

EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN QUÍMICA DE QUITINA Y QUITOSANO A PARTIR DE DESECHOS DE CANGEJOS. ESCALA PILOTO E INDUSTRIAL

Marinela Colina^{1,2}, Andrés Ayala², Dianela Rincón¹, José Molina¹, Jairo Medina¹, Rubén Ynciarte¹, José Vargas¹, Brinolfo Montilla²

1. Empresa Mixta Innovación Ambiental Quitosano CA (INNOVAQUITO). Av 4 San Francisco No 29–25 Sector San Benito. Maracaibo. Venezuela. Correo electrónico: colinamarinela@gmail.com

2. Laboratorio de Química Ambiental. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela

Recibido: Agosto 2013; Aceptado: Noviembre 2013

RESUMEN

En este trabajo, se evaluaron las condiciones de operación de los procesos químicos que se realizan para la obtención de quitina y quitosano en un reactor piloto y se comparó con un reactor industrial.. utilizando los exoesqueletos de cangrejo de la variedad de cangrejo azul (*Callinectes sapidus*). Se evaluó el proceso de desproteíniación, desmineralización, decoloración para la obtención de quitina y luego las mejores condiciones para la desacetilación. Se obtuvo quitosano, con distintos grados de desacetilación comprendidos entre 82,52 hasta – 95,01% calculados por espectrometría infrarroja de transformada de *Fourier* tomando en cuenta la relación de bandas A_{1320}/A_{1420} . La quitina y el quitosano se elaboraron a partir de desechos de la industria cangrejera El proceso para la obtención de quitosano se realizó siguiendo los cuatro pasos fundamentales, la desproteíniación del exoesqueleto con NaOH al 10%, para la desmineralización se utilizaron dos ácidos (ácido clorhídrico y ácido fosfórico) a diferentes concentraciones y variando el tiempo de reacción para determinar que ácido es más apto para la remoción de los minerales, la decoloración se realizó con etanol y comparado con otros alcoholes, por último la hidrólisis termoalcalina de los grupos acetamida de la quitina con NaOH al 30%. Los quitosanos obtenidos se caracterizaron mediante FTIR donde se observaron las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano, como es la banda del grupo amino a 1.621 y 1.650 cm^{-1} del grupo acetamida. Adicionalmente, se midieron los parámetros de porcentaje de ceniza, humedad. Los resultados muestran que la deproteíniación se debe hacer en menos de 2 horas, el ácido clorhídrico y el ácido fosfórico son igualmente buenos en la desmineralización. Con un buen tratamiento se pueden obtener quitosanos con alta masa molar y alto grado de desacetilación.

Palabras claves: Quitina, quitosano, reactor piloto, procesos de obtención.

ABSTRACT

In this work, the operation conditions for the chemical processes to obtain chitin and chitosan were evaluated in a pilot reactor and it was compared with an industrial one. The process of deproteinization, demineralization and decoloration were evaluated and the better conditions for the deacetylation. Chitosan with degree of deacetylation between 82.52 and 95.01 % were obtained calculated by Infrared *Fourier* Transformed Spectrometry, using which take in account the relations between the bands A_{1320}/A_{1420} . The chitosan obtention was performance using crab wastes from the industry with the exoskeleton of blue crab (*Callinectes sapidus*). The main four steps for chitosan obtation were desproteinization with NaOH 10%, a desmineralization using two acids (Hydrochloric acid and phosphoric acid) of two different concentrations with reaction time variations to determine the more acceptable acid for the remotion of minerals, the decoloration was made with ethanol and compared with other alcohol the last step by thermoalcaline hydrolysis of the chitin with 30% NaOH. The obtained chitosan were characterized by FTIR where the bands of the functional groups characteristics for chitosan were observed, the amine group band at 1,621 and 1,650 cm^{-1} , the acetamide group (amide I). Additionally ashes percentage and humidity were measured.

Keywords: chitin, chitosan, pilot reactor, obtention process.

INTRODUCCIÓN

La quitina y su principal derivado el quitosano son considerados como polímeros biofuncionales con amplia aplicación en el área de la biotecnológica, ya que además de ser recursos

abundantes y renovables, también presentan diversas propiedades que incluyen: la biodegradabilidad y biocompatibilidad [1].

Tanto la quitina como el quitosano son copolímeros lineales de residuos de *N*-glucosamina (D-GlcN) y *N*-Acetil glucosamina (D-GlcNAc) distribuidos al azar y unidos mediante un enlace β -1,4 que produce una estructura rígida no ramificada (Figura 1).

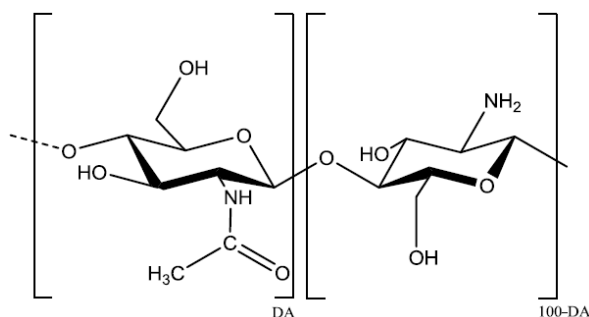


Figura 1. Estructura primaria de la quitina y el quitosano.

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (hongos, algas, protozoos, moluscos, artrópodos entre otros), sin embargo el exoesqueletos de artrópodos es la fuente más accesible, en especial los crustáceos marinos como cangrejos y camarones ya que se encuentran disponibles como desecho de la industria marisquera [2]. Los crustáceos son la mayor fuente de quitina a nivel industrial con una producción de entre 2.200 Ton [3]. El contenido de quitina en crustáceos varía entre 2–12% del total de masa corporal, el contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides en el exoesqueleto de crustáceos varía dependiendo de la especie, parte del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo. El exoesqueleto contiene alrededor del 15–40% de quitina (α -quitina), proteínas alrededor del 20 al 40% y carbonato de calcio entre 20–50%, como componentes principales, y presenta en menor cantidad pigmentos y otras sales metálicas. La proteína proviene del tejido conectivo, el contenido de minerales está influenciado con la edad y ciclo reproductivo del crustáceo, las especies más viejas presentan un exoesqueleto mucho mas calcificado y baja cantidad de quitina y la cantidad de lípidos es generalmente debido a residuo de musculo o vísceras. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de proteínas, cenizas, lípidos y quitina presentes en algunas especies de crustáceos estudiados.

El exoesqueleto de crustáceos es una capa no celular secretada por la epidermis, el cual se encuentra formando una organización jerárquica de varios niveles estructurales. En el nivel molecular se encuentra la quitina, la cual mediante su alineamiento antiparalelo forma estructuras altamente cristalinas, el siguiente nivel estructural es el arreglo entre las moléculas que se encuentran ligadas en la periferia a proteínas globulares formando estrechas unidades llamadas

nanofibrillas, el tipo de proteínas presentes contiene β -aminoácidos como la glicina, tirosina, glicoproteínas conteniendo residuos histidilo y aspartilo, ácido aspártico, serina y glicina [4].

Tabla 1 Composición química proximal en porcentaje (v/v)% en base seca del exoesqueleto de crustáceos.

Fuente de quitina		Proteína	Quitina	Ceniza	Lípidos
cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	22	31	46	1.0
camaron	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Cragon cragon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Langosta	<i>Procambarus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
krill	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

Las nanofibrillas de quitina-proteína se agrupan formando racimos, que a su vez forman capas planas horizontales y paralelas de fibrillas que cambian de dirección de un plano a otro en continua rotación, Este complejo forma una red o lámina que agrupa a la quitina y proteínas con minerales que se encuentran por lo general en forma de cristales de CaCO_3 y lípidos [5] (Figura 2). Dentro del complejo quitina-proteína-minerales se encuentran distintos tipos de carotenoides como la luteína, β -carotena, astaxantina y derivados que se encuentran formando conjugados con las proteínas, combinados con los grupos amino de la quitina mediante enlaces carbonilamino [4].

