



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Química

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO PROCEDENTE  
DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN  
FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO DURANTE LA HIDRÓLISIS  
ALCALINA A NIVEL LABORATORIO**

**Andrea Lizet Fong Reyes**

Asesorado por el Ing. César Alfonso García Guerra  
Coasesorado por la Inga. Mercedes Esther Roquel Chávez

Guatemala, junio de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO PROCEDENTE  
DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN  
FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO DURANTE LA HIDRÓLISIS  
ALCALINA A NIVEL LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
POR

**ANDREA LIZET FONG REYES**

ASESORADO POR EL ING. CÉSAR ALFONSO GARCÍA GUERRA  
COASESORADO POR LA INGA. MERCEDES ESTHER ROQUEL CHÁVEZ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**INGENIERA QUÍMICA**

GUATEMALA, JUNIO DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA**

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Juan Carlos Molina Jiménez
VOCAL V	Br. Mario Maldonado Muralles
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Otto Raúl de León de Paz
EXAMINADORA	Inga. Telma Maricela Cano Morales
EXAMINADOR	Ing. Jaime Domingo Carranza González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

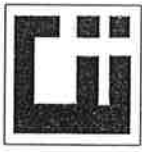
## HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO PROCEDENTE DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO DURANTE LA HIDRÓLISIS ALCALINA A NIVEL LABORATORIO**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 25 de noviembre de 2011.

  
Andrea lizet Feng Reyes



Guatemala, 09 de mayo 2012

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
Director  
Escuela de Ingeniería Química USAC

Respetable Ingeniero Álvarez:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para informarle que he asesorado y aprobado el Informe Final de Trabajo de Graduación titulado: **“EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO PROCEDENTE DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO DURANTE LA HIDRÓLISIS ALCALINA A NIVEL LABORATORIO”** desarrollado por la estudiante Andrea Lizet Fong Reyes, con número de carné 2006-14872.

Por lo cual, después de haber realizado la revisión del respectivo Informe Final y de haberle hecho las correcciones pertinentes, considero que llena los requisitos exigidos para su aprobación.

Agradezco a usted la atención a la presente.

Atentamente,

  
Ing. Qco. **Cesar Alfonso García Guerra**  
Asesor  
Jefatura  
Sección Química Industrial  
CII/USAC





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 30 de mayo de 2012  
Ref. EI.Q.TG-IF.031.2012

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
DIRECTOR  
Escuela Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el Acta TG-212-2011-IF le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

**INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

Solicitado por la estudiante universitaria: **Andrea Lizet Fong Reyes**

Identificada con número de carné: **2006-14872**

Previo a optar al título de INGENIERA QUÍMICA.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO  
PROCEDENTE DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARON (Litopenaeus  
vannamei) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO  
DURANTE LA HIDRÓLISIS ALCALINA A NIVEL LABORATORIO**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por el Ingeniero: **César García Guerra**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ing. Víctor Manuel Monzón  
COORDINADOR DE TERNA  
Tribunal de Revisión  
Trabajo de Graduación



ESCUELA DE  
INGENIERIA QUIMICA

C.c.: archivo

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
ACREDITADO POR  
Agencia Centroamericana de Acreditación de  
Programas de Arquitectura y de Ingeniería  
Periodo 2009 - 2012



ACAAI

Agencia Centroamericana de Acreditación de  
Programas de Arquitectura y de Ingeniería



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Ref.EIQ.TG.084.2012

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **ANDREA LIZET FONG REYES** titulado: "**EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO PROCEDENTE DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO DURANTE LA HIDRÓLISIS ALCALINA A NIVEL LABORATORIO**". Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

  
Ing. Williams Guillermo Alvarez Mejia; C.Dr.  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química

Guatemala, Junio de 2012



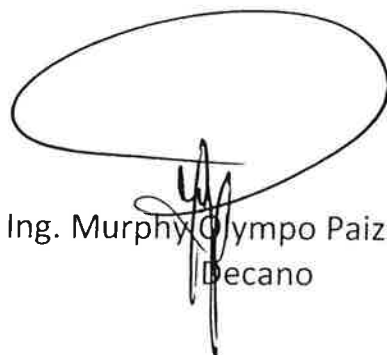
Cc: Archivo  
WGAM/ale



DTG. 280.2012

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE QUITINA A QUITOSANO PROCEDENTE DEL EXOESQUELETO DEL ABDOMEN DEL CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO TOTAL MEDIDO DURANTE LA HIDRÓLISIS ALCALINA A NIVEL LABORATORIO**, presentado por la estudiante universitaria **Andrea Lizet Fong Reyes**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos  
Decano

Guatemala, 21 de junio de 2012.



/gdech



## **ACTO QUE DEDICO A:**

<b>Dios</b>	Por guiarme en todo momento y permitirme culminar este sueño.
<b>La virgen María</b>	Por estar conmigo en cada paso de mi vida.
<b>Mis padres</b>	Alberto Fong Wong y Hermencia Lizet Reyes Quinto.
<b>Mis hermanas</b>	Ana Luisa y Ana Lucía Fong Reyes.
<b>Mi tío y tía</b>	Carlos Rolando Reyes Quinto y Ana María Reyes Quinto.
<b>Mis abuelas</b>	Rosa Elena Quinto Sintú y Foo Yeuk Wong (q.e.p.d.).
<b>Tía abuela</b>	Zoila Quinto Sintú (q.e.p.d.).

## **AGRADECIMIENTOS A:**

- Dios** Por darme la vida y bendecirme con una familia maravillosa, quienes comparten conmigo esta alegría que responde a sus sacrificios.
- La virgen María** Por cuidarme, guiarme e iluminarme en cada decisión de mi vida.
- Mis padres** Por su esfuerzo, sacrificio, confianza, apoyo, consejos, principios y valores que me han permitido salir adelante, por ser parte importante de mi vida, convirtiéndome en lo que ahora soy y por su amor incondicional que siempre me han brindado, deseándome siempre lo mejor.
- Mis hermanas** Por su amor, confianza, comprensión y apoyo incondicional.
- Mi tío y tía** Por su amor, consejos, apoyo incondicional y por estar pendientes de mí, convirtiéndose en mis segundos padres.
- Mi abuela** Por su amor, ternura, por cuidar y preocuparse siempre por mí, así como por sus sabias palabras.

<b>Mis amigos</b>	Por su amistad, apoyo y cariño brindado durante todo este tiempo y por haber vencido juntos tantos retos y proyectos.
<b>Fam. Juárez Méndez</b>	Por su apoyo y cariño.
<b>Ing. César García</b>	Por su asesoría, conocimientos brindados, tiempo y empeño dedicado durante la realización de esta investigación.
<b>Inga. Mercedes Roquel</b>	Por su amistad, apoyo, colaboración y tiempo dedicado en la asesoría de esta investigación.
<b>Ing. Murphy Paiz</b>	Por su amistad y apoyo durante toda la carrera.
<b>Licda. Ingrid Benítez</b>	Por su colaboración durante la realización de la investigación.
<b>Mis revisores</b>	Por su apoyo y tiempo dedicado en la revisión de esta investigación.
<b>Universidad de San Carlos de Guatemala</b>	Por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios y cumplir en ella uno de mis sueños.
<b>Facultad de Ingeniería</b>	Por darme las herramientas y conocimientos necesarios para culminar la carrera de Ingeniería Química.



2.4.3.	Aplicaciones del quitosano .....	16
2.4.3.1.	Química analítica .....	17
2.4.3.2.	Biomedicina .....	17
2.4.3.3.	Agricultura y ganadería .....	17
2.4.3.4.	Cosméticos .....	17
2.4.3.5.	Dietéticos .....	18
2.4.3.6.	Industria alimentaria.....	18
2.4.3.7.	Industria papelera .....	18
2.4.3.8.	Industria textil.....	18
2.4.3.9.	Tratamiento de agua .....	18
3.	DISEÑO METODOLÓGICO .....	19
3.1.	Definición operacional de las variables .....	19
3.1.1.	Variables de control .....	19
3.1.2.	Variables independientes .....	20
3.1.3.	Variables dependientes .....	21
3.2.	Delimitación de campo de estudio .....	21
3.2.1.	Tipo de estudio .....	23
3.2.1.1.	Elección del diseño experimental.....	23
3.2.1.1.1.	Diseño factorial totalmente al azar.....	23
3.2.2.	Selección y tamaño de muestra .....	25
3.2.3.	Elección del número de repeticiones .....	25
3.2.4.	Unidad de análisis y observación .....	25
3.3.	Recursos humanos disponibles .....	26
3.4.	Recursos materiales disponibles.....	26
3.4.1.	Equipos.....	26
3.4.1.1.	Equipo de medición .....	27
3.4.1.2.	Equipo auxiliar .....	27

3.4.2.	Instrumentos de laboratorio y cristalería .....	27
3.4.2.1.	Cristalería de medición.....	27
3.4.2.2	Instrumentos de laboratorio y cristalería auxiliar .....	28
3.4.3.	Materia prima y reactivos .....	28
3.4.3.1.	Materia prima .....	28
3.4.3.2.	Reactivos de tipo industrial .....	29
3.4.3.3.	Reactivos de tipo comercial .....	29
3.5.	Técnica cuantitativa .....	29
3.5.1.	Evaluación del quitosano .....	32
3.5.1.1.	Preparación de la materia prima .....	32
3.5.1.2.	Desproteínización.....	32
3.5.1.3.	Desmineralización .....	32
3.5.1.4.	Desacetilación de la quitina.....	33
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información .....	34
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	35
3.7.1.	Procedimiento de la recolección y preparación de los exoesqueletos.....	35
3.7.2.	Procedimiento de la desproteínización.....	35
3.7.3.	Procedimiento de la desmineralización.....	36
3.7.4.	Procedimiento del blanqueo.....	36
3.7.5.	Procedimiento de la desacetilación de la quitina .....	36
3.7.6.	Procedimiento de la purificación del quitosano .....	37
3.7.7.	Método para la obtención de nitrógeno (basado en el método oficial de A.O.A.C. 976.05).....	37
3.8.	Análisis estadístico .....	38
3.8.1.	Análisis de varianza de 3 factores .....	38
4.	RESULTADOS.....	43

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	53
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES .....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61
APÉNDICE .....	65
ANEXOS.....	79

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

1. Representación esquemática de las cadenas de (a) celulosa (b) quitina totalmente acetilada y (c) quitosano totalmente desacetilado..... 5
2. Ecuación química del proceso de desacetilación.....7
3. Diagrama de la obtención de quitosano..... 11
4. Diseño general para la obtención de quitosano ..... 30
5. Diseño específico para la obtención de quitosano ..... 31
6. Evolución del porcentaje de nitrógeno total determinado en función de las variaciones en la hidrólisis alcalina para la desacetilación de quitina con la relación quitina/álcali 1/5 y 100 °C..... 43
7. Evolución del porcentaje de nitrógeno total determinado en función de las variaciones en la hidrólisis alcalina para la desacetilación de la quitina con la relación quitina/álcali 1/10 a 75 °C y 100 °C ..... 44
8. Distribución del porcentaje de nitrógeno total en función de la relación quitina/NaOH para la combinación de los parámetros experimentales: temperaturas y tiempos de desacetilación ..... 45
9. Distribución del porcentaje de nitrógeno total en función de la temperatura para la combinación de los parámetros experimentales: relación quitina/NaOH y tiempos de desacetilación ..... 46
10. Distribución del porcentaje de nitrógeno total en función del tiempo para la combinación de los parámetros experimentales: relación quitina/álcali y temperaturas de desacetilación..... 47
11. Porcentaje de nitrógeno total medido en función del tiempo..... 48
12. Grado de desacetilación en función del contenido de nitrógeno..... 49



## TABLAS

I.	Comparación entre la quitina y el quitosano .....	9
II.	Definición operacional de las variables.....	19
III.	Definición operacional de las variables independientes, para la obtención del quitosano .....	20
IV.	Definición operacional de la variable dependiente, para analizar el quitosano .....	21
V.	Diseño factorial 2x2x2 totalmente al azar para la evaluación del quitosano a partir de la desacetilación de la quitina .....	24
VI.	Diseño experimental de las combinaciones a utilizar en la evaluación del quitosano .....	34
VII.	Datos típicos para el diseño de bloques al azar .....	39
VIII.	ANOVA para el experimento de tres factores de n réplicas .....	41
IX.	Condiciones óptimas para la estimación determinada del grado de desacetilacion (DD) .....	50
X.	Análisis de varianza, con los valores obtenidos de $f$ para cada fuente de variación .....	51

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
<b>N</b>	Concentración normal
<b>DA</b>	Grado de acetilación
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>DD</b>	Grado de desacetilación
<b>g</b>	Gramo
<b>h</b>	Hora
<b>mL</b>	Mililitro
<b>%</b>	Porcentaje



## **GLOSARIO**

<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (métodos oficiales de análisis))
<b>Desacetilación</b>	La eliminación de un grupo acetilo de una molécula.
<b>Factores</b>	Variables experimentales independientes controladas.
<b>pH</b>	Valor que representa convencionalmente la concentración de iones de hidrógeno de una disolución acuosa.
<b>Polisacáridos</b>	Son biomoléculas formadas por la unión de muchos monosacáridos.
<b>Tratamiento</b>	Es una combinación específica de niveles de factores.
<b>Quitina</b>	Es un polisacárido, componente principal del exoesqueleto de los crustáceos.

**Quitosano**

Es un polisacárido que está compuesto por dos tipos de unidades estructurales: poli[ $\beta$ -(1,4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa] y poli[ $\beta$ -(1,4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa].

**Tubos Kjeldahl**

Tubos que normalmente son utilizados para la determinación del contenido de nitrógeno total.

## RESUMEN

Se evaluó el aprovechamiento de los desechos del camarón (*Litopenaeus vannamei*), los cuales fueron recolectados en el mercado de la zona 4 de la ciudad de Guatemala, utilizándolos como materia prima para la extracción de la quitina, que a su vez se utilizó para desacetilarla y poder obtener así como producto final el quitosano.

La obtención del quitosano utilizó como variables independientes la relación quitina/NaOH, el tiempo y la temperatura quienes se evaluaron con 2 niveles para cada factor, dando como resultado 8 combinaciones en triplicado a las cuales se les determinó su contenido de nitrógeno total, de lo anterior se determinó que la relación quitina/NaOH y temperatura óptima a utilizar fue de 1:5 y 100°C respectivamente.

Para determinar el tiempo óptimo de desacetilación se tomaron en cuenta los resultados anteriores y a partir de ellos se decidió variar el tiempo a 4, 6 y 12 horas más, encontrando que el tiempo óptimo fue de 12 h.

El contenido de nitrógeno total fue de 7,29% con un DD=62,49% para las condiciones óptimas y se determinó que si tuvo diferencia significativa respecto a las distintas fuentes de variación.

