



EFFECTO DE LA CALIDAD DEL AGUA Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA PRODUCCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE β -QUITINA EXTRAÍDA DE DESPERDICIOS DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*)

EFFECT OF WATER QUALITY AND PARTICLE SIZE ON THE PRODUCTION OF CHITOSAN FROM β -CHITIN ISOLATED FROM JUMBO SQUID PROCESSING WASTES (*Dosidicus gigas*)

Z. Rocha-Pino¹, K. Shirai^{1*}, L. Arias² y H. Vázquez-Torres²

¹ Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros

² Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, C.P. 09340., Mexico D.F.

Recibido 7 de Mayo 2008; Aceptado 29 de Octubre 2008

Resumen

La pluma de calamar gigante es una fuente importante de β -quitina, la cual tiene un arreglo de cadenas en forma paralela que le da un carácter particular en sus propiedades tales como, alta reactividad, afinidad en disolventes orgánicos y retención de agua. La extracción de la β -quitina se realizó con el método químico, el cual consistió en desmineralización (DM) probando HCl 0.2M ó 1M, posteriormente se realizó la desproteínización (DP) con NaOH en concentraciones de 0.2M a 2M. La DP total, el cual es el paso limitante para la extracción de la β -quitina, se logró mediante concentraciones de NaOH 1M a 25 °C. El tamaño de partícula fue significativo para la DM pero no en la DP. Se observó que es factible la utilización de agua corriente para la neutralización de las muestras con el fin de disminuir un costo de producción obteniéndose rendimientos de 32% a 20% a partir de pluma de calamar, así como gastos de agua de 0.3 L/g de quitina y de 2.8 L/g de quitosano. El quitosano resultante fue soluble en un 95% en ácido acético 0.1 M, con peso molecular (M_v) de 534.17 g/mol y grado de acetilación de 26%.

Palabras clave: β -quitina, *Dosidicus gigas*, calamar, quitosano, desproteínización, desmineralización.

Abstract

Jumbo squid wastes represent an important source of β -chitin, which recently has been studied for its properties and potential applications. β -chitin is characterized for chains in parallel fashion with weaker intermolecular interactions than α -chitin. Therefore β -chitin is more soluble in common solvents as well as it display higher reactivity for deacetylation and chemical modification than α -chitin. Preparation of β -chitin was carried out by chemical method that involved demineralization (DM) with HCl, followed by deproteinization (DP) with NaOH. *Dosidicus gigas* pen was used in several particle sizes. Distilled or tap water were used for all the processes and their effect was compared on the basis of products qualities. Protein was fully removed from squid pen by using NaOH concentration of 2M at 25°C. Particle size was a significant factor for DM, however it was non significant for DP. The yields of β -chitin and chitosan obtained were 32% and 20% and water expenses were 0.3 L/g and 2.8 L/g, respectively. The chitosan produced was highly soluble in acidic water (95%) with molecular weight (M_v) of 534.17 g/mol and degree of acetylation of 26%.

Keywords: β -chitin, *Dosidicus gigas*, jumbo squid, chitosan, deproteinization, demineralization.

1. Introducción

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un molusco cefalópodo cuya distribución geográfica se encuentra en la parte central del Golfo de California en México con migraciones estacionales de Santa Rosalía (Baja California Sur) a Guaymas (Sonora) (De la Cruz-

González y col., 2007; Benoît-Bird y col., (2008). En el interior del manto se encuentra una concha córnea transparente a la que se le denomina "pluma", la cual se encuentra envuelta en el interior de los tejidos como una formación de tipo esquelético. Esta estructura proporciona consistencia al cuerpo blando

* Autor para la correspondencia. E-mail: smk@xanum.uam.mx
Tel: +(52) 5558044921; Fax: +(52) 5558044712

del animal debido a que contiene quitina responsable de conferir dicha dureza.

La quitina en la pluma de calamar está presente con un arreglo molecular de cadenas en paralelo que se denomina β -quitina y está asociada con proteínas de tipo de la colágena, propiedad que confiere tenacidad, flexibilidad y movilidad (Shirai, y col., 1996).

La β -quitina tiene gran potencial para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica, gracias a sus características, tales como, alta reactividad, afinidad por disolventes orgánicos y retención de agua (Kurita y col., 1993). Las ventajas del uso de la quitina y su derivado, el quitosano, es que son polímeros naturales, no tóxicos y biodegradables (Shirai, y col., 1996).

La captura del calamar gigante en el noroeste de México por pangas y barcos, se ha mantenido en ascenso durante la última década en ca 53,486 toneladas con un aporte del 9% de la captura a nivel nacional ocupando el cuarto lugar en importancia en el país (Anónimo 2003; De la Cruz-González y col., 2007). Esta actividad es de gran importancia para la economía de la región, principalmente en Santa Rosalía, Baja California Sur, Guaymas, Sonora y Mazatlán, Sinaloa, sin embargo sus desperdicios, los cuales representan el 50% de la pesca total, son desechados sin ningún tratamiento.

