



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**OPTIMIZACION DEL METODO QUIMICO DE EXTRACCION
DE QUITINA PARA LA OBTENCION DE QUITOSAN, A PARTIR
DEL CAPARAZON DE JAIBA Y SU APLICACION EN LA
COAGULACION DE SOLIDOS DE SUERO GENERADO
DURANTE EL PROCESAMIENTO DE QUESO PANELA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A N :
AGUILAR GARCIA JUAN ALBERTO
COLIN HERNANDEZ VICTOR MANUEL**

**ASESORES: O.F.B. S. PATRICIA MIRANDA CASTRO
M.C. A. VIRGINIA LARA S.
I.B.O. LETICIA FIGUEROA V.**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1997

**FESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 FACULTAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

SECRETARÍA DE EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JAIME MILITIA TORRES
 DIRECTOR DE LA F.E.S. CUAUTITLÁN
 P.R. 501014

Asesor: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el artículo 3 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Optimización del método químico de extracción de quitina para la obtención de quitosán, a partir del osaragón de jibia y su aplicación en la coagulación de sólidos de efluente generado durante el procesamiento de queso panela.

que presenta el pasante: Guar. Alberto Aguilar García.

con número de cuenta: 8801014-4 para obtener el TÍTULO de:

Ingeniero en Alimentos. ; en colaboración con:

Victor Manuel Colín Hernández.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T O M E N T E .
 "POR MI RAZA HABLA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 5 de Marzo de 1997

PRESENTE I.B.C. Rosa M. Arriaga Orihuela.
 VOCAL Q.F.R. Susana Patricia Miranda Castro.
 SECRETARIO Dra. Sara E. Valdez Martínez.
 PRIMER AUSENTE Dra. Rosalva Velázquez Ferras.
 SEGUNDO AUSENTE I.A. M. de los Angeles Coronado Villalón.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIMÉ KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, los permittidos comunico a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Optimización del método químico de extracción de quitina para la
obtención de quitosan, a partir del desperdicio de jibia y su aplicación
en la coagulación de sólidos de efluente durante el procesamiento
de queso panela.

que presenta el pasante: Vicior Manuel Ojeda Hernández,
con número de cuenta: 910271-9 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniero en Alimentos, : en colaboración con:
Juan Alberto Guillén García.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E,
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlan, Hidalgo, Edo. de Mex., a 5 de Septiembre de 1997

PRESIDENTE	<u>I.E.Q. Nora E. Arriaga Oribeola</u>
VOCAI	<u>R.F.J. Susana Patricia Miranda Castro</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Sara E. Valdés Martínez</u>
PRIMERA SUPLENTE	<u>L.A. Rocalía Velázquez Pérez</u>
SEGUNDA SUPLENTE	<u>L.A. Ra. de San Angeles Cornejo Villalón</u>

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**, por ser pilar fundamental en la formación de nuestro pueblo
y brindarnos el privilegio de forjarnos en su seno.

Por mí raza hablará el espíritu.

El presente proyecto fue realizado en las instalaciones de la
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Laboratorio de
Ciencia de los Alimentos. Edificio de Posgrado.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento a la Directora del presente trabajo: *2.7.8 S. Patricia Miranda C.* por su invaluable apoyo y el tiempo que desinteresadamente nos otorgó para cumplir una meta más en nuestras vidas. *Gracias por ser una extraordinaria mujer.*

Un agradecimiento especial a la *M. C. A. Virginia Lara S.* por su gran ayuda en el tratamiento de los datos experimentales, parte fundamental del proyecto.

Agradecemos el apoyo brindado por parte de la *7.8.2. Leticia Figueroa Villanar* para la realización de este trabajo.

A los Profesores Sinodales, gracias por su tiempo y comentarios para la mejora del presente trabajo.

DEDICATORIAS.

A mi madre *Ma. Luisa Garcia de Aguilar* por que a ti Madre te debo todo lo que soy y puedo llegar a ser. Por el ejemplo que me diste en todo momento. Infinitamente Gracias.

A mi Hermano Sergio Noé por todo el apoyo que en cada momento me diste para seguir adelante. A mis tíos Miguel Ángel Garcia y Noemí Albornos de Garcia por estar con nosotros en todo momento.

Para Luz *Ma. Rocio Vargas* gracias por estar a mi lado y tener una infinita comprensión.

A mi compañero de tesis Victor Manuel Colín por todos los momentos compartidos a lo largo de la carrera.

Para Pedro, Luis, Miguel, Marco, Erasmo, Alejandro.

J. Alberto Aguilar G.

DEDICATORIAS.

A Jehová por darme la oportunidad de vivir y de tener unida a mi familia.

A mis padres **Eulalia y Raúl** por otorgarme el mejor de los regalos: mis hermanos y una carrera profesional. Gracias de todo corazón.

A mis hermanos **Julio, Octavio, Uziel** y el pequeño **Kevin Daniel**, porque Ustedes son parte fundamental de la fuerza que me impulsa para seguir adelante.

A mis abuelos, tíos, primos y en especial a mi primo **Seferino** por ser más que eso ; para mi prima **Miriam**, porque no es indispensable comprobar parentesco para ser parte de la familia.

Para **Alberto Aguilar** por aceptar ser mi compañero de Tesis y no morir en el intento, *gracias por darme esquina*. A todos mis compañeros de Generación por compartir momentos inolvidables durante la carrera y brindarme su amistad y en especial a **Ceci, Alfredo, Lalo, Rafa, Tania, Andrés, Alberto y Lupita Barrios, Miguel, Rocío, Luz, Azucena, Marco y Fernando**.

ΕΥΕ ΣΟΙΗΙ ΧΘΥΕΓ ΦΧΜ ΥΡΘ ΠΠΥΑ ΣΟΝΕΜ ΝΜΡ ΙΠΥ ΕΝΓΣΑ Τ,ΑΟΟ ΙΑΠ ΑΛΕ ΝΧΣΧΟ

Victor Colin.

por último al ~~grande~~, porque gracias a ellos apenas
nos estamos titulando.

INDICE GENERAL.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
I. GENERALIDADES	
1.1 JAIBA.....	4
1.1.1 Especies.....	4
Cuadro 1.	
Jaiba. Especies de Interés Comercial.....	4
1.1.2 Taxonomía y Características de las Especies... 8	
1.1.3 Producción y Comercialización.....	10
1.2 QUITINA Y QUITOSAN.....	14
1.2.1 Distribución de la Quitina en la Naturaleza... 14	
1.2.2 Biosíntesis.....	17
1.2.3 Métodos de Obtención de Quitina y Quitosán... 19	
1.2.4 Fuentes Potenciales de Quitina y Quitosán en México.....	22
1.2.5 Características y Usos de la Quitina y Quitosán en la Industria Alimentaria.....	24
1.3 QUESOS.....	28
1.3.1 Definición de Leche.....	28
1.3.2 Elaboración de Quesos.....	30
1.3.3 Clasificación de los Quesos.....	31
1.3.4 Elaboración de Queso Panela.....	32
1.3.5 Características del Suero Generado en el Proceso de Queso.....	35
II METODOLOGIA.	
OBJETIVOS.....	39
2.1 Implementación del Método Químico y Obtención del Polvo de Caparazón de Jaiba.....	42
2.2 Composición Química del Polvo de Caparazón de Jaiba.....	43
2.3 Desmineralización y Desproteínización del Polvo de Caparazón de Jaiba.....	43
2.4 Desacetilación de la Quitina Obtenida.....	48
2.5 Pruebas Cualitativas a los Quitosanes Obtenidos. 49	

2.6	Elaboración de Curva Patrón de Absorbancia.....	50
2.7	Composición Química del Suero de Queso Panela...	51
2.8	Pruebas de Coagulación.....	52
2.9	Composición Química de los Sólidos Recuperados..	54

III RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1	Método Químico y Obtención de la Materia Prima..	56
3.2	Composición Química de la Materia Prima.....	58
3.3	Desmineralización del Polvo de Caparazón de Jaiba.....	58
3.4	Desproteínización del Polvo de Caparazón de Jaiba.....	65
3.5	Desacetilación de la Quitina.....	66
3.6	Composición del Suero de Queso Panela y Pruebas de Coagulación.....	70
3.7	Composición Química de los Sólidos Recupetados..	74

CONCLUSIONES.....	77
SUGERENCIAS.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	81
ANEXO 1. Determinación de Humedad. Método por Estufa.....	86
ANEXO 2. Determinación de Cenizas.....	87
ANEXO 3. Determinación de Proteínas Método de Takiguchi..	89
ANEXO 4. Determinación de Grasa. Método de Soxhlet.....	91
ANEXO 5. Determinación de Humedad.....	92
ANEXO 6. Determinación de Nitrógeno total. Método Microkjeldahl.....	93
ANEXO 7. Determinación de Grasa. Método de Gerber.....	96
ANEXO 8. Determinación de Lactosa. (Lane-Eynon).....	98

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Producción Nacional de Jaiba (1985-1994).....	11
Tabla 2. Composición Química de los 2 Tipos de Suero.....	36
Tabla 3. Arreglo Ortogonal Factorial Fraccionario 2 ¹¹ de Resolución V.....	44
Tabla 4. Efectos Principales e Interacciones y sus Alias del Diseño 2 ¹¹ de Resolución V.....	44
Tabla 5. Niveles de Variación Utilizados en la Desmineralización.....	45
Tabla 6. Niveles de Variación Utilizados en la Desproteínización.....	47
Tabla 7. Niveles de Variación Utilizados en la Desacetilación.....	48
Tabla 8. Pruebas de Coagulación.....	53
Tabla 9. Segunda Serie de Pruebas de Coagulación.....	54
Tabla 10. Composición Química del polvo de caparazón de jaiba.....	58
Tabla 11. Análisis de Remoción de Cenizas (primer diseño)..	59
Tabla 12. Anova de los Efectos de la Concentración de HCl y Volumen de Reacción.....	60
Tabla 13. Segundo Diseño para la Desmineralización.....	60
Tabla 14. Análisis de Remoción de Cenizas(segundo diseño)..	63
Tabla 15. Análisis de Varianza del Diseño de Superficie de Respuesta.....	63
Tabla 16. Parámetros Estimados.....	64

Tabla 17. Análisis de Remoción de Proteína (primer diseño).	65
Tabla 18. Resultados de las Pruebas Cualitativas de los 16 Quitosanes.....	69
Tabla 19. Composición Química General del Suero de Queso Panela.....	70
Tabla 20. Porcentaje de Sólidos Recuperados de la Primera Serie de Eventos de Coagulación a Diferentes Concentraciones de Quitosán.....	71
Tabla 21. Porcentaje de Sólidos Recuperados de la Segunda Serie de Eventos de Coagulación a Diferentes Concentraciones de Quitosán No. 2.....	73
Tabla 22. Composición Química General de los Sólidos Recuperados.....	74

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Jaiba <i>Callinectes sapidus</i> en Estado Adulto.....	7
Figura 2. Estructura Química de la Unidad Monomérica de la Quitina.....	15
Figura 3. Estructura Química de la Unidad Monomérica del Quitosán.....	15
Figura 4. Método de Foster & Hackman. Extracción de Quitina.....	21
Figura 5. Diagrama de Bloques de la Elaboración de Queso Panela.....	34
Figura 6. Cuadro Metodológico.....	40
Figura 7. Método Químico de Extracción de Quitosán a partir de Jaiba.....	57

INDICE DE GRAFICAS.

Gráfica 1.	Producción Nacional de Jaiba.....	12
Gráfica 2.	Probabilidad Normal de los Efectos de las Variables Independientes Sobre el * de Minerales.....	61
Gráfica 3.	Gráfica de Medias. Interacción [HCl]-Volumen de Reacción.....	62
Gráfica 4.	Probabilidad Normal de los Efectos de las Variables Independientes Sobre el * de Proteína	67
Gráfica 5.	Comportamiento Reológico del Quitosán No.2.....	68
Gráfica 6.	Absorbancia vs Concentración de Sólidos Suspendidos de Suero de Queso Panela.....	72
Gráfica 7.	Porcentaje de Sólidos Recuperados vs Concentración de Quitosán No. 2.....	75

**OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO QUÍMICO
DE EXTRACCIÓN DE QUITINA PARA
LA OBTENCIÓN DE QUITOSÁN, A
PARTIR DEL CAPARAZÓN DE JAIBA
Y SU APLICACIÓN EN LA
COAGULACIÓN DE SÓLIDOS DE
SUERO GENERADO DURANTE EL
PROCESAMIENTO DE QUESO
PANELA.**

RESUMEN

El presente trabajo comprende la obtención de quitina y quitosán extraído del caparazón de jaiba por un método químico optimizado. La extracción estuvo dividida en 1) DESMINERALIZACIÓN y 2) DESPROTEINIZACIÓN con 16 hidrólisis ácidas y 16 hidrólisis alcalinas respectivamente, dichas hidrólisis se llevaron a cabo mediante un diseño completamente aleatorio con un arreglo factorial fraccionado 2^{16} .

Las variables de estudio para la desmineralización fueron: a) Concentración de ácido clorhídrico, b) Temperatura, c) Tiempo, d) Volumen de reacción, e) Agitación; todos ellos a dos niveles. De la misma manera las variables de estudio para la desproteínización fueron: a) Concentración de hidróxido de sodio, b) Temperatura, c) Tiempo, d) Volumen de reacción, e) Agitación. La quitina obtenida bajo las condiciones de optimización previamente establecidas (0.0% de proteínas y 0.0% de cenizas) presentó 0.0% de proteínas y 0.8% de cenizas bajo las siguientes condiciones: Las condiciones finales para la desmineralización fueron: a) 5% de ácido clorhídrico,

- b) Temperatura: 30°C,
- c) Tiempo: 1 hora,
- d) Volumen de reacción: 1/40,
- e) Sin agitación.

Las condiciones finales para la desproteínización fueron :

- a) 1% de hidróxido de sodio,
- b) Temperatura: ebullición (96°C),
- c) Tiempo: 3 horas,
- d) Volumen de reacción: 1/20,
- e) Con agitación.

Dicha quitina se desacetiló por vía alcalina usando NaOH y se llevaron a cabo 16 eventos bajo diferentes condiciones de

desacetilación. Estas condiciones fueron hechas mediante un diseño completamente aleatorio con un arreglo factorial fraccionado 2^{11} en donde se estudiaron las variables de Concentración de hidróxido de sodio, Temperatura, Tiempo, Volumen de reacción y Agitación a dos diferentes niveles. Se obtuvieron 16 quitosanes los cuales presentaron diferentes características, como solubilidad y viscosidad.

De los 16 quitosanes obtenidos, 8 presentaron solubilidad en ácido acético al 1%.

Los 8 quitosanes solubles se probaron para su utilización en la coagulación de sólidos suspendidos en suero de queso panela y el quitosán preparado bajo las condiciones de desacetilación de Concentración de hidróxido de sodio al 50%, Temperatura de ebullición (130°C-140°C), Tiempo de 30 minutos, Volumen de reacción 1/10, con Agitación presentó las mejores características de viscosidad (640 Cps). Así mismo este quitosán presentó la mayor coagulación de sólidos suspendidos de suero de queso panela (98%) bajo las condiciones de pH=6 del suero y una concentración de 400 mg del quitosán/lit. de suero. El quitosán fue utilizado en forma disuelta al 1% de quitosán en 2% de una solución de ácido acético.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los grandes volúmenes de desechos generados por un extenso sector industrial y una población en constante crecimiento han contribuido al alarmante avance de la contaminación ambiental, ante este panorama surge la necesidad de buscar alternativas para reciclar tales desechos. En el presente trabajo se plantea el aprovechamiento de dos subproductos de la industria alimentaria, tales como el caparazón de jaiba y el suero de queso panela.

Por un lado se utiliza el caparazón de jaiba para la obtención de quitina por un método químico, el cual se puede realizar de manera más práctica en comparación con otros métodos, tales como el enzimático y posteriormente derivados quitinosos, entre los cuales el más importante es el quitosán que tiene diversas aplicaciones en diferentes sectores de la industria, y por el otro lado el suero de queso panela, se puede aprovechar de diferentes formas tales como: secado por aspersión en forma de polvo, formulaciones en la industria panificadora y galletera, etc.; en nuestro caso se utiliza para sacar ventaja de la propiedad polielectrolítica del quitosán al coagular los sólidos suspendidos presentes en el suero, lo cual sirve como punto de partida para realizar una investigación futura sobre la calidad nutricional de los sólidos recuperados al utilizar el quitosán en forma disuelta.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1 JAIBA

1.1.1 ESPECIES

Las jaibas, habitantes de aguas estuarinas de lagunas costeras y desembocaduras de ríos, se encuentran ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales donde generalmente son objeto de pesquerías comerciales alcanzando en algunos países importantes volúmenes de captura, tal como es el caso de México, donde en los años 90's la producción promedio anual fue de 12,000 toneladas de jaiba (SEPECSA; 1990-1993, SEMARNAP; 1994).

En México las jaibas se encuentran tanto en el litoral del Pacífico como en el Golfo de México y el Caribe, estando representadas con más de diez especies de las cuales por lo menos cinco son de interés comercial (Cuadro 1), sosteniendo una importante pesquería

Cuadro 1. Jaiba, especies de interés comercial.

GOLFO DE MÉXICO	PACÍFICO
<i>Callinectes sapidus</i> (Jaiba azul, colorada o jaibón)	<i>Callinectes arcuatus</i> (Jaiba)
<i>Callinectes rubellus</i> (Jaiba prieta)	<i>Callinectes tricolor</i> (Jaiba)
<i>Callinectes danae</i> (Jaiba)	<i>Callinectes belluosi</i> (Jaiba)

(Rodríguez, M.; Los Recursos Pesqueros de México y sus Pesquerías México. 1988. p.p. 187-188).

