

OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARÓN
(*Protrachypene precipua*)

GABY PATRICIA ARIZA CHACÓN

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2008

OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE CAPARAZONES DE CAMARÓN
(*Protrachypene precipua*)

GABY PATRICIA ARIZA CHACÓN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de
químico

Director

Luis Alberto Lenis Velásquez

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2008

NOTA DE ACEPTACION

Director: Luis Alberto Lenis Velásquez

Jurado: POSSO Ph.D Nora Elena Valderruten

Jurado: Ph.D Alfonso Ramírez

Fecha de sustentación: 15 de Octubre de 2008

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi compañero, guía y fortaleza para lograr culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis padres Gloria y Henry, por brindarme su amor, paciencia y colaboración para seguir adelante.

A mis hermanos, cuñadas y sobrinos quienes siempre me apoyaron y animaron para no decaer en mi proceso formativo.

A mi director de tesis, Luis Alberto Lenis Velásquez, por transmitirme sus conocimientos, por su colaboración en el desarrollo experimental de este proyecto y por brindarme su amistad.

A mis jurados Nora Valderruten y Alfonso Ramírez por las correcciones, observaciones y aclaraciones a cerca de este trabajo con la honestidad que los caracteriza.

Al señor Javier Martínez, por suministrarme la materia prima para la realización de este proyecto.

Al Dr. Jaime Martin, la Dra. Olga Lucía H, la Dra Maite Rada y al Mg Fernando José Hernández por sus enseñanzas, colaboración y amistad.

Al grupo de investigación en química de productos naturales por permitirme participar en los diferentes eventos como seminarios y encuentros de semilleros de investigación los cuales fortalecieron mis conocimientos.

A mis amigos y compañeros dentro y fuera de la universidad en quienes siempre encontré una mano amiga.

A Darío, Julie y Claudia por sus consejos, cariño, apoyo incondicional y darme el valor para seguir adelante en mi vida y en el camino que escogí.

A todos los profesores del departamento de química por transmitirme sus conocimientos y hacer que la química tuviera sentido en mi vida.

A la Universidad del Cauca por brindarme la formación académica necesaria para esta etapa.

CONTENIDO

	Pag
Resumen	1
1 Marco Teórico	3
1.1 La Quitina	3
1.2 El Quitosano	5
1.3 Aplicaciones de la Quitina y el Quitosano	5
1.3.1 Tratamiento de Aguas	5
1.3.2 Industria Alimentaria	6
1.3.3 Medicina	7
1.3.4 Biotecnología	8
1.3.5 Agricultura	8
1.3.6 Cosmética	9
1.3.7 Industria Papel	9
1.3.8 Tecnología de Membranas	9
1.3.9 Alimentos Nutraceuticos	9
1.3.10 Industria Textil	10
1.4 El camarón	10
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo General	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 Metodología	13
3.1 Reactivos	13
3.2 Equipos	14
3.3 Materia Prima	15
3.4 Análisis Proximal de los Caparazones de Camarón	15
3.5 Extracción de Quitina	17
3.5.1 Extracción de Quitina a partir de Caparazones de Camarón	17
3.5.1.1 Desmineralización	17
3.5.1.2 Desproteínización	17
3.6 Transformación de Quitina a Quitosano	19

3.6.1	Determinación del Grado de Desacetilación de Quitosano	21
3.7	Caracterización de Biopolímeros	22
3.7.1	Viscosidad	22
3.7.2	Pruebas Cualitativas para Aminas	23
3.7.2.1	Prueba de Ion Cobre	23
3.7.2.2	Prueba de Hinsberg	23
3.7.3	Determinación de Nitrógeno Kjeldhal	24
3.7.4	Determinación de Carbono Orgánico Walkley – Black.	26
4	Análisis y Resultados	27
4.1	Materia Prima	27
4.2	Análisis Próximo de los Caparazones de Camarón	27
4.3	Extracción de Quitina	28
4.3.1	Extracción de Quitina a partir de caparazones de camarón	28
4.4	Transformación de Quitina a Quitosano	32
4.4.1	Determinación del Grado de Desacetilación de Quitina	35
4.5	Caracterización de Biopolímeros	37
4.5.1	Viscosidad	37
4.5.2	Pruebas Cualitativas para Aminas	37
4.5.2.1	Prueba de Ion Cobre	37
4.5.2.2	Prueba de Hinsberg	38
4.5.3	Determinación de Nitrógeno Kjeldhal	40
4.5.4	Determinación de Carbono Orgánico Walkley – Black.	41
5	Conclusiones	43
6	Bibliografía	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Estructura polimérica de Quitina	4
Figura 2 Estructura polimérica del Quitosano	5
Figura 3 El Camarón <i>Protrachypene precipua</i>	11
Figura 4 a) Caparazones Enteros Vs b)Caparazones Molidos	15
Figura 5 Procedimiento extracción de Quitina	18
Figura 6 Reacción de desacetilación de Quitina para la obtención de Quitosano	20
Figura 7 Procedimiento de transformación de Quitina a Quitosano	20
Figura 8 Titulación Potenciométrica	21
Figura 9 Viscosímetro Brookfield	22
Figura 10 Cambio de coloración en la solución de sulfato de cobre	23
Figura 11 Proceso para determinación de Nitrógeno Kjeldhal	25
Figura 12 Proceso para determinación de Carbono Orgánico Walkley – Black	26
Figura 13 Espectro infrarrojo extracción de Quitina a partir caparazón de Camarón	31
Figura 14 Espectro infrarrojo transformación de Quitina a Quitosano	34
Figura 15 Curva de titulación potenciométrica para Quitosano obtenido	35
Figura 16 Primera derivada, los máximos corresponden a los puntos de inflexión del Quitosano obtenido	35
Figura 17 Medida de viscosidad de Quitosano	37
Figura 18 Prueba del Ion Cobre para Aminas en Quitosano	38
Figura 19 Reacción prueba de Hinsberg	39
Figura 20 a) Inicio de la prueba de Hinsberg y b) sulfonamida soluble	40

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Porcentaje de Quitina de acuerdo al organismo del que proviene	4
Tabla 2	Métodos para análisis próximo, según la AOAC	16
Tabla 3	Análisis proximal de los caparazones de camarón.	27
Tabla 4	Datos obtenidos en el ensayo de extracción de Quitina	29
Tabla 5	Datos obtenidos en la transformación de Quitina a Quitosano	32
Tabla 6	Datos de la proporción de grupos amino en la muestra de quitosano obtenido en la titulación potenciométrica	36
Tabla 7	Datos obtenidos de % Nitrógeno Calculado y Obtenido	40
Tabla 8	Datos obtenidos de % Carbono Orgánico Calculado y Obtenido	42

RESUMEN

La quitina y el quitosano son polímeros orgánicos muy utilizados en la industria; la mayoría de los estudios realizados acerca de la extracción de estas dos sustancias, se han llevado a cabo a partir de residuos de mariscos, siendo las materias primas más comunes los camarones y los cangrejos. Igualmente este material está presente en almejas y en ostras, cuyas conchas corresponden al 65% y 85% del peso del animal, en los cuales se ha establecido un contenido de quitina de un 3 - 6 %. También se ha logrado establecer que dentro de los organismos marinos, una de las fuentes más puras de quitina la constituye el hueso de los calamares, pero la desventaja es que este sólo corresponde a 1% del peso del animal.

La producción de camarón en la costa pacífica colombiana se encuentra alrededor de 19.303 toneladas-año, con lo cual se generan alrededor de 3.860 toneladas-año de residuos, siendo esta cifra un volumen no despreciable de desechos que normalmente son arrojados al mar¹, donde se convierten en un foco de malos olores y proliferación de plagas, con esto también se aumenta el porcentaje de sólidos disueltos y de fitoplancton disminuyendo la penetración de la luz y aumenta la demanda de oxígeno en los cuerpos de agua en especial de los esteros; esta situación ambiental es una de las razones que motivaron el presente estudio que ofrece una alternativa económica y social a la industria camaronera de esta región del país.

Como primera instancia se realizó la determinación proximal de los caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*) según protocolos establecidos en el grupo de Química de Productos Naturales - QPN, los cuales se ajustan a métodos oficiales estandarizados (AOAC por sus siglas en inglés); para la extracción de la quitina se utilizó la metodología tradicional de la síntesis orgánica por medio de hidrólisis ácida con HCl 1.0M para la eliminación de

minerales y una hidrólisis básica con NaOH 1.0M la cual elimina la proteína de los caparzones de camarón; en la transformación de quitina a quitosano se realizó una segunda hidrólisis básica con NaOH al 40%. La caracterización de los polímeros se realizó por medio de espectroscopia infrarroja, viscosidad, pruebas cualitativas para aminas y determinación de nitrógeno y carbono para verificar que la extracción de quitina y posterior transformación a quitosano se realizó adecuadamente. Se evaluó la tasa de conversión desde los caparzones a quitina y su correspondiente rendimiento en la transformación a quitosano.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 La Quitina

La quitina fue encontrada por primera vez en hongos en 1811 por el profesor Henri Braconnot. En 1830 se aisló en insectos y se le dio el nombre de quitina, la cual deriva de la palabra griega χιτών, que significa *túnica*, haciendo referencia a su dureza.

La quitina es un polímero orgánico de N-acetilglucosamina y residuos de glucosamina que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, de tal forma que constituye el segundo polímero más abundante después de la celulosa. Es producido por invertebrados de agua dulce (artrópodos, briozoos y zooplancton); en el medio salino es producido fundamentalmente por crustáceos haloplanctónicos (copepodos, euphasiaceae) y por especies marinas pelágicas y bénticas (incluyendo crustáceos, hidrozoos y briozoos); algunos animales terrestres también poseen tegumentos quitinosos (insectos, crustáceos, anélidos y moluscos) mientras que hongos, levaduras y mohos también poseen paredes celulares quitinosas (Tabla 1). Es no tóxica, biodegradable y forma una sustancia cornea que protege las formas de vida antes mencionadas.

Químicamente, la quitina posee una estructura similar a la celulosa, con la diferencia que sobre el carbono de la posición dos en el anillo de glucosa el grupo hidroxilo ha sido sustituido por una acetamida, esto permite un incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes, dándole al material una mayor resistencia. La quitina es un polisacárido lineal que contiene unidades de acetilglucosamina de β -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-1-glucopiranososa o N-acetil-D-glucos-2-amina²⁻⁴ (Figura 1).