La extracción de β -quitina ha sido reportada en otras especies de calamar *Loligo*, *Sepia*, *Tevnia* e *Illex* (Kurita y col., 1993; Rhazi y col., 2000; Tolaimate y col., 2003; Chaussard y Domard 2004; Chandumpai y col., 2004; Saito y Osakada, 2006; Lavall y col., 2007). Sin embargo el volumen de estos desperdicios, i.e. plumas, son menores a los de *D. gigas* considerando el tamaño del molusco por ejemplo *L. vulgaris* tiene una longitud de manto de entre 15 y 25 cm mientras que *D. gigas* alcanza tallas desde los 70 cm hasta 2.5 m de longitud de manto (De la Cruz-González y col., 2007; Benoît-Bird y col., 2008). Las metodologías reportadas presentan inconvenientes como el uso de ciclos repetidos de desmineralización y desproteización a altas o bajas temperaturas, lo cual hacen que sean procesos de mayor costo (Chaussard y Domard 2004, Rhazi y col., 2000, Chandumpai y col., 2004, Lavall y col., 2007). Kurita, y col., (1993) han reportado que existen variaciones tanto en tamaño de pluma como en composición química entre diferentes especies de calamar.

Es por ello que el objetivo de este estudio fue determinar las condiciones de desproteización y desmineralización de la pluma de calamar gigante, *Dosidicus gigas*, el cual no ha sido reportado como materia prima para la obtención de β -quitina y quitosanos. Lo anterior, con el fin de ofrecer una alternativa para el procesamiento de la pluma de calamar gigante generado en las zonas pesqueras para obtener quitina y quitosano de alta calidad con

el mayor rendimiento y el menor gasto de reactivos y agua.

2. Materiales y métodos

2.1 Materia prima

La pluma de calamar gigante, *Dosidicus gigas*, proveniente del Golfo de California fue donada por la empresa Bona Pesca S.A. de C.V. de Mazatlán, Sinaloa. Estas muestras fueron secadas al sol y molidas en un molino industrial (Thomas-Scientific EUA) con criba de diferentes tamaños de partícula: 0.5, 1 y 2 mm de diámetro. La β -quitina comercial (GMBH, Alemania) fue utilizada como referencia. El ácido e hidróxido utilizados fueron grado industrial (Casa Miyako, México).

2.2 Extracción de β -quitina

2.2.1 Desmineralización

Se emplearon dos concentraciones de HCl 0.2 y 1M, en una relación 1:15 (p/v) durante 12 h a 25 °C. Posteriormente la muestra fue lavada con agua para neutralizar, se utilizó agua destilada ó corriente. Los rendimientos de la quitina cruda obtenida después de la DM fueron determinados con respecto a la pluma de calamar en base seca.

2.2.2 Desproteización

Las muestras, una vez desmineralizadas, fueron tratadas con NaOH a diferentes concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 M, con una relación 1:15 (p/v) durante 12 h a 25 °C. Posteriormente, la muestra fue lavada con agua destilada ó corriente para neutralizar. Las muestras fueron secadas a una temperatura de 55 °C. Se realizó una segunda desproteización en muestras tratadas con HCl 1 M y NaOH 2 M y lavadas con agua destilada en los tres diámetros de partícula, con las mismas concentraciones de NaOH y relación de 1:15 (p/v) a 100 °C con reflujo durante 4h. Al final del tratamiento se determinaron los gastos de agua y rendimientos de las muestras. Los rendimientos de las quitinas obtenidas fueron determinados con respecto a la pluma de calamar en base seca.

2.3. Obtención de quitosano

2.3.1 Desacetilación homogénea

Las muestras fueron tratadas con NaOH al 65% (p/v) en una relación con la pluma de 1:15 (p/v) durante 3 días a 25 °C con agitación a 200 rpm (Kurita y col., 1993).

2.4 Análisis de las muestras

Las muestras fueron analizadas después de los tratamientos de DM y DP mediante las siguientes técnicas:

2.4.1 Determinación de nitrógeno total (NT) y proteína cruda por el método de Kjeldahl

El NT fue determinado en un sistema Kjeldahl (K-435 BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) de acuerdo a métodos estándar (A.O.A.C., 1990). La determinación de proteína cruda residual fue realizada mediante la substracción del nitrógeno de quitina al NT. El resultado fue multiplicado por el factor de corrección de 6.25 (Cira y col., 2002; Chaussard y Domard, 2004). El porcentaje de desproteínización (DP) fue calculado considerando el contenido inicial de proteínas (desperdicio sin tratamiento) y el obtenido con los tratamientos.