Su distribución en ambas costas abarca todo el litoral con excepción de *C. tennesse*, que es la especie más sureña, encontrándose hasta las Bahamas.

En general todas habitan en profundidades entre cero y cinco metros en esteros, banías o el mar, soportando temperaturas entre 15° y 35°C, ya que son organismos típicamente tropicales que presentan además, una capacidad de osmorregulación muy alta, que les permite tolerar un amplio intervalo de salinidad. Cuando la salinidad en los esteros disminuye, las jaibas emigran. Esta emigración puede estar también íntimamente relacionada con el desove, ya que las larvas al eclosionar requieren de agua de mar o por lo menos con una salinidad similar para completar su desarrollo.

Las hembras se encuentran maduras entre mayo y octubre. La mayor incidencia se presenta entre fines de junio y principios de septiembre. De cuatro a nueve días después de la fecundación las hembras desovan, conservando los huevos "prendidos" a sus apéndices abdominales por algunas semanas, generalmente hasta su eclosión. Del huevo recién eclosionado emerge el primero de los estados larvarios de la jaiba, la zoea. La eclosión se lleva a cabo durante la primavera y otoño (máxima), y en menor proporción en invierno, aunque esto varía considerablemente en relación a la temperatura del agua, salinidad y región.

La zoea al pasar el tiempo se metamorfoza, notándose 7 estados, mudando entre uno y otro e incrementando su tamaño y variando su forma. Al final del período la larva muda de nuevo, resultando la megalopa dotada de ojos pedunculados, tres pares de patas marchadoras y unas toscas pinzas; al cabo de dos semanas muda, convirtiéndose ésta en un cangrejo (Cameron, J.; 1985).

Las jaibas llegan a la madurez sexual entre los doce y catorce meses de edad (10 a 15 cm.); en esta etapa se desplazan

hasta la entrada de la bahía o hasta las aguas oceánicas cercanas a la costa donde ocurre el desove.

Su crecimiento se ha calculado alrededor de 10 milímetros en promedio por mes y siempre como en todos los crustáceos, se realiza a través de mudas. Dependiendo de la especie es su tamaño, alcanzando hasta 25 cm en el caso de *C. capidus* (Fig. 1).

En todos los casos la talla se obtiene de medir la longitud entre la punta de una espina y la otra, y en promedio viven entre tres y tres años y medio.

El proceso de muda o ecdisis es aquél en el que la jaiba incrementa su tamaño y es controlado por grupos de células neurosecretoras que se encuentran en los tallos oculares (órgano X) y cerca de la base de los ojos (órgano Y); el primero produce una hormona inhibidora de la muda, liberada la mayor parte del tiempo, el segundo produce una hormona inductora de la muda que actúa sólo en la etapa de la premuda, una jaiba sana llega a vivir unos 3 años y muda aproximadamente 20 veces (Perry, H. y cols.; 1979).

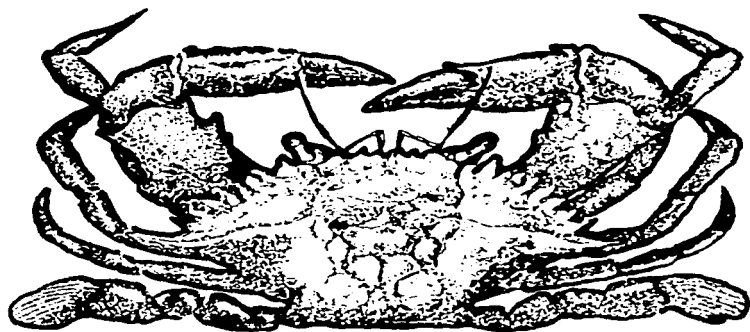


Figura 1. *Callinectes sapidus* en estado adulto

1.1.2. TAXONOMIA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES

TAXONOMIA:

<i>Phylum:</i>	<i>Arthropoda</i>
<i>Subphylum:</i>	<i>Mandibulata</i>
<i>Class:</i>	<i>Crustacea</i>
<i>Subclass:</i>	<i>Malacostraca</i>
<i>Order:</i>	<i>Eumalacostraca</i>
<i>Superorder:</i>	<i>Eucarida</i>
<i>Order:</i>	<i>Decapoda</i>
<i>Suborder:</i>	<i>Reptantia</i>
<i>Sección:</i>	<i>Brachyura</i>
<i>Familia:</i>	<i>Pentamidae</i>
<i>Género:</i>	<i>Callinectes</i>

(F.A.O. Sheets. True crabs, technical terms and principal measurements used.; 1977 . Rodriguez, C. Crustáceos Decápodos del Golfo de California. Secretaría de Pesca. México.; 1987).

Las jaibas presentan un caparazón deprimido denominado cefalotórax, el abdomen es fuerte y simétrico, el cual se encuentra cercanamente inclinado sobre el cefalotórax; este abdomen nunca es utilizado para nadar y usualmente carecen de uropodos.

Los machos se diferencian de las hembras principalmente por la forma del abdomen. Las hembras inmaduras poseen un abdomen de forma triangular volviéndose semicircular al llegar a la madurez.

En los siguientes párrafos se mencionan las características de las 2 especies de jaiba más comerciales en México y de las cuales se tienen investigaciones más completas en relación con las demás especies.

Callinectes sapidus (jaiba azul).

La anchura del caparazón es dos veces más el largo de éste, la frente presenta dos dientes bien desarrollados (excluyendo los ángulos internos de los orbitales), los márgenes internos de los dientes a menudo son más sinuosos que los externos, pero en general presentan forma triangular. La mayor parte de la superficie dorsal convexa es lisa aunque presenta líneas con gránulos finos dispuestos en forma transversal. Las pinzas son desiguales y fuertes, el quinto par de patas es aplanado y en forma de paleta. Los machos presentan el abdomen en forma de "T" invertida. El color de estos organismos es gris azulado o café verdusco en su parte dorsal, las patas son entre azul y blanco y las espinas matizadas con rojo. Las tallas máximas alcanzadas para los machos son de 21 cm. y para las hembras de 20 cm. La distribución de estos organismos se registra desde las Bermudas sobre el oeste de las costas Atlánticas extendiéndose de Nueva Escocia al norte de Argentina (F.A.O.; 1977).

Callinectes rathbunae (jaiba prieta).

La anchura del caparazón es igual al de la jaiba azul; la frente presenta dientes, el par interno es más externo. El margen del caparazón de la superficie dorsal convexa es lisa y brillante (cuando está mojada), la parte central es granulada ligera y uniforme, con prominentes líneas transversales. Las pinzas con

cordilleras granulares, los dedos de la pinza mayor ligeramente aserrados. El color de estos organismos es verde y azul con matices rojos, naranjas o morados, con blanco en la parte inferior. El tamaño máximo de los machos es de 14 cm. y de las hembras de 15 cm.. Su distribución abarca desde el oeste del Golfo de México en el Río Grande, Texas, U.S.A. al sur de Veracruz en México (F.A.O.; 1977). La Biología de estos organismos está referida específicamente a *C. capidus* pues existe más información publicada.

Las fanerógamas acuáticas de las marismas y sebadales, forman el nivel inferior de la pirámide ecológica que sostiene a las jaibas, prefiriendo aquellos alimentos que despiden olor y con tendencia a estar en descomposición, como vísceras de pescado y otros crustáceos, almejas, algas y peces (Tagatz, M.; 1968)

1.1.3. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

La captura se realiza durante todo el año en esteros, bahías y lagunas, aunque su volumen en ellas disminuye cuando las hembras emigran hacia el mar para cumplir con su función reproductiva, con excepción de aquellas bahías donde la salinidad es alta durante todo el año, como ocurre en la Laguna Madre o las situadas en el alto Golfo de California donde las jaibas pueden efectuar ahí, todo su proceso reproductivo.

No hay una flota exclusiva, su captura se realiza a bordo de embarcaciones menores y de manera incidental por la flota camaronera (Rodríguez, M.; 1988).

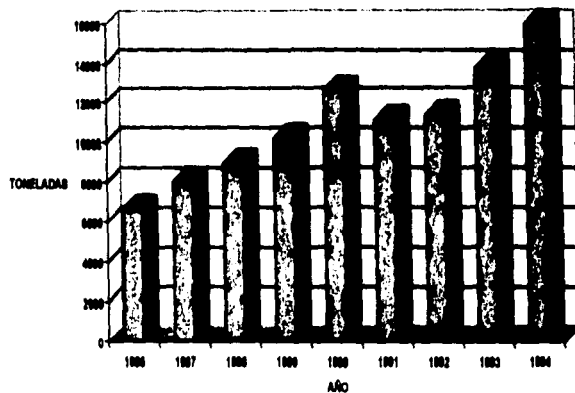
La vertiente del Golfo de México y Caribe es la que aporta el 95% de la captura comercial nacional, siendo los estados de Veracruz y Tamaulipas los máximos responsables de casi el 80% de la captura nacional, dichos volúmenes corresponden en su totalidad a jaiba fresca y congelada, no existiendo en México su explotación

TABLA 1. PRODUCCION NACIONAL DE JAIBA (1985-1994)

FUENTE: (1985-1993) Anuario Estadístico de Pesca. SEPESCA.
 (1994) Anuario Estadístico de Pesca. 1994. SEMARNAP.

ANO	TOTAL	PACIFICO	GOLFO	FRESCO	CONGELADO	PESO VIVO	PESO DESEMARCADO
1985	6,881	562	6,319	5,449	1,432	6,881	6,709
1986	6,618	1,431	5,187	5,411	1,207	6,618	6,110
1987	7,999	2,333	5,666	7,598	401	7,999	7,414
1988	8,932	2,738	6,194	8,468	464	8,932	8,590
1989	10,159	4,182	5,974	7,413	2,746	10,156	9,284
1990	12,593	5,737	6,856	9,038	3,555	12,593	11,151
1991	11,054	2,965	8,089	7,569	3,485	11,054	10,225
1992	11,301	2,356	8,945	8,169	3,132	11,301	11,028
1993	13,783	2,861	10,922	10,846	2,937	13,783	13,345
1994	15,980	5,161	10,819	13,171	2,809	15,980	15,682

GRAFICA 1. PRODUCCION NACIONAL DE JAIBA



12

FUENTE: (1985-1993) Anuario Estadístico de Pesca. SEPESCA.
(1994) Anuario Estadístico de Pesca.1994. SEMARNAP.

como jaiba suave. (Tabla 1. SEPESCA:1995-1993. SEMARNAP:1994). Como podemos ver en la Tabla 1, la producción nacional de jaiba ha ido en aumento en los últimos 10 años, mostrando un estancamiento en los años de 1991 y 1992, en los cuales se aprecian bajas de crecimiento de la producción con respecto al promedio que se presentó en los años anteriores y posteriores (ver gráfica 1) dicha disminución de la producción se debe probablemente a fenómenos meteorológicos tales como ciclones que se presentaron en gran magnitud en estos años.

En 1994, la producción registrada a nivel nacional fue de 15,980 toneladas y de ellas el 67.7 % correspondieron al litoral del Golfo y solo el 32.3 % al Pacífico.

En el Golfo de México, las principales zonas de pesca se ubican en la Laguna Madre, Tamaulipas, y Lagunas de Tamiahua y Pueblo Viejo en Veracruz, en donde se emplean tanto los aros jaiberos como las trampas, ambos cebados, para lograr su captura. Los primeros son depositados en el fondo de donde se recuperan aproximadamente 20 minutos después o más dependiendo del número que cada canoa maneja. Las trampas son colocadas en el área de pesca cada mañana y recuperadas por la noche. Las jaibas son depositadas en la canoa y mantenidas cubiertas de hielo.

No existe una planta industrial dedicada al procesamiento de este recurso, la mayoría, que son vendidas localmente en el Golfo de México, están vivas con las pinzas inmovilizadas con la ayuda de tiras de hoja de palma. Estas jaibas son agrupadas de 12 en 12 o de 24 en 24, atadas todas ellas, conociéndose este conjunto con el nombre de "mazo".

Una pequeña parte de la producción es colocada viva en cajas, refrigeradas y transportadas a grandes núcleos urbanos en donde son vendidas. Otra parte es cocida para facilitar la separación de la pulpa (músculo) del caparazón, lo cual se realiza con ayuda de pinzas. Estas pulpas se empacan en bolsas de plástico de aproximadamente 1 Kg.

Este producto tiene principalmente un consumo nacional.

Durante los últimos años se ha exportado una pequeña cantidad de pulpa de jaiba, que en 1985 ascendió a 149 toneladas (SEPESCA.; 1985).

Las jaibas en su mayor parte son vendidas directamente del pescador o permisionario de pesca a supermercados, mercados especializados de mariscos o restaurantes y hoteles (Rodríguez, M.; 1988).

1.2. QUITINA Y QUITOSÁN

1.2.1 DISTRIBUCIÓN DE LA QUITINA EN LA NATURALEZA

La quitina es un polisacárido constituido por unidades monoméricas de *N-Acetil-D-glucosamina* (NAG) unidas por medio de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. En este biopolímero los grupos amino se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amida del ácido acético (Fig. 2) (Muzzarelli, R.; 1976).

El término quitosán se refiere al producto de desacetilación obtenido a partir de la quitina en la que los grupos acetilo han sido eliminados, por consiguiente en el quitosán el grupo amino se encuentra libre, como amina primaria (Fig. 3).

El tremendo potencial de los polímeros de quitina para numerosas aplicaciones ha sido reconocido de forma limitada en el pasado: la quitina fue aislada por primera vez por H. Braconnot en 1811 usando un tratamiento aplicado a hongos con ayuda de una solución alcalina, él llamó a la fracción insoluble "fungina", la cual contenía una mezcla de quitina y proteínas (Muzzarelli, R.; 1977).

El término "quitina" (del griego "túnica") se acredita a Odier, quien en 1823 llevó a cabo una serie de experimentos sobre

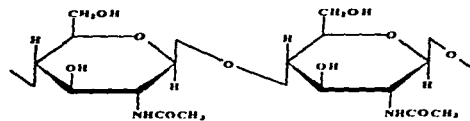


FIGURA 2: Estructura química de la unidad monomérica de la quitina.

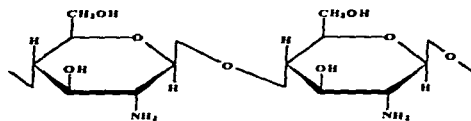


FIGURA 3: Estructura química de la unidad monomérica del quitosán.

cutículas de insectos. Odier se refirió a la quitina como el material que permanecía como remanente y sin cambios después de varios tratamientos con una solución caliente de sosa cáustica (Rudall, K.;1973). En 1878, Ledderhose reportó la presencia de glucosamina y ácido acético en la estructura de la quitina, versión que más tarde fue confirmada por Gilson en 1894.

Por otro lado, el quitosán fue descubierto por primera vez en 1859 por Rouget, pero no fue sino hasta 1950 que se identificó claramente como un polímero conformado de glucosamina (Muzzarelli, R.; 1977).

La investigación sustancial sobre quitina y quitosán se ha llevado a cabo especialmente durante los últimos 20 años, dando lugar a 4 conferencias internacionales y 2 grandes recopilaciones que contemplan cerca de 1500 artículos de investigación aparecidas en 1989 (Skjak-Braek, G. y cols.; 1989 , Pariser, E. y Lombardi, D.; 1989).

La industria pesquera en todo el mundo genera gran cantidad de subproductos con contenido quitinoso, que de acuerdo a cálculos realizados podría ascender a más de un billón de toneladas. Tan solo en Japón se procesan un millón de kilogramos de residuos quitinosos que se destinan para muy variados usos (Knorr, D.; 1991).

La quitina es un producto obtenido de desechos del proceso industrial de animales marinos, con una accesibilidad estimada en 1.2×10^5 toneladas métricas anuales en E.U. donde se tiene un promedio de captura de 150 a 180 millones de kilogramos anuales de camarón y cangrejo, de los cuales la quitina representa potencialmente en el procesamiento del camarón de un 14 a 27% y de un 13 a 15% en peso seco para el cangrejo; también se estima que el reino fungi provee 3.2×10^4 toneladas métricas de quitina (Knorr, D.; 1991).

La quitina [~~poli-B-(1→4)-N-Acetil-D-glucosamina~~] se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, formando junto con otros

materiales (proteínas y sales minerales) estructuras de protección, especialmente en invertebrados marinos, insectos, hongos y ciertos tipos de algas unicelulares.

La cutícula de insectos e invertebrados marinos se encuentra constituida en gran parte por quitina, a la que usualmente se asocian proteínas en el caso de los primeros y además sales minerales (carbonato y fosfato de calcio) en el caso de los últimos.

En otros pequeños invertebrados marinos como los lofoforados su concha se caracteriza por estar constituida de quitina y fosfato de calcio. El tegumento de los diplópodos es duro y parecido al de los crustáceos, ya que además de su naturaleza quitinosa, se encuentra impregnada de carbonato de calcio, lo mismo sucede con la cutícula de briozoarios y en las espinas y dientes que recubre el cuerpo de quetognatos, entre otros.

También algunos tipos de hongos se encuentran entre los organismos que incluyen quitina en estructuras de protección, como la pared celular, que está constituida en su mayor parte por quitina y en menor proporción por celulosa y otros azúcares. Por ejemplo, para *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, la quitina representa entre un 22 y 35% en peso seco respectivamente (Alexopoulos, C.; 1967).

