	2.29	25.5	0.02
26	2.3	26.5	0.04
27	2.32	27.5	0.04
28	2.34	28.5	0.04
29	2.36	29.5	0.04
30	2.38	30.5	0.02
31	2.39	31.5	0.06
32	2.42	32.5	0.04
33	2.44	33.5	0.04
34	2.46	34.5	0.04
35	2.48	35.5	0.06
36	2.51	36.5	0.06
37	2.54	37.5	0.04
38	2.56	38.5	0.06
39	2.59	39.5	0.06
40	2.62	40.5	0.08
41	2.66	41.5	0.08
42	2.7	42.5	0.06
43	2.73	43.5	0.1
44	2.78	44.5	0.1
45	2.83	45.5	0.1
46	2.88	46.5	0.12
47	2.94	47.5	0.16
48	3.02	48.5	0.18
49	3.11	49.5	0.2
50	3.21	50.5	0.26
51	3.34	51.5	0.5
52	3.59	52.5	1.1
53	4.14	53.5	3.28
54	5.78	54.5	1.42
55	6.49	55.5	3.1
56	8.04	56.5	2.38
57	9.23	57.5	0.74
58	9.6	58.5	0.76
59	9.98	59.5	0.6
60	10.28	60.5	0.38
61	10.47	61.5	0.26
62	10.6	62.5	0.2
63	10.7	63.5	0.16
64	10.78	64.5	0.16
65	10.86	65.5	0.12
66	10.92	66.5	0.1
67	10.97	67.5	0.1
68	11.02	68.5	0.1
69	11.07	69.5	0.08
70	11.11	70.5	0.06
71	11.14	71.5	0.06
72	11.17	72.5	0.06
73	11.2	73.5	0.06
74	11.23	74.5	0.04
75	11.25	75.5	0.06
76	11.28	76.5	0.04
77	11.3	77.5	0.04
78	11.32	78.5	0.04
79	11.34	79.5	0.04
80	11.36	80	0.142

0.9, 10min, 60°C, polvo blanco, parcialmente soluble masa: 0.8804g				43	2.76	43.5	0.08
mL NaOH	pH	promedio de NaOH gastado	$\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$	44	2.8	44.5	0.1
0	2.05	0.5	0	45	2.85	45.5	0.1
1	2.05	1.5	0.02	46	2.9	46.5	0.12
2	2.06	2.5	0.02	47	2.96	47.5	0.16
3	2.07	3.5	0	48	3.04	48.5	0.18
4	2.07	4.5	0.02	49	3.13	49.5	0.2
5	2.08	5.5	0.04	50	3.23	50.5	0.22
6	2.1	6.5	0.02	51	3.34	51.5	0.52
7	2.11	7.5	0.02	52	3.6	52.5	0.8
8	2.12	8.5	0.02	53	4	53.5	3.5
9	2.13	9.5	0.02	54	5.75	54.5	1.94
10	2.14	10.5	0.02	55	6.72	55.5	4.4
11	2.15	11.5	0.02	56	8.92	56.5	1.26
12	2.16	12.5	0.02	57	9.55	57.5	1
13	2.17	13.5	0.02	58	10.05	58.5	0.58
14	2.18	14.5	0.02	59	10.34	59.5	0.38
15	2.19	15.5	0.02	60	10.53	60.5	0.24
16	2.2	16.5	0.02	61	10.65	61.5	0.2
17	2.21	17.5	0.02	62	10.75	62.5	0.16
18	2.22	18.5	0.02	63	10.83	63.5	0.18
19	2.23	19.5	0.04	64	10.92	64.5	0.1
20	2.25	20.5	0.02	65	10.97	65.5	0.12
21	2.26	21.5	0.04	66	11.03	66.5	0.08
22	2.28	22.5	0.02	67	11.07	67.5	0.1
23	2.29	23.5	0.02	68	11.12	68.5	0.06
24	2.3	24.5	0.04	69	11.15	69.5	0.06
25	2.32	25.5	0.04	70	11.18	70.5	0.08
26	2.34	26.5	0.02	71	11.22	71.5	0.04
27	2.35	27.5	0.04	72	11.24	72.5	0.06
28	2.37	28.5	0.04	73	11.27	73.5	0.06
29	2.39	29.5	0.04	74	11.3	74.5	0.06
30	2.41	30.5	0.02	75	11.33	75.5	0.02
31	2.42	31.5	0.04	76	11.34	76.5	0.1
32	2.44	32.5	0.04	77	11.39	77.5	0.04
33	2.46	33.5	0.06	78	11.41	78.5	0.04
34	2.49	34.5	0.04	79	11.43	79.5	0.04
35	2.51	35.5	0.04	80	11.45	80.5	0
36	2.53	36.5	0.04	81	11.45	81.5	0.02
37	2.55	37.5	0.08	82	11.46	82.5	0.04
38	2.59	38.5	0.04	83	11.48	83.5	0.02
39	2.61	39.5	0.06	84	11.49	84.5	0.04
40	2.64	40.5	0.08	85	11.51	85	0.13541176
41	2.68	41.5	0.08				
42	2.72	42.5	0.08				