2.4.2 Determinación de cenizas

El contenido de cenizas totales fue determinado en las muestras sólidas obtenidas a partir de la pluma de calamar, considerando la diferencia de pesos y expresado como porcentaje con respecto al peso de la muestra original (A.O.A.C., 1990). El porcentaje de desmineralización (DM) fue calculado considerando el contenido inicial de cenizas (desperdicio sin tratamiento) y el obtenido con los tratamientos.

2.4.3 Determinación de calcio

La determinación de calcio fue realizada de acuerdo a métodos estándar A.O.A.C. (1990) mediante espectroscopia de absorción atómica (Perkin Elmer, Norwalk E.U.A). El porcentaje de descalcificación (DCa) fue calculado considerando el contenido inicial de calcio (desperdicio sin tratamiento) y el obtenido con los tratamientos.

2.5. Caracterización de quitinas y quitosanos

2.5.1 Espectros de infrarrojo

Las quitinas y quitosanos obtenidos fueron pulverizados ≤ 0.5 mm de diámetro y mezclados con KBr a una relación 1:15, para obtener pastillas (160 mg). Estas pastillas fueron analizadas por espectroscopia de Infrarrojo en un intervalo de 400-4000 cm^{-1} (Perkin Elmer, spectrum GX FT-IR Norwalk E.U.A).

2.5.2 Determinación de peso molecular promedio por viscosidad (M_v)

El peso molecular fue determinado mediante viscosidad intrínseca con concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 g/L de quitosano disuelto en ácido acético

2% (v/v)/acetato de sodio 0.2 M. Las soluciones fueron analizadas en un viscosímetro Ostwald a 25 °C obteniendo el tiempo que tarda la solución en recorrer el capilar con el fin de determinar la viscosidad intrínseca y determinar con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada [Ec. (1)] el M_v en g/mol:

$$[\eta] = kM_v^a \quad (1)$$

donde: k es 1.38×10^{-5} L/g; a es 0.85; η es viscosidad intrínseca (Kjonielsen y col., 1997).

2.5.3 Determinación del contenido de insolubles

El contenido de solubles se determinó por diferencia de peso al disolver 0.5% (p/v) de quitosano en una solución de ácido acético 0.1 M y dejando en agitación a 200 rpm por 24 h, posteriormente fue filtrado y llevado a peso constante (Kasaai y col., 2000).

2.5.4 Determinación del grado de acetilación (DA)

El grado de acetilación fue determinado en quitosanos obtenidos a partir de las quitinas con mayor pureza, es decir, quitina de 0.5 mm de diámetro tratada con HCl 1M, NaOH 2M a 25 °C en agua corriente. Esto se realizó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear, en donde el quitosano fue disuelto en solución $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ (20%) con agitación magnética durante 12 h, se utilizó un espectrómetro Broker AC 200 a 200Mhz para ^1H a 298 °K (Hirai y col., 1991).

2.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de DM, DCa, gastos de agua y rendimientos fueron analizados mediante ANOVA utilizando como fuentes de variación el tipo de agua, tamaño de partícula y concentración de ácido. Asimismo, el porcentaje de DP, gasto de agua y rendimientos fueron las variables de respuesta y las fuentes de variación consideradas fueron tamaño de partícula y concentración de hidróxido. Las comparaciones múltiples de las medias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Estos análisis se llevaron a cabo con el programa NCSS (NCSS Inc., USA).

La concentración de NaOH fue determinada como variable independiente y la DP como variable dependiente para realizar una regresión lineal. Los niveles de significación de la variable independiente, coeficientes beta, así como los coeficientes de determinación (R^2) y de correlación (R) fueron determinados por el programa estadístico NCSS a la Ec. (2):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (2)$$

donde y es el porcentaje de desproteínización, β_0 , β_i , β_{ii} son los coeficientes de regresión para el intercepto, los efectos de interacción lineal y

cuadrática, respectivamente. X_i es la concentración de álcali (M).

3. Resultados y discusión

3.1 Extracción de β -quitina

3.1.1 Desmineralización

El proceso de extracción de β -quitina por método químico se inició con la desmineralización de la pluma de calamar (*Dosidicus gigas*), con el fin de eliminar las sales inorgánicas como carbonato de calcio que se encuentran unidas a la quitina.

El contenido inicial de cenizas encontrado en la pluma de calamar de *Dosidicus gigas* fue significativamente mayor, 7.5 ± 1.5 % (base seca), que el reportado en otros calamares como *Loligo*, 2.4 % (Chaussard y Domard, 2004) o *Loligo formosana* y *Loligo lessoniana* las cuales presentan porcentajes de cenizas menores del 0.1 % (Chandumpai y col., 2004). Si bien los resultados de los contenidos de cenizas se deben a las diferencias entre géneros se resalta la importancia de la desmineralización para las plumas de *D. gigas*, ya que en otros géneros como *Loligo* es factible prescindir de la desmineralización (Chaussard y Domard, 2004).