1.2.2 BIOSÍNTESIS

Se cree que la quitina es sintetizada en la epidermis de los crustáceos (Brimacombe, J. y Webber, J.;1964). La epidermis es una capa celular delgada que se encuentra por debajo de la cutícula, en la cual se ha observado la síntesis de todos los precursores de quitina a partir de D-glucosa para UDP-acetilglucosamina (Surholt, B.; 1975).

La síntesis de quitina involucra una serie de pasos controlados enzimáticamente, todos los cuales pueden encontrarse en artrópodos. El compuesto inicial es la D-glucosa que es primero fosforilado en C₆ y entonces isomerizado a fructosa 6-fosfato. La aminación a glucosamina 6-fosfato es llevada a cabo con glutamina y glutamina-fructosa-6-fosfato amino transferasa. Los siguientes pasos son acetilación y transferencia del grupo fosfato del C₂ a la posición C₁ (Muzzarelli, R.; 1977).

La síntesis del nucleótido precursor UDP-N-acetilglucosamina es llevado a cabo con uridina trifosfato (UTP) y la enzima UDP-N-acetil glucosamina pirofosforolasa. Finalmente, la conversión a quitosán se lleva a cabo por la enzima quitina sintetasa que libera el grupo UDP y enlaza en conjunto los residuos de N-acetil glucosamina.

La quitina sintetasa se comporta de manera semejante a un zimógeno y puede activarse por varios factores, incluyendo N-acetilglucosamina (Muzzarelli, R.; 1977). El zimógeno es muy estable y puede ser aislado en una forma casi completa de inactividad (Carib, E. y Ulane, R.; 1973).

El quitosán es sintetizado por vía química o desacetilación enzimática de la quitina. La desacetilación enzimática es llevada a cabo por la quitina desacetilasa. Esta enzima parece ser más hábil para realizar hidrólisis *in vivo* que los grupos acetamido en la quitina, pero esto se inactiva bajo acción de UDP-N-Acetil-Glucosamina, N-acetilglucosamina 1-fosfato y N-acetil glucosamina 6-fosfato.

La biosíntesis de la quitina puede ser inhibida por compuestos tal como DDT, Urea 1-(4-clorofenol)-3-(2,6 diclorobenzoilo) (Muzzarelli, R.; 1977).

1.2.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSÁN.

La obtención de quitina depende de la disponibilidad de los desperdicios de procesamiento del alimento marino. En años recientes, los patrones de captura y consumo del camarón han tenido incremento constante en los Estados Unidos, básicamente debido al crecimiento de la industria de alimentos congelados y la mejora en la red de distribución del alimento. El consumo per capita del alimento marino alcanzó su máximo en 1986, esta fue de 6.8 Kg con una proyección de 9.1 Kg. para 1990 (Morris, C. y cols.; 1987).

La continua expansión de la industria del cangrejo en la última década pudo asegurar un incremento de la disponibilidad del material crudo para la industria de la quitina/quitosán. Sin embargo, a pesar de una adecuada y fiable comercialización del material crudo persiste el problema de una estimación precisa del recurso marino y las operaciones en la conservación, transporte, almacenamiento y control de calidad del material crudo a ser implementado para una mejor utilización.

El objetivo básico que se persigue al aplicar los procesos químicos para la obtención de quitina a partir del caparazón de crustáceos o desperdicios producidos en la industria pesquera es la eliminación de proteínas y sales minerales, con las que se encuenra fuertemente asociada.

Uno de los métodos más frecuentemente utilizados es el método desarrollado por Hackman en el año de 1954, con el que se obtiene quitina a partir del caparazón de crustáceos por medio de extracciones, primero con ácido clorhídrico y posteriormente con hidróxido de sodio para eliminar proteínas y sales minerales (Muzzarelli, R.; 1976).

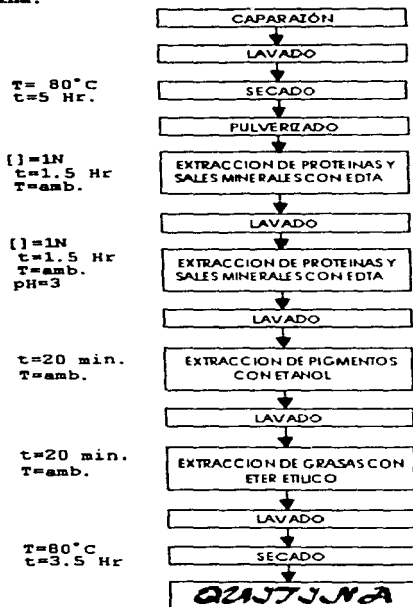
Whistler y BeMiller sugieren un esquema similar al método de Hackman, al que le hacen una ligera modificación al dar un tratamiento adicional con alcohol etílico para solubilizar los

pigmentos y un tratamiento con éter etílico para la eliminación de grasas (Muzzarelli, R.; 1976).

En general estos métodos, así como otros que se emplean en la obtención de quitina a partir del caparazón de crustáceos son catalogados como tratamientos drásticos, debido a que el uso de ácidos y bases fuertes pueden modificar la estructura química de la quitina, ya sea produciendo hidrólisis parcial en la molécula o desacetilando a ésta con la consecuente producción de quitosán.

Existen otros métodos para la obtención de quitina como el descrito por Foster & Hackman en el año de 1957 (Ver Fig. 4) con el que se ha podido aislar quitina del cangrejo *Callinectes sapidus* sin alterar su estructura química, este proceso se basa en la utilización del ácido etilendiamino tetracético (EDTA) a diferentes valores de pH para eliminar tanto proteínas como sales minerales. La eliminación de grasas y pigmentos requieren de un tratamiento con éter etílico y alcohol respectivamente.

FIGURA 4 : Método de Foster & Hackman (1957). Extracción de quitina.



(Foster, A. y Hackman, R.; 1957. Applications of ethylenediamine tetracetic acid in the isolation of crustacean chitin. Nature. pp 40)

El método de Takeda & Abe además de utilizar EDTA utiliza enzimas proteolíticas que permiten obtener una quitina con bajo porcentaje de proteínas y poco alterada en su conformación química (Muzzarelli, R.: 1976).

Durante la etapa de desproteínización de cualquiera de los métodos empleados en la obtención de quitina, las proteínas eliminadas en los efluentes generados pueden ser recuperadas por neutralización hasta alcanzar el pH isoelectrico y posteriormente centrifugación, las cuales pueden ser utilizadas como complemento alimenticio en dietas de alimentación animal (Nonte, S. y Miranda, S.: 1996).

Investigaciones recientes han demostrado que el complejo quitinolítico es un sistema inducible y parece estar constituido por 3 enzimas, por lo que se han desarrollado métodos enzimáticos usando enzimas (quitinasas), las cuales han ayudado a obtener altos rendimientos de quitina. En 1969 Monreal & Reese establecieron las condiciones óptimas de cultivo de *Serratia*

~~marcescens~~ QMB1466 para la máxima producción de quitinasas y concluyeron que la naturaleza de la quitina es importante para obtener altos rendimientos de la enzima, además de otros factores como concentración del sustrato, temperatura y pH (Monreal, J y Reese, E.: 1969).

1.2.4 FUENTES POTENCIALES DE QUITINA Y QUITOSÁN EN MÉXICO.

Considerando las 200 millas de mar patrimonial y los importantes volúmenes de organismos marinos con caparazón que son capturados y procesados se podrá calcular la cantidad de quitina que puede ser generada en nuestro país, en donde son varios los organismos que representan por sus volúmenes de captura una fuente

importante de este polisacárido tales como : almeja, calamar, camarón, jaiba, cangrejo rojo, ostión y langosta.

a) Camarón.

El camarón es el más importante, ya que anualmente se capturan aproximadamente 55,000 Ton. en peso desembarcado, de cuyo procesamiento se obtienen volúmenes importantes 14000 a 19000 Ton. por año de subproductos quitinosos como cabezas, colas y caparazón, que industrializados se pueden traducir en una quitina disponible de 1600 Ton por año. Cabe mencionar que del total capturado, se exporta un 35%, principalmente a E.U. y Japón. Debido a lo anterior, se plantea la posibilidad de utilizar este tipo de subproductos que en la actualidad al menos en México, son considerados como desperdicios y que en forma directa ó sometidos a hidrólisis parcial o total pueden ser utilizados para la elaboración de muy variados productos (SEPESCA.; 1990-1993).

b) Langostilla Mexicana.

Otra fuente importante de quitina en nuestro país, corresponde a un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Galatheidae: *Planuncodes planipes*, llamado comúnmente cangrejo rojo, cangrejo mexicano o langostilla mexicana, que en un estado adulto alcanza una talla de 8.8 a 12.7 cm y un peso aproximado de 3 a 5 g (Rodríguez, M.; 1988). La langostilla en nuestro país tiene un promedio de captura de 3500 toneladas anuales para los años 90's, siendo toda la producción destinada a consumo nacional (SEPESCA.; 1990-1993). Sin embargo se han hecho investigaciones que afirman que es posible una captura de 250,000 toneladas al año en la

Península de Baja California en la zona que comprende Bahía Magdalena y la Isla de los Cedros (Arvizu, M.; 1976).

c) Langosta.

Las langostas habitan en casi todos los tipos de fondos abundando en las áreas coralinas, en las praderas de hierbas y en menor proporción en fondos arenosos y fangosos. En una profundidad que va de la superficie a poco más de 100 m. La langosta, *Penaeus aztecus* es altamente gregaria y migratoria, cuyo potencial de captura estimado para México es en promedio 1500 Ton. anuales, de las cuales casi el 80% se destina al mercado internacional y el restante al mercado interno especialmente en restaurantes y hoteles. La planta industrial es escasa y el recurso una vez capturado por lo general es descabezado, utilizándose solamente el abdomen. La cabeza se tira, aunque actualmente empieza a utilizarse, aunque de manera muy dispersa. La cola es puesta en hielo para su posterior congelado, forma en la cual es introducida al mercado. Por lo anterior se vislumbra como una alternativa potencial para el proceso de extracción de quitina (Rodríguez, M.; 1988).

1.2.5 CARACTERÍSTICAS Y USOS DE LA QUITINA Y QUITOSÁN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los radicales amino tanto en la quitina como en el quitosán son excepcionalmente estables en NaOH al 50% y a temperaturas de hasta 160°C. El nombre científico de la quitina es: **B(1→4)-2-**

acetamido-2-deoxi-D-glucosa y el del quitosán es: $\beta(1 \rightarrow 4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glucosa.

La quitina es un polímero de aspecto cristalino que se caracteriza por su elevada insolubilidad en los solventes más comunes y su notable resistencia a la acción hidrolítica de ácidos y álcalis.

Son muchos los usos que se le pueden dar a los productos quitinosos, prueba de ello es que ya se procesan la quitina y quitosán a nivel industrial a partir de desperdicios de crustáceos para la elaboración de muy diversos productos, esto es en: Bioshell Products Albany, Oregon, USA; Kyokuyo, Co., Tokyo, Japón; Kyowa Oil an Fat, Tokyo, Japón.

Características tales como viscosidad y biodegradabilidad hacen de la quitina y sus derivados materiales que en la industria procesadora de alimentos pueden ser empleados para desarrollar diferentes propiedades funcionales en los alimentos y dar mejores resultados que polisacáridos como la CMC, ya que se han reportado resultados de hasta 16000 Cps de viscosidad en soluciones de quitosán con ácido acético al 2% y esto muestra que se puede utilizar como agente espesante en la elaboración de aderezos, salsas, bebidas, pastelería, y embutidos (Hough, W.A. y cols.; 1978), por otro lado regula la formación de cristales de hielo en alimentos congelados manteniéndolos en un menor tamaño y más homogéneo. Debido a sus características de agente secuestrante de iones metálicos y compuestos orgánicos se puede utilizar como quelante en procesos de manufactura de alimentos.

La quitina microcristalina producida por hidrólisis ácida controlada, es apropiada para ser utilizada como un espesante y estabilizador que supera en mucho (10 a 20 veces más eficiente) a otros polímeros empleados comúnmente como la celulosa microcristalina, para la elaboración de mayonesas, manteca de cacahuete y otros alimentos tipo emulsión (Knorr, D.: 1984).

El quitosán es capaz de absorber enzimas, polisacáridos aniónicos y metales iónicos, también se asocia con sólidos suspendidos en aguas de desperdicio del procesamiento de aves de corral, huevo, queso, carne, productos marinos, frutas y vegetales permitiendo la reducción de sólidos totales, la recuperación de materiales tales como: proteínas, grasas y carbohidratos de buena calidad que pueden ser reciclados como alimentos o forraje para animales (Knorr, D.; 1991).

La naturaleza policatiónica tanto en quitina como en quitosán puede ser aplicada en la industria de alimentos para remover sustancias no deseadas en algunos productos como jugos, cervezas y bebidas en general. La quitina en forma de gel también puede ser usada como soporte o excipiente para algunos medicamentos (Knorr, D.; 1991).

La quitina y el quitosán son buenos polímeros quelantes y absorbentes para iones metálicos incluyendo iones de metales tóxicos (cobre, níquel, cadmio, zinc, cobalto, hierro, manganeso, plomo, mercurio, etc.) y ciertos radioisótopos, productos de fisión nuclear, por ejemplo U^{235} , Ra^{226} , Cs^{137} . Dichas características pueden hacer de la quitina una parte importante para moderar el agua en estaciones nucleares y sus efluentes (SEA FISHERIES INSTITUTE GYDNA POLAND.; 1976).

Los filamentos producidos por la solubilización de quitina en un sistema de cloruro de litio dimetilacetamida, acelera los procesos de cicatrización en heridas siendo un material ideal para la fabricación de suturas quirúrgicas, ya que esos filamentos son absorbibles y no alergénicos.

Se han realizado varios estudios en animales para valorar la toxicidad de quitina y quitosán, un grupo de investigadores (Arai, K. y cols.; 1968) encontró que se presentaba un daño evidente en los órganos de ratones alimentados con una dieta que contenía arriba de 18 g de quitosán libre por Kg. de peso de su cuerpo por día.

En otro estudio (Landes, D. y Bough, W.: 1976) se concluyó que el quitosán usado como un agente coagulante, no tuvo efectos adversos sobre la Relación de Eficiencia Proteica (PER) de proteína recuperada de efluentes de procesos de alimentos. Además, no hubo diferencias en el índice de crecimiento, órganos internos y en la composición del suero de sangre cuando se les dio de comer en forma libre a las ratas a concentraciones arriba de 5% por 8 semanas. Gordon y Williford concluyeron que ambos, quitina y quitosán no tienen efectos de crecimiento sobre ratas jóvenes cuando se les da a comer a una concentración de 5% durante 3 semanas; sin embargo, a un nivel de 20%, tuvieron una disminución en la concentración de hierro.

Según un estudio, se observó que el quitosán tiene un efecto hipocolesterolemico en ratas (Nagyvary, J. y cols.: 1979), también se reportó que un alto porcentaje de colesterol presente en el suero sanguíneo redujo su nivel un 35% con dietas altas en grasa suplementadas con 4% de quitosán durante 4 semanas, cuando se compararon con el grupo de control. Por otro lado, Sugano, M. y cols. observaron un 25 a 30% de reducción del colesterol en el plasma cuando 2 a 5% de quitosán fue suplementado en la dieta con alto contenido de colesterol sanguíneo.

El quitosán ha sido sugerido como una fuente de fibra dietética, Watkins y Knorr observaron una alta eficiencia del alimento, incremento en peso y reducción en los tiempos de transmisión fecal en hamsters alimentados con una dieta de quitina arriba de 8.5%, cuando se les comparó con el grupo control que se alimentó con celulosa a las mismas concentraciones. Además, la quitina favoreció el crecimiento de la microflora productora de lactasa en el intestino de gallinas, es decir tuvo un efecto probiótico (Austin, P. y cols.: 1981), la quitina puede entonces ser añadida como un suplemento a fórmulas tanto para infantes o a mayores de edad.

Estos estudios sugieren que el consumo y el potencial de uso de materiales quitinosos como suplementos para reducir los niveles

de colesterol en el suero sanguíneo y una fuente de fibra dietética en dietas humanas es seguro. Sin embargo, los efectos secundarios y la influencia sobre la biodegradabilidad de los nutrimentos tiene que ser evaluado antes de ser usado en alimentos para humanos.

1.3 QUESO

1.3.1 DEFINICION DE LECHE.

La humanidad conoce la leche desde los tiempos más remotos, pero su conocimiento de las características físicas y composición química de la misma es aún en algunos aspectos deficiente (Dilanjan, S.; 1984).

La importancia de la leche radica en que es el alimento único y esencial durante las primeras fases de la vida del hombre, ya que es una fuente rica en nutrimentos, sobre todo para los niños, y representá un alimento básico a lo largo de su existencia. La leche es importante por sí misma y por los productos que de ella se derivan (Bath, D. y cols.; 1982).

Según la FAO el vocablo leche está exclusivamente referido a "la normal secreción mamaria obtenida por uno o más ordeños sin ninguna adición o sustracción" (Goded, A.; 1966).

La leche puede definirse como "un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de su cría" (Alais, Ch.; 1984).

Se entiende por leche para consumo humano, "la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas y bien alimentadas. Cuando la leche proceda de otra especie animal, se designará, con el nombre de ésta. Se excluye el producto obtenido quince días antes del parto y cinco días posteriores al mismo o cuando tenga calostro" (DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN.; 1988).

Los componentes de la leche se encuentran en 3 estados físicos:

SOLUCIÓN VERDADERA. Sustancias solubles en agua (lactosa, vitaminas hidrosolubles, elementos y sustancias inorgánicas).