Los resultados de esta investigación permitieron demostrar que el quitosano puede ser obtenido de la quitina extraída del exoesqueleto del abdomen del camarón (*Litopenaeus vannamei*), reduciendo así en parte el impacto ambiental, que este desecho provoca.



## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el grado de conversión de quitina a quitosano en función del contenido de nitrógeno total monitoreado durante la hidrólisis alcalina a nivel laboratorio.

### **Específicos**

1. Evaluar el contenido de nitrógeno total del quitosano por el método de Kjeldah (A.O.A.C. 976.05) en función de la relación de quitina/NaOH, durante el proceso de desacetilación alcalina de la quitina.
2. Evaluar el contenido de nitrógeno total del quitosano por el método de Kjeldah (A.O.A.C. 976.05) en función de la temperatura, durante el proceso de desacetilación alcalina de la quitina.
3. Evaluar el contenido de nitrógeno total del quitosano por el método de Kjeldah (A.O.A.C. 976.05) en función del tiempo, durante el proceso de desacetilación alcalina de la quitina.
4. Evaluar la existencia de diferencias significativas en el contenido de nitrógeno total del quitosano, en función de las diferentes relaciones quitina/NaOH, tiempos y temperaturas estudiadas, mediante un análisis de varianza.



# HIPÓTESIS

## **Hipótesis de trabajo**

Existe diferencia al evaluar la técnica de desacetilación del exoesqueleto del abdomen del camarón, en función de variar en el proceso de desacetilación los parámetros: relación quitina/NaOH, tiempo y temperatura, en base al contenido de nitrógeno total.

## **Hipótesis estadística**

### **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

No existe diferencia significativa en el contenido de nitrógeno total del quitosano obtenido del abdomen de los exoesqueletos del camarón en función de la relación quitina/NaOH, tiempo y temperatura que se utilizó.

### **Hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>)**

Si existe diferencia significativa en el contenido de nitrógeno total del quitosano obtenido del abdomen de los exoesqueletos del camarón en función de la relación quitina/NaOH, tiempo y temperatura que se utilizó.

## INTRODUCCIÓN

La producción del camarón en Guatemala es destinada para el consumo humano, pero se refiere solamente de la carne, y el desecho constituido por el exoesqueleto provoca un problema ambiental, al ser desechado sin tratamiento previo.

El quitosano es un polisacárido cuyas propiedades permite utilizarlo en múltiples aplicaciones como en la industria alimenticia, como conservante de frutas y verduras frescas. Este polisacárido es obtenido por hidrólisis alcalina de la quitina, la cual se extrae del exoesqueleto del camarón.

En el presente trabajo se evaluó la obtención del quitosano, variando 3 factores independientes y se analizó el contenido de nitrógeno total. Determinando así, los parámetros óptimos para el proceso de desacetilación, así como el grado de conversión de quitina a quitosano y la viabilidad de dicho proceso.



## 1. ANTECEDENTES

La disponibilidad de información mediante la literatura sobre el aprovechamiento de subproductos del camarón tiene amplia referencia y en otros países como México donde hay gran producción de camarón hay estudios realizados sobre el aprovechamiento para la obtención de quitosano. Entre los trabajos de investigación se encuentran los siguientes:

En 1999, Rodríguez Morales, Ofelia, realizó su trabajo de graduación de Ingeniería de los Alimentos de la Universidad Autónoma Metropolitana, de México, quien fue asesorada por la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, el trabajo de graduación es denominado "Obtención y caracterización de quitina y quitosano a partir de desechos de camarón". La quitina fue mezclada con NaOH al 50% y al 60% con un tiempo de 2 a 3 h, fue puesta a reflujo a presión atmosférica y se le hicieron pruebas de solubilidad. Los resultados demostraron que el quitosano obtenido con el 60% de NaOH y con un tiempo de 3 h en reflujo es más soluble, lo que indica que bajo estas condiciones se logra un grado mayor de desacetilación respecto a las demás condiciones probadas en este trabajo.

En el 2008, Claudia Hidalgo, Mirna Fernández, Olga Nieto, Armando Paneque, Gustavo Fernández y Julio Llópiz realizaron un estudio en la Universidad de La Habana, de Cuba, titulado “Estudios de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta”. Se estudiaron muestras de quitosano derivadas de la quitina de langosta, obtenidas por desacetilación bajo diferentes condiciones de temperatura a 130 °C y 100 °C, a concentraciones de NaOH de 45% y 50% y tiempo de 15 y 40 minutos de tratamiento, las cuales fueron comparadas con una muestra comercial de referencia, lo cual demostró que la combinación de 50% de NaOH, con una temperatura de 130 °C y el tiempo de 40 minutos dio mejor resultado que las demás combinaciones.

En el 2011, Esmieu, Estuardo, realizó su diseño de investigación de Ingeniería Química de la USAC, asesorado por el ing. César García, y denominado “Evaluación fisicoquímica del contenido extractable de quitina obtenida a partir de dos secciones del exoesqueleto del camarón (*Litopenaeus vannamei*) cefalotórax y abdomen, procedente de mar y cultivado en viveros”. El exoesqueleto es desproteínizado a 1:10 (g/mL) con NaOH al 0,5% g/mL por 2 h a 50 °C y con el 3% de NaOH por 1 h a 60 °C y es desmineralizado con HCl a 0,5 M a temperatura ambiente por 1 h. Los resultados demostraron que la quitina obtenida del abdomen del exoesqueleto del camarón procedente del mar, dio mayor rendimiento respecto a las demás partes evaluadas.

## **2. MARCO TEÓRICO**

El quitosano se obtiene por desacetilación alcalina de la quitina, la cual se extrae de los crustáceos, teniendo múltiples aplicaciones que lo hace ser un polisacárido de mucha utilidad.

### **2.1. Biopolímeros de origen natural**

Los biomateriales brindan la ventaja de ser estructuras similares a las sustancias macromoleculares que el medio biológico es capaz de reconocer y metabolizar; y así evitamos el problema de toxicidad y de respuesta inflamatoria.

Una característica particular de los polímeros naturales es su habilidad de ser degradados por enzimas que se encuentran en el organismo vivo, esta es garantía de que el implante será degradado y metabolizado por mecanismos fisiológicos. Esta propiedad se emplea en caso de aplicaciones temporales en las cuales se requiere el cumplimiento de una función específica en un periodo de tiempo. La velocidad de degradación de los materiales implantados puede controlarse mediante modificaciones químicas o entrecruzamiento del biopolímero, permitiendo el diseño con determinado grado de duración.

Los biopolímeros tienen ciertas ventajas que los hace idóneos para ser usados como ejemplo en el tratamiento de aguas residuales, entre las cuales podemos citar, bajo costo, biocompatibilidad, baja toxicidad, biodegradabilidad, alta abundancia natural, estabilidad, alta reactividad química y elevada capacidad de adsorción.

## 2.2. Breve reseña histórica

Por su amplia distribución en la naturaleza la quitina -poli[ $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos]- es el segundo polisacárido en abundancia, después de la celulosa. Se encuentra principalmente en los caparazones de los crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas.

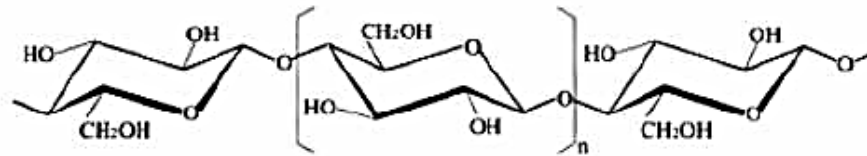
La quitina fue aislada por primera vez en 1811, a partir de hongos superiores, por Braconnot, quien le asignó el nombre de fungina. Posteriormente Odier, en un artículo sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola quitina (del griego *tunic*, envoltura).

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos; esta quitina modificada, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era de color verde. Pero no es hasta 1894 cuando Hoppe-Seyler sometió la quitina a reflujo a 180°C en hidróxido de potasio y observó que el producto que se formaba era bastante soluble en ácido acético y clorhídrico y lo denominó “quitosano”.<sup>1</sup>

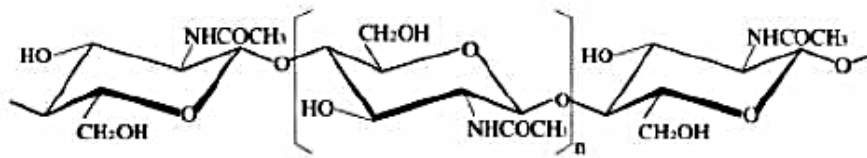
---

<sup>1</sup> MEDINA, Lucia. *Estudio de la acción de quitosano como adsorbedor de proteínas hidrosoluble; optimización de parámetros*. p. 11.

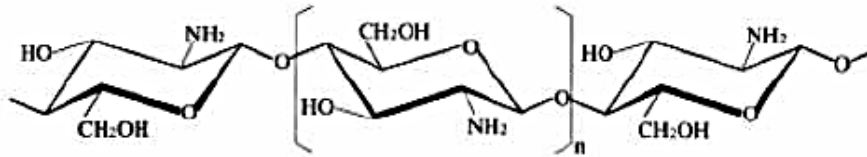
Figura 1. Representación esquemática de las cadenas de (a) celulosa (b) quitina totalmente acetilada y (c) quitosano totalmente desacetilado



(a)



(b)



(c)

Fuente: ABADÍA, Javier. Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago. p. 6.



### 2.3. La quitina

La quitina es fácil de obtener del exoesqueleto del camarón o cangrejos, insectos, moluscos y hongos, para ello se requiere un tratamiento químico con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas con ella. El nombre sistemático de la quitina es poli[ $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosas].

La quitina es altamente insoluble en agua y solventes orgánicos, lo cual restringe sus aplicaciones. Sin embargo, por desacetilación se transforma en quitosano, el cual también es insoluble en agua, pero soluble en ácidos orgánicos, ver tabla I.

La quitina es un biopolímero tipo polisacárido, considerado a menudo como un derivado de la celulosa, la diferencia se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual en la quitina ha sido sustituido por el grupo acetamida; la quitina es blanca, dura, inelástica y la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas costeras.

“Se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación, DA, de 0,66, es decir, que una de cada tres de sus unidades se encuentran desacetiladas”.<sup>2</sup> Queda definido así el DA como la fracción del total de unidades glucosídicas que están acetiladas. A veces la composición se reporta en términos del grado de desacetilación, DD ( $DD = 1 - DA$ ). En ocasiones estos valores se dan en tanto por ciento.

---

<sup>2</sup> ABADÍA PIQUERO, Javier. *Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago*. p. 6.

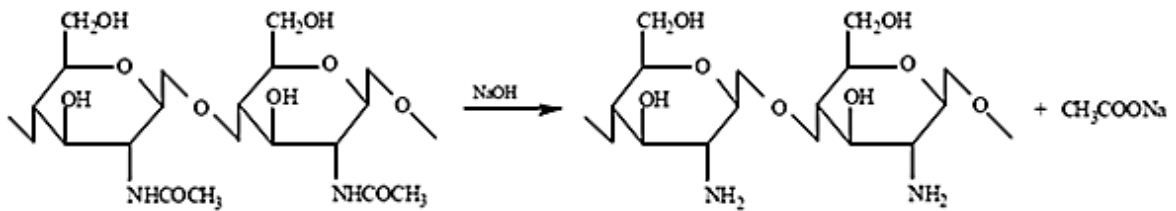
## 2.4. El quitosano

El quitosano es un poliaminosacárido obtenido por desacetilación alcalina de la quitina, por lo tanto el quitosano es una amina primaria.

El quitosano se obtiene por modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, con el fin de retirar la mayor cantidad de unidades acetilo de la estructura del polímero; el polímero que se obtiene posee un comportamiento marcadamente básico debido al grupo amino libre en su estructura, lo cual además le proporciona ciertas características quimicofísicas de gran interés industrial.

La ecuación química correspondiente al proceso es la siguiente:

Figura 2. Ecuación química del proceso de desacetilación



Fuente: PARADA, Luis. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. p. 2.

“El quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina y está compuesto por dos tipos de unidades estructurales: poli[ $\beta$ -(1,4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranos] (D-glucosamina) y poli[ $\beta$ -(1,4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranos] (N-acetil-D-glucosamina), distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena”.<sup>3</sup>

Una de las propiedades que caracteriza al quitosano extraído de la quitina, es su grado de saturación, el cual está directamente relacionado con el proceso de hidrolisis de los grupos acetamido de la quitina ( $\text{CH}_3\text{CONH-}$ ) hasta grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ), la cual lleva en definitiva a la obtención del quitosano. De acuerdo a esto se puede esperar un comportamiento distinto en lo que se refiere a los posibles enlaces que ocurre con la proteína, si se comparan dos tipos de quitosano de diferente grado de desacetilación.

El quitosano, principal derivado N-desacetilado de la quitina, no se presenta como una molécula única. Muestra variabilidad no solamente en el tamaño de las cadenas, sino también, en el grado de acetilación (DA) de las mismas.

La composición y estructura del quitosano son muy similares a la celulosa, la diferencia es que el quitosano tiene un grupo amino primario en el carbono 2 del anillo de la hexosa.

---

<sup>3</sup> SÁNCHEZ, Andrés. *Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas* (en línea). p. 242.

Tabla I. Comparación entre la quitina y el quitosano

Comparación	Quitina	Quitosano
Fórmula molecular	$(C_8H_{13}NO_5)_n$	$(C_6H_{11}O_4N)_n$
Masa molecular	203n	161n
Nombre sistemático	Poli[ $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosas].	Poli[ $\beta$ -(1,4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranosas]
Unidad estructural		
Agua	Insoluble	Insoluble
Alcohol	Insoluble	Insoluble
Ácido acético	Insoluble	Altamente soluble
Ácido oxálico	Insoluble	Soluble
Ácido clorhídrico	Insoluble	Soluble

Fuente: ZARITZKY, Noemí. Películas biodegradables y recubrimientos comestibles a base de hidrocoloides: caracterización y aplicaciones. p. 11.

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de preparación y estos polímeros difieren entre sí por su distribución, masa molecular y grado de acetilación.

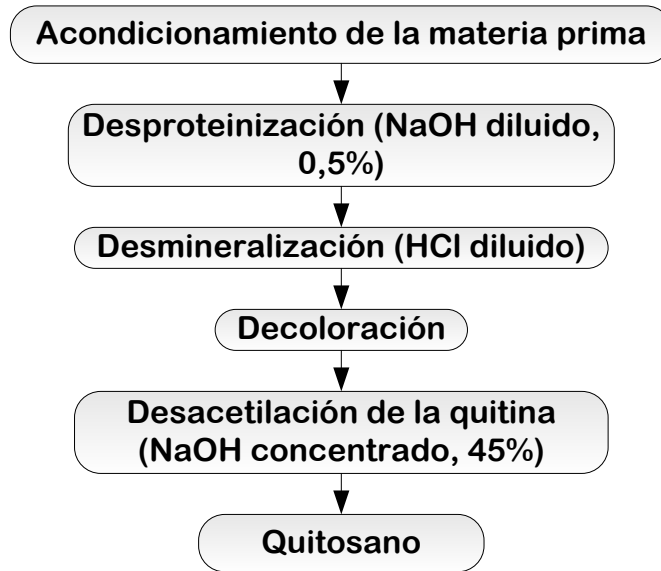
A diferencia de los polímeros sintéticos, la quitina y el quitosano, no presentan limitaciones en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad, además de ser naturalmente abundantes y renovables.