### BIBLIOGRAFÍA

Aquahoy. 2010. México: Preven camaroneos exportaciones por 340 mdp esta temporada. Dirección electrónica: [http://aquahoy.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12064%3Amexico-preven-camaroneos-exportaciones-por-340-mdp-estemporada&catid=58&Itemid=100032&lang=es](http://aquahoy.com/index.php?option=com_content&view=article&id=12064%3Amexico-preven-camaroneos-exportaciones-por-340-mdp-estemporada&catid=58&Itemid=100032&lang=es).

Arias-Torres, Ó., Mendoza-Márquez, A.M. 2010. Caracterización mecánica de un polímero de origen natural derivado de cefalotórax y exoesqueletos de camarón. Tesis profesional de Químicos de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. Mayo 12. México D.F. México.

Asgar, A.W. 2008. Novel edible coating for tropical fruits as an alternative to synthetic fungicide. School of biosciences. The University of Nottingham Malaysia Campus. Dirección electrónica: <http://www.itfnet.org/gfruit/Slides/ISCCTE%202008/Novel%20Edible%20Coating%20for%20Tropical%20Fruits%20as%20an%20Alternative%20to%20Synthetic%20Fungicide.pdf>

Bárcenas-Ochoa, E.M. 2010. Biopolímeros de cefalotórax y exoesqueleto de camarón. Uso de aditivos químicos para modificar sus propiedades mecánicas. Tesis profesional de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. Agosto 23. México D.F. México.

Barrera-Rodríguez, S., Flores-Ortega, R.A., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. 2007. Extracción de quitina del cefalotórax de camarón para la elaboración de películas / Chitin extraction from shrimp cephalothorax and exoskeleton for films preparation. Serie Tecnologías más limpias. Vol. 10. 2ª Ed. Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.

Barreto, C.M., Signini, R., Campana-Filho, S.P. 2001. On sonication of chitin: Effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. *Polymer Bulletin*. 47:183-190.

Bautista-Baños, S., Bravo-Luna, L. 2004. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 6(001):63-67.

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del-Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait-Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. 2006. Review. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*. 25(2):108-118.

Belandria, B. J. C., Morillo de M. N. J. 2008. Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. *Revista Cubana de Química*. 20(3):17-26.

Benjakul, S., Wisitwuttikul, P. 1993. Improvement of deacetylation of chitin for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) carapace and shell. Dirección electrónica: <http://www.thaiscience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/1/Ts->

1%20improvement%20of%20deacetylation%20of%20chitin%20from%20black%20tiger%20shrimp%20penaeus%20monodon%20carapace%20and%20shell.pdf.

Cabrera, L. 2002. Diccionario de aztequismos. Editorial Colofón, S.A. México D.F. México. (Nota: Luis Cabrera no llegó a conocer la versión final de su diccionario, que fue puesto en orden y revisado por J. Ignacio Dávila Garibi y que ahora se publica por primera vez. Para tal efecto, Luis Reyes García revisó los términos nahuas y Esteban Inciarte los que aparecen en latín).

Cañipa, A., Durán, M., Escobedo, G., García, R. 1994. Aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. Serie “Tecnologías más limpias”. Publicación UNAM, PIQAyQA. Vol. 3. ISBN 968-36-4104-0. México. D. F., México.

Caprile, M.D. 2010. Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. Dirección electrónica: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/iswa2005/quitina.pdf>.

Cartaya, O., Peniche, C., Reynaldo, I. 2009. Polímeros naturales recolectores de iones metálicos. Revista Iberoamericana de Polímeros. 10(2):81-84.

Chen, R.H., Chang, J. R., Shyr, J. S. 1997. Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solution on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. Carbohydrate Research, 299: 287-295.

Domard, A., Rinaudo, M. 1983. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. Int. J. Biol. Macromol. 5:49-52.

Du, J., Gemma, H., Iwahori, S. 1997. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 66(1):15–22.

Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C., Barrera-Rodríguez, S., Flores-Ortega, R.A. 2004. Extracción ecológica de quitina y subproductos. Patente Núm. 264482. Solicitada el 30 de septiembre. Expedida el 12 de febrero de 2009. Dirección Divisional de Patentes. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. México D.F. México.

Durán-Moreno, A. 2010. Materiales para filtración de muestras viscosas. Comunicación personal. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.

