



## Obtención y caracterización de quitina y quitosano extraídos de exoesqueletos de camarón (*penaeus vannamei*)

Alvarado Juan de Dios\*  
Alba Almeida\*\*  
Mirari Arancibia\*\*  
Alejandra García\*\*\*  
Adriana Pinotti \*\*\*  
Noemi Zaritzky\*\*\*

\* *Universidad Técnica de Ambato  
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
jdda@uta.edu.ec*  
\*\* *Ingenieros en Alimentos  
Investigadores asociados*  
\*\*\* *Universidad Técnica de la Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
La Plata - Argentina*

### RESUMEN

La producción elevada de crustáceos, entre ellos los camarones, genera importantes cantidades de desechos. La idea central del trabajo fue adaptar una tecnología para la obtención de quitina y quitosano a partir de desperdicios de camarón cultivado en Ecuador.

En una primera parte se analizó el efecto de las diferentes condiciones de aislamiento de la quitina, para definir las condiciones tecnológicas adecuadas de obtención y determinar las principales características químicas y físicas. La proteína y materia mineral se eliminaron con tratamientos alcalino y ácido respectivamente. Se utilizó un diseño con arreglo factorial 22 para evaluar el efecto de las variables de proceso y seleccionar las mejores condiciones para la obtención de quitina, las cuales se presentan en un diagrama de bloques.

Como segunda parte se adaptó un método para aislar quitosano, por remoción del grupo acetilo de la quitina obtenida utilizando el mejor tratamiento de la primera parte, para luego proceder a su caracterización química y física. Se utilizó un diseño con arreglo factorial 22 para evaluar el efecto de las variables de proceso. Las mejores condiciones para la desacetilación se indican en el diagrama correspondiente.

Según los datos obtenidos para la caracterización de quitina y quitosano (humedad, cenizas, nitrógeno, grupos amino libres, grado de desacetilación, densidad del polvo, distribución del tamaño de partículas, peso molecular viscosimétrico, rendimientos, índice de blancura, estructura por microscopía electrónica de barrido), los dos compuestos fueron considerados aceptables como productos de grado comercial. Para incentivar la producción inicial a pequeña escala se incluye el diagrama de proceso.

## SUMMARY

High production of crustaceans, including shrimp, generates important quantities of waste. The central idea of the study was to adapt a technology for obtaining chitin and chitosan from the shrimp waste cultivated in Ecuador.

In the first part, the effect of the different chitin isolation conditions was analyzed in order to define the adequate technological conditions for the obtaining and also determine the main chemical and physical characteristics. The protein and mineral material were eliminated with alkaline and acid treatments respectively. A design with factorial arrangement 2<sup>2</sup> was used to evaluate the effect of the process variables and to select the best conditions for the chitin obtaining which are presented in a block diagram.

In the second part, a method to isolate the chitosan was adapted for the removal of the acetyl group of the chitin obtained using the best treatment of the first part and afterwards characterized chemically and physically. A Design with factorial arrangement 2<sup>2</sup> was used to evaluate the effect of the process variables. The best conditions of the deacetylation are shown in the corresponding diagram.

According to the obtained data for the chitin and chitosan characterization (humidity, ashes, nitrogen, free amine groups, deacetylation degree, bulk density, particles size distribution, viscosimetric molecular weight, yield, whitening index, structure by electronic microscopy), both compounds were considered acceptable as commercial degree products. To stimulate the initial production in small scale a process diagram is included.



## INTRODUCCIÓN



Según la información presentada por la Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (<http://www.corpei.org.>, 2004), el cultivo de camarón en cautiverio se realiza en diecisiete países de América, desde Estados Unidos hasta Brasil.

Sobre exportaciones de camarón, la Cámara Nacional de Acuicultura (<http://www.cna-ecuador.com>, 2004) reportó que para el año 2003 Ecuador exportó 114'765.210 libras, lo que equivale a 52'166.005 kg de camarón. En términos monetarios las exportaciones de camarón, tercer rubro de divisas de productos tradicionales del Ecuador, se ubicaron en U\$ 274,8 millones en el 2003, frente a U\$ 252,7 millones del 2002; el récord es de U\$ 886 millones en 1997 (<http://www.iberomericaempresarial.com>, 2003). Según Peral y Gartzia (2002), los biopolímeros quitina y sus derivados los quitosanos cuentan con un alto valor agregado y gran demanda en los campos de la alimentación, medicina, agricultura y control ambiental, entre otros.

Características tales como dureza, biodegradabilidad y bioactividad hacen de la quitina y quitosano, materiales que en la industria procesadora de alimentos pueden ser empleados para modificar o controlar las propiedades funcionales de los alimentos, ya sea como regulador de formación de cristales de hielo en alimentos congelados, agente espesante, texturizante, quelante, emulsificante, estabilizante, elaboración de aderezos (Knorr, 1982, 1984). Se utiliza también en la elaboración de salsas, bebidas, pasteles, embutidos, gelatinas, productos lácteos, mayonesas, y otro tipo de emulsiones (<http://www.educ.ar>, 2003).

En lo que se relaciona con la industria alimentaria, estos materiales son aceptados como constituyentes de productos alimenticios en países como Japón, Italia y Estados Unidos. Por lo que se recomienda su utilización para la elaboración de envases activos que protejan y aumenten la vida útil de los alimentos, en donde el quitosano es idóneo, principalmente teniendo en cuenta que se pueden elaborar películas o films antimicrobianos, comestibles y biodegradables.

Con quitosano también pueden prepararse artículos técnicamente útiles como películas y filamentos sin soporte. La solución obtenida disolviendo quitosano en ácido acético diluido, o en otros ácidos, puede ser hilada, vaciada o extrusada, en diversas formas, para obtener películas, hilados para uso en medicina y agentes de apresto de textiles (Khan y colaboradores, 2002). Se conoce que el quitosano presenta inocuidad a la salud humana, al ser el único polielectrolito catiónico natural, con poder filmogénico y biodegradable, por lo cual su producción a gran escala es prometedora para numerosas aplicaciones en distintas áreas, principalmente en medicina, tratamiento de aguas y efluentes, cosmética y medio ambiente.

Después de la celulosa, la quitina es el segundo polímero más abundante en el planeta, por lo que su utilización a gran escala en Ecuador y otros países productores de camarón en cautiverio es muy prometedora, como lo ha sido en Japón, en donde alrededor de 250 empresas explotan la quitina (<http://www.cautitlan2.unan.mx>, 2003). La quitina de origen animal está íntimamente asociada con proteínas insolubles en agua y sales inorgánicas que hacen difícil aislarla sin el uso de medidas extremas y

caras (Kirk y Othmer, 1970).

La quitina,  $C_8H_{13}O_5N$ , es un polímero formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxiglucosa enlazadas al modo 1,4-beta-glucosídico de la celulosa, tiene gran peso molecular, al igual que la celulosa, también tiene una estructura micelar de cadenas orientadas paralelamente. La importancia de la quitina como materia prima química es escasa, no se encuentra en estado puro en la naturaleza y rara vez llega al 50% de una estructura.

Si bien la mayoría de los métodos empleados para la obtención de quitina incluyen tratamientos ácidos y básicos, la incidencia del orden y las condiciones en que los mismos han de ser realizados deben ser tomados en cuenta para una materia prima particular (García y colaboradores, 1996). Entre los métodos publicados se indican los siguientes:

Parada y colaboradores (2004) presentaron un método en el que se utilizan los exoesqueletos de camarón, molidos y tamizados y se someten a un proceso de despigmentación química con la mezcla de solventes: éter de petróleo, agua y acetona en la proporción 15/10/75. Para ello se coloca la harina (exoesqueletos) en un matraz provisto de agitación magnética, por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procede a filtrar el producto en un embudo Buchner y finalmente se seca en una estufa eléctrica a  $50^\circ C$  durante 6 horas. El producto obtenido en la fase anterior se somete a una descalcificación mediante tratamiento con ácido clorhídrico 1 M durante tres horas a temperatura ambiente, en un matraz con agitación constante. La relación masa de harina y volumen de disolución ácida que dio mejores resultados fue 1/10. Finalmente, se procede a filtrar en un embudo Buchner, haciendo lavados con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad del medio. El tratamiento siguiente es la desproteinización química, la cual se llevó a cabo en un matraz equipado con condensador de reflujo, mediante el empleo de hidróxido de sodio al 4,5%, con una relación masa de harina y volumen de disolución básica de 1/15. El proceso se realizó durante 3 horas, a  $65^\circ C$  y con agitación constante. El producto obtenido se purificó filtrando en un embudo Buchner y realizando lavados con agua destilada caliente para la eliminación del exceso de base.