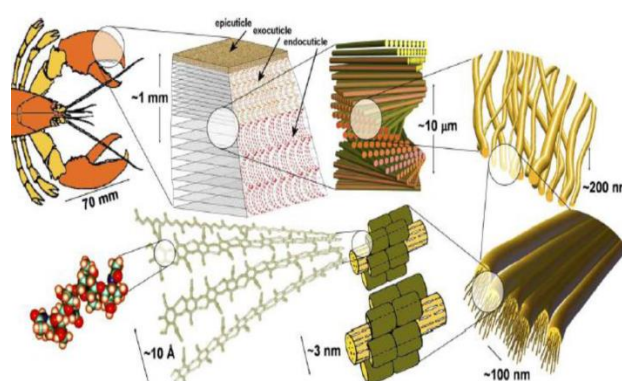


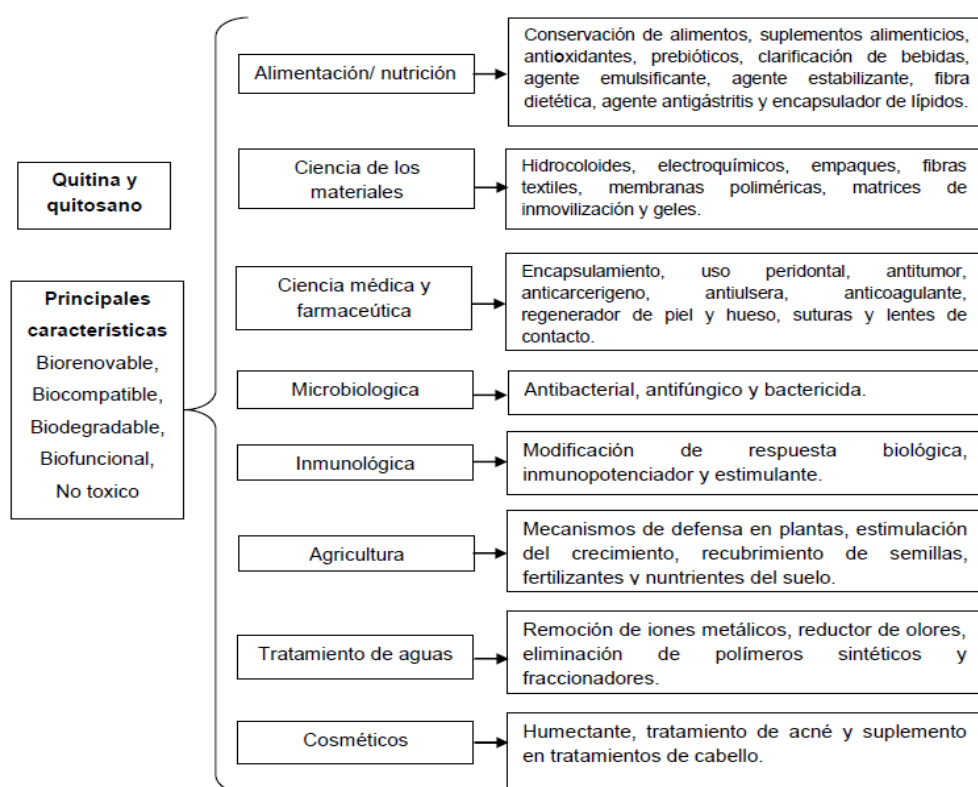
Figura 2. Estructura microfibrilar del exoesqueleto de crustáceos de acuerdo a [5].

El quitosano presenta una baja toxicidad, es inerte en el tracto intestinal de mamíferos, es biodegradable debido a la presencia de quitinasas distribuidas ampliamente en la naturaleza en bacterias, hongos y plantas, así como en el sistema digestivo de diversos animales. La Tabla 2

muestra las aplicaciones más comunes del quitosano.

Obtención de quitina y quitosano. Las técnicas de extracción encontradas en la literatura son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente, la composición del material de partida varía notablemente de una especie a otra. La mayor parte de las técnicas desarrolladas descansan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. Algunos incluyen un paso de decoloración de la quitina extraída, mediante una extracción con solvente o la oxidación de los pigmentos remanentes.

Tabla 2. Aplicaciones del quitosano de acuerdo al área [3,6].



En general los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos: acondicionamiento de la materia prima, extracción de la proteína (desproteinización), eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización), y decoloración de la quitina. La quitina resultante es desacetilada, si por este tratamiento la quitina es desacetilada en más de un 50% se produce el quitosano y cuando el grado de desacetilación alcanza el 100% el polímero se conoce como quitano Figura 2 [7].

Procesos para la obtención de quitina y quitosano. A continuación se brindará una breve información sobre cada uno de estos procesos.

Acondicionamiento de la materia prima. Consiste en el lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismos. Posteriormente se procede a su molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros.

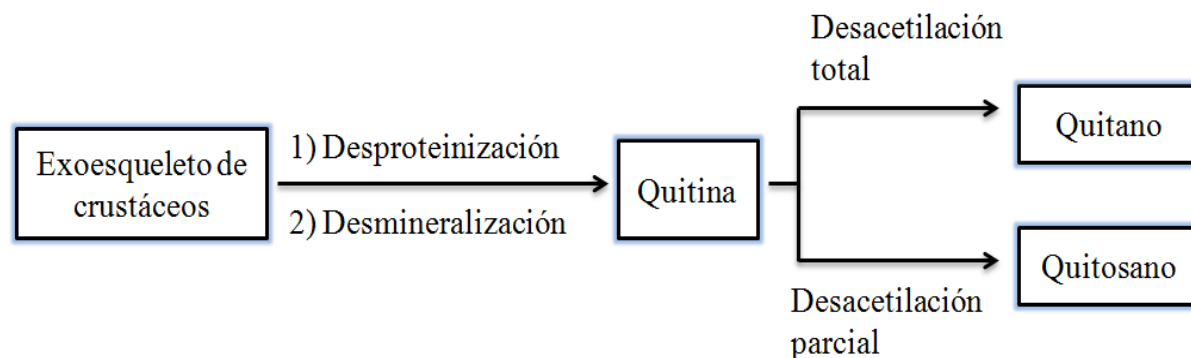


Figura 2. Proceso de obtención de quitina, quitosano y quitano [7].

Desproteínización. El procedimiento más comúnmente utilizado para desproteínizar consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura más bien alta (65–100°C), con el fin de disolver la proteína. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0,5 y 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero. También se han utilizado otros agentes para extraer la proteína, entre los cuales se mencionan los siguientes: Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, Na₃PO₄ y Na₂S [8].

Los procesos de desproteínización usando extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas se han probado con relativo éxito, pero la alternativa del tratamiento enzimático/microbiológico, además de consumir largo tiempo, suele dejar de 1–7% de proteína residual [9].

Desmineralización. El principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el CaCO₃, el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta 10%) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos (HNO₃, HCOOH, HNO₃, H₂SO₄, y CH₃COOH). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas más altas, que provocan la degradación del polímero [8]. Un tratamiento alternativo para disminuir la degradación consiste en el empleo del agente acomplejante EDTA (ácido etilendiaminotetracético) [10].

Decoloración. La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como la astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β-

caroteno. Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de disolventes [9]. También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H_2O_2 (0,5–3%) y el NaClO (0,32%), aunque debe tenerse presente que éstos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero. En caparazones fuertemente coloreados, como el de la langosta común, se ha reportado la utilización exitosa de tratamientos con mezclas de acetona y NaOCl a temperatura ambiente [11].

Obtención de quitosano. La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (30–50%) a temperaturas superiores a 100°C, preferiblemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras como el $NaBH_4$ o el Na_2SO_3 para evitar la despolimerización del polímero. Las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de partida, el tratamiento previo, y el grado de desacetilación deseado. No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo grado de desacetilación alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85%. Tratamientos prolongados suelen provocar la degradación del polímero sin traducirse en un aumento sensible del grado de desacetilación [12, 13].

Al igual que la celulosa, la quitina es un polímero semicristalino, de manera que cuando la desacetilación se realiza en fase heterogénea la reacción tiene lugar fundamentalmente en las regiones amorfas. La reacción en condiciones homogéneas permite una modificación más uniforme del polímero, y se realiza sobre *álcali quitina*. La misma se obtiene sometiendo una suspensión alcalina de quitina a tratamientos de congelación–descongelación hasta producir una solución acuosa de quitina en hidróxido de sodio. La desacetilación homogénea se lleva a cabo a concentraciones de álcali más moderadas (alrededor del 30%), a 25–40°C por tiempos de 12 a 24 horas [14].

Se ha podido demostrar que mientras que las quitosanas obtenidas en el proceso heterogéneo presentan polidispersidad en cuanto al grado de acetilación de sus cadenas, las obtenidas por vía homogénea tienen todas la misma composición [15].

En este trabajo se hace una evaluación de los diferentes parámetros para la obtención química de quitina y quitosano a partir de los desechos de cangrejo

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Todos los reactivos empleados se utilizaron sin ningún método de purificación previa. La desmineralización de la quitina se realizó con HCl *Riedel de Haën*), H_3PO_4 *Merck*. Para

la obtención del quitosano se utilizó sulfito de sodio (*Merck, G.A.*) como agente antioxidante, las reacciones de hidrólisis alcalina se llevaron a cabo con NaOH (98%, *Riedel de Haën*), y las reacciones de decoloración se llevaron a cabo con etanol (99%, *Fluka, Riedel de Haën*), se solubilizo con ácido acético (99,9%, *Merck*), se utilizaron patrones de quitina y quitosano de la casa comercial *Sigma-Aldrich*[®]. A escala industrial se utilizaron reactivos grado técnico suministrados por *Masuca*.