DISPERSIÓN COLOIDAL. Caseína ligada a sales minerales.

EMULSIÓN. Materias grasas en forma globular (Revilla, R. 1983).

El componente más abundante es el agua, oscilando su contenido entre el 83 y 89%. Las sales y los azúcares se encuentran formando una disolución acuosa; las proteínas, en su mayor parte, en estado coloidal, y las grasas en emulsión constituyendo la fase dispersante una solución acuosa de sales, azúcares y proteínas. El contenido en extracto seco (alrededor del 12.6%) es uno de los factores que más influye en la calidad de la leche; por lo general para fabricar queso se recurre a la leche de vaca o de cabra principalmente.

La leche utilizada en el proceso de la elaboración de quesos debe ser de buena calidad. La validez de la leche como materia prima para la elaboración de quesos viene determinada por su tratamiento en la granja. Además de los niveles normales de higiene requeridos, la leche debe estar libre de antibióticos, que destruirían los cultivos utilizados en la maduración de los quesos. La leche calostroal y la leche de animales enfermos no debe ser utilizada para la elaboración de queso.

La propiedad más importante de la leche utilizada en este proceso es la velocidad de coagulación cuando se mezcla con cuajo y la capacidad del coágulo formado para eliminar suero. Estas características varían de forma considerable de leche procedente de vacas sometidas a crianzas distintas e incluso varía también para un mismo número. Dichas diferencias pueden ser compensadas mezclando la leche de distintos productores, pero aún así se seguirán presentando variaciones estacionales. Las propiedades de la leche para elaborar queso puede ser mejorada por la adición de cloruro cálcico o por maduración previa de la leche.

La definición internacionalmente aceptada para el queso ha sido hecha por la FAO/OMS. El queso es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos.

1.3.2 ELABORACIÓN DE QUESOS.

Una explicación general de las etapas necesarias para la elaboración del queso, aunque existen variantes específicas para cada tipo, es la siguiente:

1. RECEPCIÓN Y TRATAMIENTOS PREVIOS DE LA LECHE :

- a) Refrigeración (de 3 a 6°C)
- b) Higienización (eliminación de impurezas y bacterias)
- c) Pasteurización (calentamiento a 70-80°C durante 15-40 segundos)

2. ELABORACION DEL QUESO

- d) Adición de fermentos lácticos para acidificar la leche con lo que se coagulará más fácilmente.
- e) Si es necesario, y está permitido, se añade a la leche:
 - Cloruro cálcico (favorece la coagulación)
 - Nitrato potásico o sodico (inhibe el crecimiento y bacterias perjudiciales)
 - Colorantes naturales (para mantener uniforme el color del queso)
 - Hongos y bacterias lácticas que ayudan a desarrollar aromas y sabores durante la maduración, en algunos tipos de quesos.
- f) Adición del cuajo a una temperatura de 28-35°C generalmente.
- g) Coagulación de la leche y separación parcial del suero.
- h) Llenado de moldes y prensado previo.
- i) Moldeado y prensado (con eliminación de más suero)
- j) Salado de los quesos en salmuera o por sal seca.

k) Maduración de los quesos en cámaras con control de humedad, temperatura y aereación. En los quesos frescos no es necesaria la maduración.

l) Control de calidad, envasado y salida del producto elaborado.
(Cenzano, I. Los quesos. España. 1991. pp 11-18)

1.3.3 CLASIFICACION DE LOS QUESOS.

Los quesos se pueden clasificar atendiendo a diversas circunstancias (contenido en grasa, dureza, origen, tipo de leche empleada en su elaboración, etc). De acuerdo al sistema seleccionado para la coagulación de la leche se tiene:

- Quesos al cuajo
- Quesos Ácidos

en los primeros se consigue la coagulación por la adición del cuajo a la leche, el principio activo del cuajo es la quimosina (renina), que es una enzima proteolítica que tiene la propiedad de hidrolizar los enlaces pépticos de las proteínas, la coagulación se realiza de la siguiente forma: el caseinato de calcio al ser atacado por el cuajo se transforma en paracaseinato de calcio, y en seguida, este paracaseinato se combina con los iones libres del calcio (sales solubles), se vuelve insoluble y se precipita formando gel o cuajada. En los quesos ácidos se consigue por acidificación, a través del ácido láctico que transforma progresivamente el fosfato dicalcico de la caseína en fosfato monocálcico que, a su vez, es desmineralizado poco a poco, perdiendo el resto del calcio hasta que es precipitado, llegando al estado de caseína pura con formación secundaria de lactato de calcio soluble. En su punto isoeléctrico la caseína (pH 4.5-4.7 a 21°C) se encuentra en su estado más puro y en el punto más bajo de su solubilidad. Otros quesos combinan los dos sistemas acidificación y adición del cuajo, por ejemplo requesón.

Según la textura del queso estos se clasifican en:

- Quesos compactos.
- Quesos con ojos redondeados.
- Quesos granulares de formas irregulares.

Según el tipo de microorganismos utilizados en la maduración tendremos la siguiente clasificación:

- Quesos veteados donde se produce el crecimiento de mohos como el ~~Penicillium~~ durante la maduración, dando estas vetas de color azul.
- Quesos del moho blanco.
- Quesos con desarrollo bacteriano en la corteza, en los que se unta la superficie con un cultivo de bacterias que se desarrollan dando características especiales a los quesos.

De acuerdo con su contenido de grasa se clasifican en:

- Doble grasa: el que contiene un mínimo de 60%.
- Extragrasso: el que contiene un mínimo de 45%.
- Semigrasso: el que contenga un mínimo de 20%.
- Magro: el que contenga menos del 20%.

Por último la más conocida que se basa en el contenido de agua:

- Quesos frescos.
 - Quesos blandos.
 - Quesos semiblandos.
 - Quesos duros.
 - Quesos semiduros.
- (Cenzano, I.; 1991).

1.3.4 ELABORACIÓN DE QUESO PANELA.

Queso tipo panela: este es el queso fresco por excelencia, su sabor a leche, el aroma delicado, su consistencia blanda y cremosa

y su textura suave y elástica, lo hacen ser uno de los quesos más consumidos en el territorio nacional, en especial en la zona centro, donde se consumen principalmente quesos de sabor suave. El queso panela es de conservación corta, descomponiéndose rápidamente si no se contempla una rigurosa higiene; absorbe los olores del medio. Para su elaboración se emplea leche de vaca, fresca entera o semidescremada.

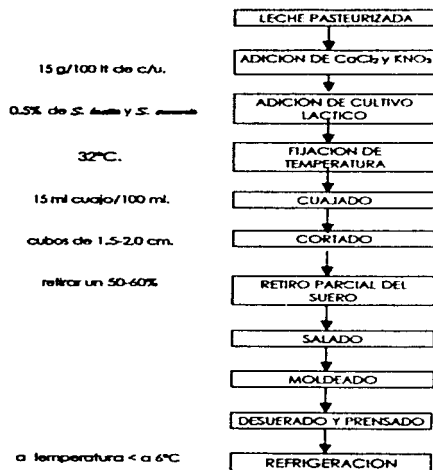
La reacción más específica de la leche es la de su coagulación por acción del cuajo al pH natural de la misma, cuya actividad enzimática es lo que permite la coagulación (Temperatura: 28-33°C) Esta reacción difiere teórica, formal y prácticamente de la coagulación ácida, es decir, la que ocurre en su punto isoeléctrico (pH=4.6.), y tiene implicaciones de extrema importancia técnica a través de su condición de eje fundamental en la fabricación del queso. Después de la coagulación la leche es cortada en la propia cuba con dispositivos de corte o manualmente.

Gracias a estos tratamientos de corte junto con agitación y calentamiento se produce la separación de gran parte de suero, en esta etapa es cuando realmente la leche se transforma en queso, aún sin su forma final, sin salar y sin moldear.

Se procede a salar el queso, bien por inmersión directa en baños de salmuera o por sal sólida aplicada a la corteza o mezclada con la masa (Hernández, J. , Tapia, R.: 1991).

Después de la eliminación de gran parte del suero, los cortes de la cuajada se colocan en moldes de diferentes tamaños y formas, que son los que le dan la apariencia final al queso. Se procede al prensado de la masa en sus moldes, bien por su propio peso o por dispositivos mecánicos o neumáticos. Las etapas para la elaboración de queso panela se encuentran referidos en la Fig. 5.

FIGURA 5 : DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA ELABORACION DE QUESO PANELA



(Hernández, J. y Tapia, R. Elaboración de queso panela y manchego en el Taller de Lácteos de FESC.; 1991. p. 60)

1.3.5 CARACTERÍSTICAS DEL SUERO GENERADO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO .

El suero de leche o lactosuero es el producto de la transformación de leche en queso o caseína (Casalis, J.: 1974).

Durante la fabricación de estos productos se generan aproximadamente 9 kg. de suero líquido por Kg. de producto final. Su composición es variable dependiendo del proceso tecnológico seguido durante la fabricación de quesos de los cuales procede (Jelen, P.: 1979).

Cuando se trata de quesos de coagulación rápida (tipo panela) se produce el suero "dulce" con pH de 6.5, que contiene la lactosa de la leche (4.0-4.5%) y las proteínas del suero (0.55-0.60%), además tienen un mayor contenido de aminoácidos libres y fragmentos de caseína resultado del rompimiento o hidrólisis enzimática.

De los quesos de coagulación lenta (tipo cottage) que se obtienen por la acidificación del medio al ser transformada parte de la lactosa en ácido láctico por acción de un microorganismo láctico, resulta el suero "ácido", con pH menor y por lo tanto una vida de anaquel mayor que el suero dulce; parte de las proteínas del suero se han incorporado a la caseína, debido a que su pH isoeléctrico se encuentra entre 4.2-5.3, este tipo de suero no contiene residuos de caseína aunque si más calcio que el suero dulce. En los dos tipos de suero el contenido de agua es alto pero aún así quedan la mitad de los sólidos de la leche original, esencialmente las vitaminas hidrosolubles, los minerales, las proteínas solubles y la lactosa (Tabla No. 2) (Jelen, P.: 1979 , Racotta, V.: 1976 , Whitaker, J.: 1977).

Dentro de estos sólidos la fracción protéica es el componente más importante nutricionalmente hablando. Las proteínas del suero

representan aproximadamente el 20% del total de las proteínas lácteas.

TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS DOS TIPOS DE SUERO.

	SUERO DULCE	SUERO ACIDO
SOLIDOS TOTALES	6.7 *	6.4 *
PROTEINA (N x 6.38)	0.9 %	0.9 *
LACTOSA	4.9 *	4.3 *
CENIZAS	0.5 *	0.8 *
GRASA	0.1-0.3 *	0.1 *
PH	5.8-6.6	4.6

(JELEN, P. *Industrial Whey Processing Technology: an overview*, J. Agric. Food Chem.; 1979. pp 660).

La β -lactoglobulina es la más abundante en el suero, tiene un peso molecular de 36,000 Daltons, es rica en lisina, leucina, ácido glutámico y ácido aspártico. Contiene cisteína, que por tener grupos sulfihidrilo libres intervienen en el desarrollo del sabor a cocido en la leche hervida.

La α -lactoalbúmina es la otra proteína importante del suero de leche, tiene un peso molecular de 16,000 Daltons, no contiene grupos sulfihidrilo libres aunque su contenido en cisteína es alto, es rica en triptófano.

Ambas proteínas forman del 70-80% del contenido protéico del suero, cantidades fácilmente identificables de inmunoglobulinas, seroalbúmina sanguínea y proteasas-peptonas forman el remanente de las principales proteínas del suero (Whitaker, J.; 1977, Webb, J.; 1974, Manson, W.; 1978).

Las proteínas del suero son de las más nutritivas que existen en la naturaleza, su aminograma con respecto al patrón de la FAO para los aminoácidos indispensables es mayor en una relación de 1.35:1.00. La Relación de Eficiencia Protéica (REP) de estas proteínas con respecto a la caseína es mayor. Son ricas en lisina y triptófano, bien equilibradas en aminoácidos azufrados gracias a su elevado contenido en cisteína y por lo tanto son valiosas para enriquecer proteínas vegetales, donde estos aminoácidos son de lo más limitantes (Casalis, J.; 1974 , Racotta, V.; 1976).

El otro componente importante del lactosuero es la lactosa. Es un carbohidrato que solo se encuentra en la leche, es un azúcar reductor formado por glucosa y galactosa en unión 3(1→4), tiene efectos fisiológicos no característicos de otros azúcares o aún de otros disacáridos. Su valor nutritivo es muy importante, sobre todo en bebés, ya que la leche humana tiene un contenido doble de lactosa en comparación con la leche de vaca, es menos dulce, menos soluble y más estable que la sacarosa (Racotta, V.; 1976).

Se atribuyen a la lactosa varias funciones reguladoras, una de éstas es la aceleración del crecimiento de bacterias deseables en el intestino delgado. Algunas de estas bacterias son útiles en la síntesis de vitaminas del complejo B. Facilita la absorción de calcio y fósforo.

El contenido de lactosa en el suero de la leche es aproximadamente el mismo que el de la leche descremada (50g/lit) y representa alrededor del 70% del extracto seco del suero (Casalis, J.; 1974).

Todavía hace algunos años este subproducto en la industria láctea era eliminado, provocando la muerte por asfixia de la fauna piscícola en lagos y ríos, debido a su elevada Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) que es del orden de 40,000-50,000 mg/lit (Jelen, P.; 1979 , Nieto, F.; 1975). El uso del suero líquido para la elaboración de bebidas alcohólicas y no alcohólicas aún no es muy generalizado en muchos países, así como la fermentación para

producir ácido láctico, antibióticos, vitaminas o para la obtención de proteína unicelular para consumo animal.

La recuperación de los sólidos totales del suero como ingredientes para la alimentación humana y animal ha sido la técnica más usada por los grandes procesadores de suero. Los métodos tradicionales incluyen : secado por aspersión o secado por rodillos, concentración del suero para consumo animal o producción de suero concentrado dulce, otros métodos incluyen cristalización de la lactosa de sueros no tratados, por medio de la desnaturalización por calentamiento o recuperación de la grasa que contiene el suero.

El elevado costo que representa el tratamiento de las aguas de desecho, la necesidad de reducir la contaminación ambiental y la posibilidad de aprovechar la calidad de la proteína del suero han dado lugar a numerosos estudios para industrializar este subproducto, tal es el caso del presente trabajo en el cual se utiliza polímero de quitosán obtenido de Caparazón de jaiba mediante un método químico para coagular los sólidos que permanecen suspendidos en el suero lácteo después de elaborar queso panela (suero dulce).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar el método químico de extracción de quitina a nivel laboratorio partiendo del caparazón de jaiba, para obtener quitosán y su aplicación para coagular sólidos suspendidos en suero proveniente del proceso de queso panela.

OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVO PARTICULAR 1

Determinar las condiciones adecuadas para las etapas de desmineralización y desproteínización del polvo de jaiba, para la obtención de quitina.

OBJETIVO PARTICULAR 2

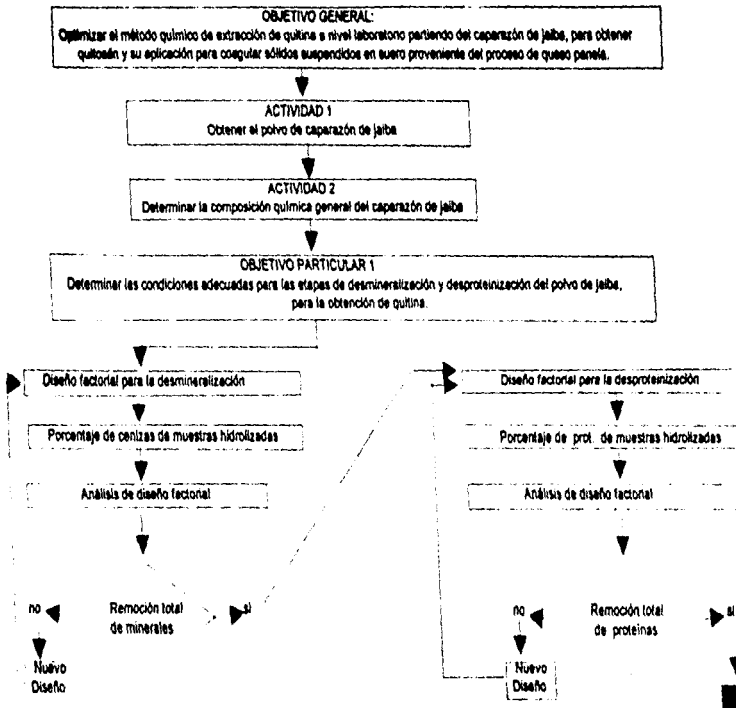
Establecer experimentalmente la desacetilación de la quitina para la obtención de quitosán de jaiba.