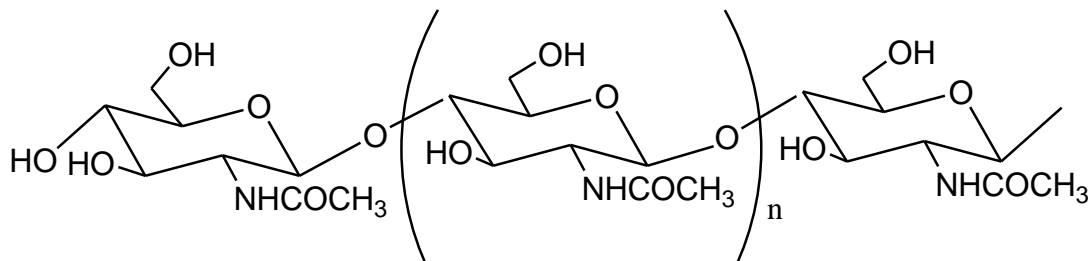
Tabla 1. Porcentaje de quitina de acuerdo al organismo del que proviene³

Organismo	Quitina %
Almejas, ostras	3-6
Hongos	10-25
Insectos	0-8
Krill	3-7, 24% en ocasiones
Crustáceos	14-35, 25% de media
Cefalópodos	1-2, 40% en el esqueleto interno

En su presentación industrial es un producto ligero, un polvo de color blanco o amarillento que puede ser procesado en múltiples derivados.

En el laboratorio la quitina es fácil de obtener del exoesqueleto de camarones o cangrejos, para ello se requiere un tratamiento químico con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas con ella. La obtención del quitosano se realiza por medio de un tratamiento con álcali concentrado y caliente, con el fin de retirar la mayor cantidad de unidades acetilo de la estructura del polímero.

Figura 1. Estructura polimérica de la Quitina



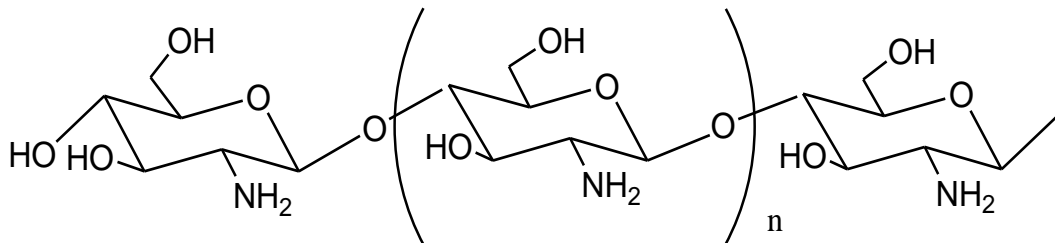
La producción industrial de la quitina y el quitosano se realiza por lo general a partir de desechos de la industria pesquera y alimentaria. La quitina y el quitosano son producidos comercialmente en India, Japón, Polonia, Noruega y Australia²⁻⁹.

1.2 El Quitosano

El quitosano fue descubierto por C. Rouget en 1859, quien dio origen a las investigaciones intensivas sobre estos biopolímeros.

El quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina de la que se obtiene después de hidrolizar los grupos acetamido (Figura 2). Forma parte de la pared corporal de la mayoría de hongos y mohos²⁻⁹.

Figura 2. Estructura polimérica del Quitosano



1.3 Aplicación de la Quitina y el Quitosano

Las aplicaciones de la quitina y el quitosano son muy amplias, existen sectores en los que su utilización es habitual y otros que constituyen actualmente una interesante vía de investigación, estas aplicaciones se describen a continuación^{4, 10}.

1.3.1 Tratamiento de Aguas.

La Quitina, el Quitosano y sus derivados actúan como quelantes de metales de transición y contaminantes ambientales como bifenilos policlorados (PCBs); remueven los iones metálicos como Hg, Cd, Pb, Ag y Ni; como floculantes, coagulantes y precipitantes de proteínas, aminoácidos, tintes, colorantes, algas,

aceites, metales radioactivos (U y Co), partículas en suspensión y pesticidas. Por ello se emplean en el tratamiento de piscinas y estanques, efluentes de industrias de alimentación y residuos alimenticios (reduciendo la DQO hasta en un 80%), aguas residuales (refinerías de petróleo, plantas procesadoras de pescado, cerveceras, mataderos) y en el tratamiento de agua de bebida o consumo^{4, 10}.

1.3.2. Industria Alimentaria

• Como aditivos en los alimentos:

Por sus propiedades como espesantes, gelificantes, y emulsificantes se utilizan como mejoradores de la textura ya que fijan agua y grasa (ej. Quitina cristalina), también se emplean como estabilizantes del color, como agente que previene la precipitación en el vinagre, como aditivos con características nutricionales (fibra dietética ingrediente funcional), en galletas y pan previene la disminución del volumen de la masa, como aditivo para alimentación animal (hasta el 10% en alimento para pollos) ya que aumenta el crecimiento y el vigor y el crecimiento de bifidobacterias en el buche que bloquean el crecimiento de otros microorganismos y generan lactasa.

• Envoltura y recubrimiento protector de alimentos:

Las películas con quitosano son resistentes, duraderas y flexibles con propiedades mecánicas similares a las de los polímeros comerciales de fuerzas medias.

Su uso en films comestibles puede favorecer la protección de la vida salvaje ya que aunque sean ingeridos por algunos animales (el 30% de los peces marinos tienen plásticos en su estómago) pueden ser fácilmente degradados por enzimas existentes en el estómago de algunos de estos. También se emplean junto con otros elementos en recubrimientos para frutas (NO-

carboximetilquitina) retrasando el envejecimiento, disminuyendo la oxidación, las pérdidas por transpiración y protegiendo frente al ataque de hongos.

Su acción como protector de alimentos frente a microorganismos (concentraciones \geq del 0,02% protegen frente a E. Coli) como bacterias, levaduras y hongos, la hace interesante para retrasar la aparición del mal olor en la carne. La acción antimicrobiana la realizan privando a los microorganismos de iones vitales (Cu), bloqueando o destruyendo la membrana, filtrando constituyentes intracelulares y formando complejos polielectrolíticos con polímeros ácidos y células de superficie^{4, 10}.

• ***En otros procesos:***

Se emplea en la recuperación de proteína de desechos de ovoproductos para alimentación animal, como agente purificador del azúcar, clarificador en industrias de bebida (agua, vino, zumo de manzana y zanahoria) sin afectar el color, coagulación del queso (2-2,5% pH 6, remueve el 90% de los sólidos) y retardador del pardeamiento enzimático de jugos de manzana y pera^{4, 10}.

1.3.3. Medicina

Debido a que las moléculas de quitosano presentan propiedades antimicrobianas, de liberación controlada de sustancias, una buena histocompatibilidad, higroscopicidad y buenas propiedades mecánicas, hacen parte de vendajes, lentes de contacto, gotas oftalmológicas, cremas y recubrimientos para quemaduras, heridas y úlceras, implantes y cultivos de tejido.

En los últimos años, algunos estudios han demostrado la capacidad del quitosano para reducir de forma efectiva la absorción de grasa de la dieta, reducir la presión sanguínea y disminuir los niveles de colesterol sérico. Todo ello gracias a un mecanismo de formación de enlaces iónicos con los que se fija a diferentes tipos de aniones, tales como ácidos biliares y ácidos grasos libres,

y a su capacidad de formar micelas con el colesterol con lo que disminuye la absorción de ácido cólico y su aporte al hígado.

Otros campos y acciones conocidos son la distribución controlada de medicamentos en el organismo (como diluyente de medicamentos y tabletas), transporte de células, acción antitumoral de los oligómeros de quitosano, materiales para ortopedia, estomatología (enfermedad periodontal, antiplaca aumentando el pH), antiácido (previene la gastritis), aumento de la biodisponibilidad del calcio y de la producción de bifidobacterias en el digestivo, estimulante inmunitario, en problemas de intolerancia a la lactosa, secuestrante de sales biliares, protector frente a la diarrea y la constipación y en membranas renales artificiales^{4, 10}.

1.3.4. Biotecnología

El quitosano actúa en la inmovilización de enzimas como la glucosa isomerasa empleándose en lechos para biorreactores, en la separación de proteínas, en biosensores (monitorizando la oxidación de los lípidos en músculo de pescado y crustáceos), en recubrimientos celulares, cromatografía, inmovilización celular, reacción con aldehídos, captación de células y enzimas y en la producción de proteínas de única célula^{4, 10}.

1.3.5. Agricultura

En recubrimientos de semillas, como fertilizante y spray foliar, en la conservación de las frutas, como insecticida, en la protección frente a plagas y ataque de hongos (induciendo la acción de las quitinasas frente a hongos), como virucida y estimulante del crecimiento (transporte de nutrientes)^{4, 10}.

1.3.6. Cosmética

Son varias sus aplicaciones por sus propiedades humectantes (cremas de manos, lociones de baño), abrasivas (limpieza de la piel), su polaridad positiva (fijación de los productos a piel y pelo) y no alergenicidad. Se emplea con éxito como matriz apropiada para otros ingredientes en el cuidado bucal (pasta de dientes y colutorios bucales) y en el tratamiento para la celulitis^{4, 10}.

1.3.7. Industria papelera

Empleo en la elaboración del papel, aumento del rendimiento de la pulpa y de la capacidad de retención de agua (pañuelo de papel), como adhesivo, tratamiento de superficie en el papel (mayor resistencia y mejor fijación de la tinta), papel fotográfico, separación de productos y recuperación de componentes^{4, 10}.

1.3.8. Tecnologías de membrana

Para la separación de componentes (filtros moleculares), en columnas cromatográficas, como absorbentes de encapsulación, para el control de permeabilidad en ósmosis inversa, electrodiálisis, quitina magnética y aislamiento de lisozima^{4, 10}.

1.3.9. Alimentos Nutracéuticos

En alimentos funcionales (bebidas, barras comestibles, etc.) por sus características de solubilidad y la posibilidad de obtención de múltiples compuestos derivados^{4, 10}.

1.3.10 Industria textil

El quitosano como agente para evitar el encogimiento de los tejidos y fijador del color^{4, 10}.

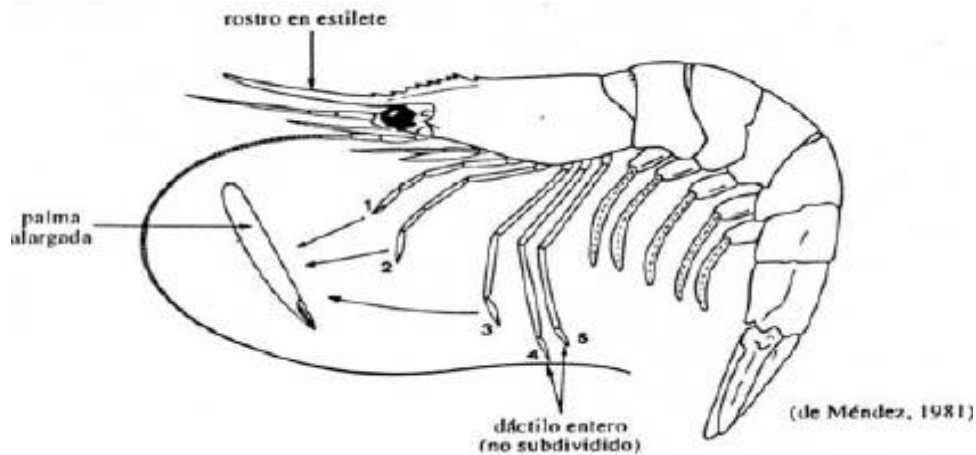
1.4 El camarón

El camarón, langostino o gamba es un crustáceo marino, decápodo, perteneciente al suborden de los Dendrobranchiata, de unos 10 a 15 centímetros de longitud, patas pequeñas, bordes de las mandíbulas fibrosos, cuerpo comprimido, cola muy prolongada respecto al cuerpo, coraza poco consistente y color grisáceo. Son relativamente fáciles de encontrar en todo el mundo, tanto en cuerpos de agua dulce como en agua salada^{7, 11}.