El análisis estadístico mostró que el tamaño de partícula no tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el contenido de cenizas en las muestras lavadas con agua corriente. La concentración de ácido y el tamaño de partícula fueron significativos con las muestras tratadas con agua destilada (Fig. 1).

Con el fin de observar el efecto del agua sobre el contenido de cenizas se realizó la desmineralización en muestras de pluma de calamar en los tres diferentes tamaños de partículas con HCl 1 M, tanto los lavados como la preparación de los reactivos fueron realizados con agua destilada.

En los tratamientos realizados con agua destilada se observó que el porcentaje de desmineralización fue favorecido a tamaños pequeños de partícula obteniendo así porcentajes de DM de 57 en partículas de 0.5 mm, mientras que a 1 y 2 mm fueron de 47% (Fig. 1).

Debido a que el calcio ha sido reportado como un elemento que se encuentra ligado a la quitina (Shirai y col., 1996) se determinó el porcentaje de remoción de este o descalcificación (DCa) de la pluma de calamar. En las muestras lavadas con agua corriente este porcentaje se vio afectado por el tamaño de partícula. Los contaminantes del agua corriente afectaron tanto el contenido de cenizas como la descalcificación (figs. 1 y 2).

El porcentaje de descalcificación fue favorecido a tamaños de partícula pequeños obteniendo así porcentajes de 100 %DCa en partículas de 0.5 mm para ambos tipos de agua a diferencia de aquellos de 2 mm en lo que la % DCa

fue de 37 y 84% en agua corriente y destilada, respectivamente (Fig. 2).

Como se observó con los resultados anteriores es importante la repercusión de los contaminantes del agua corriente sobre el porcentaje de desmineralización y descalcificación, sin embargo es factible el uso de este tipo de agua pero se debe considerar para posteriores aplicaciones de los productos. Estos biopolímeros son agentes quelantes potentes por lo que se recomienda el uso de agua desionizada durante los tratamientos para productos que requieren alta pureza.

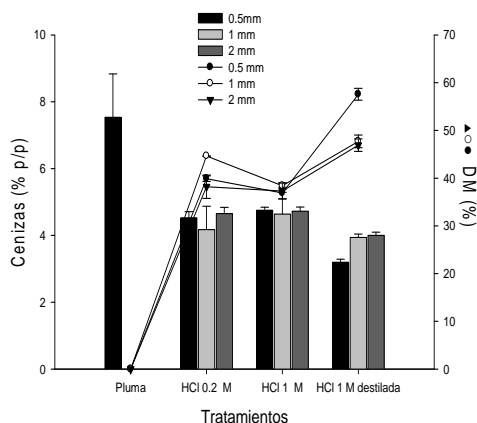


Fig. 1. Efecto de la concentración de ácido, tamaño de partícula y tipo de agua corriente (0.2 y 1 M HCl) y destilada (1 M HCl) sobre el contenido de cenizas y porcentaje de desmineralización de la pluma de calamar *Dosidicus gigas*.

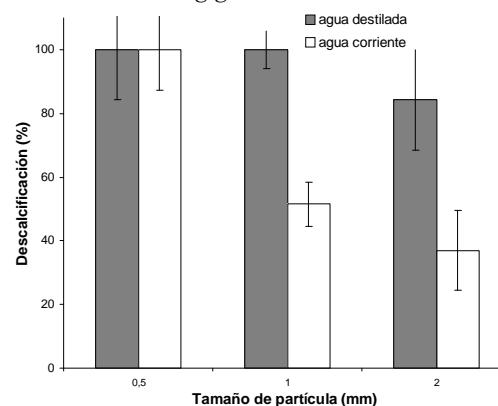


Fig. 2. Efecto del tamaño de partícula y tipo de agua sobre el porcentaje de descalcificación en pluma de calamar *Dosidicus gigas* tratadas con HCl 1 M.

El análisis estadístico de los rendimientos de quitina cruda, es decir el producto obtenido después de la DM pero que aún presenta proteínas, mostraron que la concentración de ácido tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento, observándose incrementos de hasta un 6 ± 0.3 % en los tratamientos con HCl 1 M en comparación con el tratamiento de HCl 0.2 M (Tabla 1). Por su parte el tamaño de partícula y tipo de agua no mostraron diferencias significativas.

Tabla 1. Tipo de agua durante la etapa de desmineralización (DM) y rendimientos.