Equipos. Se utilizó un molino (*Trapp TRF 400*) para la molienda de los desechos, para medir las masas de los desechos industriales de cangrejos y Hidróxido de Sodio durante la extracción de la quitina y obtención del quitosano se uso una balanza digital (*Premier*) con sensibilidad ± 5 g, para el resto del proceso se utilizo una balanza analítica (*Kern 440-33N*) con sensibilidad $\pm 0,01$ g, para las reacciones de desproteínización, y desacetilación se utilizo un reactor de capacidad de 8 kg de diseño propio (fabricado por la empresa *Acerinox*) elaborado en acero inoxidable con camisa de calentamiento, válvula de seguridad y enfriamiento con agua. Se utilizó un agitador de fabricación propia. El reactor industrial fue diseñado y fabricado por la empresa *Innovación Ambiental Quitosano CA, Maracaibo, Venezuela*. Para la caracterización fisicoquímica se utilizó un Espectrómetro FTIR marca *Shimadzu* modelo FTIR 8300, viscosímetro capilar tipo *Ubbelohde* ASTM D445, estufa (Oven SO-030), y una mufla (*Thermolyne fb131511*).

Procedimiento

Obtención de la quitina y el quitosano. Para la obtención de la quitina y el quitosano se utilizaron exoesqueletos de cangrejo de la variedad (*Callinectes sapidus*) provenientes del *Lago de Maracaibo*, fueron suministradas por la empresa *PROMARCA*, ubicado en el *Municipio San Francisco del Estado Zulia*. Se recolectaron 8 kg de desechos al azar los cuales se molieron en un molino (*Trapp TRF 400*), para posteriormente realizar la desproteínización colocando la muestra en un reactor piloto de capacidad de 8 kg de diseño propio fabricado por la empresa *Acerinox*, en el cual se trataron con una solución de NaOH al 10% m/v en una proporción 1:1 (m:v) y sulfito de sodio al 1% como agente antioxidante para evitar la degradación del material y se calentó a 100–110°C durante 60 minutos, para disolver los restos de proteínas. Luego de lavar repetidas veces con abundante agua, se secaron los desechos a temperatura ambiente por 24 horas. Este procedimiento se realizó en un reactor de 10,3 m³ de capacidad en los cuales se introdujeron 2.000 kg de desechos molidos y se adicionó NaOH al 10 % en una relación 1:1 m/V. Se le determinó humedad y cenizas a los desproteínizados obtenidos en los dos reactores piloto e industrial. Luego se evaluó la efectividad del HCl y H₃PO₄ para la desmineralización de la quitina, utilizando diferentes concentraciones de ácido (1, 2, 3) molar con distintos tiempos de reacción (30 minutos, 1, 2, 3 y 4 h).

Se evaluó la mejor desmineralización variando la relación sólido/líquido 1/3, 1/5 y 1/7 a temperatura ambiente, para evitar la degradación del polímero. Se determinó la cantidad de Ca que pasa a solución para evaluar la desmineralización. La concentración de Ca se evaluó mediante Espectrofotometría de absorción atómica con un equipo *Perkin Elmer* 3110. La quitina obtenida se lavo con abundante agua, hasta un pH cercano a 7, para eliminar el ácido en exceso. Luego se filtró y lavó con abundante agua para decolorarlo repetidamente con etanol al 99%. Posteriormente, se desacetiló sometiéndola a un tratamiento termo alcalino con una solución al 30% de NaOH y sulfito de sodio al 1% durante 6 horas a 110–120°C, con el fin de hidrolizar los grupos acetamida en el C2 de la quitina. Por último, el quitosano se secó a temperatura ambiente por 48 horas.

Caracterización de la quitina y el quitosano

Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Los espectros de quitina se tomaron elaborando pastillas de KBr mezclando 2 mg de quitina con 148 mg de KBr seco. Para el espectro de quitosano se prepararon películas del mismo disolviendo 250 mg de quitosano en 50 mL de ácido acético al 6% (v/v) formándose un gel transparente y viscoso, este gel se colocó en moldes plásticos con un área de 13 cm de diámetro y luego se secaron a temperatura ambiente en ausencia de luz hasta la obtención de la película.

Las pastillas y películas fueron medidas con 50 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹ en un intervalo 400–4.000 cm⁻¹. Los espectros obtenidos se compararon con un patrón comercial de la casa *Sigma–Aldrich*[®]. El grado de desacetilación (GD) se determinó utilizando las ecuaciones (1) y (2) propuestas por *Brugnerotto* [16]:

$$A_{1320} / A_{1420} = 0,3822 + 0,03133 \cdot GA \quad (1)$$

$$GD^A = 100 - GA \quad (2)$$

Medidas viscosimétricas. Se realizaron en un viscosímetro capilar tipo *Ubbelohde* ASTM D445 a una temperatura de 25°C. Las muestras de quitosano se prepararon por disolución en una mezcla compuesta de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M. La concentración inicial del polímero fue 1,0·10⁻³ g·mL⁻¹ en todos los casos. Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a determinar el tiempo de caída de la disolución polimérica, para finalmente hallar la viscosidad [17]

$$\eta_{rel} = \left(\frac{\eta}{\eta_0} \right) \quad (3)$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (4)$$

$$[\eta] \approx \frac{2\eta_{sp} - 2\ln(\eta_{rel})^{1/2}}{c} \quad (5)$$

$$[\eta] = KM_v^a \quad (6)$$

donde η_{rel} es la viscosidad relativa, η_{sp} la viscosidad específica, $[\eta]$ la viscosidad intrínseca, K y a dos constantes empíricas que dependen del sistema establecido de disolvente-polímero a una determinada temperatura.

Caracterización físico-química del quitosano.

Determinación de la humedad. El contenido de humedad se determinó por el Método Oficial de Análisis Químico (AOAC) 930.15 [18].

Determinación de cenizas. El contenido de cenizas se determinó por el Método Oficial de Análisis Químico (AOAC) 924.05 [19]. Se basa en la pérdida de peso de la materia fresca, después de la incineración a 550°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Molienda. El tamaño de partícula tiene efecto en los procesos de desproteinización y desmineralización. El tamaño debe ser uniforme y no mayor de 0,5 mm. Tamaños superiores a este, a nivel industrial, afecta la eficiencia en éstos procesos, requiriendo mayor cantidad de álcali o ácido. Tamaños de partículas muy pequeños menores a 1 mm van a producir quitosano en polvo que tiene mejores propiedades de solubilidad. Sin embargo, se necesita mayor cantidad de quitosano para la formación de un gel concentrado con ácido acético y de películas resistentes.

Desproteinización. El primer paso de obtención de quitosano es la desproteinización de los desechos de cangrejo, en este se trataron las conchas de cangrejo de la variedad (*Callinectes Sapidus*) con NaOH a altas temperaturas (aproximadamente 110–115°C) lográndose desnaturalizar la proteína presente, esto se debe a que el NaOH rompe los enlaces de hidrogeno que mantienen unidas a las moléculas de las proteínas, esto hace que se separen y se dispersen en la solución, la adición de un antioxidante como el Na₂SO₃ evita la rupturas de la unión 1–4 glicosídica de las cadenas poliméricas de la quitina, lo cual produciría la disminución del peso molecular de la misma.[20]

El efecto de la concentración de NaOH y el tiempo de reacción ha sido estudiado anteriormente por miembros de nuestro grupo de investigación. López [21] encontró que en un tiempo entre 0,5 y 1,5 horas se genera la mayor eficiencia en la extracción de proteínas. De manera similar a un tiempo constante al aumentar la concentración de NaOH se produce una mayor concentración de proteínas, sin embargo este aumento no es muy significativo comparado a la cantidad de proteínas totales obtenidas (véase la Tabla 3).

Como se puede observar en la tabla para las tres concentraciones de NaOH hay un aumento promedio con la concentración de 8,5%, o sea lo que se aumenta en la recuperación de las proteínas usando una concentración de NaOH del 2,5 M durante 2,5 h de reacción es en el mejor de los casos un 8,5%.

Tabla 3. Extracción de proteínas del caparazón de cangrejo a diferentes concentraciones de NaOH y tiempos de reacción [21].

<i>Concentración de NaOH M</i>	<i>Tiempo de reacción h</i>	<i>Concentración de proteínas µg/mL</i>
0,5	0,5	4.333 ± 23
	1,0	4.660 ± 32
	1,5	4.720 ± 29
1,5	0,5	4.470 ± 28
	1,0	4.670 ± 31
	1,5	4.866 ± 27
2,5	0,5	4.513 ± 32
	1,0	4.690 ± 29
	1,5	4.992 ± 33

Esto industrialmente no es factible pues implica un costo del triple en NaOH y también de energía por el tiempo de reacción. A nivel de laboratorio se puede trabajar a estas concentraciones y tiempo, pero a nivel industrial para una concentración de 0,5 M y un tiempo de reacción de 0,5 horas ya se han recuperado un 92% de las proteínas que contiene el caparazón lo cual es aceptable y más económico.

Estas proteínas se pueden recuperar, lavar y secar para su comercialización. Para esto nuestro grupo ha experimentado con ácidos como el HCl, CH₃COOH y ácido cítrico, teniendo buenos resultados con éste último.

