

## Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón

H. Hernández Cocoletzi\*, E. Águila Almanza, O. Flores Agustín, E.L. Viveros Nava, E. Ramos Cassellis

*Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*

*Avenida San Claudio y 18 sur s/n CU, Edificio 106A, Puebla 72570, México*

(Recibido: 30 de abril de 2009; Aceptado: 22 de julio de 2009)

En este trabajo se presentan los resultados de la obtención del quitosano a partir de exoesqueletos de camarón desechados en restaurantes de comida marina. La obtención del quitosano se produjo por la desproteinización, la desmineralización y la desacetilación química de los exoesqueletos en polvo. La calidad del material obtenido fue evaluada utilizando las técnicas de caracterización de espectroscopia en el infrarrojo, valoración potenciométrica y el método Kjeldahl. Adicionalmente, se midieron los parámetros de porcentaje de ceniza, humedad y materia insoluble, para cuantificar el grado de purificación del quitosano. Los resultados demuestran que el quitosano obtenido es de calidad comparable al quitosano comercial.

*Palabras clave:* Quitina; Quitosano; Desacetilación

This work presents the study realized in order to obtain chitosan from shrimp shells thrown out at seafood restaurants. The chemical method was used which basically consists of three steps: the deproteinisation, the demineralisation and the deacetylation, of the shells done dust. The characterization of the obtained material was realized by infrared spectroscopy, potentiometer valuation and the Kjeldahl method. In addition, the ash, humidity and insolvable matter percentage was obtained. Results show that the obtained chitosan is of similar quality than that found in the market.

*Keywords:* Chitin; Chitosan; Deacetylation

### 1. Introducción

La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, después de la celulosa es el polímero natural más abundante [1], presenta una tasa de reposición tan alta en la biosfera que –se estima- duplica a la de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable. La principal fuente de quitina son exoesqueletos de crustáceos. Particularmente, los exoesqueletos de camarón contienen una alta concentración de quitina, de la cual es posible obtener quitosano a través de un proceso químico de N-desacetilación.

Debido a las propiedades funcionales y fisicoquímicas del quitosano, se ha podido identificar una enorme cantidad de aplicaciones que abarcan áreas tan variadas como: alimentación [2], medicina [3,4], agricultura [5], cosmética [6], y farmacia [7], entre otras. Se han reportado [8,9] diversos métodos fisico-químicos para su obtención y caracterización, sin embargo, su aplicación está limitada principalmente debido a la variación en su composición química, grado de desacetilación, tamaño de la cadena polimérica y purificación. La fuente de quitina y los incontrolados procesos de desacetilación son los principales factores que afectan las propiedades finales del quitosano [8].

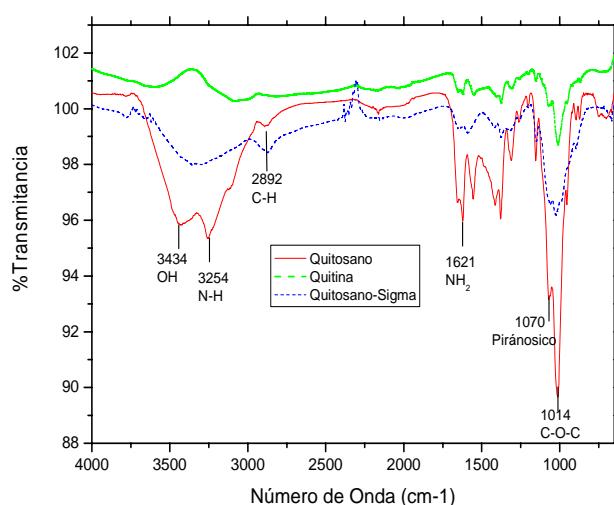
En la actualidad, la principal fuente de exoesqueletos proviene de los desechos de la industria camaronera, los cuales representan millones de toneladas de basura a nivel mundial. La mayoría de estudios realizados en la obtención de quitosano han utilizado estos desperdicios industriales,

sin embargo, a nuestro conocimiento, los exoesqueletos desechados en los restaurantes de comida marina no han sido objeto de estudio con fines de obtener un material con alto valor agregado de biomasa para diferentes áreas de aplicaciones. En este trabajo, se presenta la metodología para la obtención química del quitosano a partir de exoesqueletos que provienen de los desechos de restaurantes de comida marina. Utilizando las técnicas de caracterización espectroscopia en el infrarrojo, valoración potenciométrica y el método Kjeldahl, fue posible cuantificar la calidad del quitosano obtenido. El porcentaje de ceniza, humedad y materia insoluble también fue determinado para verificar su grado de purificación.