• Clasificación científica

Reino: Animalia
Filo: Arthropoda
Subfilo: Crustacea
Clase: Malacostraca
Orden: Decapoda
Suborden: Dendrobranchiata
Familia: Penaeidae
Género y Especie: *Protrachypene precipua*

Figura 3. Camarón *Protrachypene precipua*^{12, 13}



• **Relevancia como alimento**

Los camarones en sus diferentes especies son criaturas relativamente abundantes en los cuerpos de agua dulce o salada en todo el mundo, lo cual los convierte en un importante recurso pesquero y alimenticio.

Prácticamente cada país posee recetas y formas particulares para preparar y consumir estos crustáceos. Si existe algún punto en común, es que para consumirlos se procede a su cocimiento, remoción de la cabeza, coraza corporal y aletas anteriores y posteriores. Dichas partes son ricas en quitina y debido a esto son indigeribles por el organismo humano^{7, 11}.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rendimiento y la pureza de quitosano obtenido a partir de la quitina extraída de los caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*)

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición proximal de los caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*) por medio de un análisis fisicoquímico mediante la determinación de la humedad, ceniza, proteína, grasa y carbohidratos
- Optimizar el procedimiento de extracción y purificación de quitina a partir de caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*).
- Implementar y estandarizar la metodología de síntesis del quitosano partiendo de la quitina extraída.
- Caracterizar los biopolímeros por métodos físicos (viscosidad), químicos (pruebas cualitativas de aminos) e instrumentales (espectroscopia infrarroja).

3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados para el desarrollo experimental, fueron de grado analítico:

- Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH) 99.9% (Merck)
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) 36.5% (Mallinckrodt)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 97% (Mallinckrodt)
- Ácido Bórico (H₃BO₃) 99% (Mallinckrodt)
- Catalizador para proteína (10g K₂SO₄ 99.5% (Carlo Erba); 0.3g TiO₂ 99.5% (Carlo Erba); 0.3g CuSO₄ 98% (Carlo Erba))
- Éter etílico (H₃C-CH₂-O-CH₂-CH₃) 99.9% (Mallinckrodt)
- Bromuro de potasio (KBr) 99.9% (Merck)
- Cloruro de bencensulfonilo (C₆H₅ClO₂S) 98% (Merck)
- Sulfato de cobre (CuSO₄) 98% (Carlo Erba)
- Àcido acético (CH₃COOH) 99% (Mallinckrodt)
- Glucosamina-Clorhidrato (C₆H₁₄ClNO₅) Move Free
- Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 98% (Carlo Erba)
- Sulfato ferroso (FeSO₄) 98% (Carlo Erba)
- Difenilamina (C₁₂H₁₁N) 98% (Sigma)
- Glucosa (C₆H₁₂O₆) 99% (Mallinckrodt)

3.2 EQUIPOS

Para realizar los análisis fisicoquímicos, de caracterización y grado de desacetilación de la quitina y quitosano se emplearon los siguientes equipos.

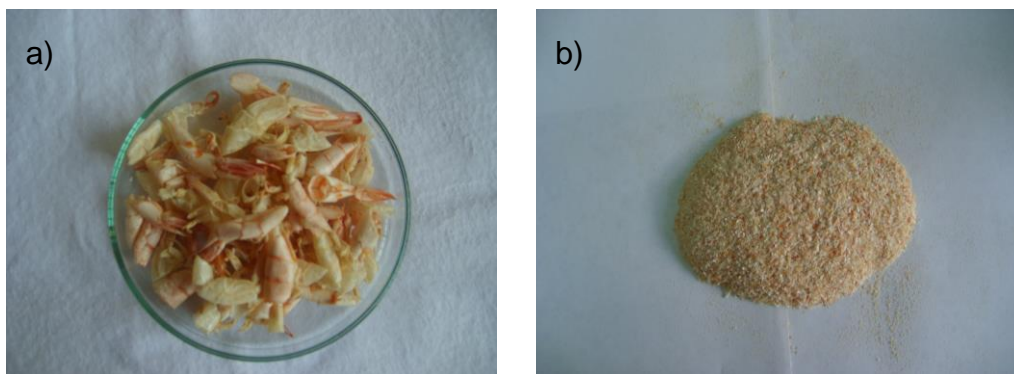
- Balanza analítica Mettler AE 200 precisión 0.0001g
- Estufa de desecación FISHER ISOTEMP 737G
- Mufla TERRIGENO Modelo F2PGA
- Unidad KJENDAHL BUCHI. Unidad de digestión k-424, Scrubber B-414, Destilador K-314
- Placas calefactores con agitación CORNING PC- 420
- Desecador DURAN
- Desionizador de agua E&Q REF D-1 SERIAL 281
- Espectrofotómetro IR 200 TERMO
- Rotaevaporador HEIDOLPH LABOROTA 4001
- Viscosímetro eléctrico Brookfield
- pHmetro METTLER TOLEDO SevenMulti
- Tamiz Retsch N° 10

3.3 MATERIA PRIMA

La materia prima se obtuvo en el municipio de Costero de Tumaco - Nariño, el camarón (*Protrachypene precipua*) se aproxima a la zona costera del Pacífico en los meses de calor (de noviembre a marzo) donde se aprovecha la marea alta del Pacífico para pescar esta variedad. Los caparazones de camarón se empacan y transportan en bolsas de polietileno bidireccional con sello hermético.

Los caparazones de camarón limpios y secos fueron molidos hasta obtener un tamaño de partícula menor a 2.0mm (Figura 4)

Figura 4. a) Caparazones Enteros Vs b) Caparazones Molidos



3.4 Análisis Proximal de los Caparazones de Camarón

Se realizó un análisis proximal de los caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*) para determinar su contenido de humedad, cenizas, proteína, grasa y carbohidratos totales, según protocolos establecidos por la AOAC referenciados en la Tabla 2 los cuales se han ajustado y estandarizados en el grupo de investigación Química de Productos Naturales (QPN).

Tabla 2. Métodos para análisis proximal, según la AOAC.

Análisis	Método	Referencia
Humedad	Desecación	AOAC 986.21
Cenizas	Gravimétrico	AOAC 941.12
Nitrógeno	Kjeldhal	AOAC 920.165
Grasa	Soxhlet	AOAC 963.15
Carbohidratos Totales	Weende	AOAC 978.10 (4.6.02)

Humedad: Para la determinación del porcentaje humedad se tomó el polvo de caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*), se colocó en cajas petri limpias y secas y se llevó a la estufa por un tiempo de 3 h a una temperatura de 105 °C, hasta obtener peso constante^{14, 15}.

Cenizas: Para la determinación de cenizas o material mineral se tomó la muestra seca (*Protrachypene precipua*), se colocó en un crisol, previamente limpio y seco y se llevó a la mufla a 550 °C por 4h, hasta que las cenizas presentaron una coloración grisácea clara^{14, 15}.

Grasa: La determinación de grasa se realizó colocando la muestra seca (*Protrachypene precipua*) en un cartucho de papel filtro en una cámara Soxhlet, se llevó a reflujo por 4h con éter de petróleo, luego se destila el solvente y se coloca el balón en la estufa a 100 °C^{14, 15}.

Proteína: La determinación de proteína, se realizó utilizando la metodología Kjeldhal con el equipo de digestión y destilación Buchi, por un tiempo de 4h y la solución se tituló con HCl estandarizado previamente^{14, 15}.

Carbohidratos: una vez establecidos los porcentajes de humedad, cenizas, extracto etéreo y proteína, se obtuvo por diferencia el porcentaje de

carbohidratos solubles; la fibra bruta se evaluó por el Método de Weende según el siguiente procedimiento: se pesó la muestra seca y libre de grasa en un balón, se adicionó H_2SO_4 0,255N y se dejó en reflujo por 30 min exactos. Se filtró y se repitió el procedimiento con NaOH 0,313N. Se filtró y lavó con etanol; el sólido no disuelto, se secó en un crisol a 100 °C. El crisol con la muestra se llevó a la mufla a 550 °C y el residuo de la calcinación se pesó^{14, 15}.

3.5 Extracción de Quitina

Para realizar una adecuada extracción de quitina, se llevó a cabo la siguiente metodología:

3.5.1 Extracción de Quitina a partir de Caparazones de Camarón

3.5.1.1. Desmineralización

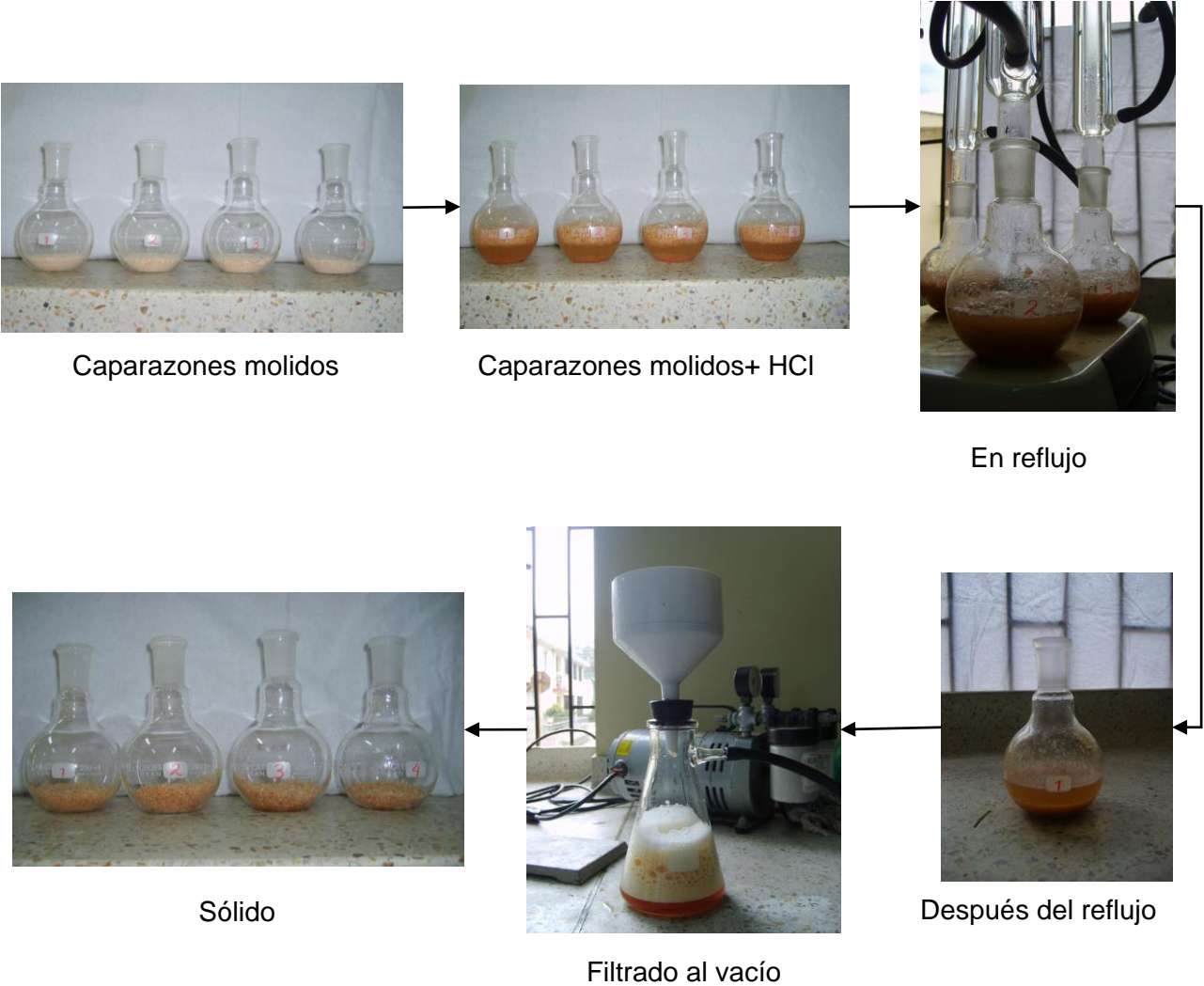
Se tomó aproximadamente 10g de caparazón de camarón molido en un balón de 250mL conectado a un sistema de reflujo, se adiciono 100mL de HCl 1.0M por 20 min a 100°C, se decanto y el residuo fue lavado con agua desionizada hasta obtener un pH neutro en el agua de lavado. El sólido se llevo a sequedad en la estufa a 100°C, obteniéndose un polvo de color habano y finalmente se pesó la muestra obtenida.