También se ha encontrado que para tiempos de reacción de 2 horas esta extracción tiene su máximo [21]. A tiempos de reacción mayores, las proteínas extraídas pueden estarse hidrolizando, dificultando su determinación por el método de *Lowry*. Además conviene destacar que las proteínas tienen mayor potencial de utilización que péptidos y aminoácidos. Para el caso que se quiera obtener su recuperación industrial conviene no utilizar tiempos mayores a 2 hoas.

A escala industrial se elaboró quitosano con un proceso de desproteínización de 3 horas. El quitosano obtenido presentó un peso molecular inferior a 110.000 g·mol⁻¹. Estos tiempos altos de desproteínización probablemente también degraden el quitosano.

Desmineralización. En la desmineralización se remueven sales de carbonato de calcio (CaCO₃) y fosfato de calcio (Ca₃(PO₄)₂) y otros minerales presentes en el exoesqueleto .

En este proceso, diversos investigadores han realizado la desmineralización con diferentes tipos de ácidos fuertes como (HCl, HNO₃, H₂SO₄) o débiles (CH₃COOH, HCOOH) [22, 23]. No se encontró literatura sobre la utilización del ácido fosfórico, por este motivo, en esta investigación se realizó la desmineralización con el ácido débil (H₃PO₄), el cual podría ser una fuente importante en la producción masiva de quitina a escala industrial debido a que es un ácido más económico que el ácido clorhídrico y de fácil adquisición ya que presenta menor control por parte de los organismos de reguladores de sustancias químicas. También se ha utilizado el ácido fuerte (HCl) utilizado frecuentemente por la mayoría de los investigadores de quitina, por presentar excelentes resultados en la eliminación completa de sales inorgánicas.

López [21] encontró que los iones más abundantes en los caparazones de cangrejos son el Ca y el Mg (Tabla 4). Esta encontró una correlación entre la concentración de ácido clorhídrico y la eficiencia de la extracción de los minerales siendo R = 0,97 para el Ca y R = 0,98 para el Mg. En la Tabla 4 se presentan estos resultados de la extracción de minerales utilizando HCl a diferentes concentraciones y distintos tiempos de reacción.

En la Tabla 4 puede observarse que a medida que el tiempo de reacción se incrementa ligeramente la concentración de los minerales aproximadamente un 2%. Esto a nivel industrial no es significativo por lo que el tiempo de 1 hora es suficiente para la desmineralización. Con respecto a la concentración de HCl se observa que se incrementa la extracción en casi un 100% al pasar de 1 M a 2 M. Para el caso del HCl una concentración de 2 M y un tiempo de 2 horas es suficiente para una buena extracción.

Tabla 4. Extracción de minerales del caparazón de cangrejo a diferentes concentraciones de HCl y tiempos de reacción [21].

Concentración HCl (M)	Tiempo h	Ca mg/kg	Mg mg/kg	Na mg/kg	Sr mg/kg	K mg/kg
1	1	95.750	3.513,5	1.244,0	668,0	25,0
	2	98.500	3.659,0	1.248,0	656,5	25,8
2	1	150.250	3.854,5	1.747,0	962,0	55,0
	2	153.600	3.881,0	1.704,5	972,5	56,0

Para el caso del H₃PO₄ en la Figura 3 se observa la variación de la concentración de Ca en solución extraído del desproteínizado de cangrejo con ácido fosfórico a diferentes concentraciones de ácido y a distintos tiempos de reacción. Se puede observar que a los 30 minutos ya se obtiene una buena extracción para concentraciones de ácido entre 3 y 4 M, a partir de allí comienza a disminuir la concentración de calcio. Industrialmente a una concentración 3 M y 30 minutos se puede obtener una buena extracción.

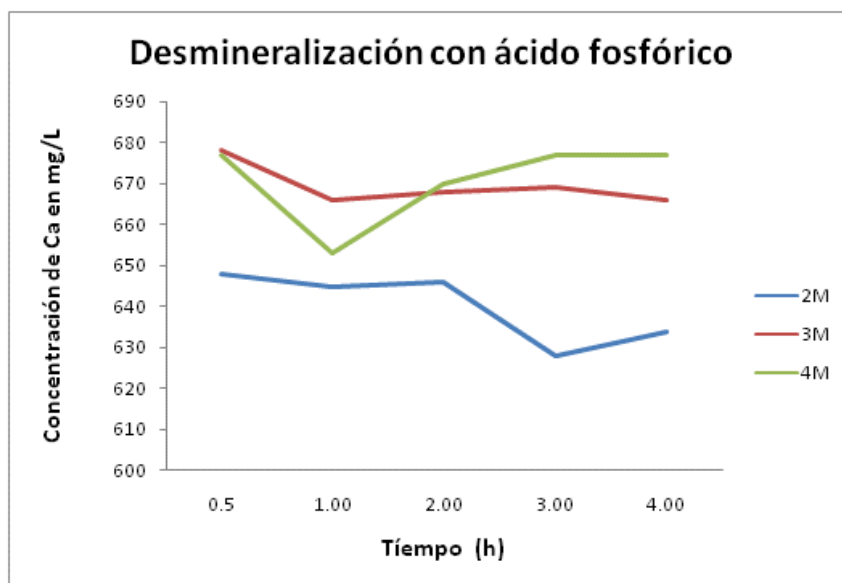


Figura 3. Extracción de calcio del desproteínizado de cangrejo utilizando ácido fosfórico a diferentes concentraciones y distintos tiempos de reacción.

En la Figura 4 se observa como varía la concentración de calcio en la solución desmineralizada cuando se cambia la relación sólido/líquido (cantidad desproteínizado/volumen ácido fosfórico). Para una relación 1/5 (0,2) ya se obtiene una buena extracción de calcio. Para relaciones mayores 1/7 ya se hace constante la cantidad de Ca extraída.

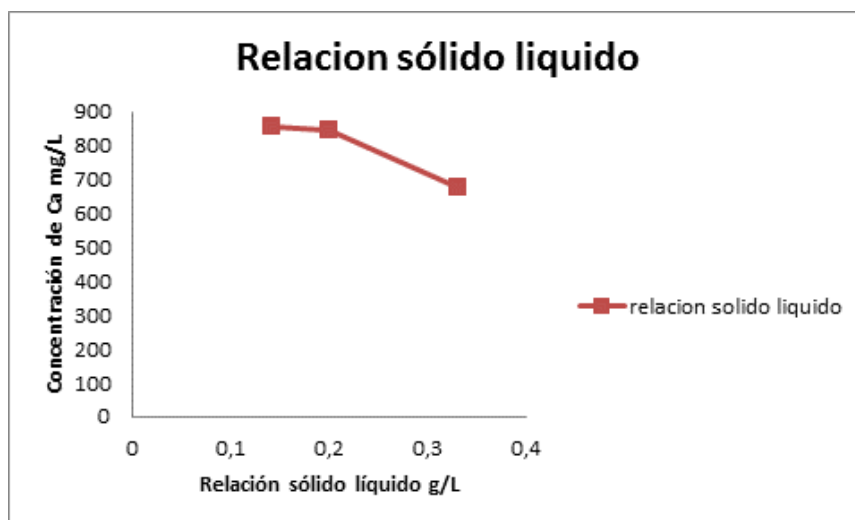


Figura 4: Efecto de la relación sólido/líquido en la desmineralización de quitina con ácido fosfórico.

Decoloración. La etapa de decoloración fue optimizada por un miembro del grupo de investigación [24] obteniendo los siguientes resultados en términos de rendimiento de extracción y absorbancias de los extractos líquidos aislados durante la decoloración de los caparzones de cangrejos. La Figura 5 muestra el rendimiento obtenido dependiendo del disolvente utilizado.

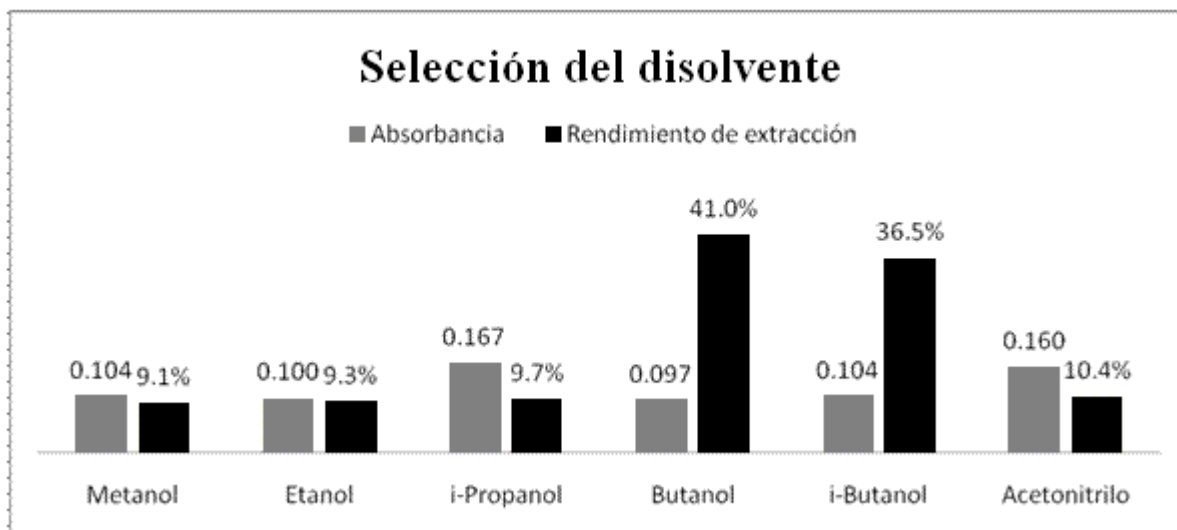


Figura 5. Distintos alcoholes utilizados en la decoloración del disolvente.

