

## Influencia de tratamientos químicos sobre el rendimiento y calidad del quitosano de exoesqueletos de cangrejos

Influence of chemical treatment on yield and quality of chitosan from crabs exoskeletons

Irán E. Parra Castillo<sup>1,2\*</sup>, Gerson E. Chávez Narváez<sup>2</sup>,  
Milangel de J. Luzardo Morillo<sup>2</sup>, Adriana C. López Márquez<sup>3</sup>,  
Lisette Ch. Montilla Cantillo<sup>1</sup>, Alexandra L. Vera Bonilla<sup>1</sup>,  
Bélgica B. Bravo Tovar<sup>2</sup>, Nacarid del V. Delgado Parra<sup>2</sup> y  
Nelson Márquez Salas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia.

<sup>2</sup>Laboratorio de Petroquímica y Surfactantes, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. <sup>3</sup>Laboratorio de Química Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

### Resumen

Existe un exceso importante de residuos de exoesqueletos de cangrejos que impactan al ambiente, y la obtención de quitosano a partir de estos materiales es importante por su alta aplicabilidad; por tanto es necesario estudiar el efecto de los procesos químicos sobre las propiedades y la calidad comercial de este biopolímero. Se evaluaron seis métodos modificando los procesos de desmineralización, desproteinización, despigmentación y desacetilación para la obtención de seis quitosanos. La desmineralización fue el proceso con mayor influencia sobre el rendimiento y pureza de la quitina. Los espectros de infrarrojo corroboraron la obtención del quitosano con los métodos aplicados, presentando valores de grado de desacetilación entre  $78,77 \pm 3,99$  a  $93,11 \pm 0,36\%$ . Los métodos M3 y M6 resultaron más eficientes porque se logró obtener dos biopolímeros con mayor pureza y adecuadas propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas. Las condiciones para la obtención del quitosano tienen un efecto en la calidad final del producto.

**Palabras clave:** cangrejos, exoesqueletos, residuos, biopolímero, quitosano.

Recibido el 06-02-2017 • Aceptado el 07-05-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: iranparra@fa.luz.edu.ve

## Abstract

There is a significant excess of crabs exoskeletons residues that impact the environment, and chitosan obtaining from these materials is important due to its high applicability; therefore it is necessary to study the effect of chemical processes on the properties and commercial quality of this biopolymer. Six methods by changing the processes of demineralization, deproteinization, depigmentation and deacetylation to obtain six chitosans were evaluated. Demineralization was the process with the greatest influence on the yield and purity of chitin. The infrared spectra corroborated the obtaining of the chitosan with the applied methods, presenting deacetylation degree values between  $78.77 \pm 3.99$  to  $93.11 \pm 0.36\%$ . M3 and M6 methods were more efficient where it was possible to obtain two biopolymers with higher purity and good chemical, physicochemical and microbiological properties. The conditions for chitosan obtaining have an effect on the final quality of product.

**Keywords:** Crabs, exoskeletons, residues, biopolymer, chitosan, quality.

## Introducción

Las empresas procesadoras de carne de cangrejos generan gran cantidad de residuos de exosqueletos que contribuyen a la contaminación ambiental, y constituyen una fuente principal de dos biopolímeros de alto valor agregado y de aplicación mundial: la quitina y su derivado funcional, el quitosano. El método químico para el aislamiento de quitina de cangrejos implica varias etapas principales: inicialmente la eliminación de la materia inorgánica en medio ácido diluido (desmineralización), que por lo general se logra mediante el uso de HCl diluido; seguido de la extracción de proteínas en medio alcalino (desproteínización), mediante el tratamiento con soluciones acuosas de NaOH o KOH. La conversión de quitina a quitosano implica, por lo general un tratamiento alcalino a altas temperaturas. La eficacia de estas

etapas depende de la temperatura del proceso, la concentración de álcali y la relación de su solución con los exoesqueletos (De la Paz *et al.*, 2012). En este trabajo se estudió la influencia de los tratamientos termoquímicos en las propiedades del quitosano obtenido a partir de quitina aislada de los residuos de exoesqueletos del cangrejo azul.