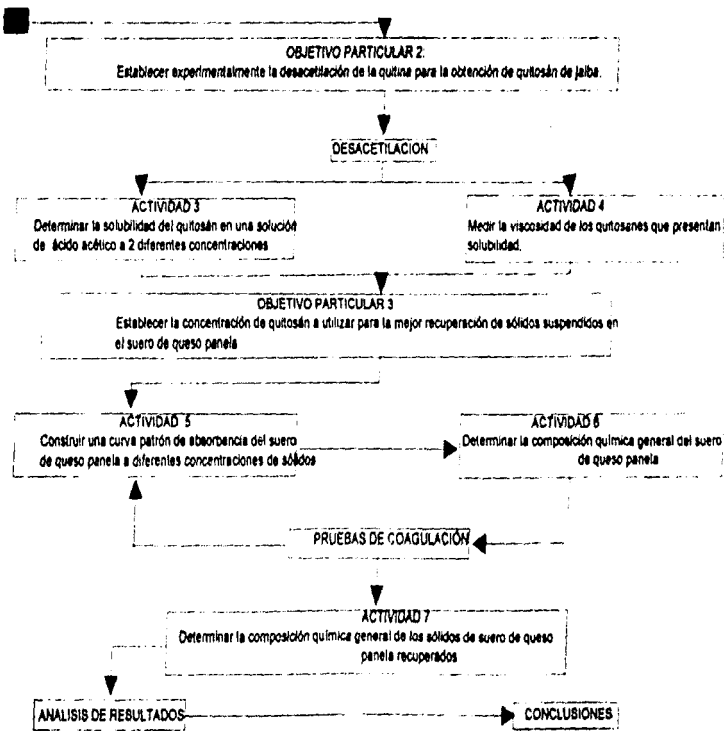
OBJETIVO PARTICULAR 3

Establecer la concentración de quitosán a utilizar para la mejor recuperación de sólidos suspendidos en el suero de queso panela.

La metodología para el desarrollo experimental realizado en este trabajo se resume en el cuadro metodológico mostrado en la figura 6.

FIGURA No. 6 CUADRO METODOLOGICO.





CAPITULO II

METODOLOGIA

2.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO QUÍMICO Y OBTENCIÓN DEL POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA

Para la obtención de quitina del caparazón de jaiba, las operaciones principales del método se adecuaron de manera tal que primero se removieron las sales minerales y posteriormente las proteínas, esto difiere de los métodos químicos establecidos (Foster, A. y Hackman, R.; 1957) porque se observó de manera experimental con el camarón, que las sales minerales interfirieron en la determinación de proteínas si se realiza de la forma convencional (Sixto, A. y Soto A.; 1996).

Después de obtener la quitina del caparazón de jaiba, la desacetilación se llevó a cabo bajo hidrólisis alcalina con NaOH al 50% para obtener quitosán.

Durante la experimentación que se realizó en este proyecto, la molienda de los caparazones se volvió una operación necesaria debido a que las interacciones químicas de las hidrólisis se ven favorecidas cuando se utilizan polvos con un tamaño de partícula uniforme.

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA.

- Se lavó y secó el caparazón de jaiba para realizar una primer molienda gruesa con ayuda de un molino para granos manual.
- Posteriormente se secó en una estufa con aire forzado **MPSA Mod. EDP-334** con el fin de eliminar la humedad de la materia prima.
- Por último se realizó una molienda fina, con ayuda de un molino de cuchillas **MILLER Mod.**, utilizando la malla No. 20 de la serie normalizada de Tyler y se determinó el Diámetro promedio de partícula del polvo obtenido.

2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA.

Para establecer los criterios de control en las dos etapas fundamentales en el método de extracción de quitina (desmineralización y desproteínización) se hizo necesario determinar la composición química inicial del caparazón de jaiba, ya que los porcentajes de cenizas y proteínas se redujeron al mínimo posible.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS EMPLEADAS.

- DETERMINACION DE HUMEDAD A.O.A.C.; 1984 (Anexo 1).
- DETERMINACION DE CENIZAS A.O.A.C.; 1984 (Anexo 2).
- DETERMINACION DE PROTEINAS. METODO DESARROLLADO POR Takiguchi, Y. y cols. 1987 (Anexo 3).
- DETERMINACION DE GRASA. METODO SOXHLET A.O.A.C.; 1984 (Anexo 4).

2.3 DESMINERALIZACIÓN Y DESPROTEÍNICACIÓN DEL POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA.

La optimización de la desmineralización y desproteínización consistió en encontrar las mejores condiciones de acuerdo al menor costo y menor tiempo para obtener una quitina con la menor cantidad posible de minerales y proteínas. Para evaluar el efecto de las variables y sus interacciones se utilizó la

fracción principal de un arreglo ortogonal factorial fraccionario 2^{5-1} de resolución V (Ver Tabla 3).

Tabla 3. ARREGLO ORTOGONAL FACTORIAL FRACCIONARIO 2^{5-1} DE RESOLUCIÓN V

TRATAMIENTO	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	+
5	-	-	+	-	+
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	+
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	+
11	-	+	-	+	+
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	+
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+

Los efectos calculados y sus alias se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. EFECTOS PRINCIPALES E INTERACCIONES Y SUS ALIAS DEL DISEÑO 2^{5-1} DE RESOLUCIÓN V

FACTOR	12345
1	2345
2	1345
3	1245
4	1235
5	1234
12	345
13	245
23	145
14	235
24	135
34	125
15	234
25	134
35	124
45	123

ANÁLISIS DE RESULTADOS PARA DESMINERALIZACIÓN Y DESPROTEINIZACIÓN

Cuando se analizan datos de diseños factoriales no replicados, en ocasiones se observan interacciones de orden superior. El uso de un cuadrado medio de error obtenido por combinación o agrupamiento de interacciones de orden superior es inapropiado en estos casos. Un método de análisis atribuido a Daniel (1959) constituye un método sencillo de superar este problema. Daniel sugiere graficar las estimaciones de los efectos en papel probabilidad normal. Los efectos que son despreciables se distribuyen normalmente, con media cero y varianza σ^2 , y tienden a ubicarse a lo largo de una línea recta en esta gráfica, mientras que los efectos significativos tendrán medias distintas de cero y no se ubicarán en la línea recta (Montgomery, D. 1991).

VARIABLES (DESMINERALIZACIÓN)

V.I.: Concentración de ácido clorhídrico, Tiempo, Temperatura, Volumen de reacción, Agitación.
V.D.: % de cenizas.
V.R.: Interacción de los efectos.

La experimentación realizada en esta etapa se llevó a cabo de acuerdo a los niveles establecidos en la siguiente tabla.

Tabla 5. NIVELES DE VARIACIÓN UTILIZADOS EN LA DESMINERALIZACIÓN

VARIABLE	NIVEL 1 (bajo)	NIVEL 2 (alto)
Concentración de HCl (%)	3	5
Temperatura (°C)	20	30
Tiempo (Hr)	1	3
Volumen de reacción	1:10	1:20
Agitación	no	si

PROCEDIMIENTO PARA DESMINERALIZACIÓN

- Se pesaron 7 gramos de la muestra molida y seca en un vaso de precipitados.
- Se agregó el volumen de ácido clorhídrico correspondiente a cada evento de acuerdo al volumen de reacción y la concentración.
- La hidrólisis de la muestra se realizó de acuerdo a las condiciones establecidas para cada evento.
- Posteriormente se realizaron lavados de la muestra hidrolizada con agua destilada para eliminar el ácido residual y alcanzar un pH próximo a 7.0; se secó a 60°C durante 24 horas en una estufa con aire forzado **MAPSA Mod. HDP-334**.
- Para evaluar el comportamiento de las hidrólisis se determinó el porcentaje de cenizas de cada uno de los eventos y se estableció como criterio de control (Anexo 2).
- Una vez encontradas las condiciones óptimas, se procedió a desmineralizar toda la muestra, para proseguir con la etapa siguiente.

VARIABLES (DESPROTEINIZACIÓN)

V.I.: Concentración del hidróxido de sodio, Tiempo, Temperatura, Volumen de reacción, Agitación.

V.D.: % de proteínas.

V.R.: Interacción de los efectos.

Los niveles de variación utilizados para la etapa de desproteínización se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. NIVELES DE VARIACIÓN UTILIZADOS EN LA DESPROTEINIZACIÓN

VARIABLE	NIVEL 1 (bajo)	NIVEL 2 (alto)
Concentración de NaOH(%)	1	3
Temperatura (°C)	ambiente	ebullición
Tiempo (Hr)	1	3
Volumen de reacción	1:10	1:20
Agitación	no	si

PROCEDIMIENTO DE DESPROTEINIZACIÓN

- Se pesaron 7 gramos de la muestra desmineralizada y seca en un vaso de precipitados.
- Se agregó el volumen de hidróxido de sodio correspondiente a cada evento de acuerdo al volumen de reacción y la concentración.
- La hidrólisis de la muestra se realizó de acuerdo a las condiciones establecidas para cada evento.
- Posteriormente se realizaron lavados de la muestra hidrolizada con agua destilada para eliminar el ácido residual y alcanzar un pH próximo a 7.0; se secó a 60°C durante 24 horas en una estufa con aire forzado **MAPSA Mod. HDP-334**.
- Para evaluar el comportamiento de las hidrólisis se determinó el porcentaje de proteína de cada uno de los eventos y se estableció como criterio de control (Anexo 3).
- Una vez encontradas las condiciones óptimas, se procedió a desproteínizar toda la muestra, para proseguir con la etapa siguiente.

2.4 DESACETILACIÓN DE LA QUITINA OBTENIDA

VARIABLES:

V.I.: Concentración del hidróxido de sodio, Tiempo, Temperatura, Volumen de reacción, Agitación.

V.D.: Solubilidad en ácido acético, viscosidad.

V.R.: Grado de desacetilación.

La quitina obtenida en las etapas anteriores se desacetiló para obtener quitosán bajo los niveles de variación mostrados en la tabla siguiente

Tabla 7. NIVELES DE VARIACIÓN UTILIZADOS EN LA DESACETILACIÓN.

VARIABLE	NIVEL 1 (bajo)	NIVEL 2 (alto)
Concentración de NaOH(%)	50(p/v)	50(p/p)
Temperatura (°C)	100	ebullición
Tiempo (Min.)	30	60
Volumen de reacción	1:10	1:20
Agitación	no	si

PROCEDIMIENTO DE DESACETILACIÓN DE LA QUITINA

- Se pesaron 5 gramos de la muestra seca desmineralizada y desproteínizada en un vaso de precipitados.
- Se agregó el volumen de hidróxido de sodio correspondiente a cada tratamiento de acuerdo al volumen de reacción y la concentración.

- La hidrólisis de la muestra se realizó de acuerdo a las condiciones establecidas para cada tratamiento.
- Posteriormente se realizaron lavados de la muestra hidrolizada con agua destilada para eliminar el ácido residual y alcanzar un pH próximo a 7.0; se secó a 60°C durante 24 horas en una estufa con aire forzado **MARSA Mod. HDP-334**.
- Se pesó la muestra final y se obtuvieron los rendimientos totales de la extracción de quitosán del polvo molido de jaiba.

2.5 PRUEBAS CUALITATIVAS A LOS QUITOSANES OBTENIDOS

Quando se obtuvieron los 16 quitosanes bajo las diferentes condiciones establecidas para cada evento, se realizaron pruebas cualitativas de solubilidad que nos sirvieron para tener registro de las características de los que se utilizaron para la coagulación de los sólidos del suero de queso panela.

PROCEDIMIENTO PARA SOLUBILIDAD.

- Se pesaron 0.25 g de cada uno de los 16 quitosanes obtenidos después de la etapa de desacetilación, y se depositaron dentro de tubos de ensayo de 50 ml.
- Se agregaron 10 ml. de ácido acético al 0.5% (v/v).
- Cada uno de los tubos de ensayo se mezclaron por agitación a temperatura ambiente, para obtener una solubilización en frío.
- A las muestras que no presentaron solubilización en frío, se les aplicó un tratamiento con calor, mediante un baño maría **GRANT Mod. 18** a ebullición para intentar solubilizar el quitosán.

- Se registraron los resultados obtenidos para los 16 quitosanes.
- Los pasos anteriores se repitieron, pero esta vez se utilizó una solución de Ácido acético a 1.0% (v/v) de concentración.

Una prueba que se realizó a los quitosanes que solubilizaron fue la medición de la viscosidad a temperatura ambiente, la cual fue un parámetro de referencia de las propiedades funcionales obtenidas.

PROCEDIMIENTO PARA MEDIR VISCOSIDAD

- Se prepararon 50 ml. de solución de cada quitosán que solubilizó en una concentración de 0.5%, utilizando ácido acético al 1%. (HONG y MEYERS; 1989).
- Se homogenizó cada muestra con agitación vigorosa y constante, evitando que se formaran grumos.
- Se dejó reposar cada una de las muestras hasta que desapareció el aire ocluido.
- Se tomaron 30 ml. y se midió la viscosidad directamente en un viscosímetro Brookfield digital **NETTLER TOLEDO Mod. RM 180** utilizando el huso No. 1.
- La viscosidad de las muestras se midió a temperatura ambiente (aprox. a 21°C).

2.6 ELABORACIÓN DE CURVA PATRÓN DE ABSORBANCIA.

Para poder tener un criterio cuantitativo en la selección del quitosán que mejor funciona al coagular los sólidos de suero de queso panela, se tomó como base la absorbancia del líquido sobrenadante, ya que debido a la falta de un turbidímetro se buscó otras alternativas.

PROCEDIMIENTO PARA ELABORACIÓN DE UNA CURVA PATRÓN DE ABSORBANCIA.

- Se tomó una alícuota del suero de queso panela recolectado y se realizó una serie de diluciones, desde 0.0% hasta 22.0% de concentración, a intervalos de 2%.
- Se homogenizaron todas las muestras mediante agitación vigorosa y constante.
- Para medir la absorbancia de cada concentración se utilizó un espectrofotómetro **SHIMADZU Mod. UV-150-02**, utilizando una longitud de onda de 610 nm. y una celda de 1 cm. de longitud.
- Se registro cada una de las lecturas que se realizaron por triplicado, se realizó un análisis de varianza simple y se construyó una curva patrón de la concentración de sólidos de suero de queso panela vs. Absorbancia.

2.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SUERO DE QUESO PANELA

Al suero recolectado se le efectuó un análisis para determinar su composición química para tener una referencia inicial de los componentes que se recuperaron con el uso del quitosán

TÉCNICAS DE ANÁLISIS EMPLEADAS.

- DETERMINACION DE CENIZAS A.O.A.C.; 1984 (Anexo 2).
- DETERMINACION DE HUMEDAD A.O.A.C.; 1984 (Anexo 5).
- DETERMINACION DE PROTEINA. METODO MICROKJIELDAHL A.O.A.C. ;1984 (Anexo 6).
- DETERMINACION DE GRASA. METODO GERBER A.O.A.C.; 1984 (Anexo 7)

- DETERMINACION DE LACTOSA. METODO DE LANE EYNON A.O.A.C.: 1984 (Anexo 8).

2.8 PRUEBAS DE COAGULACIÓN

VARIABLES

- V.I.: Concentración de quitosán.
- V.D.: Absorbancia del líquido sobrenadante.
- V.R.: % Sólidos coagulados.

PROCEDIMIENTO PARA LAS PRUEBAS DE COAGULACIÓN.

- Se recolectó el suero de queso panela en contenedores limpios y secos de 2 litros y se mantuvieron almacenados a una temperatura de 3-5°C por un máximo de 3 días.
- Se ajustó el pH del suero a 6.0 en el momento en que se realizaron las pruebas de coagulación usando NaOH 1N.
- De los 8 quitosanos que solubilizaron en ácido acético, se prepararon soluciones de la siguiente manera: 1g de quitosán/100 ml de ácido acético al 2% a temperatura ambiente.
- Se dejaron reposar las soluciones de quitosán con el fin de que se disipara el aire ocluido, manteniendo tapados los vasos de precipitados utilizando una película de polietileno.
- Para cada uno de los 8 quitosanos que solubilizaron se preparó una serie de 6 vasos de precipitados de 250 ml conteniendo 100 ml de suero de queso panela bien homogenizado.
- Cada serie de vasos se identificó adecuadamente y se procedió a agregar el quitosán de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 8. PRUEBAS DE COAGULACIÓN

Vaso No.	ml de quitosán	Concentración de quitosán (mg/lit)
1	3.5	350
2	4.5	450
3	5.5	550
4	6.5	650
5	7.5	750
6	8.5	850

esto se repitió para cada uno de los 8 quitosanes que solubilizaron.

- Cada vaso de precipitados se homogenizó usando un agitador magnético y una parrilla **CORNING Mod PC-320**, a una velocidad de 120 rpm durante 3 minutos y posteriormente a 30 rpm durante 2 minutos.

- Posteriormente se dejaron reposar cada una de las muestras durante una hora y se tomó una alícuota del sobrenadante para medir la absorbancia en un espectrofotómetro **SHIMADZU Mod. UV-150-02**, utilizando una longitud de onda de 610 nm. y una celda de 1 cm. de longitud.

- Se registró cada lectura de absorbancia obtenida por triplicado y se comparó con la curva patrón de la concentración de sólidos de suero de queso panela vs. absorbancia para obtener el % de sólidos suspendidos en el líquido sobrenadante después de la coagulación de los mismos con el quitosán.

- Con base a los resultados de absorbancia obtenidos, se eligió el quitosán que coaguló mas sólidos suspendidos en el suero de queso panela.

- Con el quitosán que se eligió se realizó una prueba más de coagulación de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 9. SEGUNDA SERIE DE PRUEBAS DE COAGULACIÓN

No. de vaso	ml. de quitosán	Concentración (mg/lt)
1	3.0	300
2	3.5	350
3	4.0	400
4	4.5	450
5	5.0	500
6	5.5	550

- Se eligió la concentración de quitosán que mejor funcionó en la coagulación de sólidos suspendidos de suero en base a los resultados de absorbancia obtenidos del líquido sobrenadante, los cuales fueron interpolados en la curva patrón y de esta manera se obtuvieron los porcentajes de sólidos recuperados.

- Con la concentración elegida se realizó una prueba de coagulación utilizando un litro de suero de queso panela para obtener la cantidad de sólidos suficientes para realizar un análisis de la composición química de los mismos.