Como se aprecia en la Figura 5, los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron cuando se emplearon butanol e i-butanol como disolventes. Esto es congruente con lo esperado si se considera que tienen mayor longitud de cadena que el resto de los disolventes y, por tanto, una mayor afinidad hacia los pigmentos. Por otro lado, en términos de absorbancia no se encontraron diferencias significativas a una longitud de onda de 468 nm (correspondiente a la absorción de la astaxantina). En vista de que el material sólido obtenido luego de la decoloración con i-butanol se caracterizó por la ausencia de color, este fue seleccionado como agente extractante.

Una vez seleccionado el disolvente a emplear, se estudió el efecto de la relación sólido/líquido, tiempo de agitación, número de extracciones y temperatura en la extracción de los pigmentos. En la Figura 6, se exponen los resultados obtenidos en términos de rendimiento de extracción a las diferentes relaciones sólido/líquido empleadas.

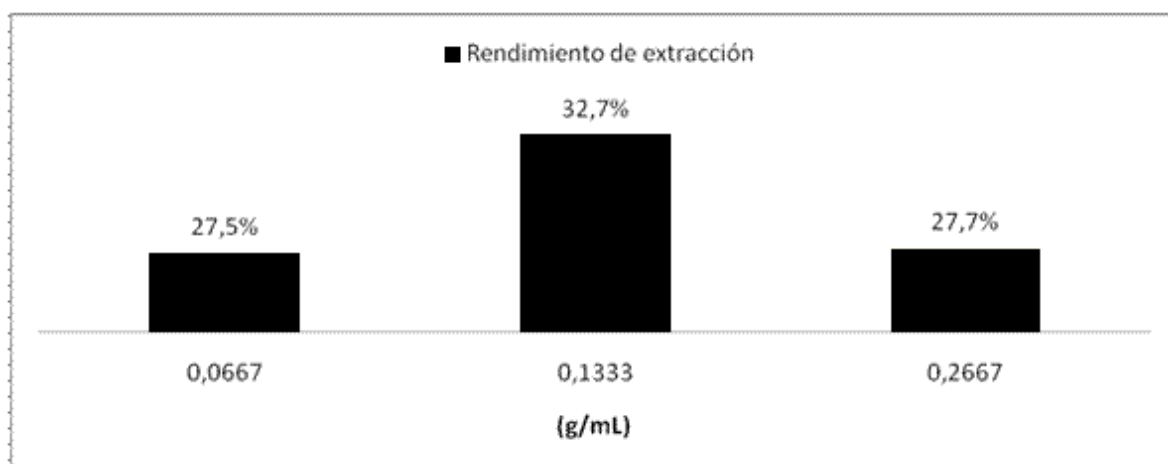


Figura 6. Efecto de la relación sólido/líquido en la extracción de pigmentos.

Como se observa, el mayor rendimiento de extracción se obtuvo cuando se empleó la relación 0,1333 (20 g/150 mL). Conforme a lo esperado, cuando se emplea menor volumen del agente extractante para la misma cantidad de muestra, menor es la eficiencia de extracción.

En cuanto a la influencia del tiempo en el rendimiento de extracción de los pigmentos se obtuvo lo siguiente: De los resultados obtenidos se desprende que existe una correlación entre el tiempo de agitación y la eficiencia de la extracción, siendo el valor de R igual a 0,9975. No obstante, debido a que el incremento en el tiempo de agitación no es directamente proporcional al incremento del rendimiento de extracción, se seleccionó 1 hora como tiempo de agitación óptimo. Además, conviene mencionar que existe la posibilidad de que a tiempos de agitación superiores a 6 horas podrían estarse solubilizando otros componentes presentes en los caparazones. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos en las experiencias de extracciones sucesivas de 1 hora.

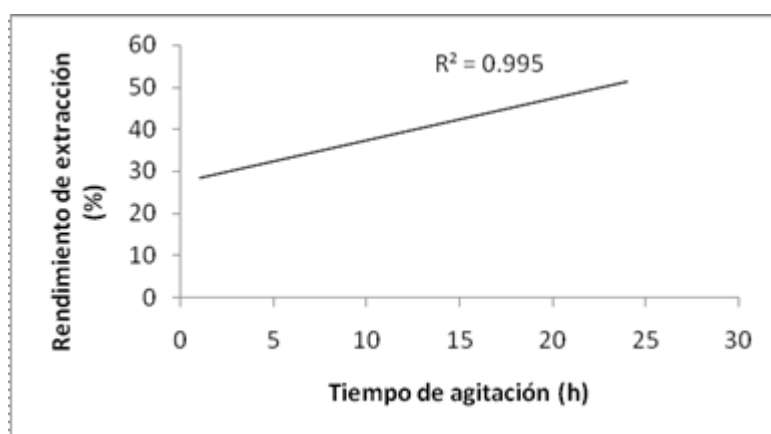


Figura 7. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de los pigmentos.

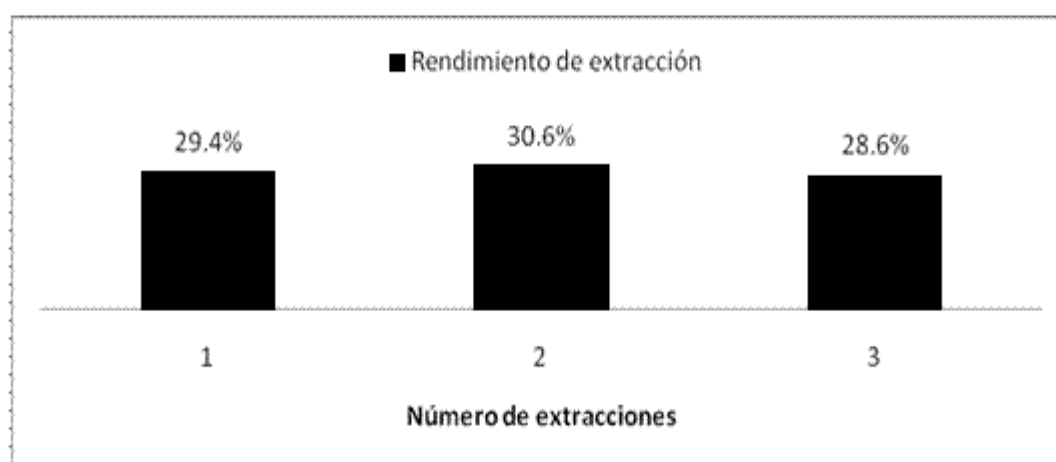


Figura 8.- Efecto del número de extracciones en la remoción de los pigmentos.

En virtud de lo anterior puede decirse que no hay diferencia significativa entre los rendimientos de extracción obtenidos. El incrementar el número de extracciones sucesivas no afecta, aparentemente, la eficiencia de la extracción de los pigmentos. Esto sugiere que se requieren

de tiempos de agitación superiores para que se produzca una mayor remoción de pigmentos.

En el presente trabajo, industrialmente se utilizó etanol como agente decolorante en el cual se eliminaron los pigmentos como: astaceno, astaxantinas, cantaxantinas, luteína y β -caroteno encontrados en los exoesqueletos de los crustáceos. El etanol es comercialmente más económico y de más fácil disponibilidad en el país

Caracterización de la quitina por espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier. En la Figura 9 se muestra los espectros infrarrojos de las quitinas obtenidas con los diferentes ácidos, en este pueden distinguirse las señales típicas del infrarrojo de la quitina, como es la señal de vibración -OH a $3.600\text{--}3.500\text{ cm}^{-1}$, se observan las bandas de la amida I y II a 1.650 y 1.550 cm^{-1} correspondientes a la quitina, también se observan bandas correspondientes a los pigmentos presentes en la muestra, los cuales presentan grupos funcionales $\text{C}=\text{C}$ en 1.650 cm^{-1} además de los alargamientos de la banda en 2.923 cm^{-1} . Las bandas comprendidas entre 898 y 1.156 cm^{-1} representan las estructuras de polisacáridos [14–18]. En la misma figura se muestra el espectro de quitina comercial *Sigma–Aldrich*, donde se aprecia los mismos grupos funcionales de las quitinas obtenidas, lo que confirma que el producto obtenido luego de la desproteínización y desmineralización es quitina.