3.5.1.2. Desproteínización

Se empleo 3.0g aproximadamente del sólido obtenido en el proceso de desmineralización, se sometió a hidrólisis con NaOH 1.0M en relación 1:10 masa/volumen a una temperatura de 65°C por 1 hora, se lavo el residuo con agua destilada hasta obtener en el agua de lavado un pH neutro, el residuo se

llevo a sequedad en la estufa a 100°C obteniéndose un polvo de color habano, se pesó el producto final y se tomó el IR^{3, 9, 16-21}(Figura 5).

Figura 5 Procedimiento extracción de quitina





Sólido+NaOH
En reflujo



Filtrado al vacío



Sólido



Quitina Almacenada y
Rotulada

3.6 Transformación de Quitina a Quitosano

Se depositó 0.04g aproximadamente de la quitina obtenida en un tubo de ensayo con 5.0mL de NaOH al 40%, este se calentó en un baño maría a 100°C por 1 hora, el residuo se lavó con agua destilada hasta obtener en el agua de lavado un pH neutro, el residuo se llevo a sequedad en la estufa a 100°C obteniéndose un polvo de color blanco (Figura 7), se pesó el producto final y se tomó el IR^{3, 9, 16-21}.

En la Figura 6 se observa la reacción de la transformación de quitina a quitosano

Figura 6. Reacción de desacetilación de quitina para la obtención de quitosano.

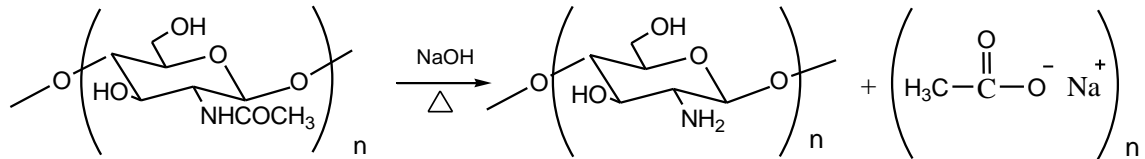
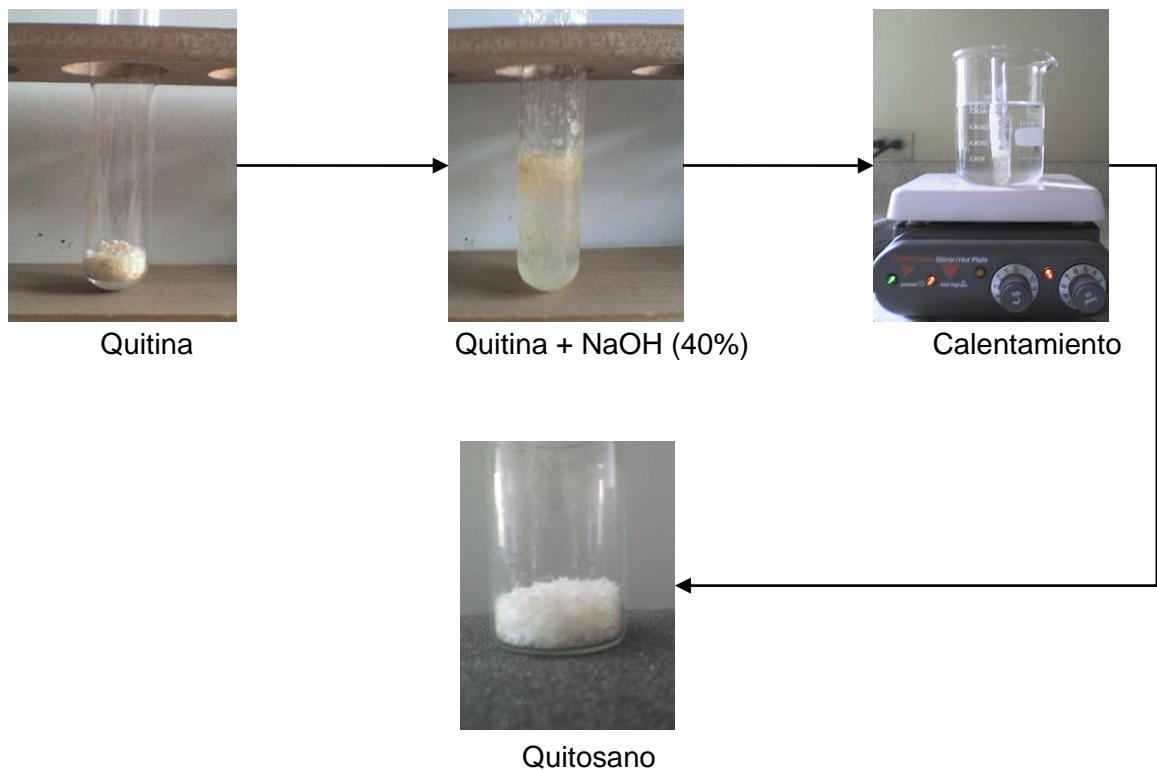


Figura 7. Procedimiento de transformación de Quitina a Quitosano



El método que propone el Instituto Tecnológico de Orizaba (ITO)²² para la obtención de la quitina y quitosano, consiste en separar primeramente los dos componentes de mayor interés: proteínas y quitina, mediante etapas consecutivas (molienda de los caparzones, desmineralización con HCl, y desproteínización mediante hidrólisis básica); finalmente, la quitina obtenida es

desacetilada para ser convertida en quitosano, su derivado comercial más importante, demostrando con este proceso la viabilidad de la separación de componentes importante para la industria, que convierten a los desechos de las camarónicas en una materia prima útil y económica.

3.6.1 Determinación del Grado de Desacetilación de la Quitina

Para evaluar el grado de desacetilación de la muestra, se determinó el contenido de grupos amino del quitosano mediante una disolución de 0,5 g del polímero en 20 mL de HCl 0,3 M. A continuación se titula con una solución de NaOH 0,1 M. La valoración se lleva a cabo midiendo el cambio de pH cada 0.5 mL de base agregada (Figura 8), la adición se realizo de forma lenta y con agitación continua para homogenizar la solución y evitar errores debidos a la posible precipitación del biopolímero. Las medidas se realizaron tres veces para cada muestra³.

Figura 8. Titulación Potenciométrica



3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS

La pureza de los biopolímeros extraídos se evaluó por medio de análisis por espectrofotometría infrarroja, viscosidad, pruebas cualitativas para aminas, determinación de nitrógeno por el método Kjeldhal y determinación de carbono orgánico por el método de Walkley - Black para caracterizar los polímeros obtenidos^{23, 26}.

3.7.1 Viscosidad

La viscosidad de la muestra obtenida fue medida con un viscosímetro Brookfield el cual mide la viscosidad aparente en centipoises, mediante el esfuerzo de torsión requerido para rotar un huso o vástago a una determinada velocidad (Figura 9), en este caso se utilizaron un vástagos enumerados del 1 al 5 y un rango de velocidad de 0,6 a 60 rpm, sobre una solución de quitosano 0,5% en ácido acético 0,5%^{8, 27}.

FIGURA 9. Viscosímetro Brookfield



3.7.2 Pruebas Cualitativas para Aminas

3.7.2.1 Prueba de Ion cobre

Las aminas presentan un precipitado o una coloración azul-verdosa cuando son adicionadas a una solución de sulfato de cobre (Figura 8).

En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL de una solución acuosa de sulfato de cobre al 10%. Se adicionó 10 mg aproximadamente de Quitosano y si se observa la aparición de una coloración azul-verdosa esto indica una prueba positiva para aminas²⁸.

FIGURA 10. Cambio de coloración en la solución de Sulfato de Cobre



Complejo sulfato de cobre + sulfato de glucosamina



Sulfato de cobre al 10%

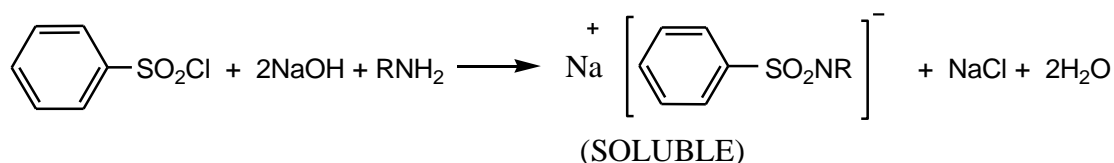
3.7.2.2 Prueba de Heinsberg

Es una prueba útil para diferenciar entre aminas primarias, secundarias y terciarias.

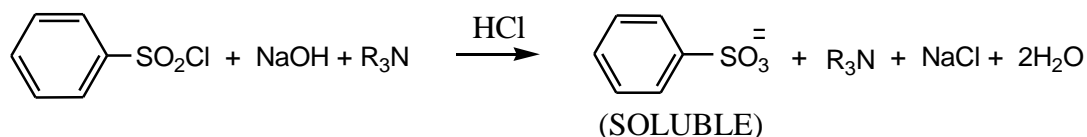
En un tubo de ensayo se colocó 1.2g de quitosano y 12 mL de una solución de KOH al 10% seguido de 1.0mL de cloruro de bencensulfonilo. Se tapó y agitó vigorosamente durante 15 min. Al final se probó con papel indicador si la solución presentaba pH alcalino, si no era así se adicionaba más KOH. Se enfrió en un baño de hielo por 15 min.