Un aspecto clave en la comparación entre la quitina y el quitosano es debido a que son comercialmente importantes por su alto contenido de nitrógeno total. Además son recomendados como probables sustituyentes de los polímeros sintéticos debido a que estos tienen excelentes propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, etc.

#### **2.4.1. Obtención del quitosano**

El quitosano se obtiene de la quitina y la principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos especialmente de los caparazones de cangrejo, jaiba, langosta y camarones. Estos compuestos poseen proporciones variables de proteínas, sales de calcio, quitina y pequeñas cantidades de grasas y pigmentos.

Figura 3. Diagrama de la obtención de quitosano



Fuente: elaboración propia.

#### 2.4.1.1. 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 (40-50%) a temperaturas superiores a 100°C por una hora, se obtiene quitosano con un grado de desacetilación de un 82%, si se extiende la reacción por 48 horas, se alcanza el 100% de desacetilación”.<sup>4</sup> Sin embargo esto conlleva a una pérdida de la viscosidad, indicando que hubo degradación de la cadena polimérica, preferiblemente en atmósfera inerte.

<sup>4</sup> SÁNCHEZ BRENES, Andrés. *Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (Pleuroncodes planipes) para el crecimiento de fibroblastos humanos*. p. 34.

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, por lo tanto el grado de desacetilación depende de la concentración del álcali, temperatura, tiempo de reacción, tamaño de partícula y densidad. No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo grado de desacetilación alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85%. La desacetilación se lleva a cabo en un reactor presurizado, el cual permite mejorar la reactividad para la obtención del quitosano.

## **2.4.2. Propiedades del quitosano**

El quitosano se diferencia de la quitina por sus diversas propiedades que tiene, las cuales se describen a continuación.

### **2.4.2.1. Grado de acetilación o grado de desacetilación**

Químicamente, la quitina y el quitosano son poliglucosaminas que son distinguidas solamente por el grado de acetilación de los grupos amino. “Las quitinas típicas tienen generalmente grado de acetilación (DA) entre 70-95%, mientras que los quitosanos tienen comúnmente un grado de acetilación (DA) entre 15-25%”.<sup>5</sup> El grado de acetilación es probablemente el parámetro más importante de estos polisacáridos y determina grandemente sus características funcionales y fisiológicas.

---

<sup>5</sup> ABADÍA PIQUERO, Javier. *Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartilago*. p. 14.

Los factores que afectan el grado de desacetilación incluyen: concentración del álcali, tratamiento previo, tamaño de partícula, y la densidad de la quitina. Los últimos dos factores afectan el índice de penetración del álcali en la región amorfa y en cierto grado también en las regiones cristalinas del polímero, necesitadas para que la hidrólisis ocurra.

El grado de desacetilación (DD) se define como el contenido en grupos aminos presentes en la cadena polimérica.

El quitosano es caracterizado por medio del grado de acetilación (DA), que corresponde a los grupos N-acetilamina; o por medio del grado de desacetilación (DD) que corresponde a la proporción de grupos D-glucosamina (monómeros desacetilados) en una molécula de quitosano.

#### **2.4.2.2. Peso molecular**

Como el quitosano es obtenido de la quitina por desacetilación alcalina, el peso molecular tiene un promedio más bajo, debido a la eliminación del grupo  $\text{CH}_3\text{-C=O}$ .

#### **2.4.2.3. Viscosidad**

La solución del quitosano exhibe una amplia gama de viscosidades en los medios ácidos diluidos que dependen principalmente de su peso molecular. El quitosano es un producto altamente viscoso similar a las gomas naturales. La viscosidad puede variar de 10 a 5000cp.



La viscosidad de las soluciones aumenta a medida que el peso molecular o la cantidad de polímero aumentan. Una disminución en el pH aumenta la viscosidad, debido a que la conformación que toma la cadena de quitosano es más extendida, ya que se presentan fuerzas repulsivas entre los grupos aminos cargados positivamente.

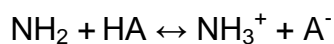
“La viscosidad también aumenta conforme aumenta el grado de desacetilación, debido a que las características del quitosano como polielectrolito aumentan o se hacen más notables”.<sup>6</sup>

“Debido a la alta viscosidad del quitosano en sistemas de pH < 5,5 puede emplearse como espesante, estabilizante o agente de dispersión”.<sup>7</sup>

#### **2.4.2.4. Solubilidad**

La solubilidad y la viscosidad del quitosano dependen del grado de desacetilación y degradación del polímero.

La presencia de grupos amino a lo largo de la cadena de quitosano permite la disolución de esta macromolécula en disoluciones de ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos. En medios ácidos diluidos tiene lugar el siguiente equilibrio:



---

<sup>6</sup> SÁNCHEZ BRENES, Andrés. *Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (Pleuroncodes planipes) para el crecimiento de fibroblastos humanos*. p. 35 y 37.

<sup>7</sup> ABADÍA PIQUERO, Javier. *Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago*. p. 14.

Al adquirir carga positiva la amina, el quitosano aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones diluidas formando sales ya que el pKa del grupo amino en el quitosano es 6,5.

El quitosano se puede solubilizar en ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico y perclórico diluidos. En cambio es insoluble en ácido sulfúrico diluido. También es insoluble en la gran mayoría de disolventes orgánicos como el alcohol y en solventes acuosos neutros o alcalinos. El quitosano al igual que en la quitina es insoluble en agua.

#### **2.4.2.5. Biodegradabilidad**

Como un polímero de interés en sistemas alimenticios, la biodegradación de la quitina y el quitosano es una propiedad importante para ser considerada porque muchas de las aplicaciones en alimentos se relacionan directa o indirectamente con la capacidad de las enzimas para despolimerizar.

Solamente la biodegradabilidad no es una característica relevante de estos biopolímeros, también la no toxicidad de los productos de la degradación, es lo más significativo para las aplicaciones biomédicas y alimenticias. El quitosano es bioabsorbible y biodegradable, y se ha demostrado que es lentamente degradado.

#### **2.4.2.6. Nitrógeno total (Kjeldahl)**

El método Kjeldahl es un proceso de análisis químico para determinar el contenido en nitrógeno total de una sustancia química.

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en:

Ácido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico.

#### **2.4.2.7. Cenizas o minerales totales**

La mineralización del material orgánico biológico es determinada en la sustancia química por la incineración de la materia orgánica, el residuo se pesa y es lo que se conoce como ceniza. Una determinación de este tipo revela los elementos específicos presentes, además las cenizas pueden contener carbón de la materia orgánica en forma de carbonato cuando hay excesos de minerales capaces de formar bases. El análisis de cenizas aclara las combinaciones en que se encuentra un material determinado, los minerales presentes en las combinaciones orgánicas se convierten en compuestos inorgánicos.

#### **2.4.3. Aplicaciones del quitosano**

Por sus naturalezas catiónicas en soluciones ácidas, que le confiere propiedades únicas relativas a otros polisacáridos, la industria del quitosano y algunos de sus derivados se han estimulado internacionalmente, encontrándose un amplio universo de aplicaciones.

A continuación se presenta una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le ha dado al quitosano:

#### **2.4.3.1. Química analítica**

Aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, entre otros.

#### **2.4.3.2. Biomedicina**

Membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, liberadores sistemáticos de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA.

#### **2.4.3.3. Agricultura y ganadería**

Recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores controlados de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, formulaciones de pesticidas. Es decir como bioestimulantes de plantas en tratamientos de semillas, raíces y hojas y, en tratamientos postcosecha de frutas y verduras con el fin de aumentar su conservación.

#### **2.4.3.4. Cosméticos**

El quitosano se introduce en cremas humectantes, pues es una molécula que absorbe el agua. Algunos fabricantes de shampoo lo utilizan como ingrediente, ya que desarrolla una película que da protección y brillo al cabello.

#### **2.4.3.5. Dietéticos**

Productos adelgazantes que actúan como atrapador de grasas como el colesterol y los triglicéridos en el estómago.

#### **2.4.3.6. Industria alimentaria**

Se utiliza como estabilizante para dar consistencia y viscosidad a los aderezos para ensaladas y mayonesas, mientras que en las frutas y verduras frescas sirve como un protector antimicrobiano. Utilizado también como suplemento dietético, administrado en forma de píldoras para adelgazar, componentes de películas o film para el envasado de alimentos.

#### **2.4.3.7. Industria papelera**

En la industria papelera el principal insumo es la celulosa, por lo tanto el quitosano sirve para fijar y dar resistencia al papel.

#### **2.4.3.8. Industria textil**

Componente de fibras que se utilizan en la mejora de lanas y en la impermeabilización de algodones y linos.

#### **2.4.3.9. Tratamiento de agua**

Agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas, también tiene la propiedad de absorber metales pesados como: arsénico, zinc, cobre, cromo e incluso uranio, remoción de surfactantes.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

A continuación se describe el diseño metodológico para la evaluación del grado de conversión de quitina a quitosano en base al porcentaje de nitrógeno total del quitosano determinado.

#### 3.1. Definición operacional de las variables

Como resultado de la revisión bibliográfica sobre los factores que influyeron para la evaluación del quitosano, se determinaron las variables de entrada para medir el efecto sobre los resultados obtenidos.

##### 3.1.1. Variables de control

A continuación se muestran las variables involucradas para la determinación del porcentaje de nitrógeno total, en la tabla II.

Tabla II. **Definición operacional de las variables**

No.	Variable	Unidad	Factor Potencial de diseño	
			Constantes	Variables
1	Peso de la quitina	g	X	
2	Volumen de NaOH	mL		X
3	Concentración de NaOH	%	X	
4	Temperatura	°C		X
5	Tiempo	h		X
6	Contenido de nitrógeno total	%		X

Fuente: elaboración propia.

### 3.1.2. Variables independientes

La tabla III describe las variables independientes en el curso de la desacetilación alcalina.

Tabla III. **Definición operacional de las variables independientes, para la obtención del quitosano**

No.	Variable	Unidad	Descripción
1	Peso de la quitina	g	El peso de la quitina se midió en una balanza y fue el mismo en todas las muestras para la obtención de quitosano.
2	Volumen de NaOH	mL	Con el volumen de NaOH se analizó la variación con respecto a la relación con la quitina.
3	Concentración de NaOH	%	La desacetilación de la quitina se llevó a cabo con NaOH al 45%.
4	Temperatura	°C	La medición de la temperatura se realizó en el proceso de la desacetilación de la quitina, por medio de un termómetro en escala Celsius de mercurio con una escala con marcas cada 0,1 °C.
5	Tiempo	h	Los procesos de desacetilación variaron conforme el tiempo, por lo tanto se controló este factor.

Fuente: elaboración propia.

### 3.1.3. Variables dependientes

Como variable dependiente o variable respuesta se evaluó el contenido de nitrógeno total de las muestras de quitosano obtenido, para luego proceder a encontrar el grado de conversión de quitina a quitosano.

Tabla IV. **Definición operacional de la variable dependiente, para analizar el quitosano**

No.	Variable	Unidad	Descripción
1	Nitrógeno Total	%	Cantidad de nitrógeno total que contiene la muestra de quitosano.

Fuente: elaboración propia.

### 3.2. Delimitación de campo de estudio

- Área  
Fundamento del conocimiento: Bioquímica.  
Aplicación del procedimiento experimental: Biotecnología.
- Proceso  
Evaluación del grado de conversión de quitina a quitosano procedente del exoesqueleto del abdomen del camarón.



- **Etapa del proceso**  
Recolección de la materia prima, limpieza, desproteínización, desmineralización, blanqueo, desacetilación, purificación y determinación del contenido de nitrógeno total del quitosano, mediante ensayos de laboratorio.
- **Ubicación**  
En el mercado de la zona 4 de la ciudad de Guatemala se obtuvo la materia prima. La obtención del quitosano se llevó a cabo en el Laboratorio de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería. La determinación del contenido de nitrógeno total se realizó en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- **Clima**  
Se encontró semi-cálido entre los (19 y 24 °C) en la ciudad de Guatemala y con 68% de humedad relativa.
- **Viabilidad**  
La investigación fue factible, por disponer de los recursos necesarios para llevarla a cabo.

### **3.2.1. Tipo de estudio**

El tipo de estudio que se aplicó en el trabajo de graduación es el experimental, ya que provee de un método lógico que indica lo que resultó bajo condiciones cuidadosamente controladas, se plantearon hipótesis y se experimentó, en este caso fue la desacetilación de la quitina por hidrólisis alcalina.

#### **3.2.1.1. Elección del diseño experimental**

Se seleccionó el diseño que consideró 3 variables independientes controladas en el experimento y que incluyó dos niveles de presencia por cada una de las variables independientes.

##### **3.2.1.1.1. Diseño factorial totalmente al azar**

Este diseño sirvió para ver el comportamiento de la muestras del quitosano a evaluar.

Consistió en que todos los niveles de cada variable independiente son tomados en combinación con todos los niveles de las otras variables independientes y que ninguna combinación estuviera repetida.

El diseño de la investigación es el diseño factorial  $2 \times 2 \times 2$ , en donde el valor numérico de cada dígito indicó el número de niveles de la variable independiente. Por lo tanto cada una de las 3 variables a trabajar, tiene dos niveles presentes.

Se realizó un experimento factorial en el que se estudió el efecto de 3 factores; el factor A la relación quitina/NaOH, el factor B el tiempo y el factor C la temperatura; con lo cual es importante no sólo determinar si los factores influyeron sobre la respuesta, sino también si existió una interacción entre ellos.

Para el diseño factorial se utilizaron las letras (A, B, C) para las variables independientes y números (1, 2) para los niveles de cada factor. Las combinaciones de letras y números que aparecen en las casillas de la siguiente tabla, representaron las mezclas de niveles de dichas variables. Cada una de las celdas es un grupo de muestra.

Tabla V. **Diseño factorial 2x2x2 totalmente al azar para la evaluación del quitosano a partir de la desacetilación de la quitina**

NaOH 45 %	C <sub>1</sub> = 75 °C		C <sub>2</sub> = 100 °C	
	B <sub>1</sub> = 1,5 h	B <sub>2</sub> = 3 h	B <sub>1</sub> = 1,5 h	B <sub>2</sub> = 3 h
A <sub>1</sub> = 1/5	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>
A <sub>2</sub> = 1/10	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>

Fuente: elaboración propia.