Flores-López, M.L. 2008. Recuperación termoquímica de quitina de camarón por tecnología limpia y su caracterización fisicoquímica. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah., México.

Flores-Ortega, R.A. 2008. Obtención y caracterización de esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón. Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. UNAM, México D.F., México.

Flores-Ortega, R.A. 2004. Bioplástico de quitina: Formación de películas de quitina a partir de desechos de camarón por métodos ecológicos. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. UNAM, México D.F., México.

Flores, R., Barrera-Rodríguez, S., Shirai, K., Durán-de-Bazúa, C. 2007. Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry. *J. Appl. Polym. Sci.* 104:3909-3916.

Flores, R., Barrera-Rodríguez, S., Shirai-Matsumoto, C.K., Durán-de-Bazúa, C. 2006a. Obtención de esponjas de quitina a partir de cefalotórax de camarón para empaques. *AlimenPack*, 2(4):26-28.

Flores, R., Shirai, K., Durán-de-Bazúa, C. 2006b. Recycling of soil polluting residues: Biodegradable chitin sponge from shrimp wastes / Revalorización de residuos que contaminan los suelos: Esponja de quitina biodegradable a partir de residuos de camarón. En *Proceedings of the 2006 FOURTH INTERNATIONAL MINISYMPOSIUM ON REMOVAL OF CONTAMINANTS FROM WASTEWATERS, ATMOSPHERE, AND SOILS*. C. Durán-de-Bazúa, L.I. Ramírez Burgos (Eds.). Disco compacto (versión electrónica). Pp. 74-79. PIQAyQA, Facultad de Química, UNAM. Noviembre 8-11. México D.F. México.

Gacén, J., Gacén, I. 1996. Quitina y quitosana. Nuevos materiales textiles. *Boletín Interior*. No. 110. Pp. 67-71. Dirección electrónica:  
<http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/6421/1/Article06a.pdf>.

García, M.V. 2006. Potencialidades de la quitina cubana en la elaboración de tabletas. Tesis de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Farmacia. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

Goycoolea, F., Agulló, E., Mato, R. 2004. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Capítulo 3. Fuentes y procesos de obtención. Resultado del proyecto CYTED IV.14. Pub. CIAD. Hermosillo, Sonora. México.

Hansen, M.E., Llanes, A. 1994. Applications of crustacean wastes in biotechnology. In: *Matin, A.M., editor. Fisheries processing: Biotechnological applications*. Chapman and Hall. Pp. 174-205. Londres, Reino Unido.

Hernández, C.H., Águila, A.E., Flores, A.O., Viveros, N.E.L., Ramos, C.E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*. 22(3):57-60.

Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Vélez, D., Gavara, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage postharvest shelf life extension of strawberries using a biodegradable package. *Food Chemistry*. 110(2):428-435.

Hidalgo, C., Fernández, M., Nieto, M.O., Paneque, A.A., Fernández, G., Llópiz, C.J. 2009. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros*. 10(1):11-27.

Hidalgo, C., Suárez, Y., Fernández, M. 2008. Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. *Ars Far*. 49(3):245-257.

Hirano, S., Nagao, N., Tsuchida, H. 1989. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymatic hydrolysis. *Biomaterials*. 10(8):574-576.

Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., Nishiyama, Y. 2000. Enzymatic degradation of beta-chitin: Susceptibility and the influence of desacetylation. *Carbohydrate Polymers*. 42(1):19-21.

Kyoon, N. H., In, Ch. Y., Meyers, S., Rak, K. H. 2000. Effective deacetylation of chitin under conditions of 15 psi/121°C. *J. Agric. Food Chem*. 48:2625-2627.

Lárez-Velázquez, C. 2008. Algunas de las potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. Laboratorio de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Liu, H., Du, D. M., Kennedy, J. F. 2007. Hydratation energy of the 1,4-bonds of chitosan and their breakdown by ultrasonic treatment. *Carbohydrate Polymers*. 68:598-600

López, C.J., Sánchez, M.D.I., Bueno, S.C. 2010. Envases activos e inteligentes con bioproductos de los residuos de camarón. *Ideas Concyteg* 5(60):590-597.

Majeti, N.V., Ravi, K. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Ractive and Functional Polymers*. 46:1-27.

Maldonado, V. S. 2005. Nuevos tratamientos de lana con enzimas. Tesis de maestría. Universidad de Barcelona. España.

Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J., Rincón, M. 2004. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. 4(002):1-10.

McLean, C. 2000. Chitin, chitosan, and silage from New Zealand arrow squid. Dirección electrónica: <http://neon.otago.ac.nz/chmistry/research/resgrads.htm>.

Muzzarelli, R. A. 1985. Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*. 5:461-472.