El precipitado formado se filtró al vacío y se lavó con agua fría. Se tomó 0.2g aproximadamente del sólido, se le agregó 5mL de NaOH al 10% y se agitó la mezcla vigorosamente. De acuerdo a lo planteado en la prueba de Hisberg: si el precipitado desaparece, la amina es primaria (Ecuación 1), si el precipitado persiste y solo se disuelve al agregar HCl al 10%, la amina es terciaria (Ecuación 2) y si el precipitado persiste en medio ácido la amina es secundaria²⁹ (Ecuación 3) como se indican en la siguientes ecuaciones:

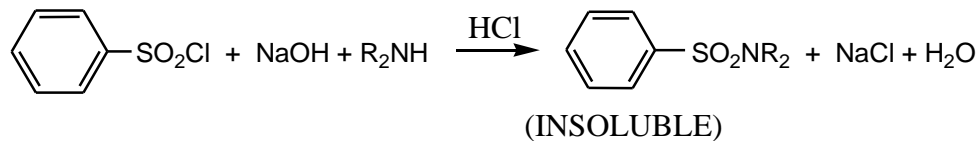
Ecuación 1



Ecuación 2



Ecuación 3

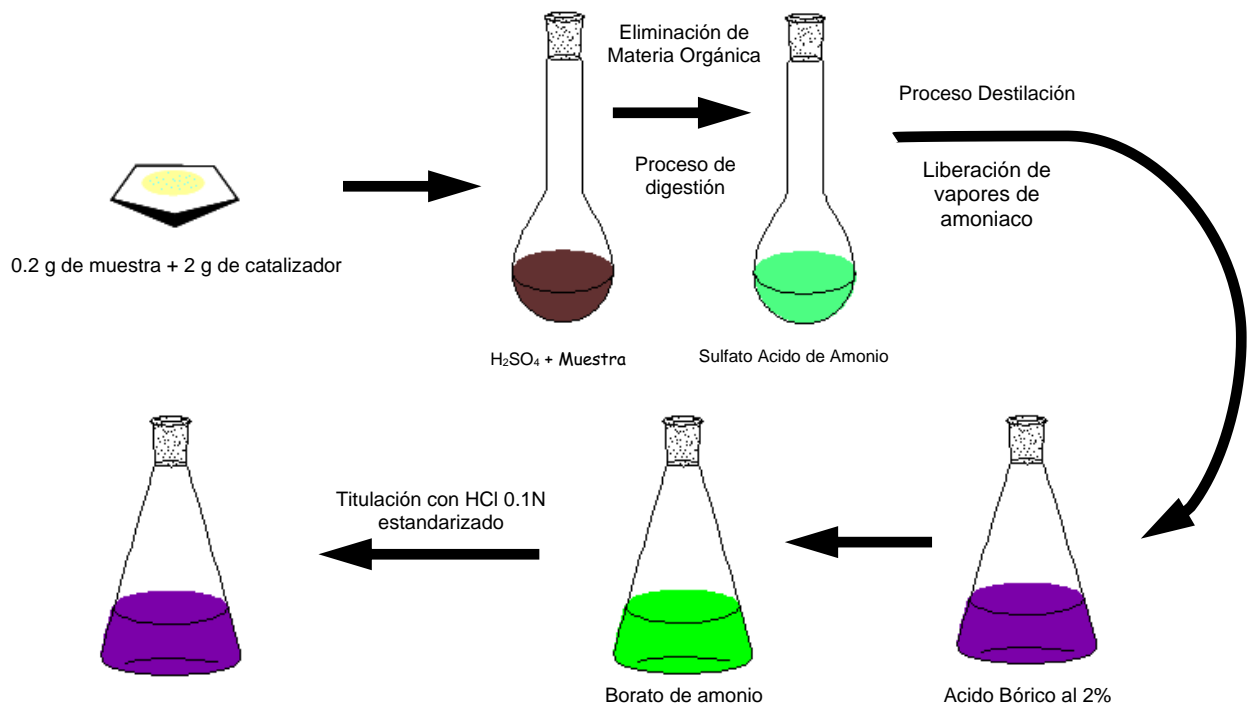


3.7.3 Determinación de Nitrógeno Kjeldhal

La determinación de nitrógeno se realizó con la metodología Kjeldhal. Se pesó 0.2g de muestra en un balón Kjeldhal con 2.0 g de catalizador para proteína (K_2SO_4 ; TiO_2 ; CuSO_4) y 9 mL ácido sulfúrico concentrado, el balón se llevó a calentamiento en la unidad de digestión Buchi hasta obtener un color verdoso en la muestra, se dejó enfriar y se le agregaron tres gotas de fenolftaleína. El balón con la muestra digestada se colocó en la unidad de destilación Buchi,

donde se le agregó NaOH al 32%, generándose así vapores de amoniaco, los cuales se recogieron en un erlermeyer que contenía 100mL de una solución de ácido bórico al 2.0% con dos gotas de indicador de tashiro (morado), cuando se han recogido todos los vapores de amoniaco en la solución de ácido bórico toma una coloración verde por la formación del borato de amonio, la solución se tituló con HCl 0.1N estandarizado para determinar por retroceso la cantidad de nitrógeno presente en la muestra^{14, 15}(Figura 11).

Figura 11. Proceso para determinación de Nitrógeno Kjeldhal

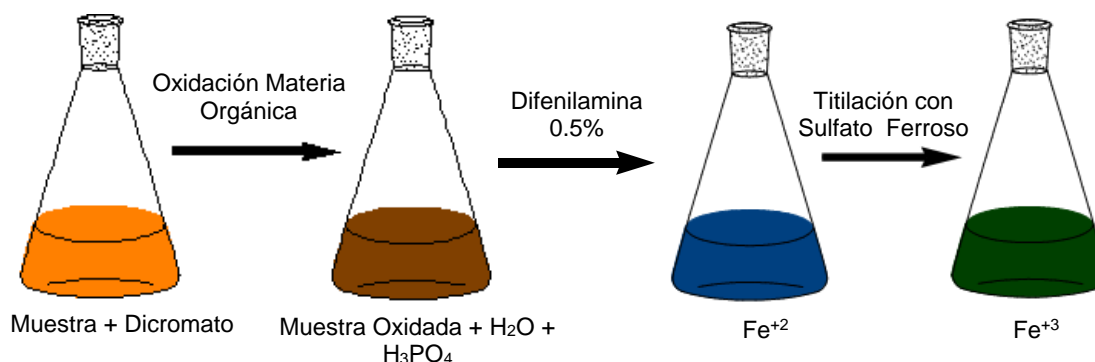


3.7.4 Determinación de Carbono Orgánico Walkley – Black

La determinación de carbono orgánico se llevó a cabo con la metodología Walkley-Black utilizando como patrón la glucosa. La determinación consiste en la oxidación del carbono orgánico por una mezcla oxidante de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), acelerada por el calor de dilución del H_2SO_4 en agua. El carbono orgánico reduce al dicromato Cr^{6+} (amarillo- naranja) hasta cromato Cr^{3+} (verde). El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- Se pesó 0.01g de muestra en un erlenmeyer de 250mL, se le agregó 10mL de $K_2Cr_2O_7$ 0.17M con 10mL de H_2SO_4 concentrado, se agitó y se dejó reposar por 30 min. Se llevó a un volumen de 100mL con agua destilada, se adicionó 5mL de H_3PO_4 concentrado y se dejó reposar durante 10 min, se agregó 20 gotas de indicador de difenilamina al 0.5%.
- El exceso de dicromato se tituló con una solución con sulfato ferroso ($FeSO_4$) 1.0M, teniendo en cuenta el paso de un color púrpura oscuro a un verde brillante³⁰ (Figura 12).

Figura 12. Proceso para determinación de Carbono Orgánico



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presenta la interpretación y el análisis de los datos registrados durante el desarrollo experimental.

4.1 Análisis de Materia Prima

Los caparazones fueron recolectados y lavados con agua potable y jabón detergente, hasta que se eliminaron los residuos blandos (carne). Se colocaron ya limpios sobre papel periódico y se dejaron secar a temperatura ambiente, se almacenaron en bolsas de polietileno bidireccional con sello hermético para mantener en buenas condiciones la materia prima.

Los caparazones de camarón se molieron hasta obtener un polvo cuyo tamaño de partícula sea menor a 2.0mm (tamiz N° 10), estos se almacenaron en bolsas de polietileno bidireccional con sello hermético.

4.2 Análisis Proximal de los Caparazones de Camarón

Se realizó un análisis fisicoquímico a los caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*) para identificar el contenido de grasas, minerales, humedad, proteínas y carbohidratos totales, los datos obtenidos en el análisis próximo se relacionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis proximal de los caparazones de camarón

Análisis	Valor %
Humedad	9.10
Ceniza	47.72
Extracto etéreo (grasa)	0.89
Proteína bruta (F=6.25)	24.82
Carbohidratos Totales	17.46

F: es el valor del factor protéico

Los resultados obtenidos en el análisis proximal muestran un alto contenido de proteína (24.82%), este valor se encuentra dentro de los datos reportados por Hernández³¹ los cuales varían entre un 20% a un 40%. Este análisis se realizó por el método Kjeldahl que determina la cantidad de nitrógeno total y al ser multiplicado por un factor protéico se determinó la proteína presente en la muestra.

En la literatura encontrada, el contenido de cenizas se debe a la presencia de sales de calcio y de magnesio, como carbonatos y fosfatos ³¹; en la muestra analizada se obtuvo un valor significativo (47.72%) coincidiendo con lo publicado (30%-60%).

El extracto etéreo presenta un valor muy bajo y es de esperarse ya que los caparazones de camarón forman la epidermis del organismo, además en el proceso de lavado se eliminan los residuos de carne.

La determinación de carbohidratos totales se lleva a cabo por diferencia con los otros análisis realizados en el análisis próximo. No se reporta fibra ya que los animales no presentan fibra como tal, por ello se lleva a cabo la determinación de carbohidratos totales.

4.3 Extracción de Quitina

4.3.1 Extracción de Quitina a partir de los caparazones de camarón

Los datos obtenidos en la extracción de quitina se relacionan en la Tabla que se encuentra a continuación:

Tabla 4. Datos obtenidos en el ensayo de extracción de Quitina

Nº	Muestra	Quitina	% Rendimiento
1	10.0331	1.7231	17.174
2	10.0634	1.732	17.123

En el proceso de desmineralización se observó la formación de una espuma blancuzca en la superficie de la solución, debida a la liberación de carbonatos y fosfatos presentes; al comenzar el calentamiento la solución tomó un color amarillo pardo. El residuo se lavó con agua desionizada tornándose de color rosado y después de secarse en la estufa a 100°C se obtuvo un polvo habano (Figura 5). Estos cambios de color se debieron a las liberaciones de pigmentos propios del material de partida.