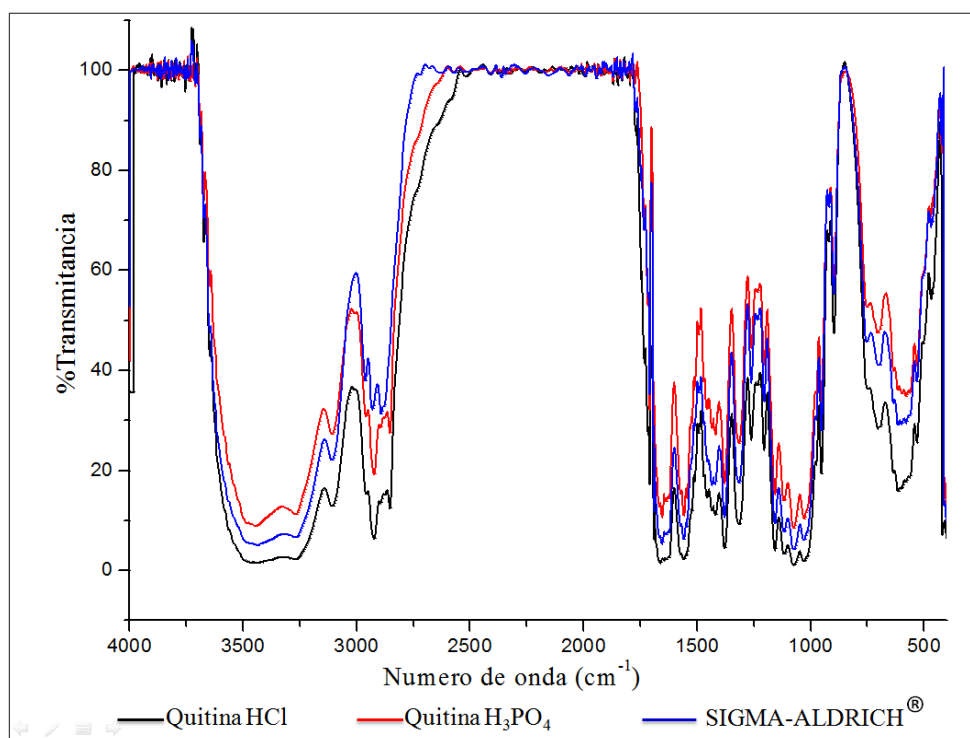


Figura 9. Espectros FTIR de quitina: Comercial *Sigma–Aldrich*, desmineralizada con ácido clorhídrico y fosfórico.

Desacetilación de la quitina. La reacción de N-desacetilación de la quitina con el hidróxido de sodio, ocurre con una hidrólisis en la que el ión hidróxido, fuertemente nucleófilo, atacó

inicialmente a los grupos acetamida presentes en el C(2) mediante un mecanismo de adición-eliminación nucleófila, para generar el quitosano [25] (Figura 10a y 10b).

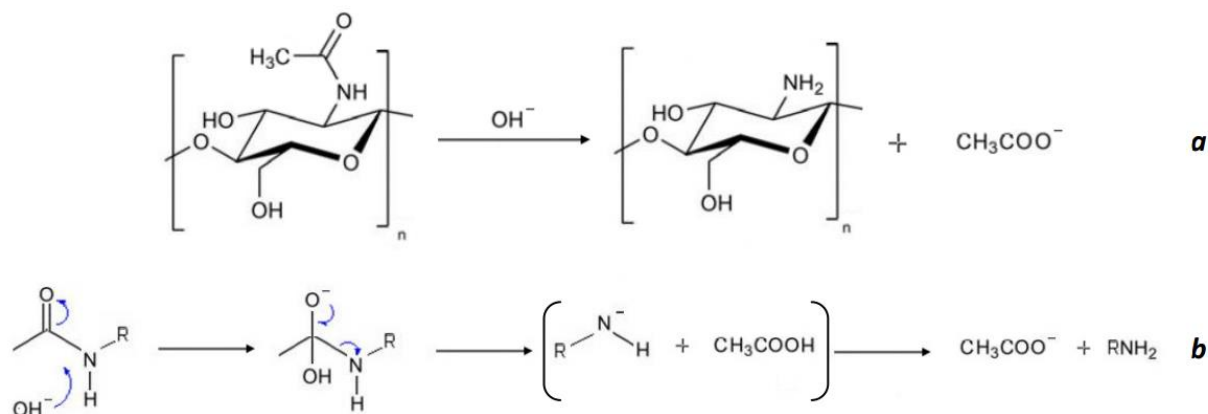


Figura 10. Mecanismo de reacción de la desacetilación de la quitina para obtener quitosano. a) Reacción generalizada, y b) Detalle del mecanismo de reacción.

La desacetilación se realizó con un tratamiento térmico a altas temperaturas, debido a la combinación de tres factores: 1) la baja reactividad debida a la configuración trans de los sustituyentes acetamida con respecto al grupo OH unido al átomo de C3 del anillo piranósico de la unidad monomérica [26], la presencia de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carbonilo y amida de cadenas adyacentes; y 3) el denso empaquetamiento de las cadenas en el enrejado cristalino de la quitina, que previene el acceso del álcali a los sitios reactivos.

La presencia de oxígeno durante la desacetilación influye en la degradación del polisacárido y da como resultado una disminución en la viscosidad y el peso molecular de los productos, por tal motivo se planteó la adición de un antioxidante como el Na_2SO_3 el cual evita que el NaOH reaccione con los grupos hemiacetálicos, formados durante la desmineralización oxidándolos y formando grupos carboxilos.

Caracterización físico-química del quitosano. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos en el análisis físico-químico de los quitosanos obtenidos de las quitinas desmineralizadas con los ácidos clorhídrico y fosfórico. El contenido de humedad de las muestras de quitosano obtenidos de las quitinas desmineralizadas por el ácido clorhídrico y fosfórico presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

El contenido de cenizas es un indicador de la efectividad del proceso de desmineralización debido a la eliminación de los minerales presentes conformado entre el 30–55% constituido principalmente por carbonato de calcio (CaCO_3) y fosfato de calcio, $(\text{CaPO}_4)_2$, en menor proporción [27].

Tabla 5. Contenido de ceniza y humedad de los quitosanos obtenidos de la desacetilación de las muestras de quitina desmineralizadas con los ácidos clorhídrico y ácido fosfórico a las distintas condiciones de reacción.

<i>Concentración</i> <i>M</i>	<i>Tiempo</i> <i>min</i>	<i>Ácido clorhídrico</i>		<i>Ácido fosfórico</i>	
		<i>Humedad</i>	<i>Ceniza</i>	<i>Humedad</i>	<i>Ceniza</i>
1	30	13,16	4,48	1,33	61,00
	40	7,48	4,46	1,80	59,00
	50	7,50	4,00	2,33	53,50
2	30	7,53	2,48	3,32	32,00
	40	7,23	2,09	9,00	26,00
	50	8,44	1,99	5,33	25,00
3	30	7,46	1,98	6,20	12,50
	40	6,82	1,97	7,00	7,00
	50	8,31	1,97	7,62	5,50

En la Tabla 6 Se observa diferencias significativas ($p < 0,05$), en la desmineralización realizada con el ácido fosfórico durante las concentraciones de 1 y 2 M a los tiempos de reacción no hubo variación considerable en el contenido de cenizas, a una concentración de 3 M se evidencia una mayor remoción de minerales en los distintos tiempos de reacción estudiados presentando diferencias significativas entre ellos a ($p < 0,05$), obteniéndose un contenido de cenizas de 5,50% para 50 minutos de reacción. En cambio, la desmineralización con ácido clorhídrico disminuyó considerablemente el contenido de cenizas no habiendo diferencia significativa entre ellos a ($p < 0,05$). Se puede observar que el tratamiento realizado con el ácido clorhídrico a 2 M y a un tiempo de reacción de 50 minutos, presenta un contenido de cenizas de 1,99%, el cual está dentro del intervalo aceptado para este tipo de productos ($< 2\%$) grado alimenticio especificado por varias casas fabricantes. Este tratamiento se considera como el más efectivo para la remoción de los minerales presentes en el exoesqueleto aunque no exista diferencias significativas a ($p < 0,05$) entre este tratamiento y los de 3 M en los distintos tiempos de reacción estudiados, ya que el tratamiento de desmineralización se debe evitar concentraciones altas de ácido por la posibilidad de degradación de la quitina por ruptura de las uniones 1–4 glicosídicas, esto ocurre al protonarse la unión etérica 1–4, provocando que el grupo acetal en C(1), se repliegue formando un hemiacetal lo cual divide la molécula polimérica, esto no permite que el proceso de desmineralización se realice a valores de pH menores de 3, por lo que esta concentración de ácido no es adecuada para la

desmineralización.