En la Universidad Santo Tomás (<http://www.ust.cl>, 2003) se realizaron pruebas con 40 g de caparazones de camarón los cuales se lavaron con agua y secaron bien, para ser tratados posteriormente con  $200\text{ cm}^3$  de NaOH al 0,5% y llevados a ebullición, con agitación. En un segundo paso, el residuo sólido se calentó a ebullición con  $100\text{ cm}^3$  de NaOH al 3%. El residuo sólido remanente se trató con  $180\text{ cm}^3$  de NaClO agitando por 30 minutos aproximadamente para remover todos los pigmentos que contengan los caparazones de camarón. La desmineralización se realizó con  $100\text{ cm}^3$  de solución de HCl 1,25N a temperatura ambiente por 30 minutos aproximadamente.

McLean (2000), en su tesis doctoral manifiesta que la extracción de quitina a partir de residuos de calamar requiere remover la proteína como parte principal. Existen cinco diferentes métodos de extracción de quitina utilizando desechos de calamar así: una solución  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  NaOH; un extracto crudo de enzima actinidina de la fruta conocida como kiwi; AMT endoproteasa; pepsina que es una mucosa porcina; y catepsina endógena de carne de calamar activada durante procesos de ensilación. Todas las enzimas presentan actividad proteolítica cuyo grado depende de la concentración. La extracción química, utilizando soluciones de NaOH da como resultado una quitina de menor peso molecular que la obtenida utilizando actinidina y catepsina.

Saavedra y colaboradores (1998) trabajaron con caparazones de camarón del género *Penaeus* provenientes de la operación pelado-desvenado, los cuales se trataron térmicamente a 80° C por 30 minutos con la finalidad de inactivar enzimas hidrolíticas. Posteriormente fueron secados en un secador túnel Proctor & Schwartz modelo K16978 durante 18 horas a 70° C y se molieron en un molino de martillo Willey modelo 4 con tamaño de partícula 200  $\mu$ . A la cáscara seca se le extrajo la proteína utilizando una solución de NaOH al 0,4% y 2 % con una relación soluto: solvente del 1:7 se mezcló con agitador magnético a una temperatura de 60° C ( $\pm 1$ ) durante 60 minutos, filtrándose y lavándose después con agua destilada hasta eliminar el NaOH (pH 7,0-7,5), este proceso se denomina desproteinización. Para remover el material mineral presente en la cáscara se agregó una solución de HCl al 3% y 5% y se sometió a un tratamiento térmico por 120 minutos a 40, 50 y 60 °C, posteriormente se hicieron varios lavados hasta eliminar el ácido y después se secó en una estufa de convección VWR modelo 1430, a 50°C por 18 horas, este proceso se denomina desmineralización.



García y colaboradores (1996) señalaron que se puede trabajar con desechos de langosta secos y triturados a un tamaño de partícula promedio de 1  $\text{cm}^2$ . En el caso de que se emplee cefalotórax aconsejan la remoción de las vísceras cuando el material está aún fresco para evitar un proceso de lisis posterior. Se adicionó HCl 2N en relación sólido: líquido 1:10 durante 2 horas a temperatura ambiente. Dado que el 50% del material inicial está formado por carbonatos principalmente de calcio, se obtienen importantes volúmenes de CO<sub>2</sub> puro, así como una solución ácida impura de CaCl<sub>2</sub> al 5%. Para la obtención de quitina se adicionó NaOH 2% en una relación sólido: líquido 1:5 y se agitó de 30 minutos a 1 hora entre 70 y 80°C. El sólido resultante fue quitina. El rendimiento fue de un 6% después de seco y molido respecto al material inicial.

El método empleado por Kylan Corporation para aislar quitina que implica un tratamiento prolongado de los caparazones de crustáceos con carbonato sódico acuoso caliente, se liberan a los caparazones de camarón de la materia proteínica, hirviéndolos con una solución al 2%, aproximadamente, de carbonato sódico durante tres a cuatro horas. Este tratamiento es seguido de un proceso de desmineralización en el cual el residuo bien lavado se somete a extracción ácida para eliminar las sales inorgánicas, principalmente el carbonato cálcico; el material se sumerge en una solución de 2-5% de ácido clorhídrico a la temperatura ambiente durante 12-24 horas. Después de desmineralizados, los caparazones se lavan con agua y se someten a otro tratamiento con carbonato sódico para obtener un producto relativamente puro y blanco con 90% de quitina, aproximadamente. La quitina obtenida por este método tiene un contenido de nitrógeno de 6,0-6,6% y está degradada en cierto grado, según la concentración del ácido clorhídrico usado en la desmineralización. Una reacción positiva con ninhidrina y una reacción positiva de Schiff con ácido peryódico indican que en el proceso de purificación la quitina ha sufrido cierto grado de desacetilación (Kirk y Othmer, 1970).

Se han reportado algunas características de la quitina a través de las páginas Web de empresas que lo comercializan, tales como Peakchem (<http://www.peakchem.com>, 2004), Dalian Xindie Chitin (<http://www.chitin.com>, 2003) y Wellable Group (<http://www.wellablegroup.com>, 2003), una recopilación de las más importantes se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales características de quitina en polvo tipo comercial.

CARACTERÍSTICA	Peakchem	Dalian Xindie Chitin	Wellable Group
Color	Bianco amarillento	Bianco amarillo	Bianco
Humedad (h/h)	8,79%	< 10%	10%
Ceniza (h/h)	2,64%	< 1,5%	-
Peso molecular	-	[203,19]n	[203]n

El quitosano es un sólido blanco amorfo, insoluble en agua, soluble en los ácidos, cuya estructura cristalina es sustancialmente la de la quitina purificada original. Por las condiciones extremas de desacetilación, el quitosano, también llamado quitosana, tiene una cadena más corta que la de la quitina original, alrededor de 25-30 unidades menos de glucosamina.

En la obtención del quitosano, el grupo N-acetilo debe ser removido sin la hidrólisis del polisacárido, razón por la cual los métodos alcalinos son los más empleados, entre ellos se indican.

Parada y colaboradores (2004) reportaron que la obtención de 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. La obtención de quitosano es un proceso de modificación química de la quitina, en el cual las unidades acetilo son eliminadas, para ello se procedió colocando 5 g de la quitina obtenida en un matraz de 250 cm<sup>3</sup> de capacidad, provisto de un refrigerante para reflujo y sumergido en un baño de parafina. Se agregaron 100 cm<sup>3</sup> de disolución de hidróxido de sodio al 70% a 105°C. El sistema se mantuvo reflujo, con agitación en una atmósfera de aire, durante dos horas. El producto se purificó por filtrado en un embudo Buchner, realizando lavados con agua destilada, hasta lograr eliminar la alcalinidad del medio.

Da Silva y Nakamatsu (2004), en su estudio para la obtención del quitosano utilizaron 4,5 g de quitina y la colocaron en un balón de 500 cm<sup>3</sup>, añadiendo 200 cm<sup>3</sup> de una solución de NaOH al 50% (w/w) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó y calentó durante 6 h a 100° C. Luego se mantuvo 18 h a temperatura ambiente, con la finalidad de obtener un producto altamente desacetilado. El producto final obtenido fue de 3,77 g de quitosano, con un rendimiento del 97,85 %. Por otro lado, cuando se trató 4,0 g de quitina en contacto con aire a las mismas condiciones, se obtuvo 2,76 g, lo que representa un rendimiento del 81,15%.

Taboada y colaboradores (2003) prepararon quitosano a partir de quitina tratada drásticamente con 4 litros de solución 49-50% de NaOH a 100° C con agitación constante por el lapso de 3 horas.

McLean (2000) señaló que la quitina es convertida en quitosano al reaccionar con una solución concentrada de NaOH rompiendo así las cadenas entre el grupo acetilo y el grupo amino del carbono 2. Una variante de los métodos de desacetilación fue analizada para quitina de calamar de tal forma que se obtenga un alto grado de desacetilación, con una mínima degradación del polímero. Las variables modificadas incluyeron al número de tratamientos, temperatura del tratamiento y lavados entre tratamientos con ácido acético diluido; incrementado el número de tratamientos aumentó el grado de desacetilación. El intervalo de temperaturas de 70–80° C fue el óptimo ya que la desacetilación se retarda a temperaturas inferiores, y los lavados con ácido acético evitaban la degradación del polímero. Ramírez y colaboradores (1998) obtuvieron quitosano a partir de quitina de langosta. La N-desacetilación de quitina se realizó en condiciones heterogéneas, la quitina (10g) fue tratada con NaOH 50% (p/v) (100 cm<sup>3</sup>) a 100° C bajo atmósfera de nitrógeno durante 1, 1.5 y 3 horas.

Solar Griffin (<http://www.solar.griffin.peachnet.edu>, 1996), publicó un método según el cual la preparación de quitosano consistió en la extracción de ésta sustancia de los caparazones de crustáceos. Un mol de NaOH se utilizó para remover la proteína y una mol de HCl para remover el carbonato de calcio de los caparazones. Posteriormente se lavó la mezcla hasta la neutralidad, una solución de KOH 50% fue adicionada y calentada a 150-160° C. La mezcla entonces fue secada a 100° C produciendo quitosano.