## Materiales y métodos

Las muestras de residuos de exoesqueletos del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) se suministraron por una empresa del municipio San Francisco del estado Zulia. Como estándares se utilizó quitosano comercial de baja, media y alta masa molar (Aldrich, 98%). Todos los solventes y reactivos fueron grado análisis y se emplearon sin purificación previa. El tratamiento de las muestras se inició con la limpieza,

secado y molienda de los exoesqueletos para la obtención de una harina que se tamizó para seleccionar los sólidos con tamaño de partícula entre 180-250  $\mu\text{m}$ . Utilizando como masa inicial de 20,0 g de harina, se aplicaron cinco métodos (M1 a M5) reportados (Parada *et al.*, 2004; Mármol *et al.*, 2009; Pardo *et al.*, 2006; Ming-Tsung *et al.*, 2009; Al Sagheer *et al.*, 2009, respectivamente) y otro método (M6) como propuesta de esta investigación (desarrollado previamente por diseño factorial) para la obtención de seis quitosanos, modificando los procesos de desmineralización (DM), desproteínización (DP), decoloración (DC) y desacetilación (DA), por variación de la concentración de HCl

y NaOH, relación sólido/reactivo (R), tiempo de reacción (t), y temperatura (T) en el tratamiento de los exoesqueletos de cangrejos (cuadro 1). Los biopolímeros obtenidos (quitina y quitosano) se caracterizaron por espectrometría FTIR para determinar el grado de desacetilación (Parada *et al.*, 2004; Mármol *et al.*, 2009; Pardo *et al.*, 2006; Ming-Tsung *et al.*, 2009; Al Sagheer *et al.*, 2009). Las propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas se determinaron aplicando los métodos y técnicas reportadas ampliamente en la literatura como son: el índice de cristanilidad (ICR), masa molar promedio (Mw), masa molar viscosimétrica (Mv), viscosidad,

**Cuadro 1. Condiciones experimentales de los procesos aplicados para obtener quitina y quitosano (concentración de NaOH en %m/v).**

	DM	DP	DC	DA
M1	HCl 1,0 M, t = 3 h R = 1:10, T = amb.	NaOH 4,5%, t = 3 h R = 1:10, T = 65 °C	Éter de petróleo, agua, acetona	NaOH 70%, t = 2 h R = 1:20, T = 105 °C
M2	HCl 0,6 M, t = 3 h R = 1:11, T = 28 °C	NaOH 1,0%, t = 24 h R = 1:11, T = 28 °C	No aplica	NaOH 50%, t = 2 h R = 1:4, T = 100 °C
M3	HCl 2,0 M, t = 3 h R = 1:10, T = amb.	NaOH 1,0% y 10% t = 1,5 h, R = 1:2,5 T = 70 °C	Metanol 100%v/v	NaOH 40%, t = 4 h R = 1:10, T = 110 °C
M4	HCl 1,0 M, t = 6 h R = 1:10, T = amb.	NaOH 5,0%, t = 3 h, R = 1:10, T = 100 °C	KMnO <sub>4</sub> 1% Oxálico 5% m/v	NaOH 40%, t = 2 h R = 1:30, T = 105 °C
M5	HCl 0,25 M, t = 3 h R = 1:40, T = amb.	NaOH 4,0%, t = 24 h, R = 1:20, T = 70 °C	Etanol y acetona	NaOH 45%, t = 8 h R = 1:15, T = 110 °C
M6	HCl 1,5 M, t = 3 h R = 1:20, T = amb.	NaOH 5,0%, t = 3 h, R = 1:20, T = 70 °C	Acetona (Soxhlet)	NaOH 50%, t = 3 h R = 1:20, T = 110 °C

material insoluble (MI), cenizas, proteína residual, análisis elemental (%N y %C), concentración de metales tóxicos (As, Cd, Pb, Hg) y niveles microbiológicos (mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos, levaduras, y salmonella). Se asumió una varianza homogénea y los datos obtenidos se procesaron por comparación entre medias mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA - efecto fijo), para tres réplicas de mediciones, comprobando los resultados con otros métodos estadísticos de significancia como la prueba Tukey y la Kruskal-Wallis empleando el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.15.