En el proceso de desproteínización, los caparazones de camarón fueron sometidos a una hidrólisis con NaOH 1.0M y se obtuvo una solución amarilla ya que la proteína presente en los caparazones se solubiliza en el NaOH. El sólido de color habano fue lavado hasta la neutralidad para detener la hidrólisis y finalizar el procedimiento, al producto final se le tomó un espectro IR para verificar la presencia de las bandas características de la quitina y así garantizar que se ha removido los minerales y la proteína.

Los valores reportados en la Tabla 4 muestran una coherencia entre el porcentaje de quitina extraída y el valor de los carbohidratos totales encontrados en el análisis próximo realizado a los caparazones de camarón, esto significa que la quitina presente en los caparazones ha sido extraída en su mayor parte con esta metodología.

En el espectro infrarrojo de la quitina (Figura 13), se observan las bandas características de vibraciones de tensión N-H a 3443 cm^{-1} ; otra banda de deformación de N-H a 1566 cm^{-1} ; y bandas a 1156 cm^{-1} las cuales corresponden a vibraciones de tensión C-OH; las bandas que se encuentran a

1655 cm^{-1} corresponden a vibraciones de tensión C=O; las vibraciones de tensión OH se encuentran a 3109 cm^{-1} , además en este espectro se encuentran bandas de vibraciones tensión C-N a 1260 cm^{-1} , bandas de tensión asimétrica C-H a 2929 cm^{-1} y de tensión simétrica C-H a 2886 cm^{-1} , bandas de vibraciones deformación C-H de metilos a 1380 cm^{-1} y a 1316 cm^{-1} vibraciones de formación C-H metilenos, vibraciones de simetría de tensión C-O-C a 1072 cm^{-1} y vibraciones de deformación de C-O 1026 cm^{-1} .

Al comparar el espectro del material resultante de la extracción, con los espectros de los patrones reportados en la literatura², se puede afirmar que la metodología aplicada en la extracción es óptima para este tipo de matriz ya que todas las bandas coinciden incluyendo la zona de la huella digital.

Por ello se decidió realizar la extracción de quitosano de esta muestra.

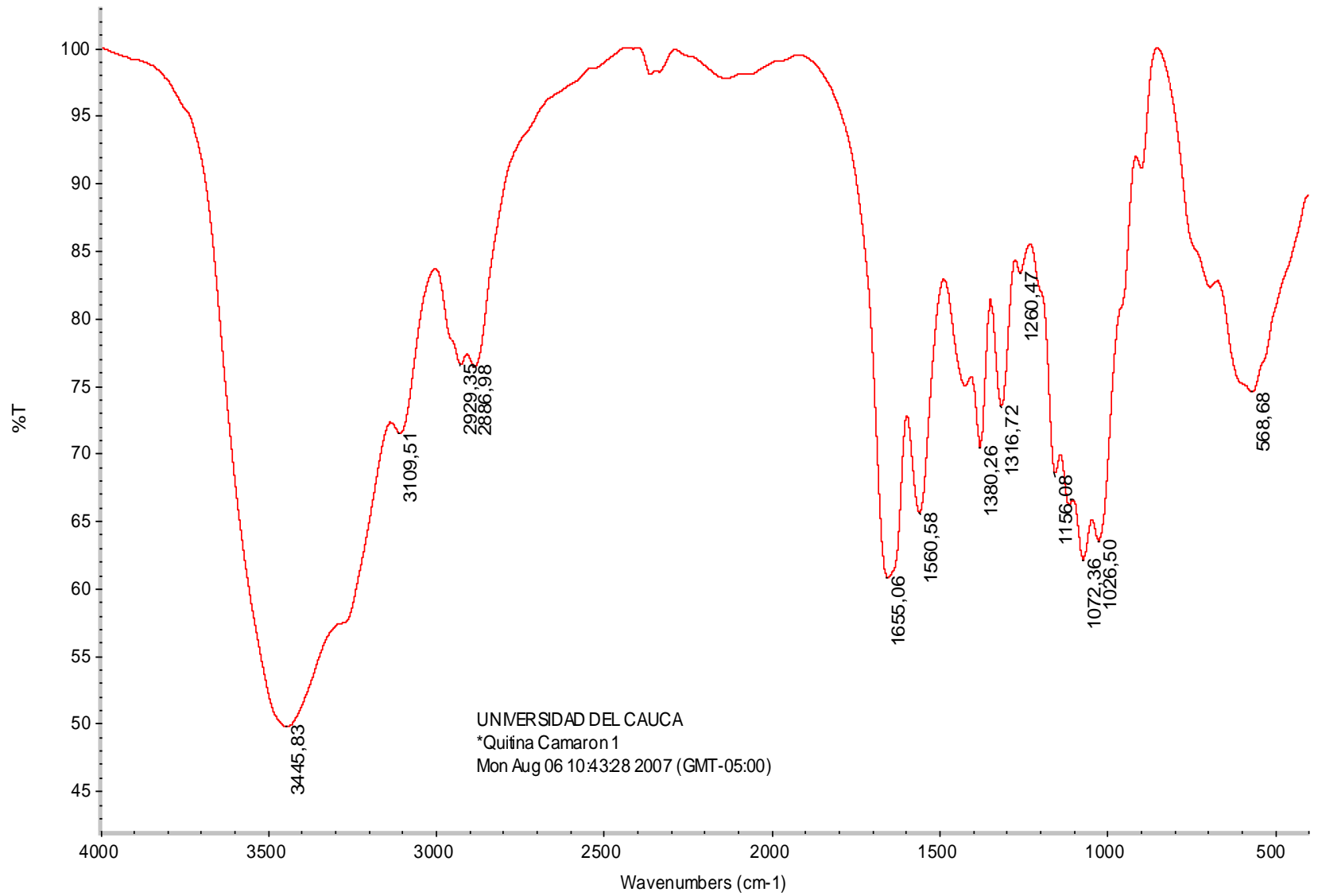


Figura 13. Espectro infrarrojo extracción de quitina a partir caparazón de Camarón.

4.4 TRANSFORMACION DE QUITINA A QUITOSANO

Los datos obtenidos en la transformación de quitina a quitosano se relacionan en la siguiente Tabla:

Tabla 5. Datos obtenidos en la transformación de Quitina a Quitosano

Nº	Quitina	Quitosano	% Rendimiento
1	0.0472	0.0364	77.11
2	0.0415	0.0319	76.86

En el proceso de transformación de quitina a quitosano se sometió la quitina a una hidrólisis con NaOH al 40% por una hora a 100°C, obteniendo una solución en donde se pueden observar dos fases una sólida de color blanco y una líquida (aceitosa) de color amarillento (ácido acético), las fases fueron separadas por filtración al vacío y la fase sólida fue lavada con agua destilada hasta la neutralidad para detener la hidrólisis y finalizar el proceso; el sólido fue secado a 100°C obteniéndose un polvo blanco, que fue pesado y analizado por espectroscopia infrarroja.

En el espectro infrarrojo de la Figura 14 se observan bandas características de vibraciones de deformación C-H a 1380 cm⁻¹, de vibraciones de deformación de C-O a 1079 cm⁻¹; las bandas vibraciones de tensión simétrica N-H y vibración de tensión OH se encuentran solapada a 3453 cm⁻¹, además se encuentra una señal solapada a 1634 cm⁻¹ que corresponde a vibraciones de tensión C=O y deformación en tijera N-H, lo que indica que el proceso de transformación no es completo por consiguiente hay presencia de quitina en el biopolímero.

Al comparar el espectro del material obtenido en el proceso de transformación de quitina a quitosano con los espectros de los patrones reportados en la

literatura⁴, se pudo afirmar que la metodología aplicada para la obtención del quitosano es la adecuada para la matriz debido a que todas las bandas coincidieron, incluyendo la zona de huella digital.

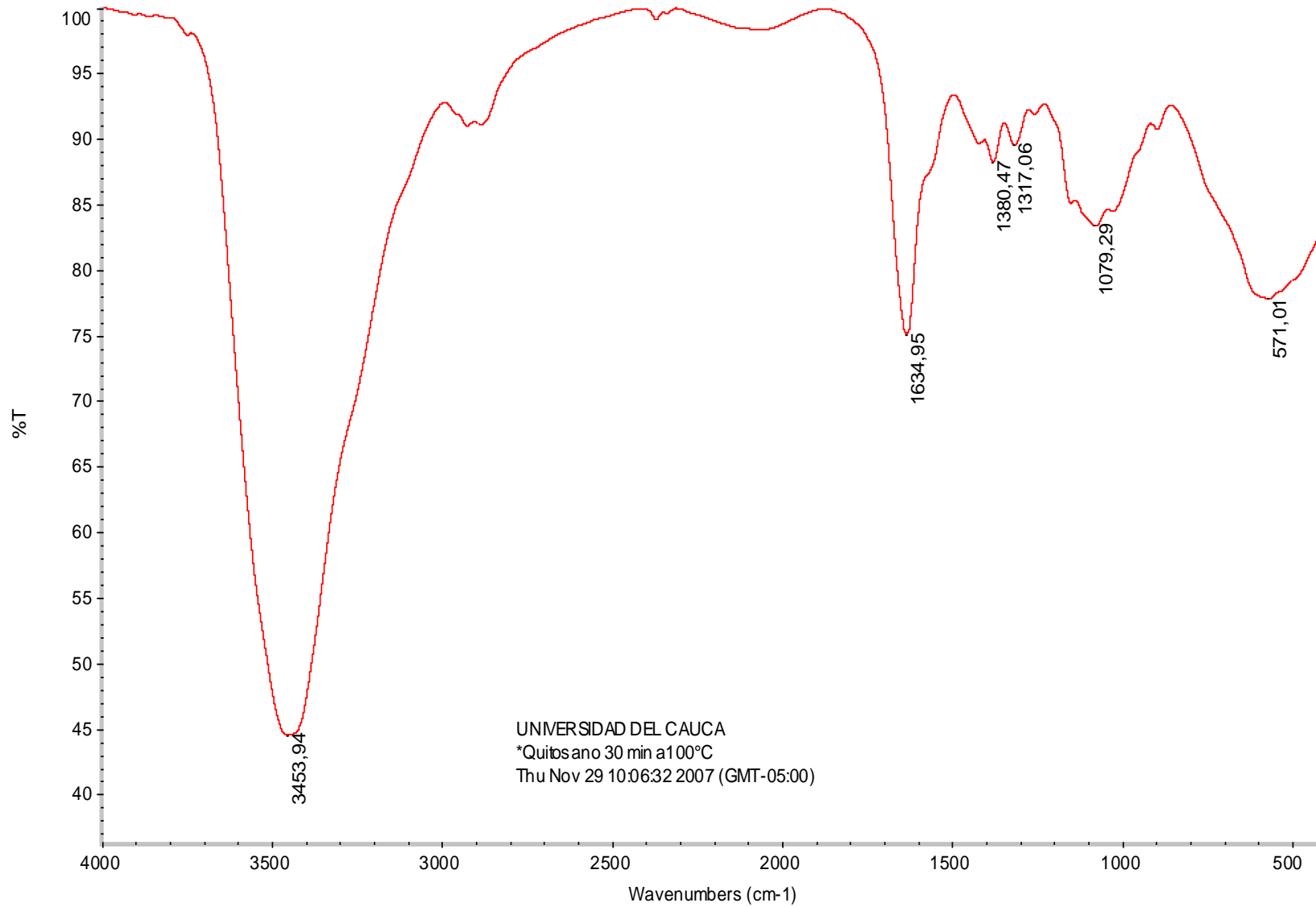


Figura 14. Espectro infrarrojo transformación de quitina a quitosano.