Para cada una de estas combinaciones se analizó el comportamiento de la variable respuesta, definida como: nitrógeno total.

Singularidad: el presente estudio experimental consideró condiciones anteriormente evaluadas, innovando para ello el uso de marmita o reactor en la presurización del sistema reactivo para la desacetilación.

### **3.2.2. Selección y tamaño de muestra**

Las muestras de quitina que se utilizaron para la desacetilación, son las obtenidas del exoesqueleto del abdomen del camarón proveniente de pesca marina y no de cultivo.

Las muestras se seleccionaron en base a un diseño factorial totalmente al azar. Por lo que en el experimento factorial  $2^3$  se obtuvieron 8 tratamientos.

El tamaño de las muestras que se utilizaron es de 8 unidades experimentales, para la obtención del quitosano.

### **3.2.3. Elección del número de repeticiones**

Para incrementar la precisión en el experimento se realizaron 3 repeticiones a las 8 unidades experimentales establecidas.

### **3.2.4. Unidad de análisis y observación**

La unidad de análisis fue el contenido de nitrógeno total del quitosano obtenido de la quitina extraída del exoesqueleto del abdomen del camarón. Se observaron los parámetros con los que se trabajó para obtener un mejor resultado. Debido a las tres repeticiones realizadas se obtuvo un total de 24 observaciones.

### **3.3. Recursos humanos disponibles**

- Investigadora  
Andrea Lizet Fong Reyes
- Asesor  
Ing. Qco. César Alfonso García
- Coasesora  
Inga. Qca. Mercedes Esther Roquel
- Colaboradores  
T.L. José Morales  
Ing. Agro. Marino Barrientos

### **3.4. Recursos materiales disponibles**

A continuación se describen los equipos, instrumentos y materiales de laboratorio utilizados para la realización del trabajo de graduación.

#### **3.4.1. Equipos**

Los equipos se dividen en equipos de medición y en equipos auxiliares. Los siguientes equipos fueron los utilizados para la obtención del quitosano en el laboratorio.

#### **3.4.1.1. Equipo de medición**

- Balanza analítica, marca Adventur
- Termómetro de vidrio con Mercurio como fluido, con escala de 0-200 °C
- Potenciómetro, marca Orión Research

#### **3.4.1.2. Equipo auxiliar**

- Ozonizador para el agua
- Procesador de alimentos, marca Black & Decker
- Campana de extracción de gases, marca Serproma
- Plancha de calentamiento con agitación, marca Corning, 120V, 60Hz
- Horno de secado, marca Serproma
- Bomba de vacío, marca Gast
- Reactores de acero inoxidable de 50 mL, dimensiones según norma ASTM C 289-03. Ver anexo No. 1

#### **3.4.2. Instrumentos de laboratorio y cristalería**

A continuación se describe la cristalería de medición y la auxiliar así como los instrumentos de laboratorio utilizados para la obtención de las muestras de quitosano.

##### **3.4.2.1. Cristalería de medición**

- Balones aforados de 1000 mL, marca Kimax
- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Probeta de 50 mL

### **3.4.2.2 Instrumentos de laboratorio y cristalería auxiliar**

- Beakers de vidrio con capacidad de 25, 100 y 600 mL, marca Pirex
- Varilla de agitación de vidrio, 8\*300 mm
- Kitazato de vidrio de 500 mL
- Embudo buchner de porcelana, diámetro 110 mm, 500 mL
- Earlenmeyer de vidrio de 100 mL
- Crisol gooch de porcelana de 40 mL, 1150 °C
- Mortero con pistilo, de porcelana pequeño
- Embudo de vidrio de 100 mL
- Pizeta de polietileno de 125 mL
- Agitadores magnéticos de 1 pulgada
- Espátula con mango de madera de 15 cm de largo

### **3.4.3. Materia prima y reactivos**

A continuación se describe la materia prima y los reactivos utilizados para la obtención del quitosano, los cuales se dividen en reactivos tipo industrial y en reactivos tipo comercial.

#### **3.4.3.1. Materia prima**

- Exoesqueleto del camarón

#### **3.4.3.2. Reactivos de tipo industrial**

- Hidróxido de sodio grado reactivo, MERCK
- Ácido clorhídrico grado reactivo, MERCK
- Ácido acético glacial grado reactivo, MERCK
- Etanol al 95% grado reactivo, MERCK

#### **3.4.3.3. Reactivos de tipo comercial**

- Agua desmineralizada, marca salvavidas
- Hipoclorito de sodio grado comercial
- Quitosano en polvo grado práctico

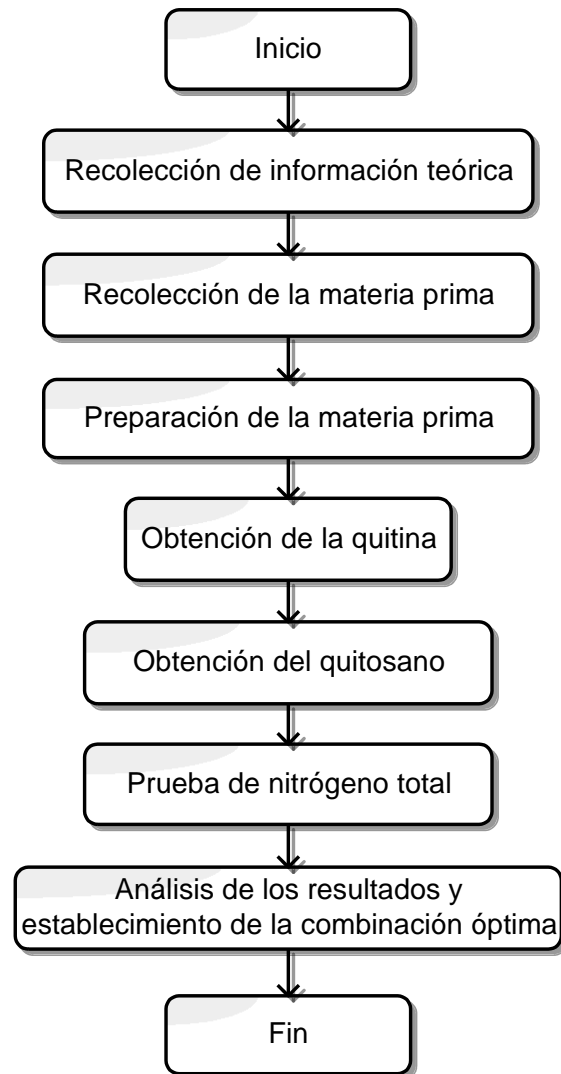
### **3.5. Técnica cuantitativa**

Se empleó como técnica cuantitativa el procedimiento a seguir para lograr la obtención del quitosano a partir de la quitina extraída del exoesqueleto del abdomen del camarón y a partir de ello se estableció la mejor combinación entre la relación de quitina/NaOH, el tiempo y la temperatura a variar en el proceso de la desacetilación, luego se evaluó el contenido de nitrógeno total que las muestras de quitosano contenían, el cual se trató de un método para el análisis cuantitativo de nitrógeno que se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria.

A continuación en la figura 4, se muestra el diagrama general de la técnica cuantitativa para obtener el quitosano.



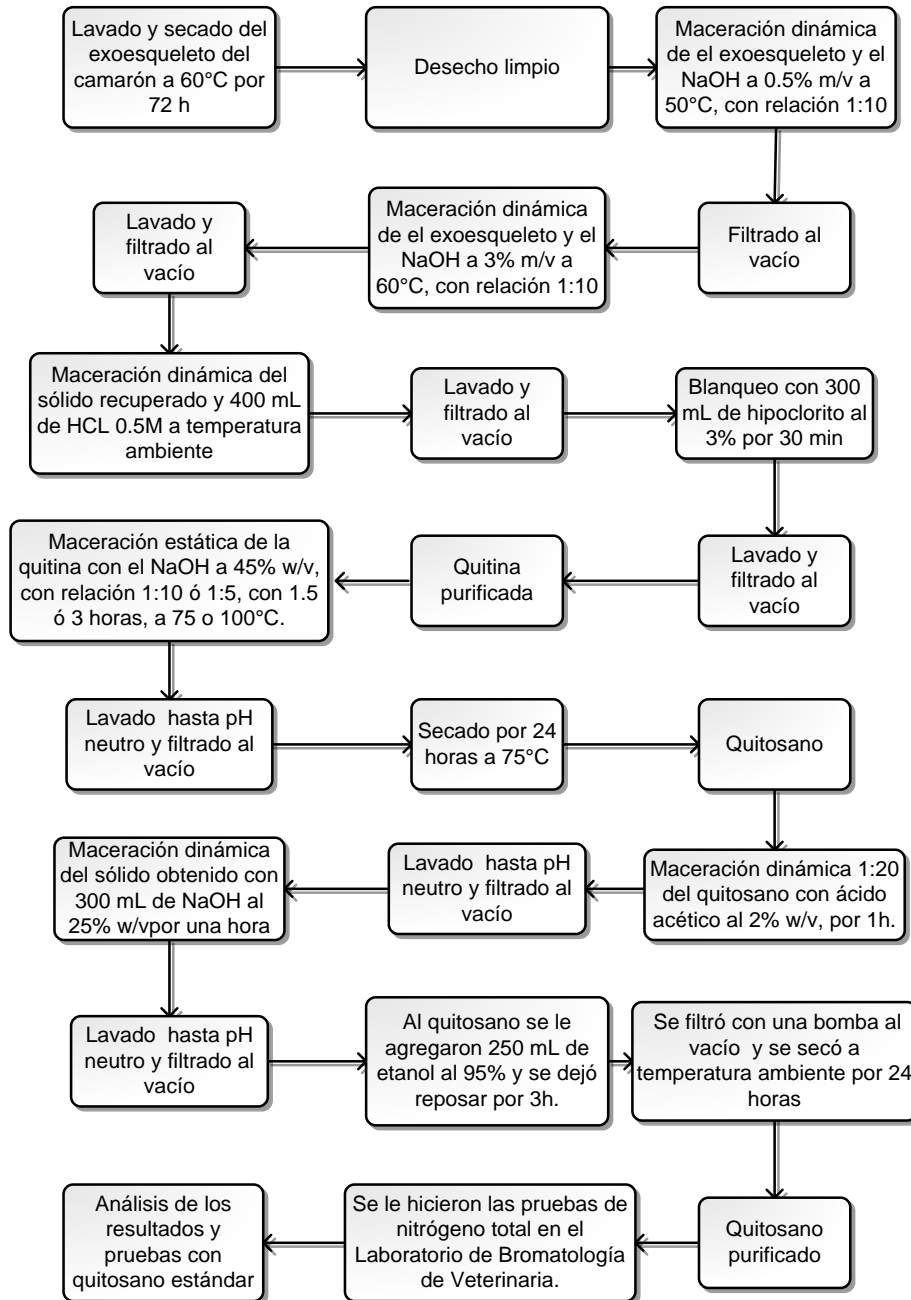
Figura 4. **Diseño general para la obtención de quitosano**



Fuente: elaboración propia.

El siguiente diagrama de la figura 5, muestra de una manera más específica la obtención del quitosano a partir de la quitina extraída del exoesqueleto del abdomen del camarón.

Figura 5. **Diseño específico para la obtención de quitosano**



Fuente: elaboración propia.

### **3.5.1. Evaluación del quitosano**

A continuación se describe la forma de evaluación y obtención del quitosano obtenido de la quitina procedente del abdomen del exoesqueleto del camarón.

#### **3.5.1.1. Preparación de la materia prima**

La materia prima se obtuvo de los desechos del camarón del mercado de la zona 4 y de forma aleatoria, se trabajó únicamente con el abdomen del exoesqueleto. Las muestras se lavaron con abundante agua ozonizada y se procedió a la separación de la masa proteica principalmente que pudo quedar adherida a los mismos, para luego pasar al proceso de secado y pulverizado, esto con el objetivo de que al tener un diámetro demasiado pequeño, pueda tener mayor área de contacto para trabajarla.

#### **3.5.1.2. Desproteínización**

Consistió en tratar el abdomen del exoesqueleto del camarón con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura de 60 °C, con el fin de disolver la proteína. Tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pudieron provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero.

#### **3.5.1.3. Desmineralización**

El principal componente inorgánico de los exoesqueletos de los crustáceos es el  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{MgCO}_3$ , el cual se pudo eliminar empleando soluciones diluidas de HCl a temperatura ambiente.

#### **3.5.1.4. Desacetilación de la quitina**

La reacción se realizó en fase heterogénea empleando una solución concentrada de NaOH al 45% a temperaturas altas.

La evaluación del quitosano se trabajó con dos diferentes relaciones entre quitina/NaOH (w/v), tiempo y temperatura. Con el fin de separar la mayor cantidad de grupos acetilo de la cadena polimérica.

- Las relaciones de quitina/NaOH para la obtención del quitosano son de 1:10 y 1:5, con 45% de NaOH.
- El tiempo que se utilizó para la desacetilación de la quitina fue de 1,5 y 3h.
- Las temperaturas que se utilizaron para la desacetilación de la quitina fueron de 75 °C y 100 °C.

A las muestras de quitosano obtenidas se les determinó el contenido de nitrógeno total por el método de Kjeldahl.

A partir de los resultados anteriores se estableció que la relación quitina/NaOH y temperatura óptima era de 1:5 y 100 °C respectivamente, por lo que se decidió variar nuevamente el tiempo a 4, 6 y 12 horas más, con el objetivo de observar la variación del contenido de nitrógeno total respecto al tiempo.

### 3.6. Recolección y ordenamiento de la información

La desacetilación de la quitina se realizó con una concentración de NaOH de 45%, dos relaciones entre quitina/NaOH, dos tiempos diferentes y dos temperaturas diferentes, dando como resultado la elaboración de 8 muestras de quitosano diferentes a las cuales se les determinó su contenido de nitrógeno total con 3 repeticiones por cada una de ellas, para tener un total de 24 tratamientos.

Tabla VI. **Diseño experimental de las combinaciones a utilizar en la evaluación del quitosano**

<b>Combinación de la muestra No.</b>	<b>Quitina/NaOH (g/mL)</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	1:5	1,5	75
2	1:5	3,0	75
3	1:10	1,5	75
4	1:10	3,0	75
5	1:5	1,5	100
6	1:5	3,0	100
7	1:10	1,5	100
8	1:10	3,0	100

Fuente: elaboración propia.

### **3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información**

Con la información recolectada se procedió a describir cada uno de los procedimientos a realizar para la obtención del quitosano a partir de la quitina extraída del exoesqueleto del abdomen del camarón.