Caracterización del quitosano por espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier. En la Figura 11 se pueden observar los espectro FTIR de los quitosanos obtenidos por medio de la desacetilación parcial de las quitinas desmineralizadas con ácido clorhídrico y ácido fosfórico. Se pueden observar las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano, evidenciándose la aparición de la banda del grupo amino a 1.621 cm^{-1} y se observa una mejor definición de las bandas de los grupos OH a 3.447 cm^{-1} y N-H a 3.258 cm^{-1} , respecto al espectro de la quitina, debido al proceso de desacetilación a 2.924 cm^{-1} , se evidencia el estiramiento C-H, a 1.655 cm^{-1} aparece la tensión por vibración del C = O, a 1.571 cm^{-1} se ve la frecuencia de torsión -NH₂, a 1.423 cm^{-1} la torsión -CH₂-, a 1.318 cm^{-1} la tensión C-N, el estiramiento simétrico C-O aparece a 1.076 cm^{-1} , y el estiramiento C-O-C glucosídico se ve a las frecuencias 895, 709 y 556 cm^{-1} . Nótese como las señales correspondientes al C-O-C, C-H y OH, se mantienen presentes durante todas las etapas, mientras que las bandas correspondientes al grupo N-H de la amina se definen mejor conforme la muestra se somete a cada proceso químico [14,15]. En lo que respecta a las bandas encontradas para ambas muestras, resultaron acordes a las características del quitosano comercial (*Sigma-Aldrich*) y se corresponde con lo planteado por *Hidalgo et al.* [28,29].

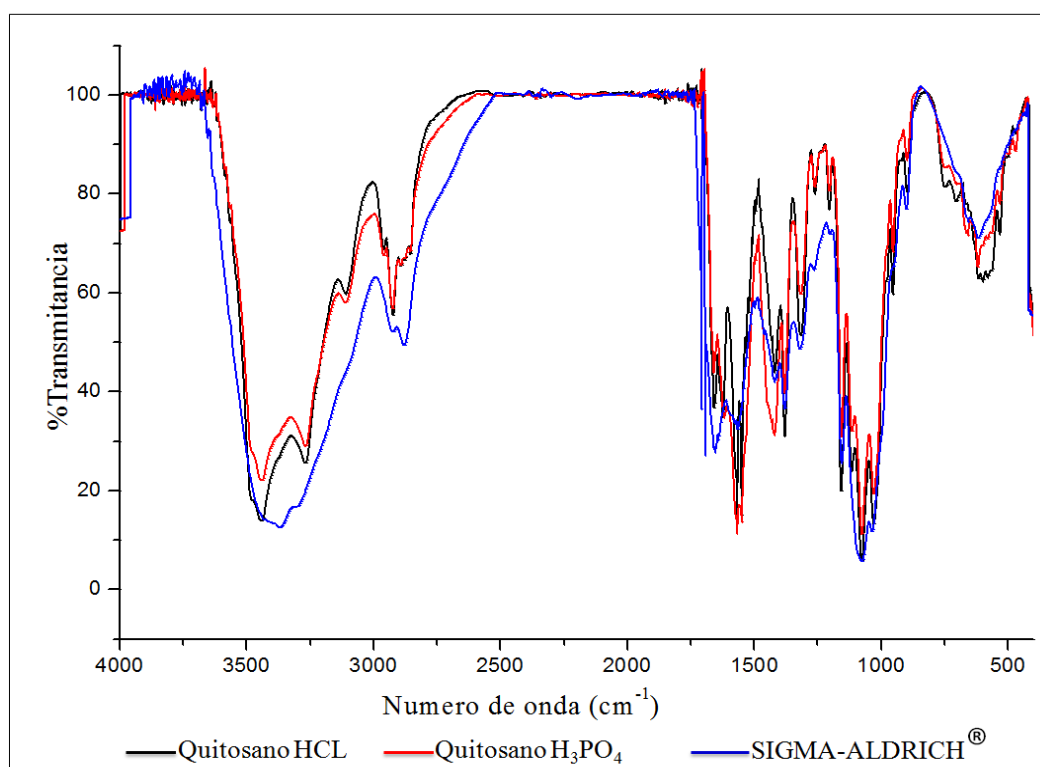


Figura 11. Espectro FTIR de quitosano comercial (*Sigma-Aldrich*) y de los obtenidos de las quitinas desmineralizadas con ácido clorhídrico y fosfórico.

El análisis mediante IR mostró la similitud en los espectros para cada una de las muestras,

confirmando con estos resultados que la utilización de diferentes quitinas obtenidas por la desmineralización con HCl y H₃PO₄ no afectó la identidad del producto, pues se mantienen las bandas de los grupos funcionales más importantes, demostrándose así que las quitinas se transformaron en una nueva materia prima importante como el quitosano.

Grado de desacetilación. Los grados de desacetilación calculados considerando la absorbencia de dos bandas patrón de (1.420/1.620) para las muestras de quitosanos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

El grado de desacetilación se determinó mediante espectrometría infrarroja de transformada de *Fourier*, utilizando la ecuación propuesta por *Brugnerotto y col.* [16], para las muestras de quitosanos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Se observa que los dos factores estudiados tienen una influencia significativa sobre el grado de desacetilación del quitosano. Los quitosanos obtenidos de la N-desacetilación de las quitinas desmineralizadas con el ácido clorhídrico presentaron grados de desacetilación comprendidos (82,52–89,82%), presentando un grado de desacetilación menor que los obtenidos por la N-desacetilación de las quitinas desmineralizadas con el ácido fosfórico (91,09–95,01%). Por otro lado, el quitosano obtenido por la N-desacetilación de las quitinas desmineralizadas con el ácido fosfórico presentan mayor intensidad en la banda a 2.870 cm⁻¹, correspondiente al estrechamiento C–H del anillo de glucosa; esta banda es sensible a variaciones en el grado de desacetilación, un incremento en la intensidad de la misma está directamente relacionado con un incremento en el grado de desacetilación. De manera similar la banda a 3.291 cm⁻¹ es más intensa correspondiente al estrechamiento N–H, sensible al grado de desacetilación [30].

Tabla 6. Grado de desacetilación y peso molecular viscosimétrico de los quitosanos obtenidos.

Concentración (M)	Tiempo (min)	ácido clorhidrico		Ácido fosforico	
		GD %	$M_v \cdot 10^3$ $g \cdot mol^{-1}$	GD %	$M_v \cdot 10^3$ $g \cdot mol^{-1}$
1	30	82,52	717	91,09	109
	40	82,75	677	91,56	251
	50	83,26	596	91,69	309
2	30	84,38	586	93,71	324
	40	88,20	568	93,80	333
	50	89,34	554	94,01	356
3	30	89,66	401	94,36	506
	40	89,82	350	94,71	515
	50	89,80	3324	95,01	522

GD: Grado de desacetilación obtenido por espectroscopia de FTIR con las ecuaciones (1) y (2).

Peso molecular. En la Tabla 6 se muestran los pesos moleculares obtenidos por la técnica de viscosimetría capilar mediante la ecuación de *Mark-Houwink-Sakurada* [17]. Los quitosanos obtenidos de la N-desacetilación de las distintas quitinas desmineralizadas con los dos ácidos presentaron diferencias significativas a ($p < 0,05$). Los quitosanos obtenidos por la N-desacetilación de las quitinas desmineralizadas con el ácido clorhídrico disminuyen gradualmente sin presentar un patrón de disminución aparente, esto se debe por el aumento de las concentraciones del ácido utilizado, discutido anteriormente.

En la misma tabla se observa que los quitosanos desmineralizados con el ácido fosfórico contienen un mayor porcentaje de material inorgánico residual comparado con el quitosano obtenido de la N-desacetilación de las quitinas desmineralizadas con el ácido clorhídrico, lo que puede explicar el comportamiento creciente sin patrón aparente del peso molecular, ya que las cenizas residuales, específicamente el calcio, puede afectar la solubilidad, e influir en la viscosidad del mismo, y por ende, en el peso molecular calculado [31]. La Tabla 7 muestra los resultados de porcentaje de cenizas, humedad, grado de desacetilación y masa molecular para quitosanos comerciales y los quitosanos obtenidos en este trabajo.

Tabla 7. Características de los quitosanos obtenidos experimentalmente y comerciales.

<i>Muestra</i>	<i>Cenizas %</i>	<i>Humedad %</i>	<i>GD %</i>	<i>M_v · 10⁻³ g · mol⁻¹</i>
Con HCl	1,99 ± 0,02	8,4 ± 0,9	89,34	553,88
Con H ₃ PO ₄	5,50 ± 0,20	7,6 ± 0,5	95,01	522,10
<i>Pronova Biopolymer</i> grado industrial	2,50	13,10	≥ 85,00	–
<i>Qingdao Develop Chemistry</i> grado agricultura	2,0	10,00	≥ 85,00	–
<i>Sigma-Aldrich</i> HMW	0,48	11,69	79,00	140–220
<i>Sigma-Aldrich</i> MMW	0,61	13,67	81,40	110–150

Se aprecia que el valor de cenizas obtenido experimentalmente es superior respecto a las muestras comerciales, este resultado depende en gran medida, del origen, propiedades y condiciones en la obtención del quitosano. Tomando en consideración la presencia de materiales inorgánicos en las muestras de quitosanos, con respecto a las de referencia, pueden justificar estos resultados.