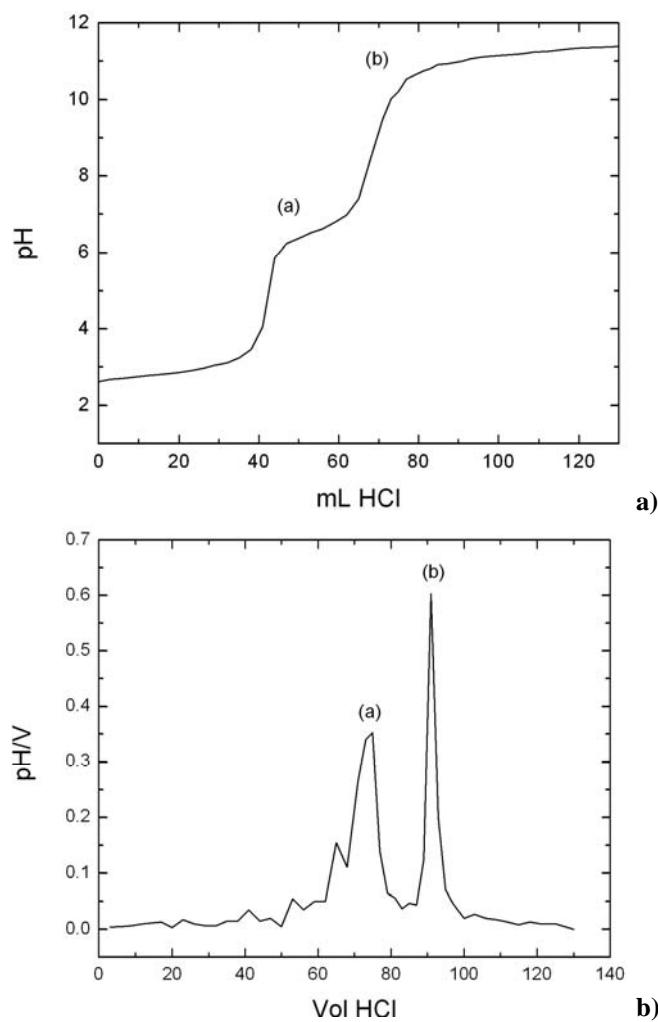
### 2. Desarrollo experimental

La quitina, precursor del quitosano, fue obtenida utilizando el método químico a partir de exoesqueletos de camarón obtenidos en restaurantes de mariscos. Se procedió a la recolección de desechos de camarón en diferentes restaurantes. Los residuos de camarón fueron separados de sus caparazones, para luego ser lavados tenazmente con abundante agua, quitando los restos orgánicos que pudieran estar presentes. Los exoesqueletos obtenidos, fueron secados en una estufa a 60-70 °C hasta peso constante. Los exoesqueletos secos y libres de cabeza, patas y cola se sometieron a un proceso de tamizado buscando obtener un polvo con tamaños de partícula menor que 250 µm [11]. Para llevar a cabo la desmineralización de los exoesqueletos, se pesó una cantidad del polvo del

\* e-mail: heribert@siro.ifuap.buap.mx



**Figura 1 a)** Espectro de absorción de la muestra desproteinizada (Quitina) espectro de absorción de la muestra desacetilada (Quitosano) y espectro de absorción de una muestra de la empresa Sigma Aldrich.



**Fig. 2 a)** Curva de Titulación del Quitosano y **b)** su primera derivada.

crustáceo y se colocó en un matraz contenido una solución de HCl 0.6N en una relación 1:11 sólido-líquido a una temperatura de 30°C durante 3 horas. Posteriormente, se realizó la desproteinización de la muestra con una solución de NaOH al 1% a una temperatura de 28°C durante 24 horas de agitación constante para asegurar una completa desproteinización. La quitina obtenida, finalmente se somete al proceso de desacetilación, mediante el cual, es convertida en quitosano; para ello se pesó una cantidad de la quitina obtenida y se vertió en una solución de NaOH al 50% en una relación 1:4 sólido-líquido, bajo las siguientes condiciones: primero por 2 horas a 60°C y luego por 2 horas a 100°C. El producto obtenido es el quitosano. En cada una de las etapas del proceso, el producto obtenido fue lavado tenazmente con agua destilada hasta obtener un pH neutro.

La caracterización del quitosano obtenido se realizó mediante espectroscopia en el infrarrojo (IR) en la región de 500-4000 cm⁻¹. Los espectros de absorción fueron obtenidos en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier y sistema ATR. Se realizó una determinación potenciométrica [8] para obtener el grado de N-desacetilación. El procedimiento básicamente consistió en disolver el quitosano con un exceso de HCl. La solución de quitosano se valora con una solución de NaOH. De esta manera, se obtiene una curva de pH vs mL de NaOH añadidos, la cual presenta dos puntos de inflexión; la diferencia entre ellos se corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano; la concentración de éstos se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{NH}_2 = \frac{16.1(y - x)}{w} f \quad (1)$$