Se han publicado algunas características del quitosano a través de las páginas Web de empresas que lo comercializan, tales como Peakchem (<http://www.peakchem.com>, 2004), Dalwoo (<http://www.dalwoo.com>, 2003) y Wellable Group (<http://www.wellablegroup.com>, 2003), una recopilación de las más importantes se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales características de quitosano en polvo tipo comercial.

CARACTERÍSTICA	Peakchem	Dalwoo	Wellable
Color	Bianco amarillento	Bianco amarillento	Bianco opaco
Humedad (b h)	4.52%	7.5%	-
Ceniza (h h)	0.91%	0.1%	-
pH	4 - 5	8	-
Viscosidad	~15 cps	2.78 cps	-
Grado de desacetilación	70-100%	90-100%	85-98%
Peso molecular	-	-	161·n

El análisis de los distintos procedimientos llevó a establecer una metodología básica en la que se incluye la investigación de las condiciones que mejor se adapten a los desechos de camarón producido y consumido en Ecuador, en donde la producción elevada de crustáceos genera importantes cantidades de desechos sin uso ni valor actual. Las ideas centrales del presente trabajo fueron: generar una tecnología para la obtención de quitina y quitosano a partir de desperdicios de camarón cultivado en Ecuador, y resaltar su potencial de industrialización, de tal manera que se disminuya la contaminación ambiental generada por las industrias productoras y comercializadoras de camarón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Materia prima**

El presente trabajo se realizó utilizando caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*), los mismos que fueron adquiridos de diversas marisquerías de la ciudad de Ambato en la provincia de Tungurahua.

### **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental 2. Los tratamientos a totalizarse son cuatro, tanto para quitina como para quitosano, con una réplica; cómo se indica a continuación.

### **Obtención de quitina.**

FACTOR A: Concentración de la solución de ácido clorhídrico

Nivel A<sub>0</sub> : 1,25N

Nivel A<sub>1</sub> : 2,00N

FACTOR B: Relación sólido desproteínizado: ácido clorhídrico

Nivel B<sub>0</sub> : 1: 2 (w/w)

Nivel B<sub>1</sub> : 1: 3 (w/w)

### **Obtención de quitosano.**

FACTOR A: Tiempo de cocción

Nivel A<sub>0</sub> : 30 minutos

Nivel A<sub>1</sub> : 60 minutos

FACTOR B: Relación sólido quitina: hidróxido de sodio

Nivel B<sub>0</sub> : 1: 5 (w/w)

Nivel B<sub>1</sub> : 1: 7 (w/w)

### **Respuestas experimentales:**

#### **En la obtención de quitina se determinó:**

- Humedad.
- Cenizas.
- Nitrógeno.
- Grupos amino libres.
- Peso molecular por viscosimetría de tubo capilar.
- Índice de blancura por medida de color.
- Rendimientos.

#### **En la obtención de quitosano se determinó:**

- Humedad.
- Cenizas.
- Nitrógeno.
- Grado de desacetilación.
- Peso molecular por viscosimetría de tubo capilar.
- Índice de blancura por medida de color.
- Rendimientos.

Para seleccionar las mejores condiciones en el caso de existir diferencias de significado estadístico entre los tratamientos, se realizó el análisis de varianza de acuerdo al diseño experimental indicado y se aplicó la prueba de diferenciación Tukey al 5% de significación para aquellos valores que son estadísticamente significativos (Cochran y Cox, 1974).

### **Metodología para la obtención de quitina a partir del caparazón de camarón.**

Se lavaron y separaron las patas, colas y restos de carne de los caparazones, para eliminar el fango que se adhiere en las patas y en la parte inferior del abdomen y restos de proteína que dificultarían la extracción de quitina.

Se secaron los caparazones en estufa Brabender a 90° C por 5 horas y se trituró en molino manual Corona para facilitar la manipulación.

Los caparazones triturados se colocaron en un vaso de precipitación de 2000 cm<sup>3</sup> y se sometieron a cocción con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5% en una relación 2:3 (w/w) por 30 minutos manteniendo agitación constante y la temperatura en 80°C para desproteínizar y eliminar colorantes de los caparazones.

Se decantó utilizando un cedazo de lienzo fino y se descartó el líquido sobrenadante, para trabajar con el sólido precipitado el cual fue lavado con abundante agua hasta obtener un pH cercano a 7.

El sólido de la etapa anterior se colocó en un vaso de precipitación de 2000 cm<sup>3</sup> y se trató con una cantidad igual en peso, de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 3% por 10 minutos manteniéndose la temperatura a 80° C y agitación constante, se filtró utilizando un cedazo de lienzo fino y se descartó el líquido. Se repitió esta operación tres veces, para continuar con la desproteínización y eliminación de colorantes del camarón. Al final se lavó con agua abundante hasta llegar a un pH 7.

El residuo sólido anterior se trató con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 30 minutos, con esto se eliminó el colorante residual presente en el camarón. Luego se filtró con lienzo fino y se descartó el líquido.

El sólido remanente obtenido en la etapa anterior, se lavó con abundante agua hasta pH cercano a 7 y se desmineralizó con una solución de ácido clorhídrico en dos concentraciones (1.25N y 2N en relación sólido-líquido 1:2 y 1:3, de acuerdo al diseño experimental), a temperatura ambiente por 60 minutos. Esto tuvo como propósito eliminar la mayor cantidad de minerales de los caparazones. Se lavó con abundante agua hasta alcanzar pH cercano a 7, se filtró en lienzo fino y se descartó el líquido obtenido.

El sólido obtenido, quitina, se colocó en cápsulas de porcelana y se secó en estufa Fisher a 50° C durante 6 horas. Los polvos obtenidos fueron de color blanco amarillento, de los cuales se realizaron análisis de humedad, cenizas, nitrógeno como indicador de proteína y peso molecular viscosimétrico, para determinar el mejor tratamiento.

### **Metodología para la obtención de quitosano a partir del mejor tratamiento de obtención de quitina.**

La quitina obtenida del mejor tratamiento se desacetiló con solución de hidróxido de sodio al 50% con una relación sólido líquido 1:5 y 1:7 a 30 y 60 minutos de cocción de acuerdo al diseño experimental, con agitación constante manteniendo la temperatura a 100° C en baño de aceite.

Se decantó el líquido utilizando un cedazo de lienzo fino para trabajar con el

sólido precipitado. El sólido se lavó con abundante agua para eliminar trazas de hidróxido de sodio hasta llegar a un pH cercano a 7.

El sólido obtenido, quitosano, se colocó en cápsulas de porcelana y se secó en estufa Brabender a 50° C por 6 horas. Los polvos obtenidos fueron de color amarillento, de los cuales se realizaron análisis de humedad, ceniza, nitrógeno como indicador de proteína, peso molecular viscosimétrico y grado desacetilación, para determinar el mejor tratamiento.

### **Métodos de análisis**

Humedad mediante secado en estufa Brabender a 105° C por 4 horas para la materia prima. Para quitina y quitosano se determinó en una balanza Mettler LP 16-M. con dispositivo determinador de humedad, con 4 a 5 g de muestra a 105 ° C por 30 minutos, de acuerdo con las especificaciones del catálogo de la balanza.

Cenizas por calcinación en mufla a 900° C por 3 horas. (Muzzarelli. 1985)

Nitrógeno según el método Microkjeldahl (AOAC 14,068. 1990).

Grupos amino libres por el método descrito por Antoni y colaboradores (1982), basado en la reacción de la matriz con un exceso de ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS), y la cuantificación del (TNBS) que no reaccionó utilizando glicina, previa elaboración de la curva estándar, estos trabajos fueron realizados en el Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología de la Escuela Politécnica Nacional en Quito.

Grado de desacetilación por análisis elemental utilizando la ecuación reportada por Taboada y colaboradores (2003):

$$(DD) (\%) = [(8,695 - \%N) / 1,799] 100$$

Donde 8,695 es el porcentaje de nitrógeno (N) en el quitosano totalmente desacetilado, 1,799 la diferencia entre 8,695 y 6,896 (porcentaje de nitrógeno (N) en la quitina totalmente acetilada), y %N es el porcentaje de N calculado de la fracción orgánica del material analizado. (Shepherd y colaboradores, 1997)

Densidad de los compuestos reducidos a polvo, por registro de peso y desplazamiento de un líquido para medir el volumen, según lo indicado por Alvarado y Aguilera (2001).

Tamaño de partícula mediante observación microscópica y distribución de tamaño de partícula para el cálculo de diámetros relacionados con distintas dimensiones, según lo indicado por Alvarado (1996).

Peso molecular viscosimétrico promedio, con viscosímetros de tubo capilar tipo Canon Fenske Routine Z 360 y Z 357, por reemplazo en la ecuación de Mark - Houwink. (Parada y colaboradores, 2004).