El contenido de humedad obtenido es menor que el reportado (Tabla 7). 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 termo-alcalina de la quitina que genera grupos amino libres en la

cadena polimérica y es un sitio sensible a la formación de enlaces de hidrógeno con el oxígeno de radicales libres OH^- y dado que el grado de desacetilación de los quitosanos obtenidos de la quitina desmineralizada con el ácido clorhídrico y ácido fosfórico fueron de 89,34 y 95,01% respectivamente, la posibilidad de formación de moléculas de agua disminuye debido a una menor presencia de grupos amino.

Se obtuvieron masas moleculares superiores a las muestras comerciales (Tabla 7). Esto se deba probablemente al tratamiento utilizado para la desacetilación de la quitina, tratamientos muy extremos pueden romper las cadenas del polímero y disminuir su masa molecular, por otro lado, según la especie de crustáceo utilizada se puede obtener distintas variedades de quitina, las altas masas moleculares encontradas evidenciaron que tanto las condiciones de aislamiento y purificación de quitina como las de obtención de quitosano preservaron una estructura del polisacárido original [32,33].

Los quitosanos obtenidos a partir de la desacetilación de la quitinas deproteinizadas en el reactor industrial (2.000 kg) por tres horas presentaron masas moleculares de $68.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para los desmineralizados con ácido fosfórico (3M) y $110.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para los desmineralizados con ácido clorhídrico (2M). Este resultado nos indica que el un tiempo mayor de 2 horas en la desproteinización degrada la molécula y presentan pesos moleculares menores. Además con el ácido fosfórico se obtienen moléculas de más baja masa molecular. Sin embargo, si se utiliza ácido clorhídrico más concentrado (3 M) esta relación cambia y baja apreciablemente la masa molecular.

CONCLUSIONES

Se logró obtener quitosano de exoesqueletos de cangrejo de la variedad *Callinectes sapidus*, con un rendimiento promedio del 11,29%, según las condiciones de reacción empleadas.

Se caracterizaron las quitinas y quitosanos mediante la espectrometría de infrarrojo con transformada de *Fourier* (FTIR). La caracterización de quitina y quitosano por el método de espectroscopia infrarrojo se basa principalmente en la comparación de los espectros relacionados con la presencia o ausencia del grupo carbonilo y el radical acetilo. La quitina presenta un espectro con las bandas de absorción correspondiente al enlace C–O–C, enlace C=O y grupo funcional amida, mientras que en los espectros del quitosano se hace evidente la aparición de la banda del grupo amino a 1.650 cm^{-1} y se observa una mejor definición en las bandas de los grupos OH, N–H y C–O–C debido al proceso de desacetilación al que fue sometida la quitina. Comprobando que el quitosano obtenido presenta las bandas de los grupos funcionales característicos de esta molécula.

El grado de desacetilación se determinó por espectrometría infrarroja de transformada de *Fourier*, utilizando la ecuación propuesta por *Brugnerotto y col.* [16] mediante la relación de las

bandas de A_{1320}/A_{1420} , en donde los valores obtenidos se encuentran en el intervalo entre 82,52–89,80% para los quitosanos obtenidos por la desacetilación de las quitinas obtenidas por la desmineralización del ácido clorhídrico y para los del ácido fosfórico de 91,09–95,01%, es decir, con un alto grado de desacetilación.

Los resultados indican que la desmineralización con ácido clorhídrico 2 molar por un tiempo de reacción de 50 minutos es el tratamiento más adecuado para la desmineralización, ya que disminuye considerablemente el contenido de cenizas en el quitosano obtenido. Sin embargo, en términos de grado de desacetilación y peso molecular, los quitosanos elaborados con ácidos fosfóricos presentaron mayor grado de desacetilación y los pesos moleculares fueron parecidos a los que se encontraron con HCl. Los porcentajes de cenizas y humedad demuestran que la pureza del quitosano obtenido es aceptable, para aplicaciones alimenticias.

Agradecimientos. Parte de este trabajo fue financiado por el *Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, FONACIT (Venezuela)* a través del Proyecto PEI 2011 1382.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Felse PA, Panda T “Studies on applications of chitin and its derivatives”, *Bioprocess Engineering*, **20**, 505 (1999)
- [2] Kurita K “Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean”, *Marine Biotechnology mini-review*, **8**, 203 (2006)
- [3] Synowiecki J, Al-Khateeb NA “Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43**, 145 (2003)
- [4] Rudrapatnan N, Tharanathan SK “Chitin The undisputed Biomolecule of great potential”, *Critical reviews in food science and nutrition*, **43**, 1,61 (2003)
- [5] Raabe D, Sachs C, Romano P “The crustacean exoeskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material”, *Acta Materialia*, **53**, 4281 (2005)
- [6] Rinaudo M, Milas M, Dung P “Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion”, *International J. Biological Macromolecules*, **15**, 281 (1993)
- [7] Larez C “Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro”, *Avances de Química*, **1**, 15 (2006)
- [8] Argüelles L, Álvarez O, Pérez ME, Pérez C, Peniche W “Aprovechamiento integral de los desechos de langosta”. En *Memorias de Quimindustria*, Química Aplicada Tomo II, 528 (1988)
- [9] Agüero G, Argüelles W, Peniche C “Estudio de la cristalinidad de la quitosana”, *Revista Cubana de Química*, **5**(1), 25 (1989)
- [10] Argüelles M, Gárciga C, Peniche W “Study of the stoichiometric polyelectrolyte complex between chitosan and carboxymethyl cellulose”, *Polymer Bull.*, **23**, 307 (1990)
- [11] Nieto JM, Peniche C, Padrón G “Characterization of chitosan by pyrolysis–mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry”, *Thermochimica Acta*, **176**, 63 (1991)
- [12] Peniche C, Alvarez L, Argüelles W “The adsorption of mercuric ions by chitosan”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **42**, 1147 (1992)
- [13] Argüelles W, Peniche C “Preparation and characterization of a mercaptan derivative of chitosan for the removal of mercury from brines”, *Die Angewandte Makromol. Chemie.*, **207**, 1 (1993)
- [14] Nieto JM, Peniche CJ “Preparation and characterization of a chitosan–Fe(III) complex”, *Carbohydrate Polymers*, **18**, 221 (1992)
- [15] Peniche C, Argüelles J “A kinetic study of the thermal degradation of Chitosan and a mercaptan derivative of chitosan”, *Polymer Degradation and Stability*, **39**, 21 (1993)
- [16] Brugnerotto J, Lizardib J “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization”, *Polymer*, **42**, 3569 (2001)
- [17] Solomon OF, Ciutâ IZ “Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **24**, 683–686 (1962)

- [18] AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005, Official Methods of Analysis, Methods 925.10 Humedad, 18th Edition, USA, Cap., 4, 33–36.
- [19] AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990, Official Methods of Analysis, Methods 923.03 Cenizas, 16th Edition, USA, Cap., 4, 40–42.
- [20] Stover R, Simmonds N “Bananas”. Longman scientific and technical. Third edition. England, 1987
- [21] López Adriana “Obtención de derivados de almidón y quitosano a partir de materias primas y desechos sólidos industriales”. Tesis Doctoral. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Química. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela, 2012
- [22] Majeti NV, Ravi K “A review of chitin and chitosan applications”, *Reactive & Functional Polymers*, **46**, 1 (2000)
- [23] Wang QZ, Chen XG, Liu N, Wang SX, Liu CS, Meng XH, Liu CG “Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation”, *Carbohydrate Polymers*, **65**, 194 (2006)
- [24] Vielma A “Evaluación del proceso de decoloración de los caparazones de cangrejos provenientes de la Industria cangrejera”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ingeniería. Universidad Rafael Urdaneta. Maracaibo. Venezuela 2010
- [25] Youn DK, No HK Prinyawiwatkul W “Physicochemical and functional properties of chitosans affected by sun drying time during decoloration”, *LWT Food Science and Technology*, **42**, 1553 (2009)
- [26] Chaussard, G.; Domard, A., 2004, “New Aspects of the Extraction of Chitin from squid Pens”, *Biomacromolecules.*, **5**, 559–564.
- [27] Donard A “Physicochemical properties of chitinous materials”, *Advances in chitin science*, **3**, 24 (1989)
- [28] Hasegawa M, Isogai A, Onabe F “Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid”, *Carbohydrate Polymers*, **20**, 279 (1993)
- [29] Aranaz, I.; Mengíbar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, Á., 2009, “Functional Characterization of Chitin and Chitosan”, *Current Chemical Biology*, **3**, 203–230
- [30] Fernández, C.; Ausar, S.; Badini, R.; Castagna, L.; Bianco, I.; Beltramo, D., 2003, “An FTIR spectroscopy study of the interaction between α -casein-bound phosphoryl groups and chitosan”, *International Dairy Journal.*, **13**, 897–901.
- [31] Pillai CK, Paul W, Sharma CP “Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation”, *Progress in Polymer Science*, **34**, 641 (2009)