No, H. K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science*. 72:87-100.

OCDE. 2007. Política agropecuaria y pesquera en México. Logros recientes, continuación de las reformas. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. Dirección electrónica: <http://www.oecd.org/dataoecd/6/26/38778312.pdf>

Ortega-Granados, J. 2010. Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos. Aplicación de un biopolímero funcional quitina/quitosana para el recubrimiento y protección de productos perecederos, caso: fresa (*Fragaria × ananassa*). Estancia estudiantil. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.

Ortega, O.H., Francisco, F.N. 2010. Investigadores de la Narro desarrollan proceso para obtener quitosán. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Dirección electrónica: <http://www.uaaan.mx/portal/index.php/listado-noticias-narro/195-investigadores-de-la-narro-desarrollan-proceso-para-obtener-quitosan.html>.

Pacheco-L., N.A. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Departamento de Biotecnología. UAM-Iztapalapa. México D.F. México.

Pacheco, N., Juárez, C. C., Tromboto, S., Shirai, K. 2009. Extracción de quitina a escala industrial mediante fermentación ácido láctica de desechos de camarón (*Litopenaeus vanameii*). XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Dirección electrónica: [www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA\\_V/OV-02.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_V/OV-02.pdf)

Parada, L.G., Crespín, G., Miranda, D.R. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. Revista Iberoamericana de Polímeros. 5(1):1-16.

Pastor-de-Abraham, A., Higuera, I. 2004. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. CYTED. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú.

Ramos-Ponce, L.M. 2009. Producción y caracterización de quitosano y sus derivados a partir de quitina mediante tecnologías emergentes. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Procesos Agroindustriales. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco, México.

Ríos-de-los-Ríos, J., Ramírez-Morales, L. J. 2010. Química verde y quitina. Informe de Estancias Cortas. Invierno 2009-2010. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.

Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 15(3):307-317.

Romanazzi, G. 2010. Chitosan treatment the control of postharvest decay of table grapes, strawberries, and sweet cherries. Global Science Books. 1: 111-115.

Romanazzi, G., Milokota, G. F., Santini, M., Landi, L., Karabulut, O., Smilanick, J. 2007. Advances in the use of chitosan to control postharvest decay of table grapes. Proceedings of COST 924 "Novel Approaches for the Control of Postharvest Diseases and Disorders". Pp. 327-334. Bologna, Italia.

Romanazzi, G., Nigro, F., Di Venere, D., Salerno, M. 2002. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. Journal of Food Science. 67(5):1862-1867.

Salas-Osornio, J. 2011. Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: evaluación de los recubrimientos de frutas frescas usando mezclas de quitina y quitosana obtenidas por medio de química verde. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.

Salvador, A., Cuquerella, J., Monterde, A. 2003. Efecto del quitosano aplicado como recubrimiento en mandarinas "fortune". Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 5(002):122-127.

Sánchez, A. 2011. Evaluación sensorial de fresas recubiertas con películas de quitina/quitosana obtenidas experimentalmente usando como controles quitina Sigma, quitosana Sigma (0.5, 2%) y fresas sin recubrimiento. Tesis profesional en proceso. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.

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(8):1527-1532.

Shimahara, K., Takiguchi, Y. 1988. Preparation of crustacean, Methodos in Enzimology. 161:417-423.

Shirai-Matsumoto., C.K. 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F. México.

Statgraphics. 2010. Statpoint Technologies, Inc. Página de las redes internacionales: <http://www.statgraphics.com/>.

Struszczyk, H., Pospieszny, H., Kotlinski, K 1989. Some new applications of chitosan in agriculture. En "Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications". Bræk, G.S., Anthonsen, T., Sandford, P. Editores. Elsevier Applied Sci. Londres, Reino Unido.

Tröger, C., Niranjan, K. 2010. Sustainable chitin extraction and chitosan modification for application in the food industry. International Conference on Food Innovation. Food Innova. Dirección electrónica: <http://www.foodinnova.com/foodInnova/docu2/35.pdf>.

Tsaih, M. L., Chen, R. H. 2003. Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 90: 3526-3531.

Velázquez-de-la-Cruz, G., Martín-Polo, M.O. 2000. Cuantificación por IR del agua directamente unida a una matriz polimérica. *Superficies y Vacío*. 11:24-31.

Velázquez-Solís, J. 2010. Estudio de quitina/ quitosana para uso como conservador de uvas. Estancia Estudiantil. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.

Waliszewski, N. K., Pardo, T. V., Ramírez, M. 2002. Effect of chitin on color during osmotic dehydration of banana slices. *Drying Technology*. 20:719-72.

Zhu, X., Wang, Q., Cao, J., Jiang, W. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. CV. tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*. 32:770-784.