Mediante la ecuación de Hagen – Poiseuille para líquidos con movimiento en flujo laminar, se puede relacionar el tiempo que tarda en pasar un fluido por un capilar con la viscosidad del mismo, por lo tanto, la viscosidad de una solución puede definirse como el tiempo que tarda la disolución en pasar por un capilar fino por efecto de la gravedad. La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  es la extrapolación cero de la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ), según la expresión:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left( \frac{t}{t_0} - 1 \right) / c$$

Donde  $t$  y  $t_0$  son los tiempos de caída de la disolución y el disolvente;  $c$  es la concentración de la disolución en g.dL<sup>-1</sup>, los tiempos son proporcionales a la viscosidad, para lo cual debe elegirse adecuadamente el diámetro del capilar. Una vez calculada la viscosidad intrínseca, se puede determinar el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) de un polímero a partir de la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = KM^a$$

Donde  $K$  (dL.g<sup>-1</sup>) y  $a$  son constantes tabuladas que dependen de la naturaleza del polímero, del disolvente y de la temperatura. Los valores de las constantes  $K$  y  $a$  son específicas para el solvente y el polímero utilizado siendo para el caso de quitina en ácido fórmico 0,2M;  $K = 1,79 \times 10^{-3}$  y  $a = 0,59$  (Dinsdale y Moore, 1962); para quitosano en solución de acetato de sodio 0,2 M y ácido acético 0,3 M;  $K = 0,074$  y  $a = 0,76$  (Parada y colaboradores, 2004).

Índice de blancura por medidas de color utilizando un MiniScan HunterLab y una carta de color para parámetros de  $L$ ,  $a$  y  $b$ . Los análisis se realizaron en el laboratorio de Biomateriales de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Jiménez y Gutiérrez, 2001).

Rendimiento, para su cálculo se realizaron balances de materiales a partir de materia prima original y materia prima clasificada y seca para el caso de quitina, y balance de materiales a partir de materia prima original y quitina obtenida para el caso de quitosano.

Estructura mediante microscopia electrónica de barrido, para lo cual se utilizaron muestras sombreadas con oro y paladio y se tomó una microfotografía al microscopio electrónico. Los análisis se realizaron en los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. (González y colaboradores. 2002)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Materia prima

En los caparazones de camarón, según el análisis de cenizas y nitrógeno se obtuvieron los resultados siguientes: humedad 2%, minerales 31,8% y materia nitrogenada (N=6,25), parte de ella proteína, 44,5%. Estos valores pudieron ser comparados con los reportados por Peral y Gartzia (2002), quienes publicaron los datos siguientes: carbonato de calcio 30%, proteína 40%, quitina 27% y carotenos 3%.

### Obtención de quitina

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en los análisis realizados en quitina para todos los tratamientos.

**Tabla 3. Respuestas experimentales determinadas en quitina obtenida de caparazones de camarón para seleccionar condiciones adecuadas de proceso\*.**

Característica	Condiciones de proceso			
	A <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>
Humedad (%)	8,0	7,2	8,0	6,3
Ceniza (%)	1,58	0,86	0,42	0,07
Nitrógeno(%)	4,72	4,75	4,93	5,15
Grupos amino libres (µmoles/g)	13,21	11,15	12,63	12,95
Peso molecular (g/gmol)**	3,69*10 <sup>5</sup>	3,63*10 <sup>5</sup>	3,47*10 <sup>5</sup>	3,02*10 <sup>5</sup>
Índice de blancura (%)	88,13	92,08	91,30	93,43
Rendimiento <sup>1</sup>	0,70	0,64	0,58	0,47
Rendimiento <sup>2</sup>	49	46	42	34

\*Valores promedio de dos determinaciones por duplicado

\*\*Solvente ácido fórmico 0,2M.

<sup>1</sup> rendimiento a partir de materia prima original

<sup>2</sup> rendimiento a partir de materia prima clasificada y seca

A<sub>0</sub>B<sub>0</sub> 1,25 N ácido clorhídrico; relación 1:2 sólido desproteínizado:ácido clorhídrico

A<sub>0</sub>B<sub>1</sub> 1,25 N ácido clorhídrico; relación 1:3 sólido desproteínizado:ácido clorhídrico

A<sub>1</sub>B<sub>0</sub> 2 N ácido clorhídrico; relación 1:2 sólido desproteínizado:ácido clorhídrico

A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> 2 N ácido clorhídrico; relación 1:3 sólido desproteínizado:ácido clorhídrico

Con relación a la humedad en todos los casos fue inferior al 10%, valores que son comparables con los indicados previamente para quitina comercial, existieron diferencias de significado estadístico debidas a los tratamientos, seleccionándose el tratamiento con el que se obtiene el valor de humedad menor. Los valores de cenizas, al igual que los indicados para muestras comerciales, fueron inferiores al 2%, obteniéndose un valor muy bajo de 0,07 (g/100 g) en el tratamiento A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, diferente estadísticamente de los otros tratamientos, lo cual indica un proceso satisfactorio de desmineralización. Los datos del contenido de nitrógeno para cada tratamiento no presentaron diferencias significativas, además no existe interacción entre los factores estudiados. Los grupos amino libres indican la cantidad de grupos acetilo removidos de la molécula de quitina debidos en especial al tratamiento con hidróxido de sodio, los valores expresados en (µg/g) varían desde 11,15 hasta 13,21 y existen diferencias de significado estadístico entre los tratamientos, en consecuencia, el tratamiento con ácido clorhídrico afecta el contenido final de grupos amino libres en quitina.

La Figura 1 corresponde a la representación de Huggins para datos de viscosidad medidos a 25° C en soluciones de quitina en ácido fórmico 0,2M, el coeficiente de determinación para la regresión lineal en todos los casos fue superior a 0,99. El valor del intercepto corresponde a la viscosidad intrínseca y se utiliza para calcular un valor de peso molecular promedio viscosimétrico, en base al cual se tiene una idea del tamaño de los polímeros por el número de unidades estructurales. En la determinación del peso molecular viscosimétrico el valor menor, molécula más pequeña, corresponde a la interacción A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, en el que se combinan la solución de HCl de concentración 2N con la relación 1:3 de sólido desproteínizado:ácido clorhídrico; el valor 3,02\*10<sup>6</sup> g/mol es mayor que otros valores publicados para el peso molecular viscosimétrico de quitina que fluctúan entre: 1,03\*10<sup>6</sup> g/mol, 2,03\*10<sup>6</sup> g/mol y 2,5\*10<sup>6</sup> g/mol (<http://www.chitin.com.cn>, 2004; <http://www.wellablegroup.com>, 2004). Si el peso de cada unidad estructural de la quitina es 203,19 la molécula del polímero tendrá aproximadamente 14 863 unidades.

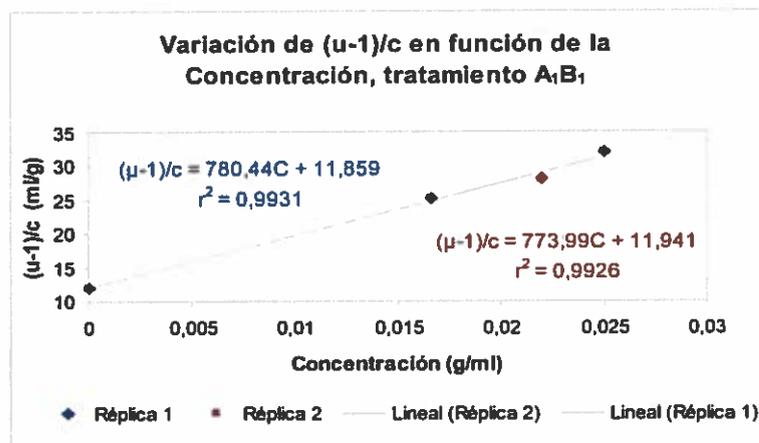


Figura 1. Representación de Huggins para datos de viscosidad a 25° C de soluciones de quitina en ácido fórmico 0,2M.

Los valores del índice de blancura son característicos de un producto blanco, los valores de luminosidad fueron cercanos a 100; lo anterior es de esperarse por los tratamientos utilizados que remueven los carotenos y el uso de hipoclorito de sodio como agente blanqueador. Los rendimientos son bajos, inferiores al 1% con relación a camarón entero y se explica pues se conoce que el 33,7% corresponde a la cabeza del crustáceo, la parte carnosa que es la principal parte comestible es el 53,97%, las patas y colas 7,17%, la cáscara que es el material utilizado para la obtención de quitina es apenas el 5,12%. Cuando el cálculo del rendimiento se realiza a partir de la cáscara o exoesqueleto del camarón, los rendimientos se aproximan al 50% en los tratamientos menos severos con menor concentración de ácido y disminuye al 34% en el tratamiento más drástico que en cambio lleva a la obtención de quitina con mayor grado de pureza.

El análisis conjunto de las respuestas experimentales llevó a la selección del tratamiento A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, en el que se combinan la solución de HCl de concentración 2N, con la relación 1:3 de sólido desproteínizado:ácido clorhídrico; luego de lo cual se definieron la secuencia de operaciones para la obtención de quitina, las cuales se indican en la Figura 2 que incluye datos de balance de materiales para establecer rendimientos.