2.9 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS SÓLIDOS RECUPERADOS

Se planteó la realización de técnicas de análisis a los sólidos recuperados para tener una base de la composición química y punto de comparación de lo que fue posible recuperar por medio del quitosán.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS UTILIZADAS.

- DETERMINACION DE CENIZAS A.O.A.C.; 1984 (Anexo 2).
- DETERMINACION DE HUMEDAD A.O.A.C.; 1984 (Anexo 5).
- DETERMINACION DE PROTEINA. METODO MICROKJELDAHL A.O.A.C. ;1984 (Anexo 6).
- DETERMINACION DE GRASA. METODO GERBER A.O.A.C.; 1984 (Anexo 7)
- DETERMINACION DE LACTOSA. METODO DE LANE EYNON A.O.A.C.; 1984 (Anexo 8).

CAPITULO III

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

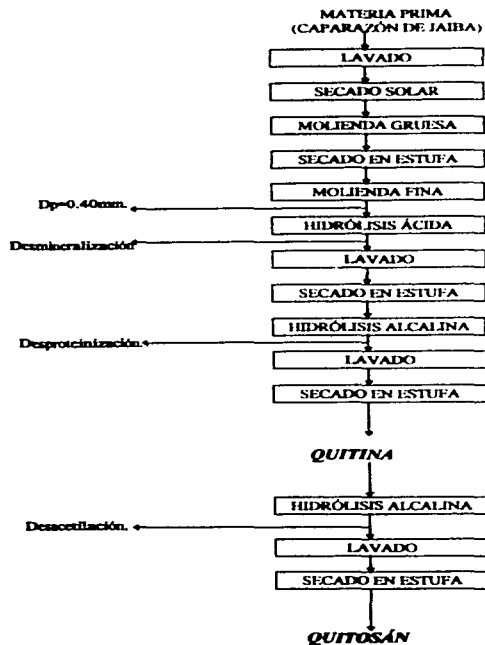
3.1 MÉTODO QUÍMICO Y OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Se analizaron las ventajas de diferentes métodos, y de acuerdo con la naturaleza de la materia prima se estableció el método de extracción reportado en la figura 7, en la cual se muestra que la hidrólisis ácida se realiza primero porque los minerales interfieren para la etapa de desproteínización, y de esta forma se mejora la remoción de proteínas; en relación con otros métodos reportados en la literatura el método de la Figura 7 es más sencillo debido a que se basa en hidrólisis ácidas y alcalinas sin involucrar otros compuestos químicos tales como el EDTA, alcohol etílico, formaldehído, etc.

En base a dicho método, el caparazón de jaiba se lavó y secó al sol por 2 días, después se procedió a realizar una molienda gruesa con un molino manual para granos, para obtener en primera instancia un producto no homogéneo de partículas grandes. Posteriormente se secó el producto de la primer molienda en una estufa con aire forzado durante 1 hora a 100°C para eliminar el exceso de humedad y se realizó una molienda fina con un molino de cuchillas con ayuda de un tamiz de malla No.20.

Al finalizar la molienda, se procedió a realizar la determinación del diámetro de partícula promedio que resultó ser de 0.40 mm, algunos investigadores reportan que el tamaño de partícula del polvo de caparazón de camarón que se encuentra entre 0.85-0.25 mm. influye en la etapa de desproteínización, mientras que no sucede lo mismo con la desmineralización (Cosío, I. y cols.; 1982).

FIGURA 7. MÉTODO QUÍMICO DE EXTRACCIÓN DE QUITOSÁN A PARTIR DE JAIBA



3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados de los análisis de la composición química general de la materia prima que se obtuvieron se encuentran reportados en la tabla 10.

Tabla 10. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA.

ANÁLISIS QUÍMICO	PORCENTAJE
Cenizas	63.45
Kjeldahl (N Total).	16.11
Grasa	0.1
Humedad	8.7
CHOS (Diferencia)	11.64

Se encontró referencia sobre un método desarrollado en Japón, en donde se reporta una técnica para determinar el % de proteína en productos quitinosos (mezcla proteína-quitina en crustáceos), la cual se utilizó para la determinación de proteína del caparazón de jaiba y se utilizó como técnica de control en la etapa de desproteínización (Takiguchi, Y. y cols.; 1987)

3.3 DESMINERALIZACIÓN DEL POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA.

En la tabla 11 se muestran los datos correspondientes a las determinaciones del porcentaje de cenizas (Anexo 2) obtenidos en cada uno de los 16 eventos realizados con el fin de remover los minerales presentes en el caparazón de jaiba.

Tabla 11. ANÁLISIS DE REMOCIÓN DE CENIZAS (PRIMER DISEÑO)

TRATAMIENTO	% DE CENIZAS RESIDUAL	% CENIZAS REMOVIDAS DEL
		TOTAL
1	60.6	4.4
2	58.0	8.5
3	63.4	0.0
4	58.0	8.5
5	62.4	1.6
6	54.6	13.9
7	63.4	0.0
8	57.4	9.5
9	57.8	8.9
10	41.0	35.3
11	59.2	6.6
12	40.0	36.9
13	59.4	6.3
14	41.6	34.4
15	57.0	10.1
16	38.0	40.1

Control de % Cenizas= 63.45

El criterio de optimización para esta etapa fue el porcentaje de cenizas removidas en el caparazón de jaiba, como se observa en la tabla No. 11 los resultados no alcanzaron el % de cenizas buscado, por lo tanto los niveles de las variables no fueron los adecuados para alcanzar el objetivo planteado. La gráfica de probabilidad normal de los efectos indicó que las variables que más influyeron en dicha etapa fueron concentración de ácido clorhídrico y volumen de reacción (gráfica No. 2), eso se comprobó con el análisis de varianza que se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12. ANOVA DE LOS EFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO
CLORHÍDRICO Y VOLUMEN DE REACCIÓN.**

EFEECTO	GRADO DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	CUADRADOS MEDIOS del error	NIVEL p
Conc. De HCl	1	583.22	12	2.55	.000000
Volumen de reacción	1	464.40	12	2.55	.000000
interacción de ambos	1	147.62	12	2.55	.000006

Nota: generalmente si p es menor a 0.05, se considera un efecto significativo.

Se construyó la gráfica No. 3, donde se muestran las medias de la interacción de la Concentración de HCl y el Volumen de reacción.

En base a lo anterior se replanteó un nuevo experimento con arreglo de superficie de respuesta del tipo 2² aumentado en un punto central con 5 repeticiones que se muestra en la tabla 13 con las variables significativas.

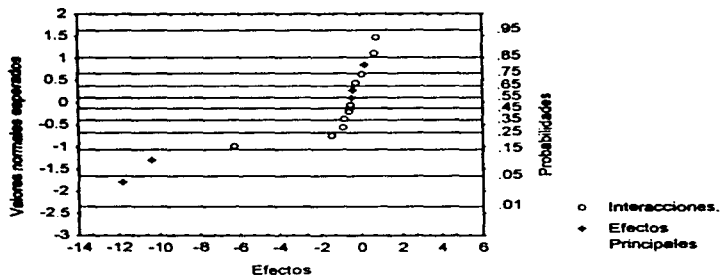
Tabla 13. SEGUNDO DISEÑO PARA LA DESMINERALIZACIÓN

VARIABLE	NIVEL -1	NIVEL 0	NIVEL 1
Concentración del ácido clorhídrico (%)	5	15	25
Volumen de reacción	1:20	1:30	1:40

Nota: la Temperatura se mantuvo a 30°C, el Tiempo a 1 hora y todos los eventos se realizaron sin Agitación; lo anterior corresponde al nivel más práctico para trabajar con estas condiciones y se manejaron así porque no tuvieron un efecto significativo.

Gráfica No. 2

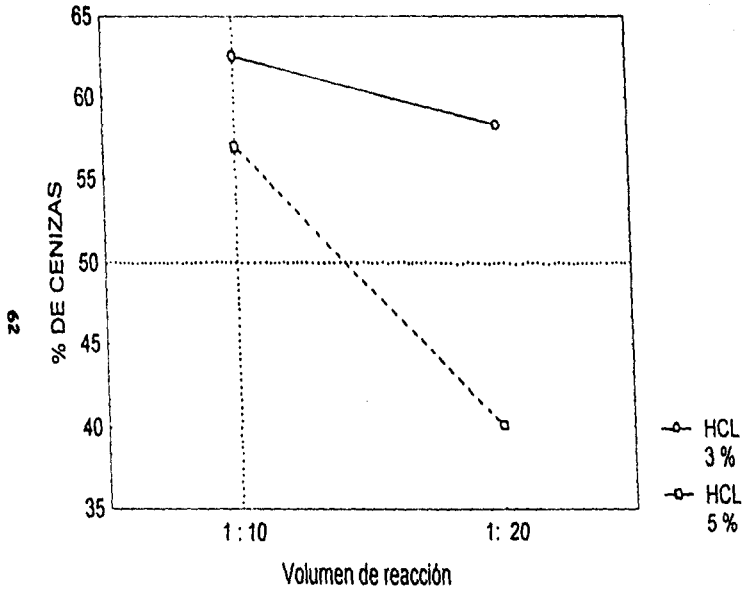
Gráfica de probabilidad normal de los efectos de las variables independientes sobre el % de minerales



Efecto	Efecto
1: MASHI	-11.8175000000000
2: TEPF	-1.1175000000000
3: TIDMP	-0.2500000000000
4: VIDA	-10.4875000000000
5: AGITACI	-0.4250000000000
12	-0.8750000000000
13	-0.8250000000000
23	-0.4750000000000
14	-0.1625000000000
24	-1.5375000000000
14	-0.2000000000000
15	-0.4250000000000
25	-0.4250000000000
15	-0.3125000000000
45	-0.2500000000000
123	-0.2500000000000
124	-0.1125000000000
134	-0.2500000000000
234	-0.8250000000000
1235	-0.2500000000000
135	-1.5375000000000
235	-0.1625000000000
145	-0.8750000000000
245	-0.8250000000000
145	-0.1875000000000
1234	-0.4250000000000
1235	-10.4875000000000
1245	-0.5250000000000
1345	-1.1750000000000
2345	-11.8175000000000
12345	---

Gráfica No. 3.

Gráfica de medias
Interacción [HCl] - Volumen de reacción



Al término de la experimentación bajo las nuevas condiciones se obtuvieron los resultados de remoción de cenizas de cada uno de los 9 eventos presentados en la tabla 14.

Tabla 14. ANÁLISIS DE REMOCIÓN DE CENIZAS (SEGUNDO DISEÑO)

TRATAMIENTO	% CENIZAS RESIDUAL	% CENIZAS REMOVIDAS DEL TOTAL
1	39.8	37.2
2	0.8	98.7
3	1.0	98.4
4	1.0	98.4
5	1.0	98.4
6	1.0	98.4
7	0.8	98.7
8	1.0	98.4
9	1.0	98.4

El análisis del diseño de superficie de respuesta confirmó el efecto significativo de las variables Concentración de HCl y volumen de reacción, mostrado en la Tabla 15.

Tabla 15. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.

EFFECTO	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P
CURVATURA	126.75	1	126.75	6337.50	.007996
CONCENTRACION HCl	380.25	1	380.25	19012.50	.004617
VOLUMEN DE REACCION	372.49	1	372.49	18624.50	.004665
INTERACCION DE AMBOS	380.25	1	380.25	19012.50	.004617

Los parámetros estimados para el modelo de primer orden, su error estándar y la prueba t respectiva se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. PARÁMETROS ESTIMADOS

EFECTO	COEFICIENTE DE REGRESION	ERROR ESTANDAR	t (1)	NIVEL p
Concentración de HCl	-9.7500	.0707	-137.88	.004617
Volumen de reacción	-9.6500	.0707	-136.42	.004665
Interacción de ambos	9.7500	.0707	137.88	.004617

Sin embargo, ya que en las condiciones del experimento se obtuvo el valor deseado de menos del 1% de cenizas, ya no se utilizó la superficie de respuesta para buscar este óptimo, solo se seleccionó el tratamiento de menor costo.

En base a lo anterior las condiciones óptimas para la desmineralización serían:

- Concentración de ácido clorhídrico = 5%
- Temperatura = 30°C.
- Tiempo = 1 hora.
- Volumen de reacción = 1:40.
- Agitación = no.

Bajo las condiciones establecidas como óptimas para la desmineralización del polvo de caparazón de jaiba, se procedió a hidrolizar el total del polvo obtenido de la molienda.

3.4 DESPROTEINIZACIÓN DEL POLVO DE CAPARAZÓN DE JAIBA.

En la tabla 17 se muestran los datos correspondientes a las determinaciones del porcentaje de proteínas (Anexo 3) obtenidos en cada uno de los 16 eventos realizados con el fin de remover las proteínas presentes en el caparazón de jaiba previamente desmineralizada.

Tabla 17. ANÁLISIS DE REMOCIÓN DE PROTEÍNA (PRIMER DISEÑO).

EVENTO	% PROTEÍNA RESIDUAL	% PROTEÍNA REMOVIDA DEL TOTAL
1	8.05	50.0
2	6.95	56.8
3	1.58	90.1
4	0.47	97.0
5	8.05	50.0
6	6.47	59.8
7	0.86	94.6
8	0.15	99.0
9	7.90	50.9
10	7.58	52.9
11	1.26	93.1
12	0.47	97.0
13	5.21	57.6
14	6.45	59.9
15	0.00	100.0
16	0.00	100.0

Control de % proteína = 16.11

El criterio de optimización para esta etapa fue disminuir el % de proteína hasta el menor nivel posible presente en la materia prima desmineralizada previamente, lo cual fue obtenido directamente en 2 de los 16 eventos realizados, por lo tanto se

obtuvieron muestras de quitina libre de proteínas y no fue necesario elaborar un segundo diseño.

La gráfica No.4 muestra la probabilidad normal de los efectos en la que se puede observar que la temperatura fue el factor que mas influyó en la desproteínización del polvo de caparazón de jaiba.

Se establecieron como condiciones óptimas para la desproteínización, las siguientes:

- Concentración de hidróxido de sodio = 1%
- Temperatura = Ebullición (121°C aprox.)
- Tiempo = 3 horas
- Volumen de reacción = 1:20
- Agitación = si.

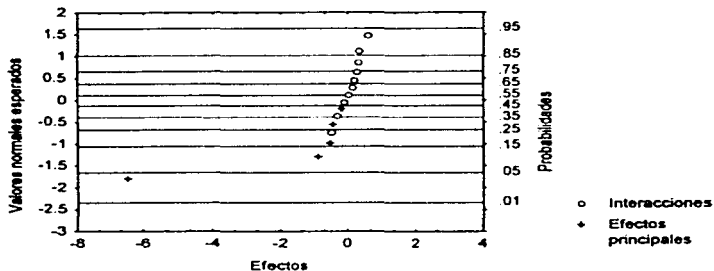
Una vez establecidas las condiciones óptimas se procedió a la completa desproteínización de la muestra ya desmineralizada, con lo cual se obtuvo finalmente la quitina que posteriormente se desacetiló para obtener quitosán.

3.5 DESACETILACIÓN DE LA QUITINA.

Se llevaron a cabo los eventos establecidos bajo las condiciones reportadas, obteniendo finalmente el polímero de quitosán con diferentes propiedades físicas como color, viscosidad y solubilidad en ácido acético, las cuales se evaluaron de forma cualitativa y se reportan en la tabla 18.

Gráfica No. 4

Gráfica de probabilidad normal de los efectos de las variables independientes sobre el % de proteína



ESTAD.		(274151) diseño de factorial (11x3x3x3x3)	
EXPERIM.		PROTEINA: N=14 = 1.440000 N = 1.441133	
DESCRIP.			
Efecto		Efecto	
1:RACH		1:TEMP	
2:TEMP		3:TIEMPO	
3:TIEMPO		4:VDEP	
4:VDEP		9:ACITACI	
9:ACITACI		12	
12		13	
13		14	
14		24	
24		34	
34		35	
35		45	
45		123	
123		124	
124		134	
134		234	
234		1235	
1235		235	
235		345	
345		245	
245		345	
345		1234	
1234		1235	
1235		1345	
1345		2345	
2345		12345	
12345			

Gráfica No. 5. Comportamiento reológico del
Quitosán No. 2

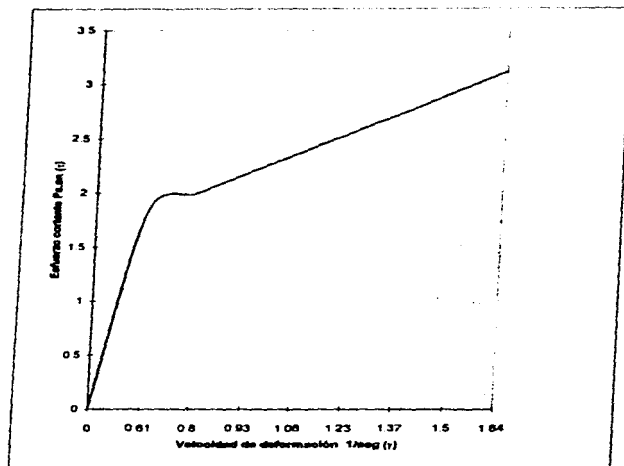


Tabla 16. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUALITATIVAS DE LOS 16 QUITOSANES

EVENTO	COLOR	CH ₃ COOH al 0.5%	CH ₃ COOH al 1.0%	VISC. APARENTE (Cps)
1	Rosa	No soluble	No soluble	-
2	Blanco	Soluble	Soluble	440
3	Rosa	No soluble	No soluble	-
4	Blanco	Soluble	Soluble	300
5	Rosa	No soluble	No soluble	-
6	Blanco	Soluble	Soluble	320
7	Rosa	No soluble	No soluble	-
8	Blanco	Soluble	Soluble	230
9	Rosa	No soluble	No soluble	-
10	Blanco	Soluble	Soluble	300
11	Rosa	No soluble	No soluble	-
12	Blanco	Soluble	Soluble	360
13	Rosa	No soluble	No soluble	-
14	Blanco	Soluble	Soluble	460
15	Rosa	No soluble	No soluble	-
16	Blanco	Soluble	Soluble	210

Se observó que la obtención de quitosán soluble se vio influenciada por la utilización de NaOH preparado al 50% (p/p) y se tuvo un tiempo corto en comparación con los tiempos reportados por Hong y Meyers, que son del orden de días utilizando también NaOH al 50% (Hong, K. y Meyers, S.; 1995).