4.4.1 Determinación del Grado de Desacetilación de la Quitina

El contenido de grupos amino en la muestra de quitosano obtenido se determinó por titulación potenciométrica. Para ello se disolvió el polímero en ácido clorhídrico 0.30M y se valoró la mezcla con hidróxido de sodio 0,10M, tal y como se describió previamente. Los resultados de la valoración se muestran en las Figuras 15 y 16.

Se produjo una curva de titulación con dos puntos de inflexión, cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada.

La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación, corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano, la concentración de éstos se determinó utilizando la expresión:

$$\% NH_2 = \frac{16.1(y-x)}{w} \times f$$

Donde **y** es el punto de inflexión mayor, **x** corresponde al punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes, **f** es la molaridad de la solución de NaOH, **w** el peso en gramos de la muestra y 16,1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano³. La valoración se realizó por triplicado, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 6. La proporción de grupos amino en el quitosano obtenido, indica que el método de síntesis utilizado conduce a un producto altamente desacetilado.

El porcentaje obtenido de quitosano en el proceso de desacetilación de la quitina es estequiométricamente igual al porcentaje de acetato de sodio resultante como subproducto de la reacción. Esto último se verificó mediante la elaboración de una curva de titulación potenciométrica al acetato de sodio para corroborar los valores obtenidos en el proceso. La curva graficada presentó los mismos puntos de inflexión de la curva

potenciométrica del quitosano, indicando que la metodología empleada es la adecuada para este tipo de materia prima.

Tabla 6. Datos de la proporción de grupos amino en la muestra de quitosano obtenido en la titulación potenciométrica.

Muestra	Y (mL)	X (mL)	Y-X (mL)	% NH ₂
Quitosano Obtenido	87.00	63.00	24.00	70.11

Figura 15. Curva de titulación potenciométrica para Quitosano obtenido

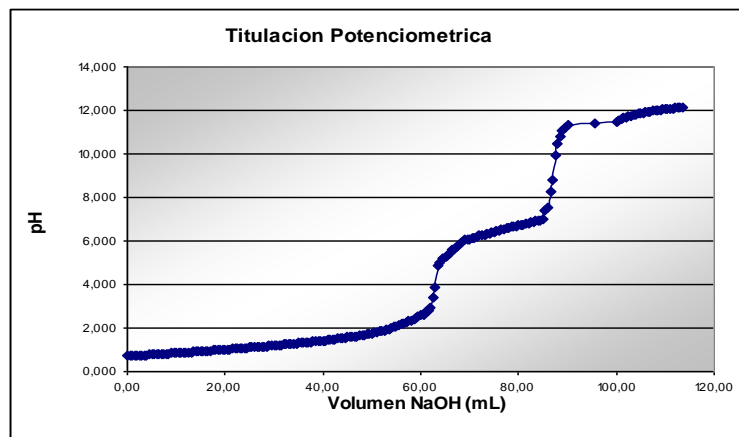
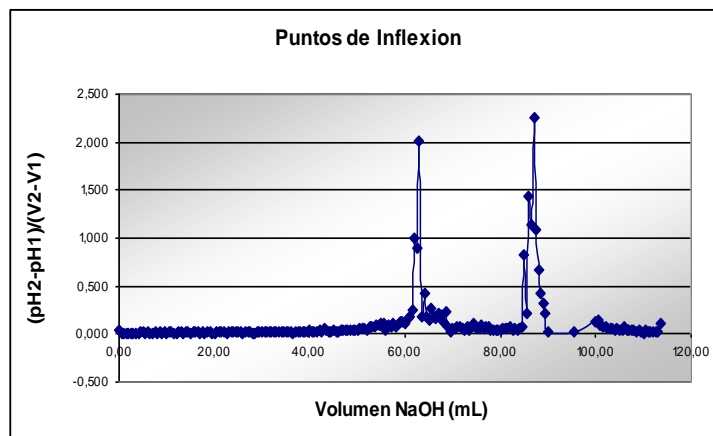


Figura 16. Primera derivada, los máximos corresponden a los puntos de inflexión del Quitosano obtenido



4.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS

4.5.1 Viscosidad

Se preparó una solución de quitosano 0,5% en ácido acético 0,5%, la cual se llevó a un vaso de precipitados y se realizó la medida de viscosidad por triplicado. Se trabajó con el vástago N°1 a una velocidad de 0.6 rpm obteniéndose una viscosidad de 8.75 (Figura 17), al aplicar el factor de corrección para este vástago a esa velocidad (100) se obtuvo una viscosidad real de 875cp lo que indica que el quitosano extraído se encuentra en un rango de pureza de 75%²⁷.

FIGURA 17. Medida de viscosidad de quitosano



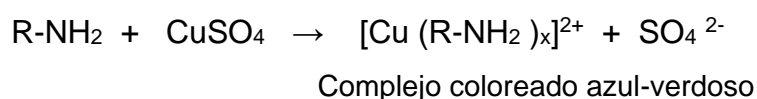
4.5.2 Pruebas Cualitativas para Aminas

4.5.2.1 Prueba de Ion cobre.

En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL de una solución acuosa de sulfato de cobre, se adicionó el quitosano y se observó la aparición de un precipitado de color azul-verdoso, lo cual indica una prueba positiva para aminas. Cuando el cobre del sulfato entra en contacto con la amina genera un compuesto de coloración azul-verdoso, el cual se precipita debido a que el cobre libera de su esfera de coordinación el agua y entra la amina precipitando el complejo. El cobre se puede volver tetravalente o

hexavalente, dependiendo del tamaño de la amina para que no se genere impedimento estérico, el cobre mantiene su carga ya que las aminas no cambian el estado de oxidación de este metal.

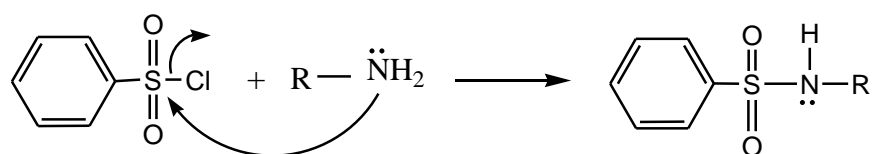
FIGURA 18. Prueba del Ion Cobre para Aminas en Quitosano



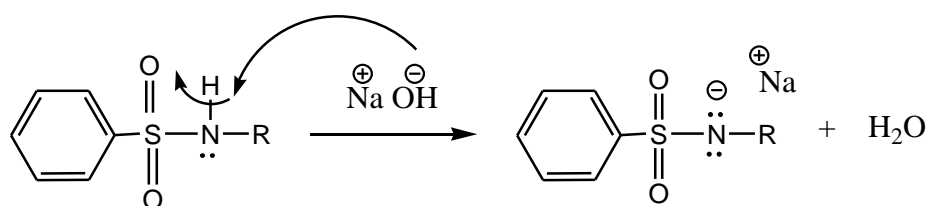
4.5.2.2 Prueba de Hinsberg.

En un tubo de ensayo se colocó el quitosano, la solución de KOH y el cloruro de bencensulfonilo (Figura 20a), se tapó y se agitó vigorosamente. Al finalizar el proceso se empleo cinta indicadora de pH y se determinó que la muestra era básica y se enfrió en un baño de hielo. Se observó la formación de un precipitado, se filtró al vacío y lavó con agua fría; se tomó el sólido y se le agregó NaOH, se agitó la mezcla vigorosamente obteniendo una solución clara (Figura 20b) , esto quiere decir que el polímero presenta grupos NH₂ ya que se disolvió completamente; la solución alcalina se acidificó con HCl al 10% para corroborar que la presencia de grupos NH₂ mediante la aparición de un precipitado (Figura 19), esto confirma que el biopolímero extraído es una amina primaria (quitosano).

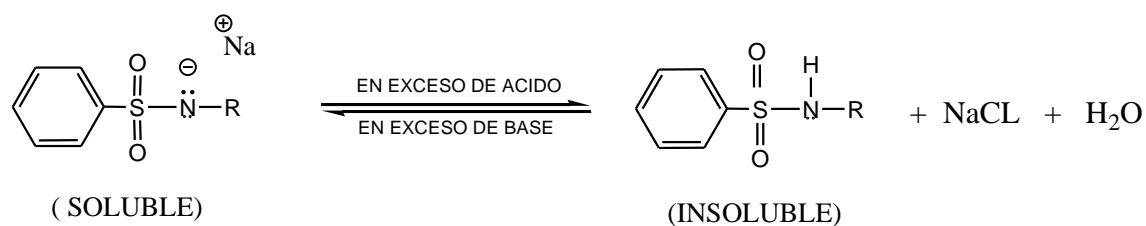
FIGURA 19. Mecanismo de reacción prueba de Hinsberg²⁹.



La amina en medio básico ataca al cloruro de bencensulfonylo, desplazando el cloro.

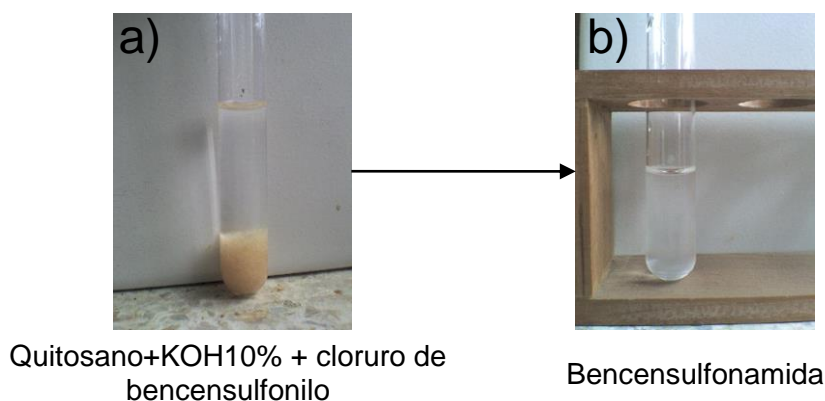


Se desprotona la sulfonamida por acción del azufre, solubilizándose



Al protonar la sulfonamida ella se precipita, comprobándose que la amina presente es primaria.