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,  $w$  es la masa en gramos de la muestra y el número 16.1 es un factor asociado al tipo de proteína que se utilice (cereal en este caso). El porcentaje de proteína (Pr) presente en el quitosano se determinó utilizando el método Kjeldahl [12], utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Pr} = \frac{(14.01)(N)(V)(100)(F)}{m(1000)} \quad (2)$$

Donde:

- $N$  = Normalidad del HCl
- $V$  = Vol. de HCl para la muestra en mL – Vol. de HCl para el blanco en mL.
- 14.01 = Peso atómico del Nitrógeno
- $m$  = Masa de la muestra en gramos.
- $F$  = 6.25 (Valor asignado para proteínas en general)

Finalmente, el rendimiento global ( $RG$ ) del proceso fue obtenido utilizando la siguiente expresión:

**Tabla 1.** Porcentaje de ceniza, humedad y material insoluble del quitosano obtenido y de muestras comerciales.

Muestra	Ceniza %	Humedad %	Material insoluble %
Este trabajo	1.40	10.48	1.80
HMW	0.48	11.69	0.34
MMW	0.61	13.67	0.94

$$RG = \frac{RR}{RT} \cdot 100 \quad (3)$$

Donde:

RT = cantidad en gramos de la muestra con la que se comenzó el proceso.

RR = cantidad en gramos del producto final (quitosano).

Para obtener el porcentaje de ceniza se introdujeron 4 g de muestra a una mufla durante 6 horas a una temperatura de 800 °C; el proceso final de enfriado se llevó a cabo con un desecador. La determinación del porcentaje de humedad se realizó introduciendo 2 g de muestra a una estufa a 105 °C durante 24 horas. El porcentaje de materia insoluble se determinó disolviendo quitosano 0.5 % (p/v) en una solución de ácido acético 0.1M con agitación constante de 200 rpm, durante 24 horas; a continuación, la muestra se filtró (papel filtro grado 610) y se secó en una estufa hasta obtener un peso constante.

### 3. Resultados y discusión

En la Figura 1 se presenta el espectro de absorción de la muestra desproteinizada; en esta etapa fueron removidos pigmentos y sales inorgánicas presentes en la materia prima. Además, en este proceso es eliminada la mayor cantidad de proteína y otros componentes traza remanentes de etapas anteriores. Se ven definidos los picos de absorción correspondientes a la quitina: enlace C-O-C, enlace C=O y grupo amida, lo cual indica que en esta etapa efectivamente se tiene la quitina. La Figura 1 también contiene el espectro de absorción correspondiente a la muestra desacetilada; esta etapa es de gran importancia debido a que es donde se lleva a cabo la conversión de quitina a quitosano. En el espectro de quitosano se observan las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano, se hace evidente la aparición de la banda del grupo amino a 1621 cm<sup>-1</sup> y se observa una mejor definición en las bandas de los grupos OH a 3434cm<sup>-1</sup> y N-H a 3254cm<sup>-1</sup>, respecto al espectro de la quitina, esto debido al proceso de desacetilación al que fue sometida. También se aprecian las bandas del grupo C-H a 2892cm<sup>-1</sup>, grupo Piranósico a 1070 cm<sup>-1</sup>, y grupo C-O-C a 1014cm<sup>-1</sup>. Nótese como las señales correspondientes al C-O-C, anillo piranósico, C-H y O-H, se mantienen presentes durante todas las etapas, mientras que las bandas correspondientes al grupo NH de la amina se definen mejor conforme la muestra se somete a cada proceso químico. En la misma Figura se muestra el

espectro de quitosano de la empresa Sigma Aldrich, en la que también aparecen los grupos funcionales característicos del biopolímero quitosano, lo cual confirma que la muestra obtenida es quitosano.

En la Figura 2a se muestra la curva de titulación, en la que se observan los dos puntos de inflexión, (a) y (b). Los valores de estos puntos se determinaron según el criterio de la primera derivada y se muestran en la Figura 2b. De esta Figura se ve que x = 71 mL y y = 91 mL. El grado de desacetilación se obtuvo con la ecuación (1) utilizando 0.5024 g de quitosano y f = 0.1. Por lo tanto, el grado de desacetilación es del 64%. Es importante hacer notar que el quitosano comercial que se ofrece en el mercado presenta un porcentaje de desacetilación a partir del 60%. Para la determinación de nitrógeno, los parámetros empleados en la ecuación (2) son: 0.0321 g de quitosano, N = 0.02, F = 6.25 y V = 3.8 mL. El porcentaje de proteína que presenta la muestra fue de 1.63 %. El contenido de proteína del quitosano obtenido es muy bajo, comparado con el que contienen los exoesqueletos que es del 58% ± 2.8. Es decir, el proceso de desproteinización fue eficiente, pues se eliminó gran porcentaje de la proteína.