## Resultados y discusión

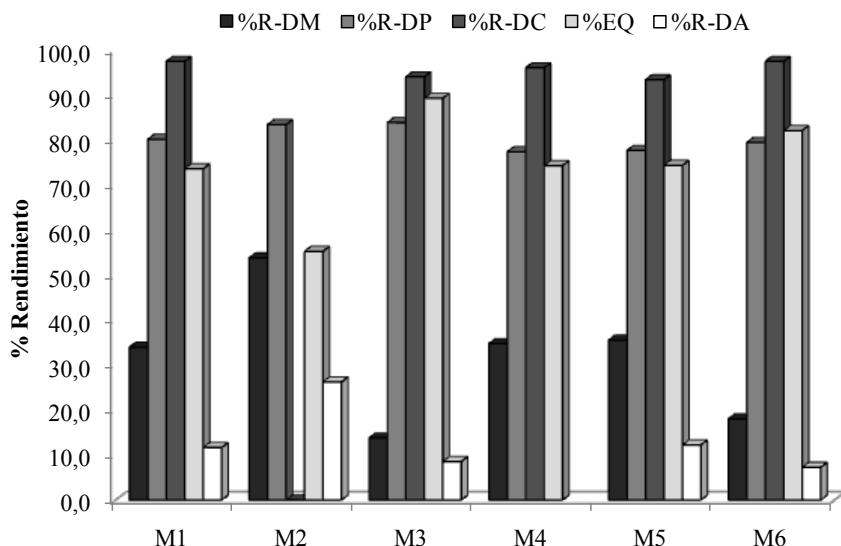
Modificando las condiciones de los procesos DM, DP y DC (cuadro 1) se obtuvieron las seis quitinas, y luego se aplicó el proceso DA para obtener los seis diferentes quitosanos. Tomando la masa final del sólido obtenido después de cada tratamiento, se determinó el rendimiento de la desmineralización (%R-DM), desproteínización (%R-DM) y decoloración (%R-DC), y se estudió el efecto de tales procesos sobre la eficiencia para el aislamiento de la quitina (%EQ). En el caso del quitosano, el rendimiento (%R-DA) se determinó con base en la masa inicial de harina y no de la quitina empleada. Como se puede observar en la figura 1, el %R-DP y %R-DC estuvo entre  $77,31 \pm 3,10$  a  $83,80 \pm 0,53$  y  $93,31 \pm 4,99$  a  $97,84 \pm 0,27$ , respectivamente, una variación que no fue notable comparado con el %R-DM que varió

de  $13,75 \pm 1,96$  a  $53,75 \pm 1,73$ , y que estuvo en similar proporción al rendimiento de quitina ( $10,82 \pm 1,59\%$  a  $44,80 \pm 1,26\%$ ).

Esto permite inferir que el proceso de desmineralización tiene una mayor influencia en el aislamiento de la quitina.

Con el método M2 la desmineralización no fue adecuada debido a la alta cantidad de material sólido calcáreo sin reaccionar, originando el mayor rendimiento de desmineralización (%R-DM =  $53,75 \pm 1,73$ ), lo que constituye una menor liberación de la quitina disponible y una deficiencia en su extracción (%EQ =  $55,20 \pm 1,26$ ). Con los métodos M1 y M5 la desmineralización tuvo un efecto adecuado para eliminar los minerales ya que disminuyó buena parte de la harina inicial (%R-DM =  $33,93 \pm 0,38$  y  $35,50 \pm 1,71$ , respectivamente) y por tanto la quitina estuvo más liberada (aislada), obteniendo una eficiencia de %EQ =  $73,54 \pm 0,03$  y  $74,32 \pm 0,32$ , respectivamente.

El método M3 presentó el menor rendimiento de quitina (10,82%) lo que demuestra que las condiciones originaron una alta pérdida de minerales (%R-DM =  $13,75 \pm 1,96$ ), favoreciendo una buena liberación de la quitina (%EQ =  $89,18 \pm 1,59$ ). Para el caso del método M6 la desmineralización también provocó una buena pérdida del material calcáreo de los exoesqueletos (%R-DM =  $18,01 \pm 0,65$ ) facilitando la disponibilidad de la quitina, similar al método M3. No se encontró una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre la eficiencia para obtener Qa3



**Figura 1. Comparación de los rendimientos obtenidos de los diferentes procesos aplicados, y la eficiencia para la obtención de quitina (%EQ).**

y Qa6 (%EQ =  $81,98 \pm 0,15$ ). El grado de desacetilación (GDA) para las quitinas se obtuvo en general entre 4,76 a 30,23%, es decir que presentó un grado de acetilación (grupos acetilglucosamina) entre 95,24 a 69,67%, lo que demuestra la obtención del biopolímero, como se comprobó con las señales de los espectros FTIR. En el caso de la Qa4 no fue posible realizar la determinación debido a la desnaturalización y oxidación del biopolímero por efecto del  $\text{KMnO}_4$  y ácido oxálico (cuadro 1), siendo descartada para la obtención del quitosano. Utilizando los espectros FTIR se determinó el GDA de los quitosanos obteniendo valores entre  $78,77 \pm 3,99$  a  $93,11 \pm 0,36\%$ . Para todos los procesos empleados se obtuvieron quitosanos de partículas