#### **3.7.1. Procedimiento de la recolección y preparación de los exoesqueletos**

- A. Se procedió a la recolección del abdomen del exoesqueleto del camarón.
- B. Los residuos de camarón, patas, colas y carne fueron separados de sus caparazones, para luego ser lavados con abundante agua ozonizada, quitándoles los restos orgánicos que pudieran estar presentes.
- C. Los exoesqueletos obtenidos, fueron secados en un secador de bandejas a 60 °C por 72 horas hasta peso constante.
- D. Los exoesqueletos secos libres de patas y cola se sometieron a un proceso de pulverizado.

#### **3.7.2. Procedimiento de la desproteínización**

- A. Se preparó una solución de hidróxido de sodio al 0,5% g/mL.
- B. Los caparazones se sometieron a cocción con el hidróxido de sodio en una relación 1:10 (g/mL) por 2 hora a 50 °C.
- C. Se filtró al vacío y se trabajó con el sólido precipitado.
- D. Se preparó una solución de hidróxido de sodio al 3% g/mL.
- E. Luego el sólido precipitado se trató con la solución de hidróxido de sodio en una relación 1:10 (g/mL) por 1 hora a 60 °C.
- F. Se descartó el líquido sobrenadante y luego se lavó hasta pH neutro.
- G. Se filtró al vacío.

### **3.7.3. Procedimiento de la desmineralización**

- A. Se preparó una solución de ácido clorhídrico a 0,5 M.
- B. El sólido remanente obtenido, se desmineralizó con 400 mL de HCl a 0,5 M a temperatura ambiente por 60 minutos.
- C. Se lavó hasta pH neutro.
- D. Luego se filtró al vacío y se descartó el líquido obtenido.

### **3.7.4. Procedimiento del blanqueo**

- A. El residuo sólido obtenido se trató con una solución de 300 mL de hipoclorito al 3% mL/mL durante 30 min.
- B. Se lavó y se filtró hasta descartar el líquido.

### **3.7.5. Procedimiento de la desacetilación de la quitina**

- A. Se preparó una solución de hidróxido de sodio al 45% g/mL.
- B. Se colocó en un reactor una relación de quitina e hidróxido de sodio 1:10 (g/mL).
- C. Se calentó en un horno a 100 °C por tres horas.
- D. Posteriormente el producto se lavó con agua hasta pH neutro y se filtró hasta obtener el sólido.
- E. Se secó a 75 °C durante 24 horas.

Nota: se realizó el mismo procedimiento variando la relación de quitina/NaOH, el tiempo y la temperatura. Según lo muestra la tabla VI.

### **3.7.6. Procedimiento de la purificación del quitosano:**

- A. Se colocó en un beacker de vidrio una relación de 1:20 g/mL de quitosano y ácido acético al 2% mL/mL. La solución se agitó mecánicamente por una hora.
- B. Posteriormente se lavó hasta pH neutro y se filtró al vacío con una bomba de vacío.
- C. La solución filtrada se colocó en un earlenmeyer y se le agregaron 300 mL de hidróxido de sodio al 25% g/mL y se agitó mecánicamente por una hora.
- D. Se filtró y se le hicieron lavados con agua hasta pH neutro.
- E. Al sólido se le agregaron 250 mL de etanol al 95% y se dejó reposar por tres horas.
- F. Finalmente se filtró con una bomba al vacío y se secó a temperatura ambiente por 24 horas.

Nota: todos los procedimientos descritos hasta acá se repitieron dos veces más, para hacer un total de 3 repeticiones. Luego se volvió a repetir el mismo procedimiento con la relación 1:5 a 100 °C y a 4, 6 y 12 h más, con el fin de encontrar el mejor tiempo de desacetilación.

### **3.7.7. Método para la obtención de nitrógeno (basado en el método oficial de A.O.A.C. 976.05)**

El contenido de nitrógeno total se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria, por el método de Kjeldahl. Ver anexo 2.



### **3.8. Análisis estadístico**

La mayoría de los experimentos consisten en el estudio de los efectos de una o más variables independientes sobre una respuesta; estas variables independientes que pudieron controlarse en el experimento se denominaron factores.

Los 3 factores involucrados para la obtención del quitosano fueron: relación de quitina/NaOH, tiempo y temperatura, de los cuales cada uno tiene 2 niveles, para lo cual se tuvo un experimento factorial de  $2^3$ , dando como resultado 8 combinaciones.

#### **3.8.1. Análisis de varianza de 3 factores**

El análisis estadístico de los datos obtenidos del contenido de nitrógeno total se realizó a través de un análisis de varianza (ANOVA) para un experimento factorial  $2^3$  en bloques completos al azar, con la distribución de Fisher.

El ANOVA, como su nombre lo indica, trató de analizar la variación de una respuesta y se usó para establecer si existían diferencias significativas en las medias entre dos o más muestras, midiendo la fuente de variación en los datos, se utilizó para comparar las 8 combinaciones para la obtención de quitosano y poder determinar la que fuera mejor.

El objetivo del análisis de varianza es identificar las variables independientes importantes en el experimento, y determinar cómo interactúa y afectan a la respuesta, que en este caso es el contenido de nitrógeno total.

Los datos se arreglaron de la siguiente manera:

Tabla VII. **Datos típicos para el diseño de bloques al azar**

	<b>Bloques</b>			
<b>Tratamientos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Promedio</b>
<b>1</b>	Y1,1	Y1,2	Y1,3	<b>Y1prom</b>
<b>2</b>	Y2,1	Y2,2	Y2,3	<b>Y2prom</b>
<b>3</b>	Y3,1	Y3,2	Y3,3	<b>Y3prom</b>
<b>4</b>	Y4,1	Y4,2	Y4,3	<b>Y4prom</b>
<b>5</b>	Y5,1	Y5,2	Y5,3	<b>Y5prom</b>
<b>6</b>	Y6,1	Y6,2	Y6,3	<b>Y6prom</b>
<b>7</b>	Y7,1	Y7,2	Y7,3	<b>Y7prom</b>
<b>8</b>	Y8,1	Y8,2	Y8,3	<b>Y8prom</b>
<b>Promedio</b>	<b>Y<sub>i,j</sub></b>	<b>Y<sub>i,j</sub></b>	<b>Y<sub>i,j</sub></b>	<b>Y</b>

Fuente: elaboración propia.

Donde:

$Y_{i,j}$  = total de las observaciones bajo el  $i,j$ -ésimo tratamiento

$Y$  = promedio total de las observaciones bajo el  $i,j$ -ésimo tratamiento

$ij$  = datos obtenidos para cada observación bajo cada tratamiento

$i$  = número de combinación

$j$  = número de repetición

El procedimiento para un diseño de bloques completos al azar consistió en seleccionar “b” bloques y en ejecutar una repetición completa del experimento en cada bloque, con un solo factor con “a” niveles.

El modelo para el experimento de 3 factores está dado por:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

- $Y_{ijkl}$  = Variable respuesta, contenido de nitrógeno total.  
 $\mu$  = Efecto de la media general.  
 $\alpha_i$  = Efecto del i-ésimo nivel del factor A, relación quitina/NaOH (w/v)  
 $\beta_j$  = Efecto del j-ésimo nivel del factor B, tiempo (h)  
 $\gamma_k$  = Efecto del k-ésimo nivel del factor C, temperatura (°C)  
 $(\alpha\beta)_{ij}$  = Interacción del i-ésimo nivel del factor A y j-ésimo nivel del factor B.  
 $(\alpha\gamma)_{ik}$  = Interacción del i-ésimo nivel del factor A y k-ésimo nivel del factor C.  
 $(\beta\gamma)_{jk}$  = Interacción del j-ésimo nivel del factor B y k-ésimo nivel del factor C.  
 $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = Efecto de interacción de tres factores  
 $\varepsilon_{ijklm}$  = Error aleatorio.

Los efectos de bloque y tratamiento se definen como desviaciones respecto a la media general.

En el análisis de varianza se calcularon:

- Grados de libertad
- Sumas de cuadrados
- Cuadrados medios
- F

En donde las sumas de cuadrados se dividieron dentro de los grados de libertad y se obtuvieron los cuadrados medios. Luego los cuadrados medios de grupos se dividieron entre el cuadrado medio del error y se obtuvo una F.

Si la F calculada es mayor que la F tabulada, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Las operaciones para el análisis de varianza se resumen en la siguiente tabla, así como las fórmulas para el cálculo de suma de cuadrados.

Tabla VIII. **ANOVA para el experimento de tres factores de n réplicas**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	f calculada
Efecto principal				
A	SSA	a-1	$s_1^2$	$f = \frac{s_1^2}{s^2}$
B	SSB	b-1	$s_2^2$	$f = \frac{s_2^2}{s^2}$
C	SSC	c-1	$s_3^2$	$f = \frac{s_3^2}{s^2}$
Interacción de dos factores				
AB	SS(AB)	(a-1)(b-1)	$s_4^2$	$f = \frac{s_4^2}{s^2}$
AC	SS(AC)	(a-1)(c-1)	$s_5^2$	$f = \frac{s_5^2}{s^2}$
BC	SS(BC)	(b-1)(c-1)	$s_6^2$	$f = \frac{s_6^2}{s^2}$
Interacción de tres factores				
ABC	SS(ABC)	(a-1)(b-1)(c-1)	$s_7^2$	$f = \frac{s_7^2}{s^2}$
Error	SSE	abc(n-1)	$s^2$	
Total	SST	abcn-1		

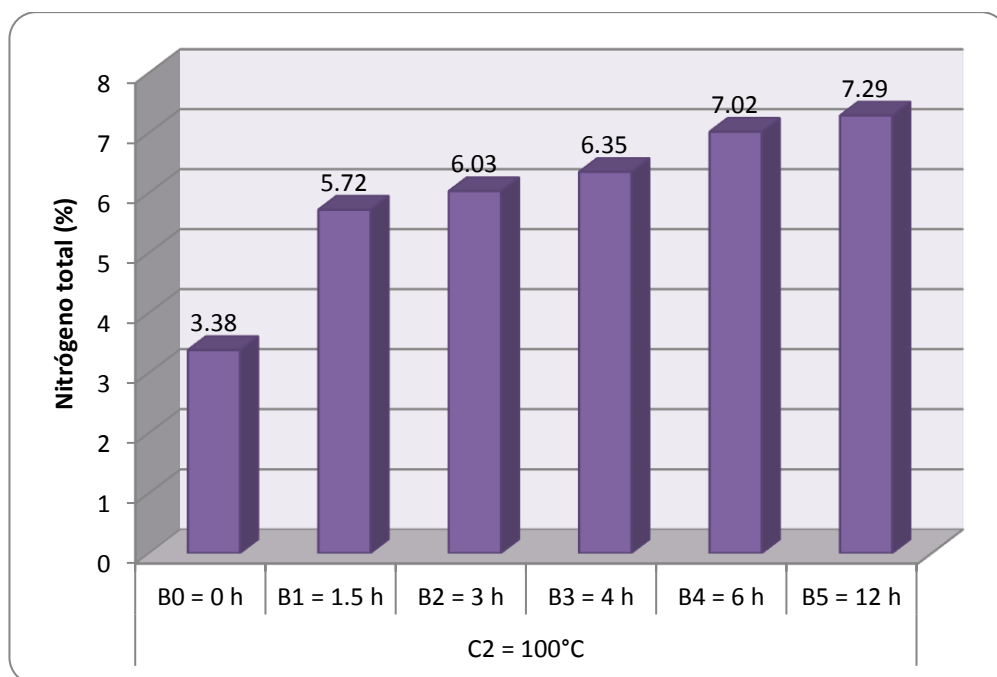
Fuente: WALPOLE, Ronald, Probabilidad y Estadística para Ingenieros. p.49.



## 4. RESULTADOS

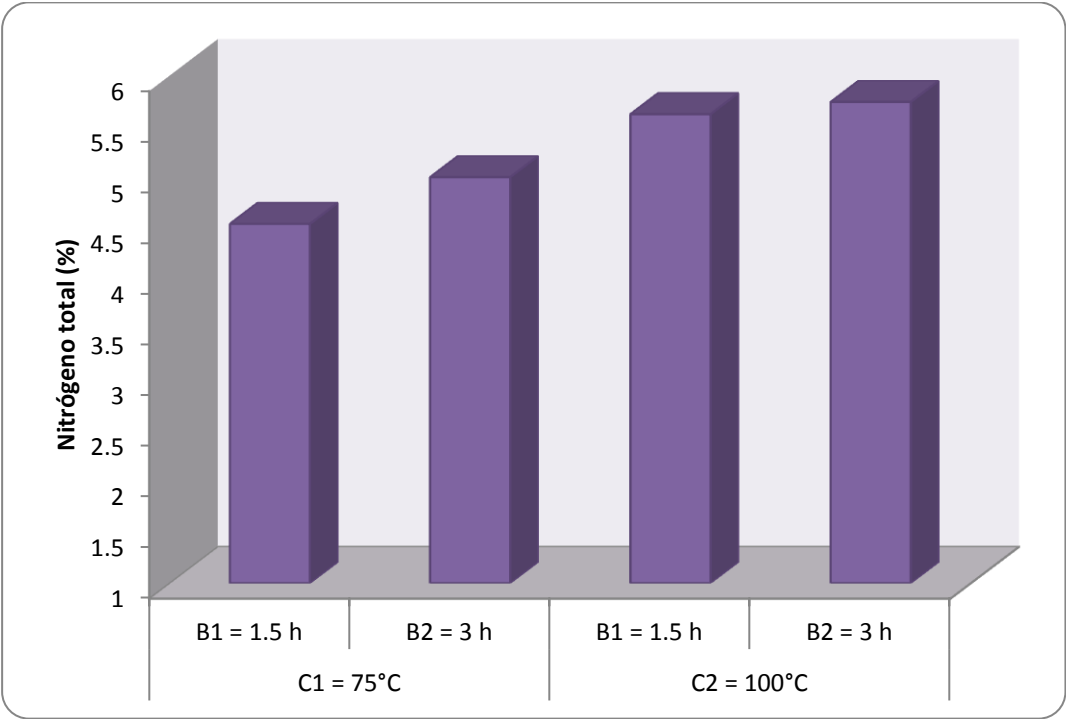
Los gráficos a continuación presentados muestran los diferentes resultados obtenidos del estudio de la conversión de quitina a quitosano, sobre el contenido de nitrógeno total en función de variar los parámetros experimentales.