El rendimiento porcentual se calculó con la expresión (3), donde los rendimientos real y teórico son: 30 y 15.583 g, respectivamente. Por lo tanto, el rendimiento global es del 51.94%.

La Tabla 1 muestra los resultados de la determinación del porcentaje de ceniza, humedad y materia insoluble; en la misma Tabla se incluyen valores reportados para muestras comerciales de quitosano de alta (HMW, 79%, GD) y media masa molecular (MMW, 81.4%, GD) (Aldrich, USA) [9].

El resultado correspondiente al porcentaje de ceniza está influenciado por la presencia de impurezas de tipo mineral, como el calcio, contenido en sales de CaCO<sub>3</sub> o incluso la presencia de contaminantes metálicos. En la Tabla 1 se aprecia que el valor obtenido experimentalmente es superior respecto a las muestras comerciales. El resultado depende, en gran medida, del origen, propiedades y condiciones de obtención del quitosano. Al ser alta la concentración de la disolución de NaOH (50%), la viscosidad se incrementa y aunado a las características estructurales del biopolímero, se facilita la retención de impurezas y se generan mayores productos de ignición.

El contenido de humedad obtenido es menor que el reportado (Tabla 1). La pérdida de agua en la muestra es debida a procesos físicos y químicos durante la etapa de obtención del quitosano. Durante la trituración, la eliminación del contenido de agua de hidratos es resultado del calentamiento localizado por fricción. También se considera la eliminación de grupos acetilo como resultado de la desacetilación termoalcalina de la quitina que genera grupos amino libres en la cadena polimérica y es un sitio sensible a la formación de puentes de hidrógeno con el oxígeno de radicales libres ·OH y dado que el grado de desacetilación del quitosano fue de 64%, la posibilidad de formación de moléculas de agua disminuye debido a una menor presencia de grupos amino.

La concentración de material insoluble es superior a la de las muestras comerciales. Tomando en consideración la presencia de material inorgánico se puede justificar este resultado.

#### 4. Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales usadas en el trabajo, se logró extraer quitosano a partir de exoesqueletos de camarón desechados en restaurantes de comida marina. Se logró la desacetilación termoalcalina heterogénea de la quitina. El porcentaje de desacetilación del quitosano obtenido es de 64 %. Los resultados de porcentaje de ceniza, humedad y materia insoluble demuestran que la pureza de nuestro quitosano es aceptable, quizás no para aplicaciones médicas o farmacéuticas, ya que estos exigen valores mucho menores para los fines prácticos que conllevan estos ámbitos, pero si es funcional como para aplicarlo, por ejemplo, en el control ambiental. El quitosano obtenido contiene un bajo porcentaje de proteína. El rendimiento fue del 51.94% lo que permite observar que se logró una transformación sintética eficiente. Finalmente, con este trabajo se está cumpliendo con dos objetivos: disminuir la generación de basura por los restaurantes de comida marina y al mismo tiempo, obtener un material con un valor agregado alto.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente apoyado por VIEP-BUAP clave HECH-ING08-I.

#### Referencias

- [1]. K. Heller, L. Claus y J. Huber, *Zeit. Naturforsch.* **14**, 476 (1959).
- [2]. C. Lárez Velásquez, *Avances en Química*, **1**, 15 (2006)
- [3]. R. L. Whisteler, (ed.). *Polysaccharide Chemistry* (Academic Press, Nueva York, 1983).
- [4]. M. Yalpani, F. Johnson y L. E. Robinson. *Chitin, Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications* (Elsevier, Amsterdam, 1992).
- [5]. M. S. Rodríguez, V. Ramos, M. Pistonesi, L. Del Blanco y E. Agulló, *Información tecnológica* **9**, 129 (1998).
- [6]. H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger y G. Menges (eds.). *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Vol. 1 (Wiley, Nueva York, 1985).
- [7]. S. Hirano, *Chitin and chitosan for use as novel biomedical materials*, in *Advances in Biomedical Polymers*, L.G. Gebelein, Editor., (Plenum: New York, 1987).
- [8]. L. G. Parada, G. D. Crespín, R. Miranda e I. Katime, *Rev. Latinoam. Polím.* **5**, 1 (2004)
- [9]. C. Hidalgo, M. Fernández, O. M. Nieto, A. A. Paneque, G. Fernández, J. C. Llópiz, *Rev. Iberoam. Polím.* **10**, 11 (2009).
- [10]. Z. Rocha Pino, K. Shirai, L. Arias y H. Vázquez Torres, *Rev. Mex. Ing. Quím.* **7**, 299 (2008).
- [11]. Tolaimate, J. Desbrieres, M. Rhazi, M. Vicendon y P. Vottero. *Polymer* **41**, 2463 (2000).
- [12]. A.O.A.C. 1984. "Official Methods of Analysis" 13 th Edition.