Agua de lavado (neutralización)	HCl (M)	Tamaño de partícula (mm)	Tipo de agua (L/g)	Rendimiento (g de quitina cruda/100g de pluma)*
CORRIENTE	0.2	0.5	0.15 ± 0.01 ^{c,d}	74.38 ± 1.5 ^a
		1	0.16 ± 0.00 ^{b,c,d}	73.63 ± 0.3 ^a
		2	0.20 ± 0.00 ^d	74.43 ± 2.2 ^a
	1	0.5	0.18 ± 0.01 ^{a,b,c}	75.20 ± 0.9 ^b
		1	0.18 ± 0.01 ^{a,b}	78.20 ± 0.9 ^b
		2	0.20 ± 0.01 ^{a,b}	79.30 ± 0.4 ^b
DESTILADA	1	0.5	0.28 ± 0.01 ^{a,b}	78.00 ± 2.1 ^b
		1	0.21 ± 0.03 ^{a,b}	76.43 ± 2.2 ^b
		2	0.27 ± 0.02 ^a	77.10 ± 2.2 ^b

*En base seca. Datos promedio de 6 observaciones y error estándar de la media. Letras diferentes en la columna indican grupos con diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias de Tukey.

Tabla 2. Coeficientes estimados, errores estándar, valores de t- y p- para el modelo de la Ec. (2).

Variable	Coeficientes	Error estándar	T	p
β_0	14.0394	3.2865	4.2719	<0.0001
β_i	164.7437	8.4921	19.3997	<0.0001
β_{ii}	-62.0844	3.9193	-15.8406	<0.0001

β_0 , β_i , β_{ii} son los coeficientes de regresión para el intercepto, los efectos de interacción lineal y cuadrática, respectivamente. X_i es la concentración de álcali (M).

3.1.2 Desproteínización

Posteriormente, se realizó la desproteínización de las muestras, en las cuáles los contenidos de proteína residual fueron determinados después de la DP. El tamaño de partícula no fue significativo ($p < 0.05$) para esta etapa del proceso. El análisis estadístico de los tratamientos de DP mostró que es viable reducir la concentración de hidróxido hasta 0.4 M, al no determinarse diferencias significativas ($p < 0.05$) en el porcentaje de desproteínización que fueron de 97 a 100% a temperatura ambiente. Los coeficientes estimados, errores estándar y valores de p fueron obtenidos a partir de los datos experimentales de porcentaje de DP y concentración de álcali y ajustados a la Ec. (2) cuadrática (Tabla 2).

$$y = 14.0394 + 164.7437X - 62.0844X^2$$

En la Tabla 3 se muestran los rendimientos de quitina obtenidos después de la DM y DP, así como los contenidos de proteína residual. Los rendimientos de β -quitina de *Dosidicus gigas* están entre un 28 hasta 34% los cuales se encuentran en el intervalo reportado para pluma de otros géneros como *Loligo* (Rhazi y col., 2000; Chaussard y Domard, 2004). Los tratamientos con concentraciones de hidróxido a partir de 0.8 M mostraron porcentajes bajos de proteína residual y para las concentraciones altas de álcali, 1 y 2 M, no se determinó proteína.

Los lavados con agua corriente en esta etapa no produjeron un aumento significativo del contenido de cenizas en las muestras aunque se incremento el contenido de calcio (Tabla 4).

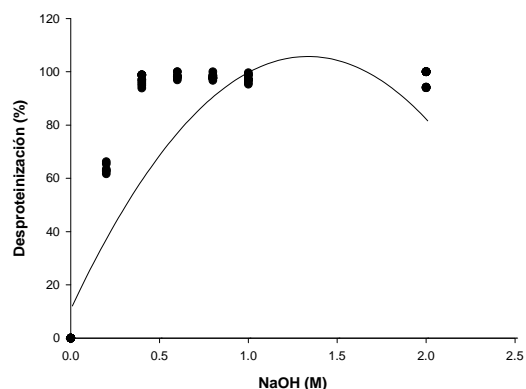


Fig. 3. Efecto de la concentración de NaOH sobre el porcentaje de desproteínización de pluma de calamar *Dosidicus gigas*.

Por otra parte se ha reportado el uso de varios ciclos de álcali para lograr la remoción total de proteína (Chaussard y Domard, 2004). Sin embargo en este trabajo se observó que la DP con un ciclo adicional de tratamiento alcalino a 100 °C solo produjo una extracción adicional de alrededor del 10% con respecto a la realizada en el primer paso y una significativa depolimerización. Sin embargo, es importante considerar que es necesario profundizar en el estudio de cinéticas de desproteínización y desacetilación ya que el incremento de temperatura puede disminuir el tiempo de reacción sin afectar el M_v .

Tabla 3. Gasto de agua durante la etapa de desproteínización, proteína residual y rendimientos después de los tratamientos (ácido/álcali) con respecto a la materia inicial.