Figura 6. **Evolución del porcentaje de nitrógeno total determinado en función de las variaciones en la hidrólisis alcalina para la desacetilación de la quitina con la relación quitina/álcali 1:5 y 100 °C**



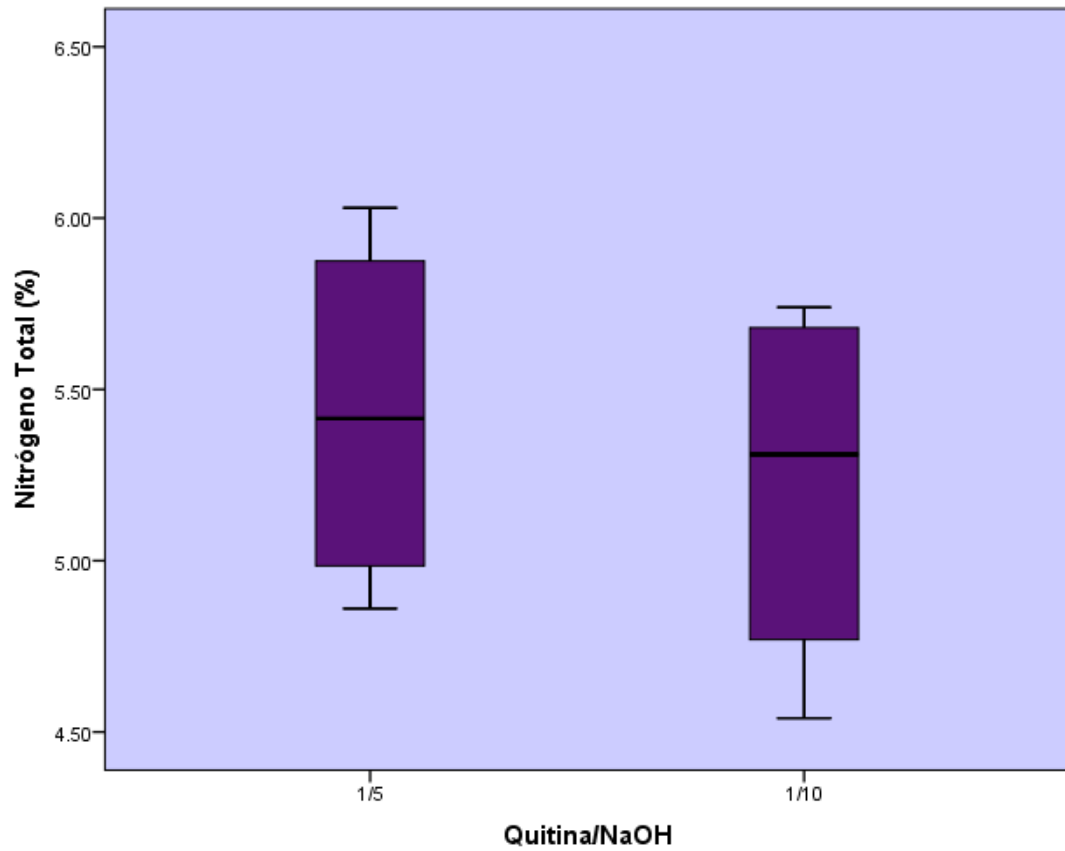
Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

**Figura 7. Evolución del porcentaje de nitrógeno total determinado en función de las variaciones en la hidrólisis alcalina para la desacetilación de la quitina con la relación quitina/álcali 1:10 a 75 °C y 100 °C**



Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

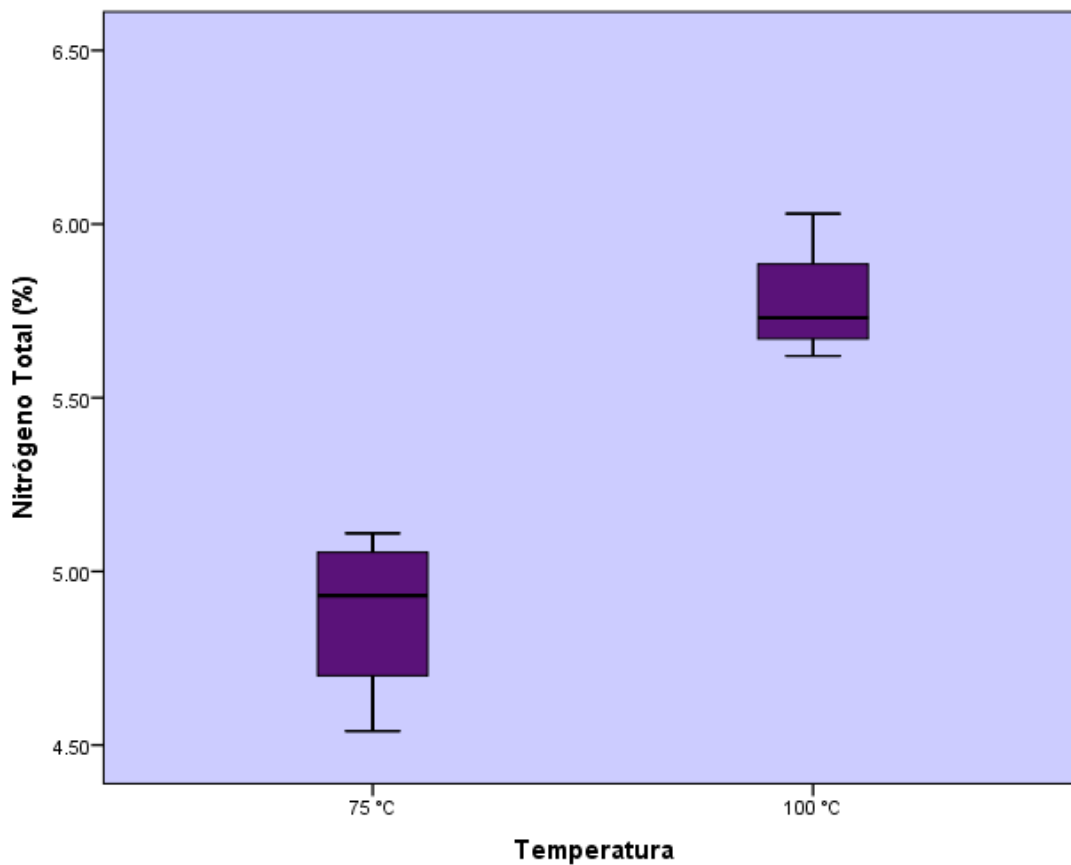
Figura 8. **Distribución del porcentaje de nitrógeno total en función de la relación quitina/NaOH para la combinación de los parámetros experimentales: temperaturas y tiempos de desacetilación**



Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

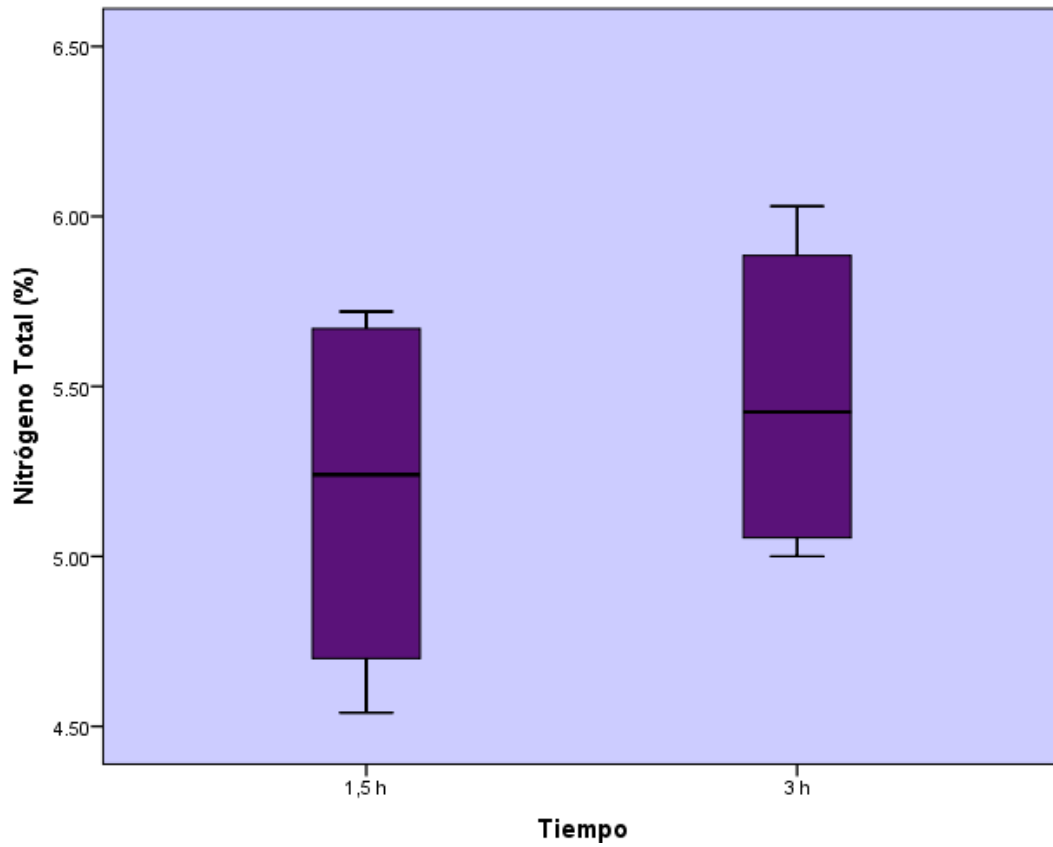


Figura 9. **Distribución del porcentaje de nitrógeno total en función la temperatura para la combinación de los parámetros experimentales: de la relación quitina/álcali y tiempos de desacetilación**



Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

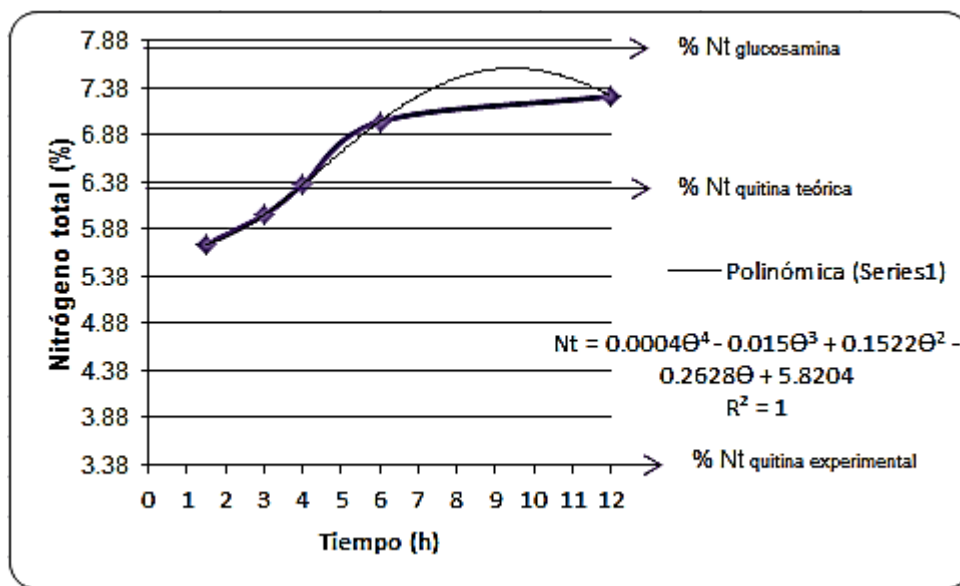
Figura 10. **Distribución del porcentaje de nitrógeno total en función del tiempo para la combinación de los parámetros experimentales: relación quitina/álcali y temperaturas de desacetilación**



Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

La siguiente figura muestra el contenido de nitrógeno total medido en función del tiempo de hidrólisis alcalina en base a las condiciones de 100 °C y una relación de 1:5 de quitina/álcali, se pueden observar los valores del porcentaje de nitrógeno total de la glucosamina, de la quitina teórica y de la quitina experimental.

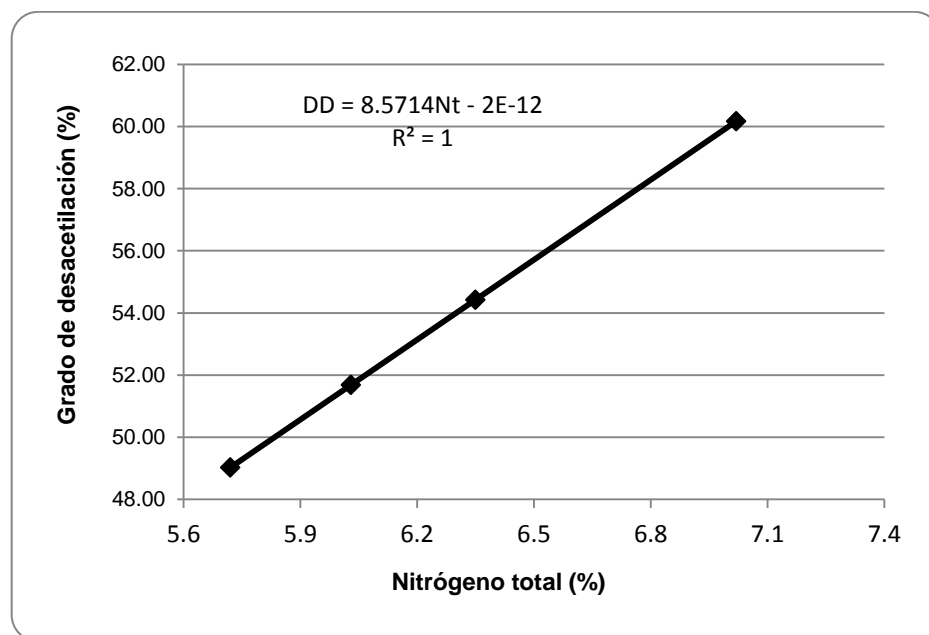
Figura 11. **Porcentaje de nitrógeno total en función del tiempo**



Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

La figura 11 muestra el grado de desacetilación estimado en base al contenido de nitrógeno total en función del tiempo de hidrolisis alcalina para las condiciones de 100 °C y una relación 1:5 de quitina/álcali.

Figura 12. **Grado de desacetilación en función del contenido de nitrógeno total**



Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

La siguiente tabla reúne los parámetros experimentales y resultados óptimos del grado de conversión de quitina a quitosano, logrado durante la parte experimental de la investigación.

**Tabla IX. Condiciones óptimas para la estimación determinada del grado de desacetilación (DD)**

<b>Quitina/NaOH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Contenido de Nitrógeno total (%)</b>	<b>Grado de desacetilación (%)</b>
1:5	100	12	7,29	62,49

Fuente: apéndice 5, elaboración propia.

La tabla X, muestra el análisis estadístico de la investigación, con el fin de determinar el resultado de las hipótesis y así saber si existe influencia significativa en la variación de los parámetros experimentales, sobre la variable respuesta denominada porcentaje de nitrógeno total.

Tabla X. **Análisis de varianza, con los valores obtenidos de  $f$  para cada fuente de variación**

<b>Fuente de variación</b>	<b><math>f</math> calculada</b>	<b>Valor crítico para <math>f</math></b>	<b>Resultado</b>
<b>Efecto principal</b>			
Temperatura	653,70	4,49	Se rechaza la hipótesis nula.
Tiempo	65,29	4,49	Se rechaza la hipótesis nula.
Quitina/NaOH	34,81	4,49	Se rechaza la hipótesis nula.
<b>Interacción de dos factores</b>			
Temperatura*Tiempo	4,06	4,49	Se acepta la hipótesis nula.
Temp* Quitina/NaOH	0,09	4,49	Se acepta la hipótesis nula.
Tiempo* Quitina/NaOH	0,07	4,49	Se acepta la hipótesis nula.
<b>Interacción de tres factores</b>			
Temp*Tiempo*Quitina/NaOH	7,95	4,49	Se rechaza la hipótesis nula.