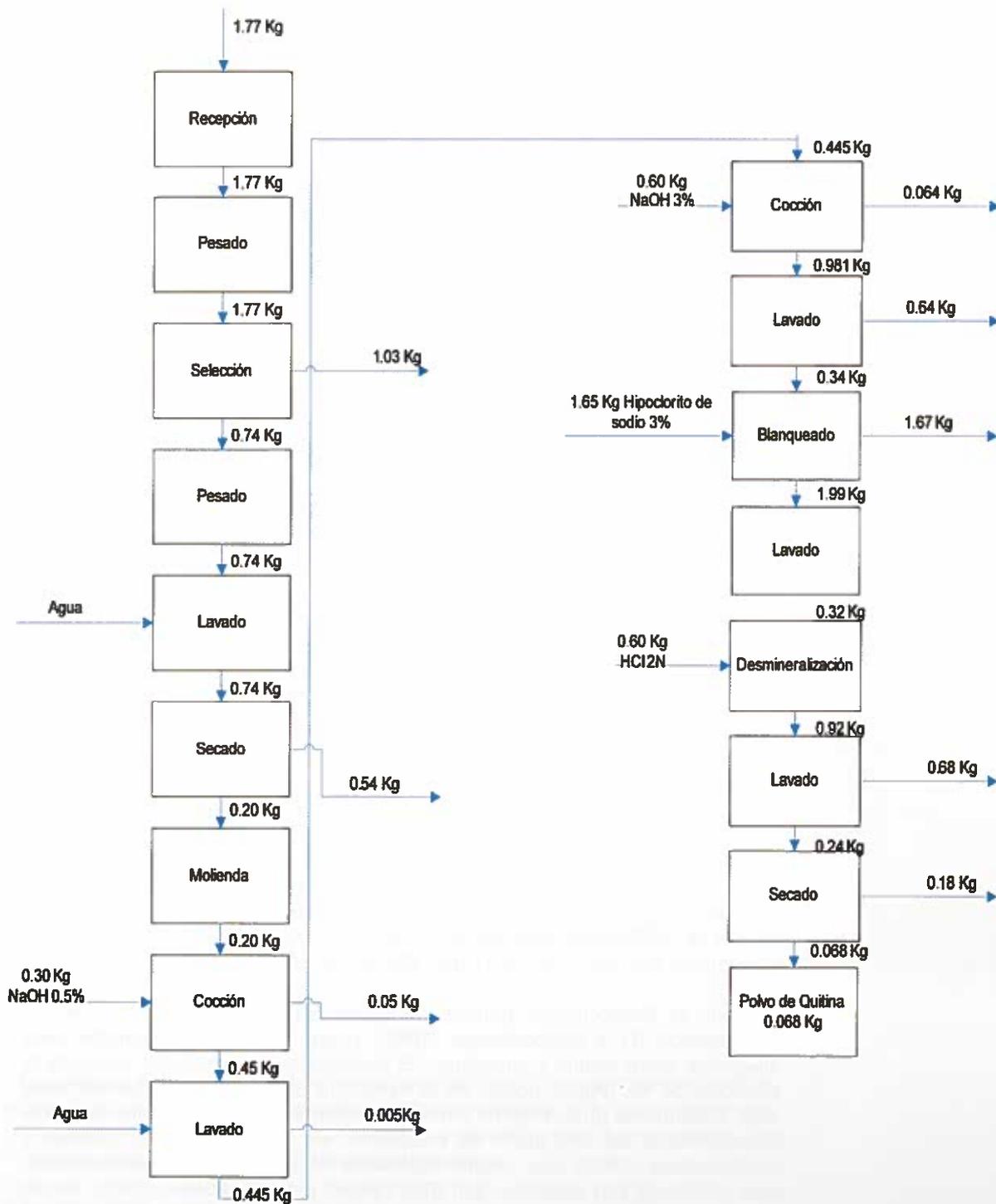


Figura 2. Diagrama de bloques con las operaciones utilizadas para la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de camarón (*Penaeus vannamei*).

### Obtención de quitosano

En la Tabla 4 se presentan los resultados de los análisis realizados en quitosano obtenido por los distintos tratamientos.

**Tabla 4. Respuestas experimentales determinadas en quitosano obtenido de quitina extraída de caparazones de camarón para seleccionar condiciones adecuadas de proceso\*.**

Característica	Tratamiento			
	A <sub>1</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>1</sub>
Humedad (%)	8,51	7,61	7,88	7,22
Ceniza (%)	0,0698	0,0688	0,0696	0,681
Nitrógeno(%)	6,71	6,74	6,91	7,00
Grado de desacetilación (%)	110	109	100	95
Peso molecular (g/gmol)*	1,36*10 <sup>3</sup>	1,34*10 <sup>3</sup>	1,16*10 <sup>3</sup>	1,12*10 <sup>3</sup>
Indice de blancura (%)	71,82	71,23	74,24	77,33
Rendimiento <sup>1</sup>	0,5	0,4	0,4	0,4
Rendimiento <sup>2</sup>	93,8	91,1	89,5	82,4

\*Valores promedio de dos determinaciones por duplicado

\*\*Solvente acetato de sodio 0,2M y ácido acético

rendimiento a partir de materia prima original

<sup>1</sup> rendimiento a partir de quitina

<sup>2</sup>

A<sub>0</sub>B<sub>0</sub> 30 minutos de cocción; relación 1:5 sólido quitina : hidróxido de sodio

A<sub>0</sub>B<sub>1</sub> 30 minutos de cocción; relación 1:7 sólido quitina : hidróxido de sodio

A<sub>1</sub>B<sub>0</sub> 60 minutos de cocción; relación 1:5 sólido quitina : hidróxido de sodio

A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> 60 minutos de cocción; relación 1:7 sólido quitina : hidróxido de sodio

La humedad en todos los casos fue inferior al 9%, valores que son ligeramente superiores a los indicados previamente para quitosano comercial, excepto en el tratamiento A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, con un valor de 7,2 g/100 g, existieron diferencias de significado estadístico entre tratamientos, seleccionándose el tratamiento con el que se obtiene el valor de humedad menor. Los valores de cenizas son bajos y se explican por la desmineralización hecha para la obtención de quitina, compuesto a partir del cual se obtiene el quitosano, los valores próximos a 0,1% son comparables a los indicados por la Casa Dalwoo, el valor 0,7% es comparable al reportado por la Casa Peakchem. El contenido de nitrógeno para todos los tratamientos es próximo a 7 g/100 g; sin embargo existieron diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos, el valor más alto es el que más se aproxima al reportado por Kirk y Othmer (1970), 8% para quitosano.

El grado de desacetilación permite determinar los grupos amino libres en los polisacáridos (Li y colaboradores, 1992), puede ser utilizado también para diferenciar entre quitina y quitosano. El proceso de desacetilación involucra la remoción de los grupos acetilo de la estructura molecular de la quitina hasta dejar únicamente grupos amino (-NH<sub>2</sub>), la versatilidad del quitosano depende principalmente del alto grado de reactividad de los grupos amino (Baxter y colaboradores, 1992). Los valores reportados para el grado de desacetilación para quitosano son variables, así: 67% (Vinoid y colaboradores, 1995), desde el 70 al 100% (<http://www.peakchem.com>, 2004), desde el 90 al 100% (<http://www.dalwoo.com>, 2004), del 85 al 98% (<http://www.wellablegroup.com>, 2004) y 95% (Shepherd y colaboradores, 1997). Lo anterior indica la gran dispersión que presentan los productos de quitosano en términos de grado de desacetilación y consecuentemente la presencia de grupos amino libres. Los valores obtenidos en este trabajo indican que en general todos los tratamientos provocan una desacetilación total.

La Figura 3 corresponde a la representación de Huggins para datos de viscosidad medidos a 25°C de soluciones de quitosano en acetato de sodio 0,2M y ácido acético 0,3M. Para las regresiones lineales los coeficientes de determinación son superiores a 0,99. El valor del intercepto corresponde a la viscosidad intrínseca. En la determinación del peso molecular viscosimétrico, el valor menor  $1,12 \times 10^5$  corresponde a la interacción  $A_1B_1$ , en el que se combinan 60 minutos de cocción con hidróxido de sodio al 50% a 100 °C con una relación 1:7 sólido quitina: hidróxido de sodio. Los valores bibliográficos de peso molecular viscosimétrico para el quitosano reportados fluctúan entre:  $1,00 \times 10^6$  g/mol,  $1,25 \times 10^6$  g/mol,  $5,00 \times 10^6$  g/mol y  $1,61 \times 10^6$  g/mol (Parada y colaboradores, 2004), además Issa (1979) reportó un valor de  $1,61 \times 10^6$  g/mol; en general los pesos moleculares de quitosano obtenido por los cuatro tratamientos son ligeramente menores que los publicados, sin embargo están dentro del intervalo esperado. Se conoce que cada unidad estructural de quitosano tiene un peso de 161, en consecuencia el número de unidades estructurales del polímero de menor peso molecular será 696, al comparar este valor con el obtenido para quitina 14 863, se establece que durante el proceso de obtención de quitosano, además de la desacetilación ocurre rompimientos de las cadenas del polímero, especialmente relacionado con el tiempo de cocción según los resultados del análisis de varianza.