pequeñas con coloración de blanco a crema. El rendimiento obtenido a partir de la quitina estuvo entre  $44,04 \pm 1,53$  a  $78,07 \pm 3,01\%$ , y respecto a la masa inicial de harina de exoesqueleto el rendimiento no superó el  $26,21 \pm 4,39\%$ . Las condiciones de M3 y M6 favorecieron la obtención del quitosano con rendimiento de  $8,53 \pm 2,32$  y  $7,24 \pm 0,21\%$ , respectivamente, que a pesar de ser bajo es adecuado debido a la alta eliminación de los componentes de los exoesqueletos.

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de los quitosanos, así como la calidad basado en los niveles de toxicidad (metales pesados y microbiológicos), encontrando diferencias significativas marcadas en la mayoría de los valores encontrados ( $p < 0,05$ ). El ICR tuvo una tendencia

proporcional al GDA encontrando un aumento del valor a medida que se incrementa el GDA. Los valores de viscosidad tuvieron una estricta relación con los valores de Mw y Mv. La pureza del biopolímero se estableció con el contenido de MI y cenizas, los cuales fueron bajos para los quitosanos de los procesos más eficientes (M3 y M6), y este comportamiento fue similar con el contenido de proteína. El %N y %C se encontró en el intervalo reportado para quitosanos con GDA > 75%. En el caso de los metales todas las concentraciones se encontraron a niveles trazas ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) indicando que se pueden utilizar como productos de consumo o uso humano (As < 0,5mg.kg<sup>-1</sup> y los otros metales < 10mg.kg<sup>-1</sup>). Los niveles microbiológicos indican que los quitosanos Qo1, Qo3 y Qo6 no presentan un riesgo potencial de intoxicación alimentaria dado que no presentaron ninguno de los patógenos determinados, cumpliendo así con lo requerido para productos alimenticios (< 100 ufc.g<sup>-1</sup>). Los quitosanos obtenidos presentaron valores de GDA similares a los reportados en los métodos publicados (Parada *et al.*, 2004; Mármol *et al.*, 2009; Pardo *et al.*, 2006; Ming-Tsung *et al.*, 2009; Al Sagheer *et al.*, 2009), sin embargo no se encontraron referencias para comparar las características de calidad fisicoquímica y microbiológica.

## Conclusiones

Aplicando diferentes procedimientos para el tratamiento termoquímicos de exoesqueletos de cangrejo fue posible obtener quitina y quitosano

con diferentes grados de acetilación. Los resultados demuestran la gran influencia que tiene el proceso de desmineralización sobre el rendimiento y pureza de la quitina, y por tanto también sobre las características del quitosano. Los diferentes procesos de desacetilación de la quitina permitieron obtener varios quitosanos con distintos GDA y tamaños moleculares. Los métodos M3 y M6 resultaron más eficientes, debido a que se obtuvieron biopolímeros con mayor pureza y adecuadas propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas.

## Agradecimientos

Al CNTQ, FONACIT-PEII y al CONDES-LUZ por el financiamiento otorgado.

## Literatura citada

- Al Sagheer, F., M. Al-Sughayer, S. Muslim, M. Z. Elsabee. 2009. Extraction and characterization of chitin and from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*. 77: 410-419.
- De la Paz, N., M. Fernández, O. López, A. Nogueira, C. García, D. Pérez, J. Tobella, Y. Montes, D. Díaz. 2012. Optimización del Proceso de Obtención de Quitosano Derivada de la Quitina de Langosta. *Rev. Iberoam. Polím.* 13: 103-116.
- Mármol, Z., E. Gutiérrez, G. Páez, J. Ferrer, M. Rincón. 2004. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. 4: 1-11.
- Ming-Tsung, Y., Y. Joan-Hwa, M. Jeng-Leun. 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 75: 15-21.

- Parada, L., G. Crespín, R. Miranda, I. Katime. 2004. Caracterización de Qitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. Rev. Iberoam. Polím. 5: 1-16.
- Pardo, A., P. Salazar, M. Colina, R. Salas, B. Montilla. 2006. Adsorción del cobre y cobalto utilizando quitosano obtenido a partir de los desechos de la industria camaronesa y cangrejera. Labciencia. 4: 14-16.