Fuente: apéndice 6, elaboración propia.



## 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se desarrolló el método de desacetilación presurizado de la quitina por hidrólisis alcalina y se utilizó el hidróxido de sodio concentrado y caliente, retirando la mayor cantidad de unidades acetilo de la cadena polimérica. La desacetilación se llevó a cabo en un reactor hermético presurizado, ver anexo 1, el cual permitió mejorar la reactividad para la obtención del quitosano.

Las muestras de quitina se obtuvieron del abdomen del exoesqueleto del camarón (*Litopenaeus vannamei*) recolectado en el mercado de la zona 4 de la Ciudad de Guatemala.

En la evaluación del comportamiento del contenido de nitrógeno total del quitosano como referente experimental, se determinaron las condiciones óptimas de obtención del quitosano, utilizando para la desacetilación varios tiempos de reacción, dos temperaturas y dos relaciones de quitina/álcali a concentración constante de 45% g/mL de hidróxido de sodio.

Las observaciones experimentales se ejecutaron en triplicado para el contenido de nitrógeno total de cada combinación de los tratamientos, los cuales se muestra en las tablas del apéndice 5.

La sección de resultados representados en la figura 6 muestra los diferentes rendimientos del porcentaje de nitrógeno total del quitosano en el curso de la desacetilación de la quitina con énfasis en el mejor rendimiento correspondiente a un tiempo de 12 h de hidrólisis alcalina a una temperatura de 100 °C y una relación quitina/álcali de 1:5.



La figura 7 describe una combinación del rendimiento en nitrógeno total en base a las temperaturas y tiempos de desacetilación a una relación 1:10 quitina/álcali determinando el aumento que existe del contenido de nitrógeno total al aumentar tanto tiempos y temperaturas de la hidrólisis alcalina.

Los gráficos de las figuras 8, 9 y 10 se hicieron promediando el contenido de nitrógeno total para la relación quitina/NaOH, la temperatura y el tiempo respectivamente y observando cuales fueron los mejores parámetros que favorecen el mejor rendimiento. A continuación se detallan cada una de ellas.

En el gráfico de la figura 8, el contenido de nitrógeno total en función de la relación quitina/NaOH; indica que el contenido de nitrógeno total es mayor al utilizar la relación quitina/NaOH menor, por lo tanto no es necesario utilizar una gran cantidad de hidróxido de sodio, para obtener un mejor resultado.

En el gráfico de la figura 9, el contenido de nitrógeno total en función de la temperatura; muestra que el contenido de nitrógeno total es mayor conforme aumenta la temperatura de hidrólisis, ya que para obtener una mejor desacetilación se requiere utilizar experimentalmente temperaturas de 100 °C y así poder lograr la mayor cantidad de unidades acetilo eliminadas de la cadena polimérica de la quitina, respondiendo a un mayor contenido de nitrógeno total.

En el gráfico de la figura 10, el contenido de nitrógeno total en función del tiempo; muestra como el porcentaje de nitrógeno total aumenta conforme aumentó el tiempo de desacetilación alcalina.

La figura 11 muestra el gráfico de correlación del contenido de nitrógeno total en función del tiempo de desacetilación, el cual se correlacionó mediante una función polinómica de orden 4.

Con los resultados anteriores se procedió a estimar el grado de desacetilación DD, según refiere la literatura (Ref. 5), así para un contenido de nitrógeno total de más de 7% en peso, el grado de desacetilación debe ser mayor del 60% para ser denominado quitosano. En base a la literatura se evaluó la relación para encontrar el grado de desacetilación del quitosano según se muestra en la tabla del apéndice 5, donde se observó que para un tiempo de 6 h se obtuvo el 7,02% de nitrógeno total, con un grado de desacetilación estimado del 60,17%.

Para obtener un mejor grado de desacetilación se elaboró el gráfico de la figura 12, del grado de desacetilación en función del porcentaje de nitrógeno total; el cual muestra que el grado de desacetilación estimado es mayor para el incremento del contenido de nitrógeno total en una proyección lineal. Así para un contenido de nitrógeno total de 7,29% logrado en un tiempo de 12 h y utilizando la ecuación lineal del gráfico 12, se procedió a estimar el grado de desacetilación el cual fue de 62,49%.

En la tabla X se observó en base a los resultados que con la relación 1:5 de quitina/NaOH, la temperatura de 100°C y el tiempo de 12 h se obtuvo mayor contenido de nitrógeno total, que fue de 7,29% con un grado de desacetilación del DD=62,49%, por lo tanto, ésta es la condición óptima del método desarrollado.

Utilizando las fórmulas estadísticas para el ANOVA, calculando las sumas de cuadrados con un nivel de confianza  $\alpha=0,05$ , se obtuvieron los resultados del análisis estadístico, tabulados en la tabla del apéndice 6 de la cual se comprueban las siguientes hipótesis:

Se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se dice que se establece que experimentalmente las diferentes relaciones de quitina/NaOH, diferentes tiempos y diferentes temperaturas, implican diferentes contenidos de nitrógeno total de resultado, se enuncia también que la iteración entre los tres factores es significativa, es decir, la relación quitina/NaOH combinada con el tiempo y la temperatura determinan el porcentaje del contenido de nitrógeno total alcanzado. Sin embargo para la iteración de dos factores se acepta la hipótesis nula y se enuncia que no existe diferencia significativa en el porcentaje de nitrógeno total.

De acuerdo con el resultado del análisis de varianza de los factores A (quitina/NaOH), B (tiempo) y C (temperatura), se determinó que los factores, sobre la variable respuesta (contenido de nitrógeno total) y la iteración que existe entre los tres, si es significativa, más no lo es para la iteración de dos factores.

Esto se respalda con los datos de la tabla X, que muestran los valores de la  $f$  calculada para la prueba de Fisher, en donde los valores de  $f$  para la fuente de variación de la temperatura, tiempo, quitina/NaOH y la iteración de los tres, son mayores que el valor tabulado de 4,49, con lo cual se determinó que existe diferencia significativa en el porcentaje de nitrógeno total.

Es así como la temperatura muestra una mayor influencia en los resultados durante el proceso de la desacetilación, el tiempo que también varía notablemente y la relación quitina/NaOH que es la que varía significativamente poco.

## CONCLUSIONES

1. Se logró establecer el grado de desacetilación estimado, como consecuencia de determinar el porcentaje de nitrógeno total en función de la hidrólisis alcalina experimentalmente realizada.
2. El mejor grado de desacetilación estimado en función del porcentaje de nitrógeno total del quitosano se logró con la menor relación de quitina/álcali.
3. El mejor grado de desacetilación estimado en función del porcentaje de nitrógeno total del quitosano se logró con la mayor temperatura de hidrólisis alcalina.
4. El mejor grado de desacetilación estimado en función del porcentaje de nitrógeno total del quitosano se logró al mayor tiempo de hidrólisis alcalina.
5. El grado de desacetilación estimado de la quitina es directamente proporcional al contenido de nitrógeno total determinado y descrito mediante una proyección lineal.
6. La iteración de los tres factores experimentales quitina/álcali, temperatura y tiempo influye significativamente sobre el contenido de nitrógeno total del quitosano.



## RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio con otros crustáceos como el cangrejo para aprovechar los desechos del proceso industrial o artesanal.
2. Diseñar un proceso que permita separar la proteína del exoesqueleto, así como su lavado y limpieza de una manera más rápida y efectiva.
3. Diseñar un reactor hermético presurizado donde se pueda desacetilar cantidades mayores de quitina y en el que pueda ser monitoreada la presión y la temperatura.
4. Continuar con el estudio del quitosano enfocándose en su caracterización para conocer más a fondo sus posibles aplicaciones.
5. Realizar un estudio de factibilidad y rentabilidad del proceso de producción del quitosano por desacetilación homogénea.
6. Realizar un estudio más detallado de la desacetilación de la quitina en relación al monitoreo de azúcares reductores remanentes en la solución alcalina en el proceso de desacetilación.
7. Realizar un estudio para la obtención de películas de quitosano.



## BIBLIOGRAFÍA

1. ABADÍA PIQUERO, Javier. *Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago*. Tesis de Química Industrial. Zaragoza, Escuela Universitaria, Ingeniería Técnica Industrial, 2010. 50 p.
2. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*. 15a ed. Arlington, Virginia: AOAC, 1990. 1141 p.
3. BALANTA, Danny. *Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de Aspergillus Niger y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas*. Cali, Colombia: Universidad del Valle, Departamento de Química, 2010. 316 p.
4. HIDALGO, Claudia. *Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta* [en línea]. La Habana, Cuba. <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/ENE09/hidalgo.pdf>. [Consulta: agosto de 2011].
5. KIM, Se-Kwon. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. New York: CRC Press, 2011. 643 p.



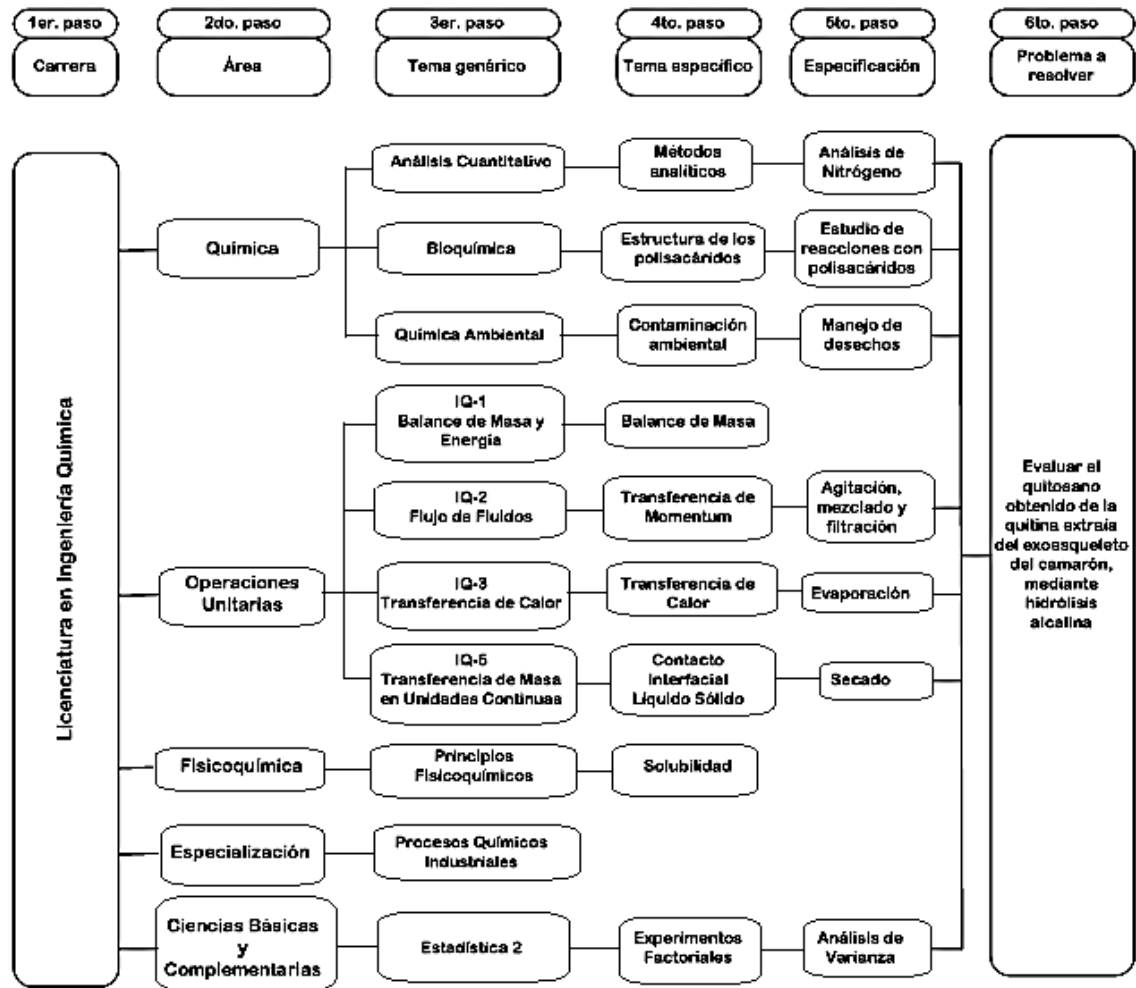
6. MEDINA, Lucia. *Estudio de la acción de quitosano como adsorbedor de proteínas hidrosoluble; optimización de parámetros* [en línea]. Tesis de Ingeniería de Ejecución en Química. Temuco, Chile: Universidad Católica de Temuco, Facultad de Ciencias, 2005. 61 p. <http://biblioteca.uct.cl/tesis/lucia-medina/tesis.pdf>. [Consulta: agosto de 2001].
7. MUZZARELLI, Riccardo. *Chitin*. Inglaterra: Pergamon Press, 1974. 401 p.
8. PARADA, Luis. *Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Escuela de Química. 2004. 110 p.
9. RODRÍGUEZ MORALES, Ofelia. *Obtención y caracterización de quitina y quitosano a partir de desechos de camarón*. [en línea]. México, Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Noviembre 1999. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=20907&docs=UAM20907.PDF>. [Consulta: agosto de 2011].
10. SAMPIERI, Roberto. *Metodología de la Investigación*. 4a ed. México. McGraw-Hill, 2006. 265 p.
11. SÁNCHEZ, Andrés. *Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas* [en línea]. San José, Costa Rica. 267 p. <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/SEP07/sanchez.pdf>. [Consulta: agosto 2011].

12. SÁNCHEZ BRENES, Andrés. *Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (Pleuoncodes planipes) para el crecimiento de fibroblastos humanos*. Tesis en Ingeniería en Biotecnología. Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. 2006. 112 p.
13. SINAY, Jorge. *Manual de operaciones de alimentos*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2001. 110 p.
14. WALPOLE, Ronald; MYERS, Raymond; MYERS, Sharon. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. 4a ed. México: Pearson Educación, 1998. 752 p.
15. ZARITZKY, Noemí. *Películas biodegradables y recubrimientos comestibles a base de hidrocoloides: caracterización y aplicaciones*. Argentina, Carrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, 2007. 114 p.