Los 8 quitosanes que no solubilizaron presentaron coloración final en la muestra debido a que algunos pigmentos propios del caparazón de jaiba no se removieron después de la hidrólisis.

Como dato complementario se realizó una caracterización reológica al quitosán que presentó la mayor viscosidad, presentando el comportamiento mostrado en la gráfica No. 5. Dicho

quitosán resultó ser un fluido de la potencia con un valor de $n = 0.78$, por lo que corresponde a un fluido pseudoplástico, con un índice de consistencia (K) de 0.16 Pa.s"

Para realizar las pruebas de coagulación se manejaron los quitosanes que solubilizaron identificándolos con el número correspondiente a cada uno (Q_1, Q_2, \dots, Q_n).

Por último se puede mencionar que el rendimiento total para el proceso de extracción del quitosán, obtenido de acuerdo a la figura 7 fue de 11.0%, es decir que por cada Kg. de polvo de caparazón de jaiba molido, se obtendrán 110 g de quitosán soluble en ácido acético.

3.6 COMPOSICIÓN DEL SUERO DE QUESO PANELA Y PRUEBAS DE COAGULACIÓN

El suero de queso panela que se utilizó para realizar las pruebas de coagulación con el quitosán solubilizado en ácido acético se recolectó del Taller de Lácteos de la FESC Campo 4 y se mantuvo en refrigeración de 3-5 °C por un periodo no mayor a 3 días para evitar un exceso de acidez en el suero.

La composición química general del suero utilizado se reporta en la tabla 19.

Tabla 19. COMPOSICIÓN QUÍMICA GENERAL DEL SUERO DE QUESO PANELA.

ANÁLISIS QUÍMICO	PORCENTAJE
Humedad	93.53
Proteína	0.81
Cenizas	0.51
Grasa	0.65
Lactosa	4.5

Los datos de la tabla 20 muestran que el suero de queso panela conserva aún ciertos componentes factibles de ser recuperados para aprovechar este subproducto de la industria láctea.

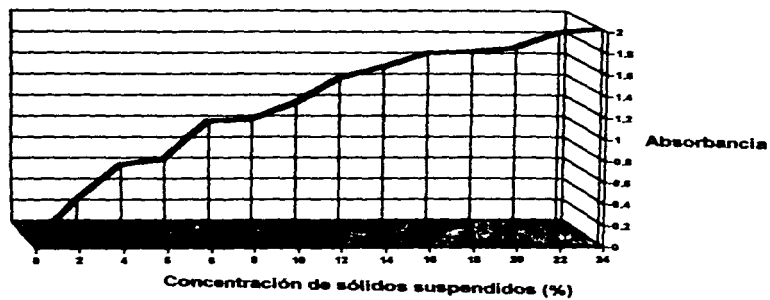
Las soluciones de quitosán para la coagulación de los sólidos se prepararon en el momento de realizar las pruebas debido a que el quitosán sufre un proceso de degradación conforme transcurre el tiempo; en 1978 Moorjani demostró que la viscosidad y la capacidad de las soluciones de quitosán para coagular se ven afectadas por el tiempo de almacenamiento debido probablemente a la agregación de macromoléculas de quitosán y degradación parcial del quitosán por el ácido acético de las soluciones.

Se midieron absorbancias a $\lambda = 610$ nm del líquido sobrenadante del suero y se extrapolaron en la curva patrón (Gráfica No. 6) para obtener los porcentajes de sólidos recuperados en la primera serie de eventos de coagulación con las diferentes concentraciones de quitosán, los cuales se presentan en la tabla No. 20.

Tabla No. 20. PORCENTAJE DE SÓLIDOS RECUPERADOS DE LA PRIMERA SERIE DE EVENTOS DE COAGULACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSÁN.

No. de Q.	350 mg	450 mg	550 mg	650 mg	750 mg	850 mg
2	92.0	94.6	94.3	89.0	85.0	--
4	90.0	94.3	93.2	88.2	79.5	--
6	88.2	91.9	94.1	88.8	84.0	--
8	89.0	89.5	94.7	94.0	90.0	--
10	--	77.0	88.0	92.0	93.1	88.2
12	--	76.8	86.0	91.0	92.3	83.8
14	--	76.2	84.6	91.8	90.6	94.3
16	--	79.6	88.1	93.9	96.5	88.2

Gráfica No. 6 Absorbancia vs Concentración de sólidos suspendidos de suero de queso panela



En base a los resultados anteriores se eligió el quitosán No. 2 como el que funcionó mejor para la coagulación de sólidos de suero de queso panela, esto se realizó con la base de la obtención de la menor absorbancia del líquido sobrenadante del suero a una $\lambda = 610$ nm cuando se utilizó la menor cantidad de ml. de la solución de quitosán y se comparó con la gráfica No.6 que muestra la curva patrón construida con el suero de queso panela en donde el contenido total de sólidos suspendidos se toma como 100%.

La tendencia general de la tabla 20 es que a medida que el volumen de quitosán agregado se acerca a 8.5 ml (850 mg) el espectrofotómetro no registra lectura y comienza a presentarse el fenómeno de resuspensión de sólidos.

Posteriormente se utilizó el quitosán No.2 para realizar una segunda serie de pruebas de coagulación cerrando el intervalo de volumen aplicado a 0.5 ml (Tabla 21).

Tabla 21. PORCENTAJE DE SÓLIDOS RECUPERADOS DE LA SEGUNDA SERIE DE EVENTOS DE COAGULACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSÁN No. 2.

350 mg	400 mg	450 mg	500 mg	550 mg
92.0	98.0	94.6	94.5	94.3

La gráfica No. 7 muestra de forma clara que la concentración ideal a utilizarse para la coagulación de sólidos de suero de queso panela a pH=6.0 es 400 mg/lt de suero de queso panela.

Los resultados obtenidos de la concentración de quitosán por litro de suero de queso panela no se encuentran muy alejados de los reportados por otros autores utilizando quitosán de diferente fuente tal como lo demuestra el estudio realizado en 1989 por Hong, K. y Meyers, S. en donde recuperan sólidos de efluentes de desecho del procesamiento de camarón utilizando 150 mg/lt de

quitosán (proveniente de cangrejo) bajo un pH= 6.0, con lo que se redujo la turbidez de los efluentes en un 97% y recuperando hasta un 27% de proteína cruda.

3.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS SÓLIDOS RECUPERADOS

En la tabla 22 se presentan los resultados de la composición química general de los sólidos recuperados después de separar el líquido en la prueba de coagulación.

Tabla 22. COMPOSICIÓN QUÍMICA GENERAL DE LOS SÓLIDOS RECUPERADOS

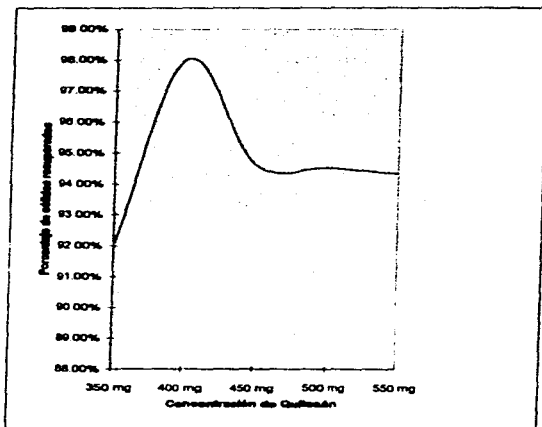
ANÁLISIS	PORCENTAJE
Humedad	89.0
Proteína	2.3
Grasa	3.4
Lactosa	4.7
Cenizas	0.6

El rendimiento obtenido de los sólidos recuperados con quitosán No. 2 usado en una concentración de 400 mg/lit de suero es de 4.9 gr. de sólidos suspendidos por cada 100 gr. de suero de queso panela.

Los datos obtenidos de la composición de los sólidos de suero de queso panela muestran que este subproducto de la industria láctea todavía conserva un valor potencial para el aprovechamiento de componentes de importancia nutricional.

La composición de los sólidos recuperados nos indica que los componentes en mayor porcentaje a excepción de la humedad son **grasa**, **lactosa** y el porcentaje proteína que se obtuvo, lo que nos da pie a proponer que los sólidos pueden ser utilizados como

Gráfica No. 7. Porcentaje de sólidos recuperados vs concentración de Quitosán No. 2



complemento alimenticio para animales siempre y cuando se realice una evaluación nutricional; por otro lado las pequeñas cantidades de quitosán presentes en dichos sólidos no tienen efectos adversos en los valores nutricionales de los componentes recuperados de efluentes de desecho de procesos alimenticios, tal como lo sostienen algunos autores (Bough, D. y Landes, W.; 1976).

En general estos resultados demuestran que el quitosán es un coagulante efectivo para la reducción y recuperación de sólidos provenientes de los efluentes de varios procesos de alimentos, lo que concuerda con estudios como el realizado por Hye, K.; Ji, S.; Hong, K. y Meyers, S. en 1994 donde se utilizó quitosán de cangrejo en una cantidad de 300 mg/lit de efluentes a un pH= 5.8 para coagular y recuperar sólidos de origen protéico de efluentes del procesamiento de Tofu, un tipo de soya que se consume tradicionalmente como alimento en Corea. En dicho estudio reportan una disminución de la turbidez del 97% después de coagular con el quitosán.

CONCLUSIONES

Los rendimientos de las hidrólisis a nivel experimental pueden mejorarse mediante el empleo de centrifugación de las muestras en la etapa de lavados, ya que el tiempo para la sedimentación es muy largo, y esto atrasa la dinámica del proceso.

Quando se agrega al polvo de caparazón de jaiba el volumen de reacción de ácido clorhídrico en la etapa de desmineralización se observó un abundante espumado, por lo que el mejor orden de adición fue:

- Colocar la mitad del total de volumen de reacción en el vaso de precipitados.
- Agregar el total de la muestra a desmineralizar, dejar reaccionar hasta observar una disminución de la espuma.
- Terminar de adicionar el volumen de ácido escurriéndolo por las paredes para que reaccione el total de la muestra, el tiempo de reacción se toma a partir de ese momento.

Durante las hidrólisis de la etapa de desproteínización fue necesaria la ayuda de un equipo de condensación a nivel laboratorio, para evitar la pérdida por evaporación del volumen de reacción, el cual debe mantenerse constante durante el tiempo de hidrólisis, esta condición fue válida para la etapa de desacetilación.

DESMINERALIZACIÓN

Los efectos significativos que influyeron en la desmineralización fueron la **concentración de ácido clorhídrico, el volumen de reacción y la interacción entre ambos**. Las condiciones encontradas para obtener menos de 1% de cenizas en la quitina fueron: **concentración de ácido clorhídrico = 5%**,

temperatura = 30°C, tiempo = 1 hora, volumen de reacción = 1:40 y sin agitación.

DESPROTEINIZACIÓN

En la etapa correspondiente a la desproteínización se pudo determinar que la temperatura fue la variable que más influyó. Las condiciones encontradas para obtener menos del 1% de proteína fueron: concentración de hidróxido de sodio = 1%, temperatura = ebullición (121°C), tiempo = 3 horas, volumen de reacción = 1:20 y con agitación.

DESACETILACIÓN

En cuanto a la etapa de desacetilación se observó que en la obtención de quitosán soluble influye la utilización de NaOH al 50%, ya que de los 16 quitosanos, 8 resultaron solubles y 8 no fueron solubles.

Como dato complementario se realizó una caracterización reológica al quitosán que presentó la mayor viscosidad entre los solubles, presentado un comportamiento de fluido de la potencia ($n=0.78$, por lo tanto es pseudoplástico) con un índice de consistencia $K= 0.16 \text{ Pa.s}^n$.

COAGULACIÓN DE SÓLIDOS DE SUERO

En cuanto a las pruebas de coagulación que se realizaron con los 8 quitosanos solubles, se utilizaron 6 diferentes concentraciones desde 3.5 mg/lt hasta 8.5 mg/lt, midiéndose las absorbancias del líquido sobrenadante y comparándose con la curva patrón elaborada, con lo anterior el quitosán No. 2 resultó ser el más adecuado presentando la menor absorbancia del líquido sobrenadante después de la prueba de coagulación.

Posteriormente se realizó una segunda prueba de coagulación exclusivamente para el quitosán No. 2 manejándose concentraciones desde 3.5 mg/lt hasta 5.5 mg/lt, con lo que se observó que

concentración de 400 mg/lit es la ideal para coagular sólidos de suero.

Por último se realizaron análisis de composición química a los sólidos de suero de queso recuperados con quitosán de jaiba dando como resultado un rendimiento de 4.9 gr de sólidos suspendidos por cada 100 gr de suero con la siguiente composición química:

Humedad=89.0%; Proteína=2.3%; Grasa=3.4%; Lactosa=4.7%;
Cenizas=0.6%.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden servir como punto de partida para la realización de otras experimentaciones cuya finalidad sea la evaluación nutricional y funcional de los sólidos recuperados con quitosán del caparazón de jaiba.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

SUGERENCIAS

Realizar un análisis infrarrojo para conocer el grado de desacetilación, ya que en el presente trabajo no fue posible su determinación.

Realizar un aminograma de los sólidos recuperados del suero de queso panela para conocer su calidad nutricional y justificar si es posible usarlos como forraje alimenticio para el ganado.

Llevar a cabo pruebas de coagulación con una mezcla de sueros de diferentes tipos de queso para saber si es posible su aplicación en la industria de quesos en general.

Utilizar el quitosán obtenido de polvo de caparazón de jaiba para la coagulación de sólidos de efluentes de diferentes procesos de alimentos.

Evaluar la posible aplicación del quitosán obtenido del polvo de caparazón de jaiba como agente espesante y emulsificante para la elaboración de productos alimenticios o como fungicida y antimicrobiano en el recubrimiento de frutas y hortalizas para alargar su vida de anaquel.

BIBLIOGRAFIA

1. Alais, Ch. 1984. Ciencia de la Leche, principios de técnica lechera. Editorial CECSA. México.
2. Alexopoulos, C.J. and Bold, M.C. 1967. Algae and Fungi. Macmillan Publishing Co. New York.
3. Arai, K.; Kinumari, T. and Fujita, T. 1968. On the toxicity of chitosan. Bull. Tokai Reg. Fish. Lab. 56(6) 889-897.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1984. Official Methods of Analysis. Fourteenth Edition. Washington. U.S.A.
5. Arvisu, M.J. 1976. Importancia Potencial de la Langostilla. Instituto Nacional de Pesca. Boletín Informativo No. 32.
6. Austin, F.R.; Brine, C.J.; Castle, J.E. and Zikakis, J.P. 1981. Chitin: New facets of research. Science 212(10) 749-753.
7. Bath, D.O.; Dickinson, F.W.; Tucker, H.A. and Applesman, R.D. 1982. Ganado lechero: principios, práctica, problemas y beneficios. Ed. Interamericana. 2a. ed. México.
8. Bough, W.A.; Wu, A.C.M.; Holmes, M.R. and Perkins, B.E. 1978. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I-III. Coagulation of cheese whey solids. Biotechnology and Bioengineering. Vol XX 1957-1996.
9. Brinscombe, J.S. and Webber, J.M. 1964. Mucopolysaccharides: chemical structure, distribution and isolation. Elsevier. Amsterdam.
10. Cameron, J.M. 1985. La muda del cangrejo azul. Investigación y Ciencia. Junio.
11. Carib, E. and Ulane, R. 1973. Chitin synthase activating factor from yeast, a protease. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50(2) 186-191.

12. **Casalis, J.** 1974. Consideraciones sobre la utilización del lactosuero en la industria de la alimentación. *Revista Española de Lechería*. 94:221-233.
13. **Cosío, I.G.; Fisher, R.A. and Carrod, P.A.** 1982. Bioconversion of Shellfish Waste: Waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis. *Journal of Food Science*. 47:901.
14. **DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION.** 18 de Enero de 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de control Sanitario, de Actividades, Establecimientos y Servicios. Título IV, Capítulos I y XI. México.
15. **Dilanján S. Ch.** 1984. Fundamentos de la Elaboración del queso. Editorial Acribia. España.
16. **F.A.O.** 1977. SHEETS. True crabs, technical terms and principal measurements used.
17. **Foster, A.B. and Backman, R.M.** 1957. Applications of ethylenediamine tetracetic Acid in the Isolation of Crustacean chitin. *Nature*. 180:40-41.
18. **Godad A.** 1966. *Modernas Técnicas Aplicadas. Análisis de la Leche.* Editorial Dossat, S.A. ESPAÑA.
19. **Gordon, D.T. and Williford, C.B.** 1983. Influence of chitin and chitosan on element absorption in the rat, in: Unconventional source of dietary fiber, their physiological and in vivo functional properties. ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc. Washington, D.C.
20. **Hong, K.M. and Meyers, S.P.** 1989. Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.* 37(3):580.
21. **Hong, K.M. and Meyers, S.P.** 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan: a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 4(2):27.