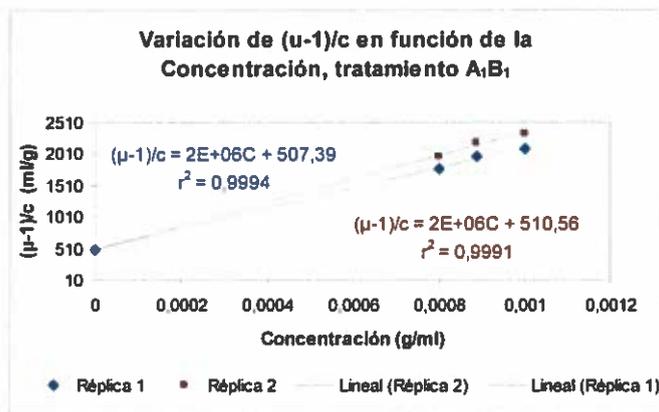


Figura 3. Representación de Huggins para datos de viscosidad a 25° C de soluciones de quitosano en acetato de sodio 0,2M y ácido acético 0,3M.



Los valores del índice de blancura son menores que los establecidos en quitina, lo cual corresponde a un producto blanco amarillento. Los rendimientos son muy bajos, inferiores al 0,5% con relación a camarón entero y en cambio son altos superiores al 80% con relación a la quitina.

Nuevamente el análisis conjunto de todas las respuestas experimentales llevó a la selección del tratamiento  $A_1B_1$ , en el que se combinan 60 minutos de cocción con hidróxido de sodio al 50% a 100 °C con una relación 1:7 sólido quitina: hidróxido de sodio; luego de lo cual se definieron las operaciones utilizadas para la obtención de quitosano, las cuales se indican en la Figura 4 que incluye datos de balance de materiales para establecer rendimientos.

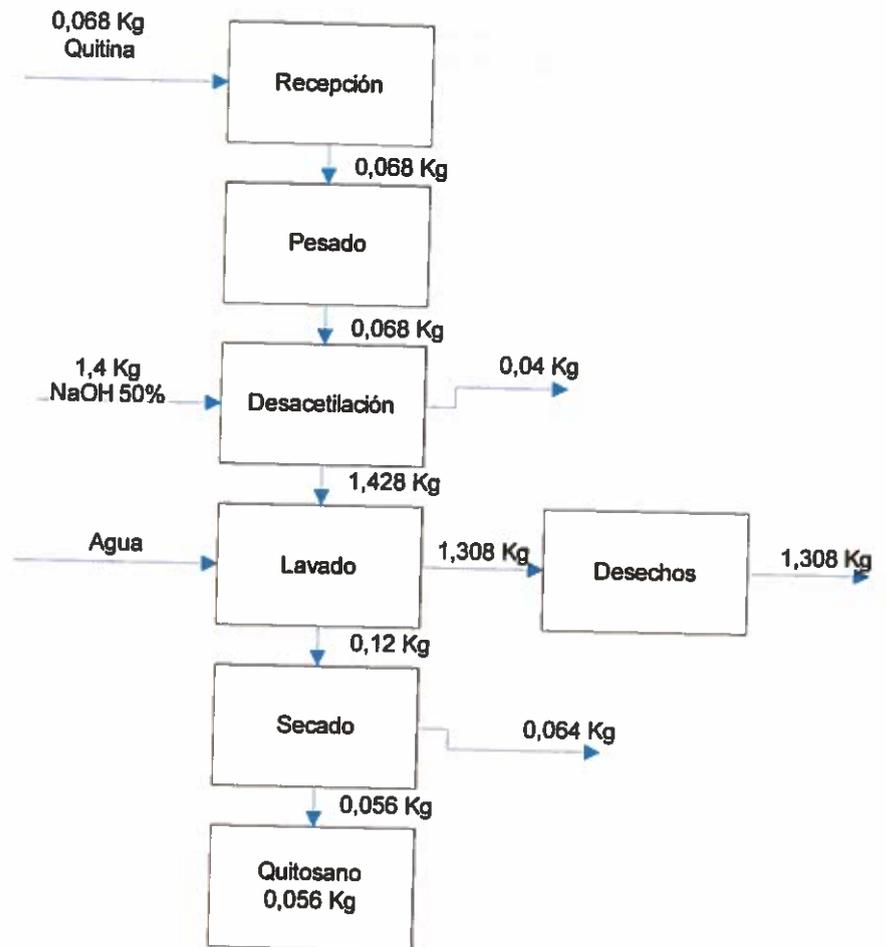
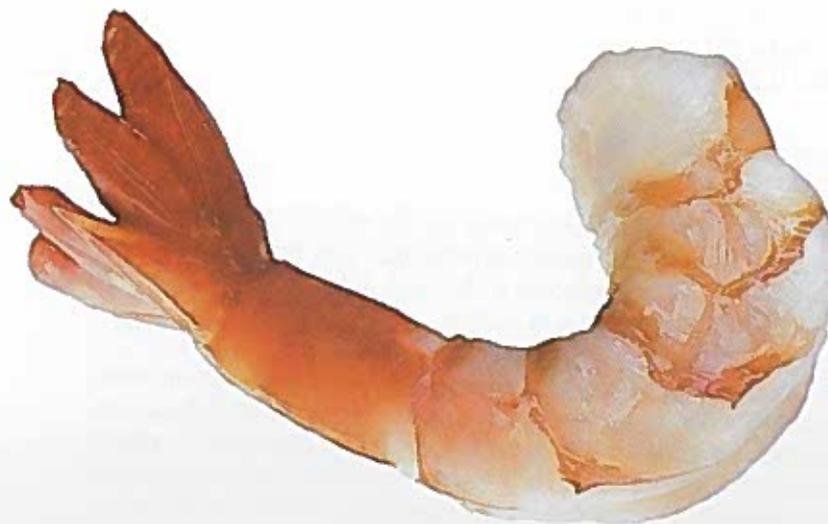


Figura 4. Diagrama de bloques con las operaciones utilizadas para la obtención de quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón (*Penaeus vannamei*).



En la Tabla 5 se presentan los resultados de diversos análisis hechos en quitina y quitosano, obtenidos con las condiciones previamente indicadas, luego de secadas y molidas mediante un molino manual hasta obtener la consistencia de polvos.

Los valores de humedad son similares a los publicados por Casas comercializadoras de estos productos, con valores menores a 10 g/100 g. Los datos de ceniza son muy bajos, menores a 0,01 g/100 g, son un indicativo de la eficiencia del proceso de desmineralización, pues los caparazones contienen alrededor de 30% de minerales, principalmente carbonato de calcio (Peral y Gartzia, 2002). Tanto la quitina como el quitosano poseen un grupo amino en su estructura molecular básica, lo anterior explica la presencia de nitrógeno, valores mayores se establecieron en el quitosano con relación a la quitina, explicable por un efecto de concentración con la remoción del grupo acetilo. En el caso de quitosano el grado de desacetilación, 95%, indica que la remoción del grupo acetilo es muy alta, comparado con valores publicados en los que se encuentra intervalos que van del 70 al 100%.

Con relación a las características físicas, los valores de la densidad son en general bajos, comparables con los reportados para polvos, son mayores en quitosano con relación a los de quitina, en especial la densidad verdadera. Los valores de los diámetros permiten tener una idea del tamaño, voluminosidad y de la relación tamaño con la masa de las partículas, la información es útil para operaciones en las que ocurre transferencia de masa, se observa que las partículas de quitina son más grandes que las partículas de quitosano, la relación es 1,5 en los valores lineales y se incrementa hasta 5,7 en los valores volumétricos y másicos. Del mismo modo el peso molecular de quitina es mayor que el peso molecular del quitosano, según los índices de blancura la quitina se presenta como un polvo blanco, el quitosano como un polvo blanco-amarillento.

Tabla 5. Características principales de quitina y quitosano en polvo obtenidos de desperdicios de camarón (*Penaeus vannamei*) en condiciones tecnológicas seleccionadas\*.