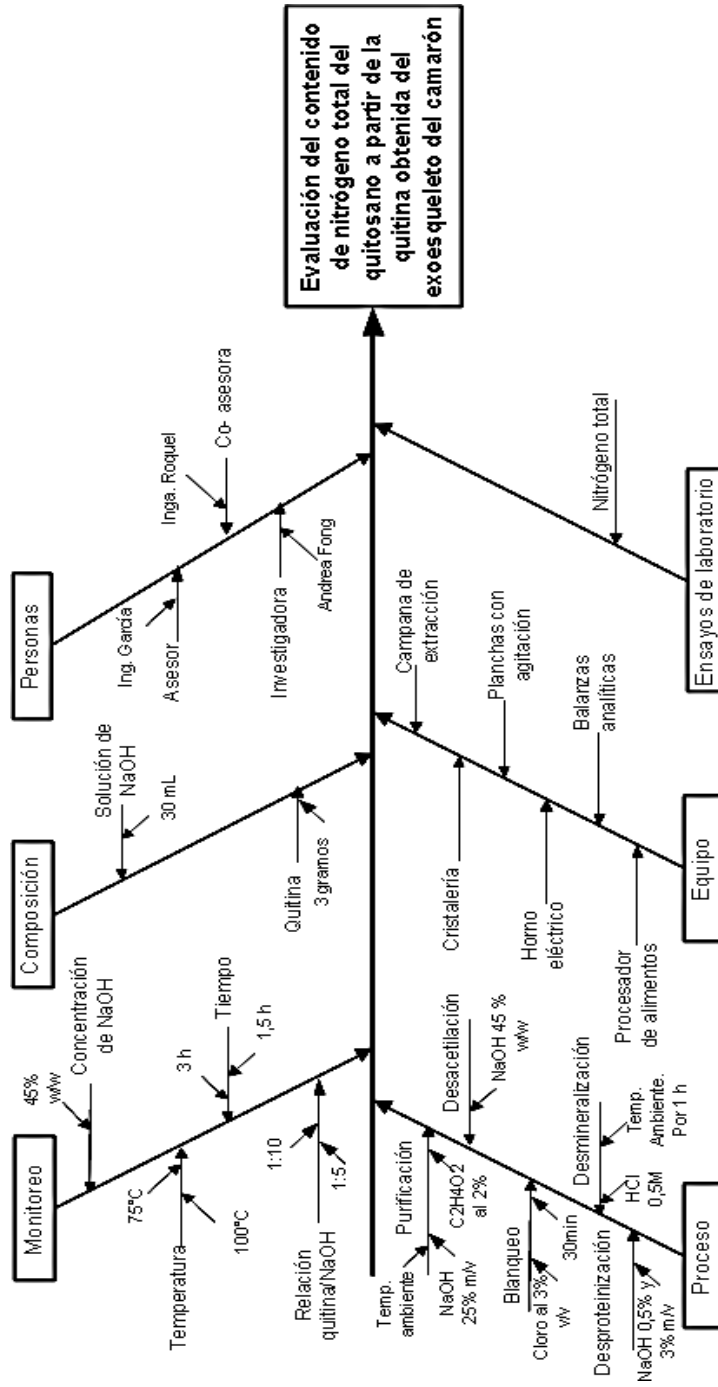
# APÉNDICE

Apéndice 1. Tabla de requisitos académicos



Fuente: elaboración propia.

## Apéndice 2. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Ilustración del proceso de obtención del quitosano**

Recolección y limpieza del abdomen del exoesqueleto del camarón



## Secado y pulverizado del exoesqueleto del camarón





## Desproteinización



## Desmineralización y filtrado





## Blanqueo y quitina pura



## Desacetilación de la quitina



## Desacetilación y filtración



## Purificación del quitosano



### Pesado y secado



### Quitina y quitosano



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Ilustración del ensayo del contenido de nitrógeno total del quitosano**

Pesado del quitosano



Digestión ácida





## Destilación alcalina



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. Rendimiento, contenido de nitrógeno total y porcentaje de desacetilación del quitosano

Peso del quitosano

No.	Combinación	Temperatura	Quitina/NaOH (g/mL)	Tiempo (h)	Crisol (g)	Crisol más el quitosano (g)	Peso Final (g)	Quitosano (g)
1	1	75°C	1:5	1,5	24,24	39,97	27,44	3,20
2					24,81	37,84	29,00	4,19
3					24,99	38,26	29,09	4,10
4	2		1:5	3	29,29	43,90	33,13	3,83
5					40,55	52,95	43,79	3,24
6					40,56	53,00	43,99	3,43
7	3		1:10	1,5	40,46	52,23	43,57	3,11
8					40,43	50,76	43,21	2,78
9					23,01	34,13	26,20	3,18
10	4		1:10	3	23,37	36,76	26,40	3,03
11					40,56	51,85	43,79	3,23
12					21,34	30,72	24,15	2,81
13	5	100°C	1:5	1,5	24,67	38,75	28,36	3,69
14					35,12	51,98	39,39	4,26
15					24,99	38,12	28,64	3,65
16	6		1:5	3	32,03	46,61	35,61	3,59
17					23,51	38,28	27,31	3,80
18					24,81	36,76	28,55	3,74
19	7		1:10	1,5	24,81	39,67	28,53	3,72
20					24,67	33,54	27,15	2,48
21					26,20	31,19	29,11	2,91
22	8		1:10	3	40,43	56,23	44,17	3,74
23					40,56	56,35	44,57	4,01
24					40,45	56,34	43,57	3,12

Rendimiento del quitosano y contenido del nitrógeno total, según las distintas combinaciones para su evaluación

No.	Combinación No.	Temperatura	Quitina/NaOH (g/mL)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Ntot (%)
1	1	75 °C	1:5	1,5	53,35	4,70
2					69,78	4,96
3					68,35	4,93
4	2		1:5	3	63,90	5,11
5					53,93	5,09
6					57,17	5,13
7	3		1:10	1,5	51,90	4,48
8					46,32	4,51
9					53,03	4,62
10	4		1.10	3	50,48	5,01
11					53,77	4,95
12					46,75	5,04
13	5	100 °C	1:5	1,5	61,52	5,57
14					71,05	5,85
15					60,75	5,75
16	6		1:5	3	59,75	6,00
17					63,40	6,05
18					62,27	6,03
19	7		1:10	1,5	62,03	5,57
20					41,38	5,73
21					48,48	5,55
22	8		1:10	3	62,37	5,75
23					66,88	5,71
24					51,98	5,76
Quitina experimental						3,38

Promedio del contenido de nitrógeno total de las muestras de quitosano según las distintas combinaciones para su evaluación

NaOH 45%	C <sub>1</sub> = 75 °C		C <sub>2</sub> = 100 °C	
	B <sub>1</sub> = 1,5 h	B <sub>2</sub> = 3 h	B <sub>1</sub> = 1,5 h	B <sub>2</sub> = 3 h
A <sub>1</sub> = 1:5	4,86	5,11	5,72	6,03
A <sub>2</sub> = 1:10	4,54	5,00	5,62	5,74

Promedio del porcentaje de nitrógeno total de las muestras de quitosano con relación 1:5 de quitina/NaOH y 100 °C

NaOH 45%	C <sub>2</sub> = 100 °C				
	B <sub>1</sub> = 1.5 h	B <sub>2</sub> = 3 h	B <sub>3</sub> = 4 h	B <sub>4</sub> = 6 h	B <sub>5</sub> = 12 h
A <sub>1</sub> = 1:5	5.72	6.03	6.35	7,02	7,29

Contenido de nitrógeno total en función del tiempo de desacetilación a 100 °C

Quitina/NaOH	Tiempo (h)	Nitrógeno total (%)
1:5	1,5	5,72
	3	6,03
	4	6,35
	6	7,02
	12	7,29

Contenido del nitrógeno total y grado de desacetilación en función del tiempo a 100 °C y 1:5 de quitina/NaOH

Tiempo (h)	Nitrógeno total (%)	Grado de desacetilación (%)
1.5	5,72	49,03
3	6,03	51,69
4	6,35	54,43
6	7,02	60,17
12	7,29	62,49

Fuente: elaboración propia.



Apéndice 6. **Análisis estadístico**

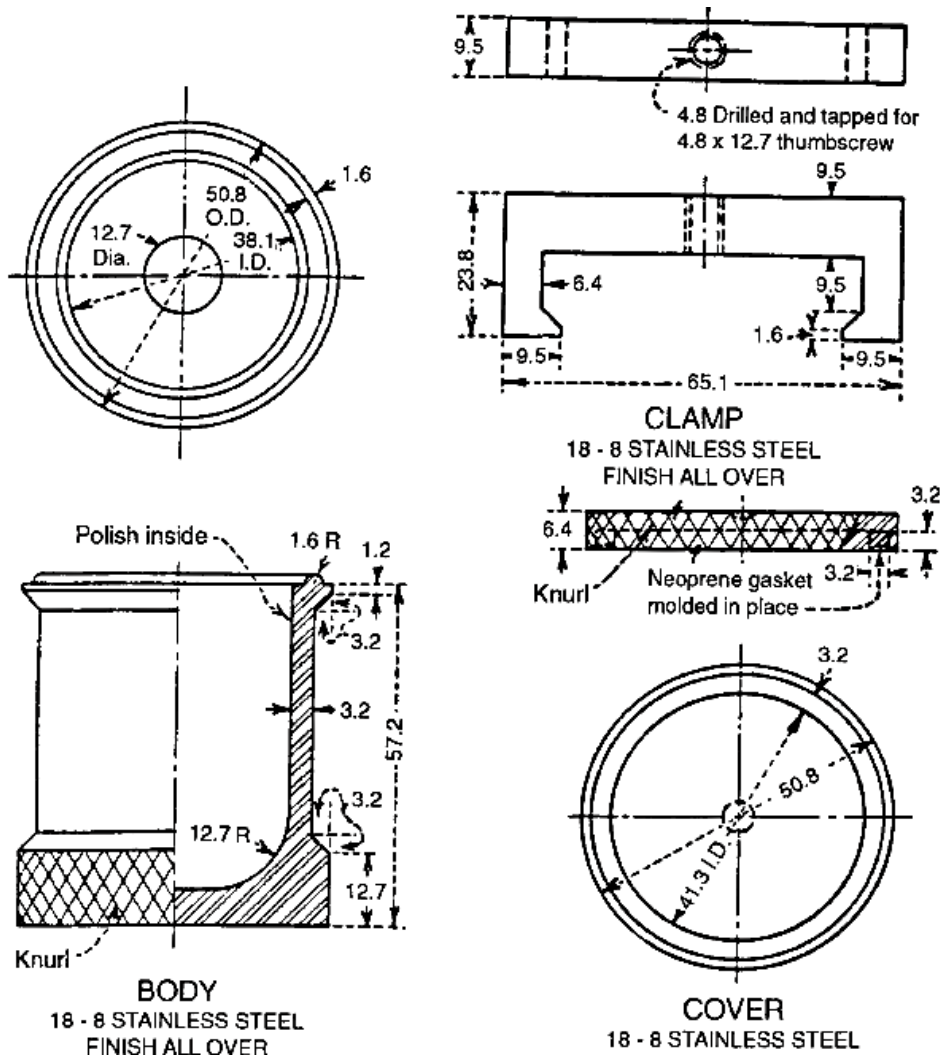
Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	<i>f</i> calculada	Valor crítico para <i>f</i>
<b>Efecto principal</b>					
Temperatura	4,85100	1	4,85100	653,70	4,49
Tiempo	0,48450	1	0,48450	65,29	4,49
Quitina/NaOH	0,25834	1	0,25834	34,81	4,49
<b>Interacción de dos factores</b>					
Temperatura*Tiempo	0,03010	1	0,03010	4,06	4,49
Temp* Quitina/NaOH	0,00070	1	0,00070	0,09	4,49
Tiempo* Quitina/NaOH	0,00050	1	0,00050	0,07	4,49
<b>Interacción de tres factores</b>					
Temp*Tiempo*Quitina/NaOH	0,05900	1	0,05900	7,95	4,49
<b>Error</b>	0,11873	16	0,00742		
Total		23			

Fuente: análisis estadístico de la tabla VIII.

## ANEXOS

Anexo 1. Dimensiones del reactor según norma ASTM C 289-03



Nota: todas las dimensiones están en mm.

Fuente: norma ASTM C 289-03.

## Anexo 2. **Metodología para la determinación del contenido total de nitrógeno**

### A. Reactivos

- Ácido Sulfúrico, grado reactivo
- Hidróxido de sodio (40%)
- Rojo de metilo
- Ácido Clorhídrico (0.02 N)
- Metanol
- Verde de Bromocresol
- Ácido Bórico
- Agua destilada
- Tabletas Kjeldhal o Tecator

### B. Procedimiento

#### Fase A: (Preparación)

1. Se taró un pedazo de papel parafinado que estuviera totalmente libre de nitrógeno.
2. Se pesó exactamente 1 gramo de quitosano en una balanza analítica y se envolvió en el papel.
3. Se colocó la muestra dentro de un tubo de Kjeldhal de 250 mL debidamente identificado.
4. Se le agregó 1 tableta de Kjeldhal (catalizador) al tubo.
5. Se le agregaron 15 mL de ácido sulfúrico grado reactivo.

### Fase B: (Digestión ácida)

1. Se colocaron los tubos en el digestor Kjelttec.
2. Se colocó la tapadera o extractor de gases venturi.
3. Se colocaron las tapaderas laterales para que la temperatura sea uniforme.
4. Se encendió el digestor y asimismo la llave de paso de agua, cuando el digestor alcanzó la temperatura de 400 °C que es la deseada, se tomó el tiempo de 1 hora que fue el necesario para la digestión.
5. Se apagó el equipo, se cerró la llave de paso de agua, se desmontó el extractor de gases y se quitaron las tapaderas laterales.
6. Se sacaron los tubos y se dejó enfriar por 20 minutos.

Nota: en esta etapa se eliminó todo lo que no es nitrógeno, ya que los demás componentes se volatilizaron en forma gaseosa y se obtuvo solo el nitrógeno total de la muestra.

### Fase C: (Destilación alcalina, se realizó en Kjelttec automático)

Previo a la destilación se purgó:

- a) Línea de NaOH 40%.
- b) Línea de ácido bórico al 2% con rojo y verde de bromocresol.
- c) Líneas de HCl al 0.02 N.

1. Se chequeó que los cuatro depósitos de reactivos tuvieran suficientes soluciones para los análisis a realizar.
2. Se encendió el aparato y se esperó que calentara de 5 a 10 minutos la cámara que produjo un estado gaseoso.
3. Se chequeó que los cuatro depósitos de reactivos tuvieran suficientes soluciones para los análisis a realizar.
4. Modo manual: (Para calentar el destilador)
  - Se realizó una prueba con un tubo de Kjeldhal que contenía 75 mL de agua destilada.
  - Se abrió la llave de paso del agua, la cual sirvió como condensador.
  - Se purgaron las líneas del ácido bórico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio.
5. Modo automático: (Para correr las muestras)
  - Se sometió a destilación las muestras ya digeridas, una vez terminada la destilación de cada tubo se observó el contenido de nitrógeno total de la muestra.

Fuente: SINAY, J. *Manual de laboratorio de bromatología*. p.33.