Tipo de agua	HCl (M)	NaOH (M)	Tamaño de partícula (mm)	Agua (L/g)	Proteína residual (g proteína/100g quitina)	Rendimiento (g quitina/100g pluma)*
CORRIENTE	0.2	0.2	0.5	0.22	6.31	30.69
			1	0.18	6.39	31.41
			2	0.20	7.74	30.46
		0.4	0.5	0.38	1.51	28.48
			1	0.24	1.47	32.03
			2	0.30	3.37	26.67
	0.6	0.5	0.28	0.62	31.94	
		1	0.25	1.25	31.13	
		2	0.25	2.44	31.62	
	0.8	0.5	0.20	0.56	30.68	
		1	0.24	0.49	30.98	
		2	0.25	1.22	31.44	
	1	1	0.5	0.20	0.19	31.53
			1	0.24	0.45	31.73
			2	0.24	1.32	31.22
	2	1	0.5	0.27	0.00	33.80
			1	0.28	0.00	33.40
			2	0.32	0.00	33.90
	0.2	0.2	0.5	0.28	11.87	30.11
			1	0.26	12.47	31.39
			2	0.25	12.46	30.30
		0.4	0.5	0.43	1.04	31.68
			1	0.42	1.39	33.03
			2	0.45	1.88	32.50
0.6	0.5	0.34	0.65	32.50		
	1	0.32	0.85	33.74		
	2	0.32	1.37	33.59		
0.8	0.5	0.44	0.00	33.54		
	1	0.40	0.37	33.95		
	2	0.40	0.54	33.50		
1	1	0.5	0.37	0.00	29.54	
		1	0.44	0.00	33.55	
		2	0.39	1.45	32.17	
2	1	0.5	0.13	0.00	32.67	
		1	0.30	0.00	32.00	
		2	0.52	0.00	32.83	
DESTILADA	1	2	0.5	0.08	0.00	32.13
			1	0.09	0.00	33.97
			2	0.13	0.00	32.03

*En base seca. Los valores de error estándar de los resultados fueron menores al 5%.

Tabla 4. Características de las quitinas con mayor pureza y sus respectivos quitosanos.

Especie/ tratamiento	Quitina		Quitosano		
	% Proteína residual	% Cenizas	% Calcio ($\times 10^{-10}$)	% Solubles en ácido acético	M_v (g/mol)
<i>Dosidicus gigas</i> ¹ (sin ningún tratamiento)	34.7 \pm 0.04	7.5 \pm 1.5	0.6 \pm 0.2 (1.33 ppm)	ND	ND
<i>Dosidicus gigas</i> ¹ (HCl 1M; NaOH 2M 25 °C) 0.5 mm. Agua corriente. Desacetilación homogénea (NaOH 65%)	0	4.5 \pm 0.5	1.2 \pm 0.001 (0.48 ppm)	95 \pm 0.2	534
<i>Dosidicus gigas</i> ¹ (HCl 1M; NaOH 2M con reflujo a 100°C), 0.5 mm. Agua destilada. Desacetilación homogénea (NaOH 65%)	0	3.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.005 (0.34 ppm)	94 \pm 4.2	191
Quitina comercial	0	1.1 \pm 0.4	0.14 \pm 0.09 ppm	ND	ND
<i>Loligo</i> ²	2	2.4	80 ppm	ND	ND
<i>L. plei</i> y <i>sanpaulensis</i> ³	ND	0.5	1.7 ppm	ND	ND
<i>L. lucinade</i> ⁴	ND	ND	ND	ND	612
<i>Loligo</i> ⁵	ND	ND	ND	ND	428

¹En este estudio; ²Jang y col., (2004); ³Lavall y col., (2007); ⁴Lamarque y col., (2005); ⁵Chaussard y Domard (2004). ND No determinado.

3.1.3 Gasto de agua del proceso de extracción de β -quitina

Durante la extracción de la β -quitina con las condiciones probadas, se determinó el gasto de agua de los lavados de las muestras para neutralizar después de cada etapa del proceso y su rendimiento, es decir, DM (Tabla 1) y DP (Tabla 3). En ambas etapas los principales factores con efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el gasto de agua fueron la concentración de ácido y de álcali, es decir, a menor concentración menor gasto de agua. Sin embargo para el caso de la DM el tipo de agua y tamaño de partícula si fueron significativos, por ejemplo, con el tamaño de partícula de 0.5 mm de diámetro se observaron ahorros de agua corriente de hasta $36 \pm 0.016\%$, en el caso de la DM, con respecto a agua destilada. Esto es relevante ya que representa un ahorro económico importante del proceso de extracción de quitina.

En la desproteinización, se determinó que no hubo diferencias significativas en el gasto de agua en los tratamientos con hidróxido de 1 a 0.4 M. En este caso no hubo efecto por parte del tipo de agua y el tamaño de partícula. No obstante, el gasto de agua total del proceso (suma de valores de la Tabla 1 y 3) se obtuvieron ahorros de hasta $25 \pm 0.02\%$ de agua corriente con respecto al agua destilada, esto debido principalmente al ahorro obtenido durante la DM.