CARACTERÍSTICA	Unidad	QUITINA	QUITOSANO
Humedad	%	6,3	7,2
Ceniza	%	0,1	0,1
Nitrógeno	%	5,2	7,0
Grupos amino	μ moles/g	13,0	-
Grado de desacetilación	%	-	95
Densidad aparente	g/ml	0,06	0,10
Densidad real	g/ml	0,16	1,10
Diámetro medio lineal (aritmético)	μ	51	34
Diámetro medio superficie	μ	3667	1337
Diámetro medio volumen	μ		57331
Diámetro medio masa	μ		57331
Diámetro medio superficie-diámetro	μ	72	39
Diámetro medio volumen-diámetro	μ	6335	1678
Diámetro medio volumen-superficie	μ	88	43
Diámetro medio masa-superficie	μ	101	46
Peso molecular viscosimétrico promedio	g/g.mol	3,02*10 <sup>6</sup>	1,12*10 <sup>5</sup>
Rendimiento sobre materia prima clasificada y seca	%	34	28
Índice de blancura	%	93,4	77,3

Para González y colaboradores (2002) el Microscopio Electrónico de Barrido permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie. Los electrones secundarios se asocian a una señal de televisión. Debido al escaso poder de penetración de los electrones, es evidente que la preparación de la muestra en la microscopía electrónica es de capital importancia, pues tales preparaciones han de ser extraordinariamente delgadas y estables para resistir el alto grado de vacío que reina en el interior del microscopio. Se ha llegado a observar la morfología de las mezclas de poliamidas con quitina y quitosano para ver la compatibilidad entre estos polímeros. Siendo de gran interés científico estudiar el efecto de las diferencias estructurales entre la quitina y su derivado el quitosano con otros polímeros.

La microscopía electrónica aplicada a quitosano se ha enfocado principalmente hacia gránulos de quitosano no tóxicos en donde se han obtenido microfotografías de su estructura y de las colonias que forman entre los gránulos del mismo (<http://www.dalwoo.com>, 2004). En la Figura 5 se presentan microfotografías SEM con Zoom 1000X de caparazones de camarón, quitina y quitosano; se observa que de la estructura porosa del caparazón, la quitina ya presenta una estructura fibrosa característica de los biopolímeros, la cual se mantiene en el quitosano con fibras más gruesas y compactas, lo que está en concordancia con los valores de densidad, mayores en el quitosano.

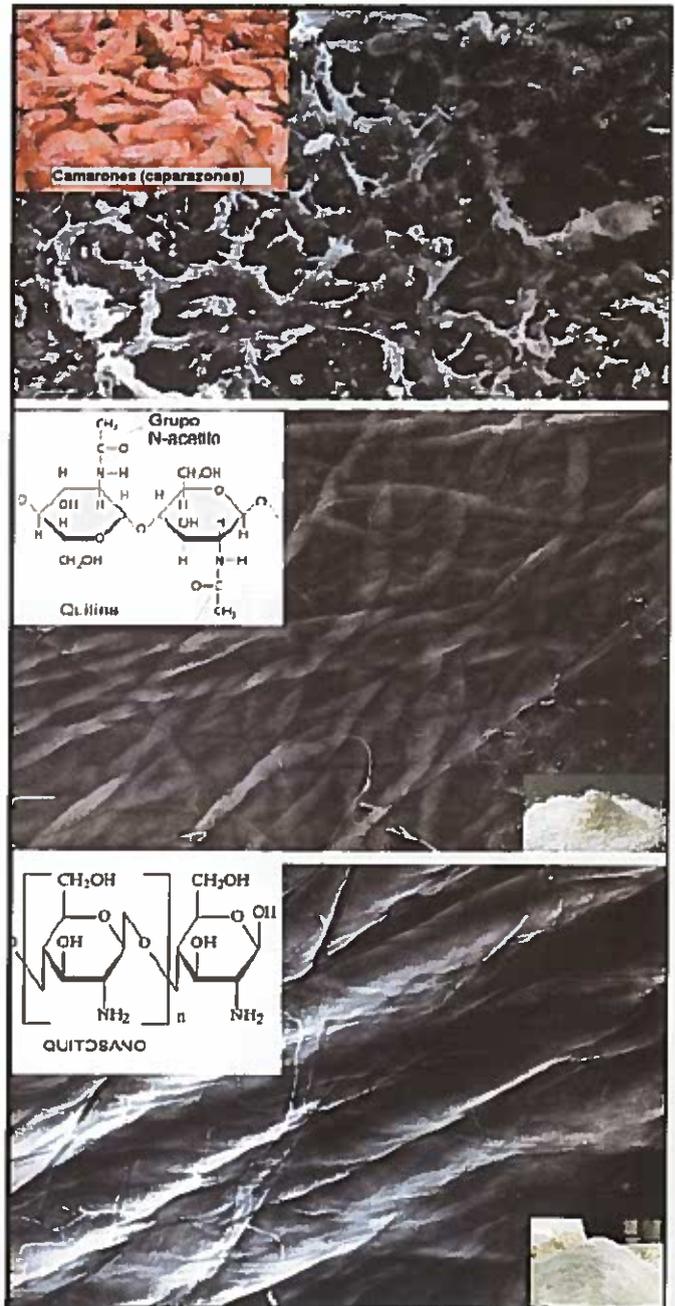


Figura 5. Estructura de caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*), quitina y quitosano observada mediante microscopía electrónica de barrido (1000X).

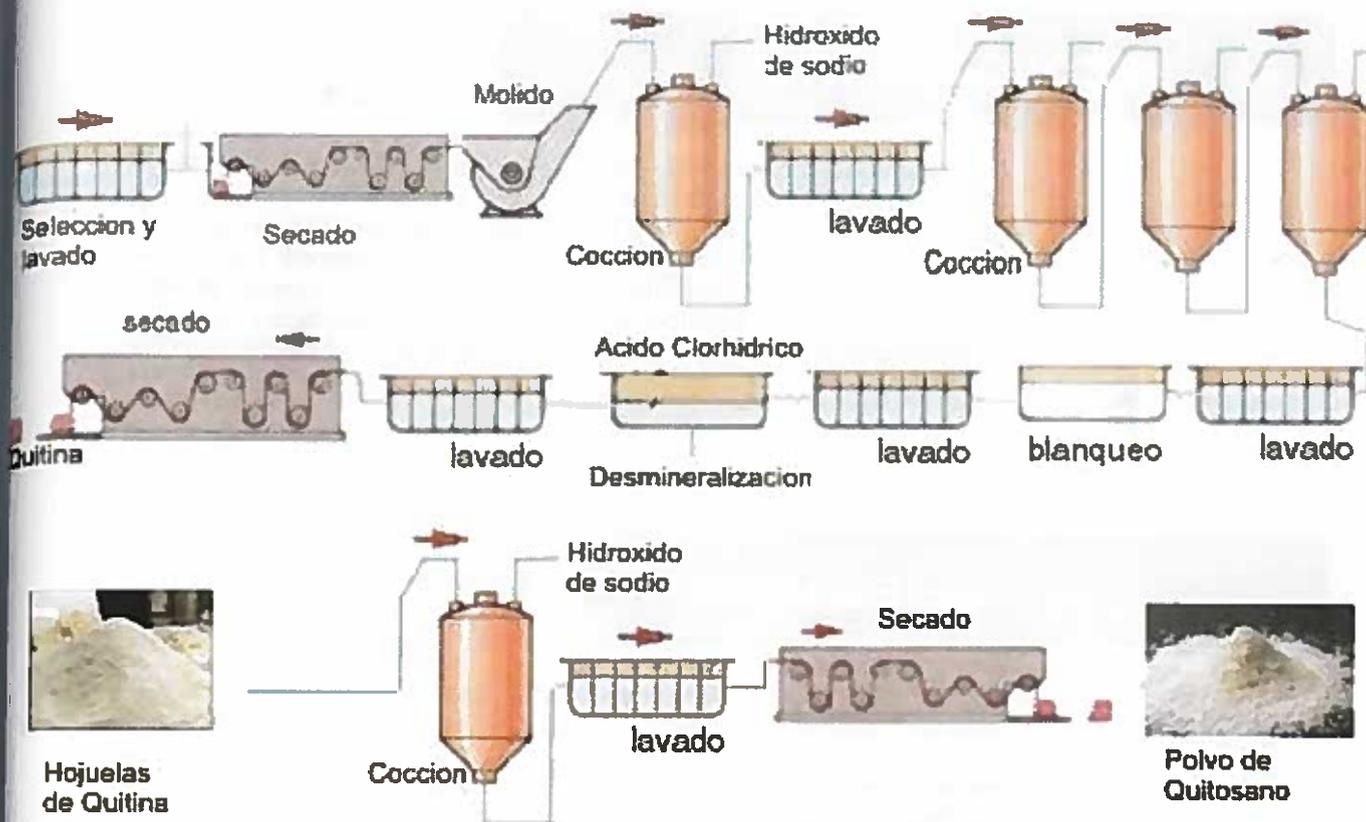


Figura 6 Diagrama de Proceso para la obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de camarón (*Penaeus vannamei*)

## CONCLUSIONES

Se presenta una tecnología para la obtención de quitina y transformarla a quitosano a partir de caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*) cultivado en Ecuador, éste es un procedimiento que permitió utilizar los desechos de éstos crustáceos, que constituyen grandes volúmenes de desperdicios que contaminan el medio ambiente. Los productos obtenidos presentaron características químicas y físicas que superan los requerimientos reportados para productos de grado comercial.