Figura 20 a) Inicio de la prueba de Hinsberg y **b)** sulfonamida soluble



4.5.3 Determinación de Nitrógeno Kjeldhal

Para la determinación de nitrógeno de los biopolímeros se utilizó la metodología Kjeldhal la cual se trabajo en el equipo de digestión y destilación Buchi, obteniéndose los resultados que se observan en al tabla N° 7 donde se han calculado los porcentajes nitrógeno teórico y experimental para cada uno de ellos aplicando la Ecuación 4.

Tabla 7. Datos obtenidos de % de Nitrógeno Calculado y Obtenido

Polímero	% Nitrógeno Calculado	% Nitrógeno Obtenido
Quitina	6.896	6.136
Quitosano	8.696	8.032

Ecuación 4:

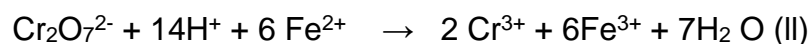
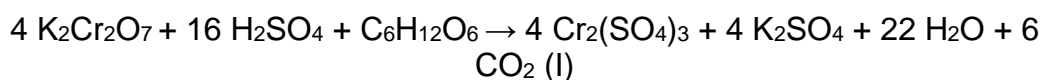
$$\% N = \frac{(V_{HCl} \times N_{HCl} \times 0.014)}{W} \times 100$$

Donde V_{HCl} es el volumen de titulación, N_{HCl} es el la normalidad del HCl 0.095N, W es el peso en gramos de la muestra y 0.014 es el valor relacionado con el peso equivalente del nitrógeno.

El nitrógeno es un elemento relevante en la estructura polimérica tanto de la quitina como del quitosano, por consiguiente si los valores obtenidos se aproximan a los valores calculados y a los valores encontrados en la literatura³² para el quitosano (8.30%), se corrobora la presencia del producto objetivo y aportan bases en la caracterización de los biopolímeros obtenidos y permiten afirmar que la metodología empleada es adecuada para el proceso planteado.

4.5.4 Determinación de Carbono Orgánico por El método de Walkley – Black.

Este método se fundamenta en el aprovechamiento de las propiedades oxidantes del dicromato de potasio, sobre los iones ferrosos y el carbono orgánico de la muestra, según las siguientes ecuaciones de óxido-reducción:



En esta reacción cada átomo de cromo del dicromato al cambiar a sal crómica, cambia su valencia +6 a +3, es decir, que hay un cambio de tres electrones en cada cromo y como el dicromato tiene dos átomos de ese elemento, el cambio total de valencia es de seis, presentándose un cambio del color de azul a verde debido al indicador de difenilamina; se emplea ácido fosfórico para ayudar a lograr mayor nitidez.

La ecuación (I) representa la cantidad de dicromato en exceso que no interviene en la reacción, y en la ecuación (II) representa la valoración del exceso de dicromato con la solución de sulfato ferrosos.

En las muestras de quitina y quitosano se realizó la determinación de carbono orgánico con este método, oxidando las muestras con una solución de dicromato de potasio 0.17M, utilizando el calor producido por la dilución de ácido sulfúrico concentrado en la solución crómica. La determinación se realizó valorando por retroceso la cantidad de dicromato que no fue reducido por la materia orgánica, con una solución de sulfato ferroso 1.0M, utilizando como indicador difenilamina al 0.5%, los cálculos se realizaron con ayuda de la Ecuación 5.

Tabla 8. Datos obtenidos de % de Carbono Orgánico Calculado y Obtenido

Polímero	% Carbono Calculado	% Carbono Obtenido
Quitina	47.29	47.04
Quitosano	44.72	43.86

Ecuación 5:

$$\%C_{\text{Organico}} = \frac{(B - V) \times M \times 0.003}{W} \times 100$$

Donde B es el volumen gastado del blanco= 10.028 mL, V es el volumen gastado en la muestra, M es la molaridad del sulfato ferroso, 0.003 es el valor relacionado con el peso equivalente del Carbono

Al igual que el nitrógeno, los porcentajes encontrados de carbono orgánico muestran que los polímeros obtenidos presentan un porcentaje de carbono muy cercano al calculado (Ecuación 5) y al reportado en la literatura³² para el quitosano (44.16), indicando que la metodología utilizada es apropiada para este tipo de materia prima (tabla 8).

5. CONCLUSIONES

- El análisis proximal realizado a los caparazones de camarón (*Protrachypene precipua*) muestra un contenido de carbohidratos alrededor de 17%, debido a que la quitina es el carbohidrato más representativo en la muestra se puede afirmar que el contenido de quitina que se encuentra en los caparazones es alrededor del 17%;
- La muestra extraída presentó un 70% de pureza, para establecer esto se empleó la técnica de titulación Potenciométrica, a la curva obtenida se le aplicó la primera derivada obteniéndose dos puntos de inflexión, los cuales corresponden a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano.
- La prueba de viscosidad realizada en el quitosano permitió corroborar el grado de desacetilación del polímero obtenido.
- La identificación del quitosano de forma cualitativa se determinó mediante el cambio de coloración de azul a azul-verdoso en presencia de sulfato de cobre.
- La solubilización de la bencensulfonamida obtenida en la prueba de Hinsberg permite clasificar el biopolímero como una amina primaria.
- Con la determinación de nitrógeno (Kjendhal) y carbono Orgánico (Walkley – Black) se cuantificó el porcentaje de estos elementos, obteniéndose valores muy cercanos a los teóricos y a los reportados en la literatura para el quitosano (N=8.30 y C= 44.16).

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Espinal C. F, Martínez H. J, González F. A. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia Documento de trabajo No.97 y 106; diciembre de 2005
- 2 Kirk, R. E., Enciclopedia de Tecnología Química, Volumen 13, 1^{ra} Edición en Español. Editorial Hispano – Americana. México: 423 – 428.1961.
- 3 Parada G L, Crespín G. D., Miranda. R, e Katime I, Caracterización de Quitosano por Viscosimetría Capilar y Valoración Potenciométrica Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 5(1), Marzo de 2004
- 4 Ravi Kumar MNV “A review of chitin and chitosan applications”. Reactive & Funcional Polymers. 46, 1; 2000
- 5 Recuperación, aprovechamiento y transformación química de Quitina/Quitosán extraído de los restos de crustáceos de las costas patagónicas
www.ambiente.gov.ar/archivos/web/PCCGDBM/File/CierreSPC/AB66.
consultado 8 de noviembre 2007
- 6 Kjell M. Vårum and Kjetill Ostgaard, Quantitative determination of chitosans by ninhydrin Sabina Prochazkova, Carbohydrate Polymers Volume 38, Issue 2, February 1999, Pages 115-122. .
- 7 Benavides M A, Quitina y quitosan: polímeros del futuro, SENA; CDT, ASTIN. 2002
- 8 M. Zulay, G. Edixon, P. Gisela, F José, R Marisela. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón; Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Centro de Investigaciones del Agua. Universidad del Zulia. Venezuela Multiciencia. Vol.4, N^o.2, Diciembre. 2004, Pág. 91-95
- 9 K. Shiral. Utilización de desechos de crustáceos para la obtención de quitina, quitosano, proteína y quitinasas mediante biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Depto. Biotecnología. 1996.

- 10 P. Irene, G. A. Irene. Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de la pesca: Quitina-Quitosano y sus aplicaciones. 2004.
- 11 Bernal de Ramirez, Ines. Análisis de alimentos. Bogota: Editora Guadalupe Ltda. 1993, pags 47-53
- 12 Holthuis. L.B; Shrimps and Prawns of the World; an Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries; Vol. 1; Pag 51 [FAO](#). Food and Agriculture Organization species catalogue.
- 13 Gutiérrez. R; Camarones Costeros del Pacífico Nicaragüense, Ciclo de Vida y Distribución; Centro de Investigaciones Pesqueras y Acuícolas (CIPA); Managua, junio 2004.
- 14 William Horwitz, AOAC Official Methods of Analysis (2000), the scientific of Analysis dedicated to Analytical excellence, chapter 45, p 93-94, 17th edition, volumen II.
- 15 Van de Velde K y Kiekens P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. volumen 58, 7 December 2004, Pages 409-416
- 16 M. Lavertu, Z. Xia, A. N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M. D. Buschmann and Ajay Gupta A validated H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, [Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis](#), Volume 32, Issue 6, 21 August 2003, Pages 1149-1158.
- 17 Joel Brugnerotto, Jacques Desbrières, George Roberts and Marguerite Rinaudo, Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography, [Polymer](#), Volume 42, Issue 25, December 2001, Pages 09921-09927.
- 18 Kjell M. Vrum a., Hilde Kristiansen Holme a, Masato Izume b Bjcrn Torger Stokke Olav Smidsrod, Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans, [Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\) – General Subjects](#), Volume 1291, Issue 1, 29 August 1996, Pages 5-15.
- 19 Alexandre T. Paulino, Julliana I. Simionato, Juliana C. Garcia and Jorge Nozaki, Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm

- crysalides, Carbohydrate Polymers, Volume 64, Issue 1, 19 April 2006, Pages 98-103 .
- 20 Yongqin Zhang, Changhu Xue, Yong Xue, Ruichang Gao and Xiuli Zhang, Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction, Carbohydrate Research, Volume 340, Issue 11, 15 August 2005, Pages 1914-1917.
- 21 J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières and M. Rinaudo, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, Polymer, Volume 42, Issue 8, April 2001, Pages 3569-3580.
- 22 Ortega R, A. Obtención de Quitina de Fuentes no Convencionales. Tesis de Doctorado Química Ambiental Instituto *Tecnológico de Orizaba* Mayo 16 1997
- 23 Kathleen Van de Velde and Paul Kiekens, Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT- IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR, Carbohydrate Polymers, Volume 58, Issue 4, 7 December 2004, Pages 409-416 .
- 24 Simionatto G L y Tadeu G É, The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, volumen 444, 15 May 2006, Pages 128-133
- 25 Crespo, M. Vilasoa Martínez, J. López Hernández and M.A. Lage Yusty High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio*, Journal of Chromatography A Volume 1116, Issues 1-2, 26 May 2006, Pages 189-192 .
- 26 G. Lamarque, C. Viton and A. Domard, *Biomacromolecular* 5 (2004), p.
- 27 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/448877>. consultado 14 de enero 2008
- 28 Cabezas. F, Benites. R, Vivas. G; Análisis Orgánico Cuantitativo, procesos a microescala; Universidad del Cauca, Noviembre 2002
- 29 Zuluaga F, Análisis Orgánico clásico y Espectral, Universidad del Valle, Mayo 2000, Págs. 23-25.

- 30 Evaluación de parámetros de calidad para la determinación de Carbono orgánico en suelos, García. G. J; Ballesteros. G. M; Revista Colombiana de Química, v.34 n.2; Bogotá.2005.
- 31 Hernández. Y; La Quitina y la Quitosana, Polisacáridos Animales de Gran Importancia, www.monografias.com/trabajos53/quitina-quitosana/quitina-quitosana publicado 10 de Marzo 2008.
- 32 Cárdenas. G, Parra. O, Taboada. E,; Synthesis and Applications of Chitosan Mercaptanes as Heavy Metal Retention Agent; Journal of Biological Macromolecules Vol 28 2001 Pags 167-174