3.2 Caracterización de β -quitina

El estudio de espectroscopía de infrarrojo fue realizado en muestras de quitina que provenían de pluma de calamar con tamaño de partícula de 0.5 mm, desmineralizadas con HCl 1M, desproteinizadas con NaOH 2M a 25 °C, lavadas con agua destilada y su respectivo quitosano (Fig. 4). Se observan las bandas de los grupos característicos de la quitina, tales como C-O a 1070 cm^{-1} , amida primaria y secundaria a los 1656 y 1559 cm^{-1} , respectivamente y a 3420 cm^{-1} para O-H y N-H (Fig. 4a).

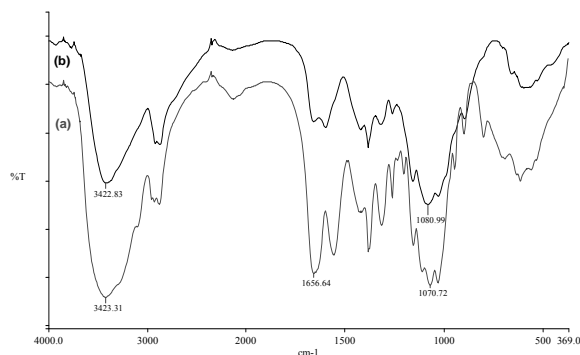


Fig. 4. Espectros de infrarrojo obtenidos en muestras tratadas con HCl 1M, NaOH 2M, desproteinizado a 25 °C, tamaño de partícula 0.5 mm y lavada con agua corriente (a) β -quitina y (b) quitosano.

3.3 Obtención y caracterización de quitosano

En cuanto al quitosano se observa en el estudio de espectroscopía de infrarrojo (Fig. 4b), que las bandas características de 1070 cm^{-1} de la quitina han cambiado a 1080 cm^{-1} esto debido a depolimerización y desacetilación. Se hace evidente la aparición de una banda a 1597 cm^{-1} con el doblete característico debido a la desacetilación (Duarte y col., 2000). Las bandas de deformación axial NH (3264 y 3106 cm^{-1}) correspondientes a enlaces intermoleculares hidrógeno carbonilo (C=O...H-N) evidentes en α -quitina no son observados en el espectro de FTIR de β -quitina por lo que no se observan cambios con la desacetilación en esta región (Campana-Filho y col., 2007).

El grado de acetilación (DA) del quitosano fue determinado por resonancia magnética nuclear en 26 % (Fig. 5). El DA fue calculado por el cambio de intensidad de la señal del protón metil del residuo de (1-4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucano con la referencia de los protones H-2 al H-6 de la estructura completa en los espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear de acuerdo a Hirai y col. (1991).

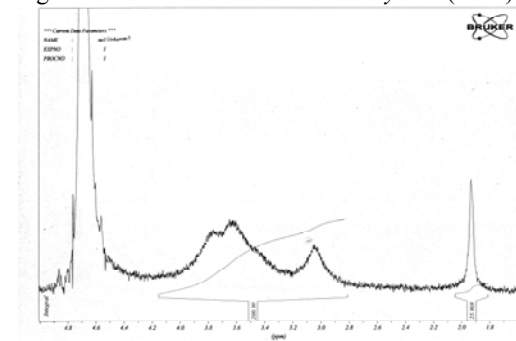


Fig. 5. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN¹H) del quitosano obtenido a partir de β -quitina.

La caracterización de las muestras obtenidas con los mejores tratamientos se presenta en la Tabla 4. La β -quitina tuvo calidad equiparable con la quitina comercial utilizada como referencia, mientras que el quitosano obtenido presenta una calidad alta de acuerdo a lo reportado por Jang y col., (2004) y Lamarque y col., (2005) en cuanto al grado de acetilación. El quitosano obtenido en este trabajo presentó alrededor del 0.5 % de insolubles en ácido acético (0.1 M), es decir solubilidad en el mismo de 95%, rendimientos del 73% con respecto a la quitina, M_v de 534 g/mol y grado de acetilación de 26%.

3.3.1 Gasto de agua en el proceso de obtención de quitosano

El rendimiento de quitosano obtenido por desacetilación homogénea fue de 73 ± 0.045 % con respecto a la quitina y 20 % con respecto a la pluma de calamar inicial, con gastos de agua corriente de

2.8 ± 0.1 L/g en la desacetilación homogénea, utilizando álcali al 65%. Sin embargo la aplicación de otras técnicas de desacetilación, como es el caso de la desacetilación heterogénea con ciclos de congelamiento y descongelamiento (Lamarque y col., 2005), puede reducir la concentración de álcali y con ello se reduciría el gasto de agua y se podría evitar la depolimerización del quitosano.