Las condiciones tecnológicas adecuadas para la obtención de quitina fueron: Lavado minucioso de la materia prima fresca procurando eliminar cualquier contenido de carne e impurezas; para facilitar la manipulación se secó a 90°C por 5 horas; desproteinización inicial con hidróxido de sodio 0,5% a 80°C por 30 minutos, lavado con agua abundante hasta llegar a un pH próximo a la neutralidad, y una segunda desproteinización con NaOH 3% a 80°C por 10 minutos por triplicado, que además removió colorantes presentes en los caparazones. Para mejorar el aspecto del producto final se realizó un blanqueado con hipoclorito de sodio 3% a temperatura ambiente por 30 min. La remoción de material mineral se realizó con solución de HCl 2N relación 1:3 (w/w) a temperatura ambiente por 60 minutos, se lavó y secó a 50°C por 6 horas en estufa. Estas etapas condujeron a la obtención de quitina, que no es soluble en agua ni solventes orgánicos, lo que la hace poco práctica para su aplicación. La quitina se sometió a un proceso llamado desacetilación para remover el grupo acetilo con hidróxido de sodio 50% con una relación 1:7 (w/w) a 100°C por 60 minutos, se lavó y secó en estufa a 50°C por 6 horas; se obtuvo como derivado al quitosano. Un diagrama general del proceso se indica en la Figura 6.

## RECONOCIMIENTO

Al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Proyecto CYTED XI.20, Películas biodegradables para alimentos en Iberoamérica, por hacer posible las pasantías en el CIDCA-Argentina en donde se ofrecieron todas las facilidades para la realización de los análisis de microscopía y otros análisis especializados. A la Universidad Técnica de Ambato, Proyecto BIOFILMS. Obtención de quitina, transformación a quitosano y elaboración de películas biodegradables a partir de desperdicios de crustáceos, por el soporte institucional y económico.

## REFERENCIAS

Alvarado, JdeD. y Aguilera, J.M. (Eds.). (2001). "Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos". Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1-48

Alvarado, JdeD. (1996). "Principios de Ingeniería Aplicados a los Alimentos". OEA. Radio Comunicaciones. Quito, Ecuador. 109-123

Antoni, G. Presentini, R. y Neri, P. (1982). "A simple method for the estimation of the amino groups on insoluble matrix beads". *Analytical Biochemistry*. 129: 60-63.  
AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemist. Official methods of analysis. 15th. ed., Heldrich, K. (Ed.). Washington, D.C.

Baxter, A. Dillon, M. Taylor, K. and Roberts, G. (1992). "Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan". *Intl. J. Bio. Macromol.*, 14: 166-169. Citado en la página web de: J Pharm Pharmaceut Sci ([www.ualberta.ca/~csps](http://www.ualberta.ca/~csps)). Vol. 5(3). 205-212. 03/02/04.

Cochran, W. y Cox, G. (1974). "Diseños Experimentales". Editorial Trillas. México. 215-235

Da Silva, R. y Nakamatsu, J. (2004). Estudio de la modificación de los polímeros politetrafluoroetileno y quitosana mediante tratamiento por plasma. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima – Perú. [http://www.pucp.edu.pe/publicaciones/rev\\_aca/quimica/?articulos.html](http://www.pucp.edu.pe/publicaciones/rev_aca/quimica/?articulos.html). 03/02/04

Dinsdale, A. y Moore, F. (1962). "Viscosity and Its Measurement". The Institute of Physics and the Physical Society.

García, I. Oviedo, D. Nieto, J. Peniche, C. y Henriques, R. (1996). "Método para el aprovechamiento del desecho de la langosta común". Instituto de Química y Biología Experimental. La Habana – Cuba. <http://www.ocpi.cu/doc/1996/t35844.PDF>. 02/02/04

González V, Guerrero C, Ortiz U. (2002). Estructura química y compatibilidad de poliamidas con quitina y quitosano. *Ciencia UANL*. Vol. 1 Enero-Marzo 2002. [http://www.yalma.fime.uanl.mx/~posgrado/graduados/grad\\_mat\\_d.pdf](http://www.yalma.fime.uanl.mx/~posgrado/graduados/grad_mat_d.pdf)

Issa, K. (1979). "Química Física Macromolecular". Ediciones del Castillo. Madrid, España. 69-109

Jiménez, A. y Gutierrez, G. (2001). Color. En: "Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos". Alvarado, Juan de Dios. y Aguilera José Miguel. (Edits). Editorial Acribia. Zaragoza-España. 329-331

Khan, T. Kulliyah Peh, K. Ching, H. (2002). "Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods". Journal of Pharm Pharmaceut Sci. Malaysia. Volumen 5(3). 205-212. ([www.ualberta.ca/~csps](http://www.ualberta.ca/~csps)) . 16/07/04

Kirk, R y Othmer. (1970). "Enciclopedia de Tecnología Química". Volumen 13. Primera Edición en Español. Editorial Hispano Americana. México. 423-428

Knorr, D. (1984). "Use of chitinous polymers in food, a challenge for food research and development". Food Technology. 38: 1-85.

Knorr, D. (1982). "Functional Properties of Chitin and Chitosan". Journal of Food Science. 47: 593

Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison E.W. y Goosen, M.F.A., (1992). "Applications and properties of chitosan". J Bioact Compat Polym., 7:370-397. Citado en la página web de: J Pharm. Pharmaceut Sci ([www.ualberta.ca/~csps](http://www.ualberta.ca/~csps)). Volume: 5(3). Pp. 205-212. 03/02/04.

McLean, C.(2000). "Chitin, chitosan and silage from New Zealand arrow squid". <http://neon.otago.ac.nz/chemistry/research/resgrads.htm>. 16/12/03

Muzzarelli, R.A.A. and Rocchetti, R. (1985). "Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry". Carbohydr. Polym. 5: 461-472. Citado en la página web de: J Pharm Pharmaceut Sci ([www.ualberta.ca/~csps](http://www.ualberta.ca/~csps)). Volume: 5(3). Pp. 205-212. 03/02/04.

Parada, L. Crespín, G. Miranda, R. Katime, Issa. (2004). "Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica". Revista Iberoamericana de Polímeros. 5(1).

Peral, I. y Gartzia, I. (2002). "Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de pesca: quitina, quitosano y sus aplicaciones". <http://www.poscosecha.com/docs/quitina.html>

Ramírez, M. Rodríguez, A. y Cardenas, R. (1998). "Preparación de hidrolizados bioactivos de quitosana a partir de diferentes fuentes". Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA, San José de las Lajas, La Habana-Cuba. <http://www.inca.edu.cu>. 30/04/2004

Saavedra, A. Toledo, A. Esquerro, I. Luviano, A. y Higuera I. (1998). "Método de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 48: 48-61

Shepherd, R. Reader, S. y Falshaw, A. (1997). "Chitosan functional properties". Glycoconjugate Journal. 14: 535-542.

Taboada, E. Cabrera, G. y Cardenas, G. (2003). "Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions". Journal of Chilean Chemical Society. 48 (1) [citado 21 Octubre 2004], p.7-12. <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-97072003000100002&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072003000100002&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0717-9707. 03/02/04

Vinoid, N. Wen, D. Chul, Y. y Qing, L. (1995). "Development of unique fibers using renewable resources via environmentally friendly technology". Report Period: June 30, 1994 to July 1, 1995. National Textile Center Annual Report: August. 17/12/03

<http://www.cautitlan2.unam.mx> (30/11/03)

<http://www.chitin.com.cn/english/jkssj.htm>. (26/04/04)

[http://www.cna-ecuador.com/estadisticas/impacto\\_ws/default1.htm](http://www.cna-ecuador.com/estadisticas/impacto_ws/default1.htm). (19/10/04)

[http://www.corpei.org/FrameCenter.asp?Ln=SP&Opcion=3\\_1\\_9](http://www.corpei.org/FrameCenter.asp?Ln=SP&Opcion=3_1_9). (19/10/04)

<http://www.dalwoo.com/chitosan/beads.html>. (08/10/04)

<http://www.dalwoo.com/chitosan/index.html>. (14/12/03)

[http://www.educ.ar/educar/superior/biblioteca\\_digital/verdocbiblio1.jsp?url=S\\_BD\\_CONGRESOQUIMICA/SEM8.html](http://www.educ.ar/educar/superior/biblioteca_digital/verdocbiblio1.jsp?url=S_BD_CONGRESOQUIMICA/SEM8.html). (10/10/03)

<http://www.iberomercosul.com/edicion/noticia.html>. (20/10/03)

<http://www.peakchem.com/product.html> (04/04/04)

<http://solar.griffin.peachnet.edu/statreport/feb96/feb2.html>. (17/12/03)

<http://www.ust.cl/medios/downloads/guia.doc>. (11/11/03)

<http://www.wellablegroup.com>. (06/02/04)