Los rendimientos de quitosano en general fueron del 60 al 80% con respecto a la quitina y de 20 a 28 % con respecto a la pluma de calamar, los valores más bajos se obtuvieron con las condiciones de DM y DP más severas (HCl 1 y NaOH 2 M), debido al efecto de depolimerización durante el proceso de extracción como se mencionó anteriormente.

Conclusiones

Las características del quitosano dependen en gran medida no solo de la fuente, sino también del método de obtención. Los requerimientos de desacetilación y M_v del quitosano pueden variar en función de la aplicación deseada, un ejemplo es su actividad antimicrobiana, la cual está en función del número de grupos aminos disponibles. En este estudio, el tipo de agua utilizada en los lavados después de DM afecta la calidad de quitina obtenida, sin embargo no fue un factor significativo para la etapa de desproteización. Es factible el uso de agua corriente lo que disminuye un costo del proceso. Finalmente se encontró que los rendimientos así como contenido de proteína residual, cenizas, calcio, grado de acetilación y M_v se encuentran dentro de los valores reportados por otros autores mostrando así la viabilidad del proceso propuesto.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por CONACyT (No. 46173) para la realización de este trabajo. ZRP da las gracias por la beca otorgada por el mismo proyecto y a la Unión Europea (proyecto Alfa Polylyfe). Los autores también agradecen a la empresa Bona Pesca S. A. de C.V. por donar las plumas de *Dosidicus gigas*. Así como a Ricardo Rosas del departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica de la Universidad Autónoma Metropolitana por su apoyo técnico en las determinaciones de calcio.

Referencias

- Anónimo (2003). Anuario estadístico de pesca. SAGARPA. Gobierno de México.
- A.O.A.C. (1990). *Methods of Analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Benoît-Bird K. J., Gill W. F., Au W. W. L., Mate B. (2007). Controlled and in situ target strengths of the jumbo squid *Dosidicus gigas* and

- identification of potential acoustic scattering sources. *Journal of the Acoustical Society of America* 123(3), 1318–1328.
- Campana-Filho S. P., De Britto D., Curti E. Abreu F. R., Cardoso M. B., Battisti M. V., Sim P. C., Goy R. C., Signini R., Lavall R. L. (2007). Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. *Química Nova* 30(3), 644-650.
- Chandumpai A., Singhpibulporn N., Faroongsarnng D., Sornprasit P. (2004). Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers* 58, 467–474.
- Chaussard G., Domard A. (2004). New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules* 5, 559-564.
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M., Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37, 1359-1366.
- De la Cruz-González, F.J., Aragón-Noriega E.A., Urciaga-García J.I., Salinas-Zavala C.A., Cisneros-Mata M.A., Beltrán-Morales L.F. (2007). Análisis socioeconómico de las pesquerías de camarón y calamar gigante en el noroeste de México. *Interciencia* 32(3), 144-150.
- Duarte M. L., Ferreira M.C., Marvão M. R. (2000). A statistical evaluation of IR spectroscopic methods to determine the degree of acetylation of α -chitin and chitosan. En *Avance of Chitin Science*. 4, Pp. 367- 374. Eds Meter M. G., Domard A. and Muzzarelli R. A. A. University of Potsdam.
- Hirai A., Odani H., Nakajima A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by H^1 -NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* 26(1), 87-94.
- Jang M-K., Kong B-G., Jeong Y-I., Lee C. H., Nah J-W. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science* 42, 3423-3432.
- Kasaai M.R., Arul J., Charlet C. (2000). Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science* 38 (19), 2591-2598.
- Kjoniksen A. L., Nystrom Bo., Iversen C., Nakken T., Palmgren O., and Tande T. (1997). Viscosity of dilute aqueous solution of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue at conditions of salt and surfactant concentrations. *Langmuir* 13, 4948-4952.
- Kurita K., Tomita K., Tada T., Ishii S., Nishimura S-I., and Shimoda K. (1993). Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation Behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Chemistry* 31, 485-491.
- Lamarque G., Viton C. M., Domard A. (2005). New Route of Deacetylation of α - and β - Chitins by means of freeze pump out thaw cycles. *Biomacromolecules* 6, 1380-1388.
- Lavall R. L., Assis O. B.G., Campana-Filho S. P. (2008). β -Chitin from the pens of *Loligo sp.*: Extraction and characterization. *Bioresource Technology* 98, 2465–2472.
- Rhazi M., Desbrières J., Tolaimate A., Alagui A and Vottero P. (2000). Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the chemical characteristics of chitosan. *Polymer International* 49, 337-344.
- Saito Y. y Osakada K. (2006). *JP Patent number JP2006321961-A+*. International Patent Classification C08B-037/00; C08B-037/08.
- Shirai K., Guerrero L.I., Hall G. M. (1996). La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia* 47(4), 317- 328.
- Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer* 44, 7939–7952.