22. Hye, K.J.; Ji, S.K.; Hong, K.W. and Meyers, S.P. 1994. Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu wastewater. *J. Agric. Food Chem.* 42:1834-1838.
23. Jelan, P. 1979. Industrial whey processing technology: an overview. *J. Agric. Food Chem.* 27(4): 658-661.
24. Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology.* 45(1):114-122.
25. Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in foods. *Food Technology.* 38(1) 84-89, 92-97.
26. Landess, D.R. and Bough, W.A. 1976. Effects of chitosan-a coagulating agent for food processing wastes-in the diets of rats on growth and liver and blood composition. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 15(5) 555-563.
27. Manson, W. 1978. Aspects of the value and the limitations of milk proteins as a food material. *Proc. Nutr. Soc.* 37: 217-223.
28. Monreal, J. and Reese, E.T. 1969. The chitinase of ~~Serratia marcescens~~ Canadian. *Journal Microbiology.* 15:689-696.
29. Montgomery, D. 1991 Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica.
30. Moorjani, M.M.;Khasim, D.I.; Rajalakshmi, S. and Amla, B.I.1978. Chitosan of high viscosity and protein valuable by-product from squilla. In proceedings of the first international conference on chitin-chitosan; Muzzarelli, R.A.A., Pariser, E.R. Eds. MIT Sea Grant Program. Cambridge, MA. p 210.
31. Morris, C.E.; Drennan, W.C.; Herkin, D.T. and Hannigan, K. 1987. Mergers fuel a healthy industry. *Food Eng.* 59(6) 75.
32. Muzzarelli, R.A.A. 1976. Chitin. Pergamon Press. Oxford. 87-154.
33. Muzzarelli, R.A.A. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan, in R.A.A. MUZZARELLI (Ed.), Chitin. Pergamon Press. Oxford.

24. Nagyvary, J.J.; Falk, J.D.; Mill, M.L.; and Bradbury, E.L. 1979. The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. *Nutr. Rep. Int.* 20(5) 677-684.
25. Nieto, F.J. 1975. Sueros de quesería: orientación sobre su aprovechamiento y revalorización. *Industrias Lácteas.* 24(5).
26. Bonta, S. y Miranda, S.P. 1996. Recuperación de proteínas de efluentes. *Memorias del XVI Congreso de Química.* Gto. México. *Rev. de la Sociedad Mexicana de Química.*
37. Pariser, E.R. and Lombardi, D. 1989. *Chitin Sourcebook: a guide to the research literature.* John Wiley & Sons. New York.
38. Perry, H.M.; Ogle, J.T. and Michelson, L.C. 1979. The fishery for softcrabs with emphasis on the development of a closed recirculating system for shedding crabs. *Proceedings of the blue crab colloquium.* October, 18-19. p 1-16.
39. Racotta, V. 1976. Aprovechamiento del suero. *Ponencia.* Enero 28-30. México, D.F.
40. Revilla, R.A.; M.S.A. 1983. *Tecnología de la Leche: procesamiento, manufactura y análisis.* Editorial Herrero Hermanos, Sucesores S.A. 7a. edición. México.
41. Rodríguez, C.R.C. 1987. *Crustáceos Decapodos del Golfo de California.* Secretaría de Pesca. México.
42. Rodríguez De la Cruz, M. C. 1988. *Los Recursos Pesqueros de México y sus Pesquerías.* Secretaría de Pesca. México.
43. Rudall, K.M. and Renchington, W. 1973. The chitin system. *Biol. Rev.* 49(4) 597-636.
44. **SEA FISHERIES INSTITUTE GYDWA POLAND.** 1976. Possibilities of commercial utilization of chitin-chitosan. *Intriguing Natural Polimers.*

45. SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE RECURSOS NATURALES Y PESCA. 1964. Anuario Estadístico de Pesca. México.
46. SECRETARIA DE PESCA. 1985-1993. Anuario Estadístico de Pesca. México.
47. Skjak-Braek, G.; Anthonson, J. and Sanford, P. 1989. Chitin and chitosan. Elsevier Applied Science. London.
48. Spreer, E. 1975. Lactología industrial; leche, preparación y elaboración. Máquinas e instalaciones. Productos Lácteos. Editorial Acribia. 2a. edición. España.
49. Sugano, M.; Fujikawa, T.; Nakashima, K. and Hasegawa, Y. 1980. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. Am. J. Clin. Nutr. 33(4) 787-793.
50. Surholt, B. 1975. Studies in vivo on chitin synthesis during the larval-adult molting cycle of the migratory locust Locusta migratoria. J. Comp. Physical. B-102. 135-147.
51. Tagatz, M.E. 1968. Biology of the blue crabs, Callinectes sapidus rathbun, in the St. Johns River, Florida. Fish. Bull. 67(1): 17-33.
52. Takiguchi, Y.; Ohkouchi, K.; Yamashita, H. and Shimahara, K. 1987. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 61:437.
53. Watkins, T.R. and Knorr, D. 1983. In vivo dye binding of chitin and its effect on gerbil growth and gut function. Nutr. Rep. Int. 27(1) 189-197.
54. Webb, J. and Alford, F. 1974. Fundamentals of Dairy Chemistry. The AVI Publishing Co. Westport, Connecticut. U.S.A.
55. Whistler, R.S. and Smiller, J.W. 1962. Chitin. J. Org. Chem. 27:1161.
56. Whitaker, J.R. and Steven, R.T. 1977. Food proteins. The AVI Publishing Co. Westport, Connecticut. U.S.A.

ANEXOS

ANEXO 1. DETERMINACION DE HUMEDAD. METODO POR ESTUFA.

FUNDAMENTO

Esta determinación se basa en la evaporación del agua libre que se encuentra presente en la muestra.

MATERIAL Y EQUIPO

- Estufa.
- Desecador.
- Balanza analítica.
- Cápsulas de porcelana o aluminio.
- Pinzas para crisol.
- Espátula.

PROCEDIMIENTO

Llevar una cápsula a peso constante, en una mufla a 500-600°C. Pesar en la cápsula a peso constante de 3-5 gramos de muestra homogenizada, colocarla en la estufa a 100°C hasta que el peso de la cápsula no varíe.

Sacar la cápsula de la estufa y enfriarla en un desecador. Pesar tan pronto como se haya alcanzado la temperatura ambiente.

CALCULOS

$$\% \text{ DE HUMEDAD} = ((A-B)/X \cdot 100) / M$$

Donde:

A= Peso de la cápsula + muestra húmeda [g]

B= Peso de la cápsula + muestra seca [g]

M= Peso de la muestra húmeda [g].

Ref.: A.O.A.C. ,1984

ANEXO 2. DETERMINACION DE CENIZAS.

FUNDAMENTO

Se basa en la incineración para destruir toda la materia inorgánica, cambiando su naturaleza; las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos o carbonatos, o bien reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros.

MATERIAL Y EQUIPO

- Mufla.
- Desecador.
- Balanza analítica.
- Crisoles de porcelana.
- Pinzas para crisol.
- Mechero.
- Triángulo de porcelana.
- Tripie.
- Espátula.

PROCEDIMIENTO

Pesar entre 1-2 gramos de muestra en un crisol puesto previamente a peso constante. Carbonizar la muestra lentamente en el mechero, para evitar pérdidas por arrastre de humo y proyecciones de la muestra fuera del crisol.

Cuando el desprendimiento de humo haya cesado, llevar el crisol a la mufla a una temperatura entre 500-600°C, hasta que las cenizas estén libres de carbón (cenizas grises o blancas). Si esto no se logra, dejar enfriar el crisol, agregar unas gotas de agua destilada, secar nuevamente en el mechero y continuar calentando nuevamente la mufla hasta peso constante. Algunas cenizas pueden presentar coloración diferente si la muestra contiene metales coloridos.

Transferir el crisol a la estufa, enfriar paulatinamente y llevar al desecador. Una vez que ha alcanzado la temperatura ambiente, pesar.

CALCULOS

$$\% \text{ DE CENIZAS} = ((A-B) \times 100) / M$$

Donde:

A= Peso del crisol + cenizas. [g]

B= Peso del crisol vacío a peso constante. [g]

M= Peso de la muestra [g].

Nota: Cuando se realicen las determinaciones al suero y sólidos recuperados, es necesario colocar el crisol en un baño maría en ebullición para no perder muestra en la calcinación debido a proyecciones.

Ref.: A.O.A.C., 1984.

ANEXO 3. DETERMINACION DE PROTEINAS. METODO DE TAKIGUCHI.

FUNDAMENTO

La proteína asociada con quitina es hidrolizada con una solución acuosa de hidróxido de sodio caliente y la concentración de sustancias ninhidrin-positivas en el hidrolizado es determinada colorimétricamente.

REACTIVOS

- Hidróxido de sodio 10 N.
- Solución buffer de acetatos 0.5 M, pH = 5.1
- Acido clorhídrico 12 N.
- Solución colorante:

Ninhidrina (0.5 g) e hidrindantin (0.15 g) aforados a 100 ml con Metil Cellosolve. El colorante anterior se debe preparar minutos antes de llevarse a cabo la reacción.

MATERIAL Y EQUIPO

- | | |
|----------------------|------------------------------|
| - Potenciómetro. | - Espátula. |
| - Balanza analítica. | - Matraz aforado de 100 ml. |
| - Autoclave. | - Matraces de polipropileno. |
| - Baño maría. | - Pipetas de 1 y 5 ml. |
| - Espectrofotómetro | - Tubos de ensaye. |

PROCEDIMIENTO

Pesar 0.3 gramos de muestra seca en polvo y transferirla a un matraz erlenmeyer de polipropileno, adicionar 50 ml de NaOH 10 N. Cubrir con papel aluminio la totalidad del matraz.

Introducir el matraz a una autoclave durante 60 minutos a 121°C. Una vez transcurrido el tiempo, enfriar rápidamente el matraz en agua con hielo.

Neutralizar con el ácido clorhídrico 12 N en un baño de hielo, usando un potenciómetro para controlar la neutralización.

Filtrar a vacío (Diámetro de poro 20-30 micrómetros) y recolectar 150 ml con ayuda de lavados con agua destilada.

Colocar en un tubo de ensayo 0.5 ml de la solución anterior, 5 ml de buffer y 5 ml de colorante. El blanco se prepara de la misma forma sustituyendo la solución problema por agua destilada. Cubrir con papel aluminio la totalidad del tubo, mezclar por agitación.

Colocar los tubos en baño maría con agua hirviendo durante 10 minutos. Enfriar rápidamente en agua con hielo, una vez transcurrido el tiempo.

Determinar absorbancia a 564 nm en un espectrofotómetro, calibrado con la solución blanco.

CALCULOS

$$\% \text{ DE PROTEINA} = 2.37 (\text{Abs.}/M)$$

Donde:

Abs. = Lectura de la absorbancia a 564 nm.

M = Peso de la muestra [g].

Ref.: Takiguchi, Y y cols: 1987.

ANEXO 4. DETERMINACION DE GRASA. METODO SOXHLET.

FUNDAMENTO

El método se basa en la extracción de grasa por medio de un disolvente orgánico a través de reflujo en un aparato de soxhlet. El solvente es removido por evaporación y el residuo de la grasa es cuantificado.

MATERIAL Y EQUIPO

- Extractor Soxhlet.
- Balanza analítica.
- Desecador.
- Estufa de secado.
- Cartucho poroso de celulosa.
- Pinzas para crisol.
- Matraz de fondo plano.
- Probeta de 100 ml.
- Mantilla eléctrica.

REACTIVOS

- Eter de petróleo.

PROCEDIMIENTO

Poner el matraz a peso constante, pesar de 5-8 g de muestra e introducirlos en el cartucho. Transferir el cartucho al equipo de extracción, agregar 150 ml de éter de petróleo.

Realizar una extracción de la grasa durante 5 horas continuas o hasta que al colocar papel filtro en la punta del extractor de soxhlet no deje mancha de grasa al evaporarse el solvente. Eliminar el exceso de eter, poner el matraz en la estufa durante 3 horas continuas, pasar al desecador y pesar.

CALCULOS

$$\% \text{ DE GRASA} = ((B-A)/W) \times 100$$

Donde:

B= Peso del matraz con grasa a peso constante [g]

A= Peso constante del matraz vacío [g].

W= Peso de la muestra [g].

Ref.: A.O.A.C.; 1984

ANEXO 5. DETERMINACION DE HUMEDAD.

FUNDAMENTO

Esta determinación se basa en la evaporación del agua libre que se encuentra presente en la muestra.

MATERIAL Y EQUIPO

- | | |
|----------------------|--|
| - Estufa. | - Cápsulas de porcelana
o aluminio. |
| - Desecador. | - Pinzas para crisol. |
| - Balanza analítica. | - Espátula. |
| - Arena. | |

PROCEDIMIENTO

Llevar una cápsula con arena lavada con agua regia a peso constante, en una mufia a 500-600°C. Pesar en la cápsula con arena a peso constante de 3-5 gramos de muestra homogenizada, colocarla en la estufa a 90°C hasta que el peso de la cápsula no varíe.

Sacar la cápsula de la estufa y entriarla en un desecador. Pesar tan pronto como se haya alcanzado la temperatura ambiente.

CALCULOS

$$\% \text{ DE HUMEDAD} = ((A-B) \times 100) / M$$

Donde:

A= Peso de la cápsula con arena + muestra húmeda [g]

B= Peso de la cápsula con arena + muestra seca [g]

M= Peso de la muestra húmeda [g].

Ref.: A.O.A.C. ,1984

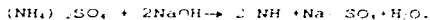
ANEXO 6. DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL. METODO MICROKJELDAHL.

FUNDAMENTO

La digestión de la muestra se efectúa con un oxidante fuerte como el ácido sulfúrico concentrado. Como productos de la oxidación de compuestos orgánicos se tienen CO₂ y H₂O; el H₂SO₄ se reduce a SO₂ y este reduce el nitrógeno de compuestos orgánicos e inorgánicos formándose así NH₃. En presencia de H₂SO₄, el NH₃ se transforma en (NH₄)₂SO₄. Para catalizar la reacción se utiliza una mezcla de Na₂SO₄ (que incrementa el punto de ebullición del ácido sulfúrico) y CuSO₄·5H₂O (que acelera la reacción).

Muestra (Contenido de sustancias nitrogenadas) + 2H₂SO₄ → CO₂ + SO₂ + (NH₄)₂SO₄ + H₂O

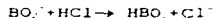
El (NH₄)₂SO₄ se hace reaccionar con NaOH para formar NH₃.



El NH₃ se destila por arrastre de vapor y se fija recibiendo en una solución de HBO₃.



Ya que por cada átomo de nitrógeno presente se forma un ión borato (BO₃⁻), este se neutraliza con una solución valorada de HCl y así de manera indirecta, se conoce el contenido de nitrógeno.



MATERIAL Y EQUIPO

- Destilador microkjeldahl.
- Matraz microkjeldahl.
- Digestor microkjeldahl.
- Bureta de 50 ml.
- Matraz erlenmeyer.

REACTIVOS

- Acido sulfúrico concentrado.

- Hidróxido de sodio al 40%.
- Sulfato de sodio o de potasio.
- Sulfato de cobre pentahidratado.
- Ácido bórico al 4%.
- Ácido clorhídrico 0.1 N.
- Indicador de Kjeldahl.

PROCEDIMIENTO

De acuerdo al contenido de nitrógeno, pesar exactamente 0.1 g de muestra, , adicionar 0.2 g de sulfato de cobre pentahidratado, 1 ó 1.5 g de sulfato de sodio envuelto en papel libre de nitrógeno y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Colocar el matraz en el digestor, calentar suavemente al principio y después en forma energética hasta completar la oxidación. El punto final de la digestión se reconoce cuando la solución es de color verde clara transparente. Si se agota el ácido y no se ha digerido totalmente la muestra (cuando no se ha alcanzado el punto final) dejar enfriar, añadir otra cantidad conocida de ácido y continuar calentando. Algunas veces se presenta un precipitado gris correspondiente a los catalizadores, el cual no afecta al punto final.

Terminada la digestión enfriar el matraz en una campana para la extracción de gases o en su defecto al aire libre hasta que no haya emisión de vapores. Añadir unos mililitros de agua para disolver completamente la muestra.

Preparar el aparato de destilación, esto es en la salida del refrigerante adaptar un tubo de vidrio el cual deberá permanecer sumergido dentro del matraz erlenmeyer de 100 ml., receptor del destilado. El matraz receptor contendrá 50 ml. de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador de kjeldahl.

Abrir la válvula de agua del sistema de enfriamiento, encender la parrilla y mezclar lentamente con movimientos rotatorios el matraz de kjeldahl.

Poner en el matraz de kjeldahl hidróxido de sodio al 40%. Conectando inmediatamente el matraz al sistema de destilación del aparato e ir añadiendo lentamente el hidróxido de sodio.

Después de recuperar un poco de destilado el indicador deberá virar de rosa o violeta a amarillo verdoso. Destilar aproximadamente 100 ml para garantizar la recuperación de todo el amoniaco.

Para evitar que el matraz kjeldahl haga succión y el destilado se regrese, retirar primero el matraz receptor y después apagar la fuente de calor. A continuación lavar con agua destilada el tubo del refrigerante que está sumergido en el matraz con ácido bórico.

Titular lenta y cuidadosamente el destilado con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N, hasta alcanzar el vire de amarillo verdoso a rojo canela.

CALCULOS

$$\% \text{ DE NITROGENO} = (V \times N \times \text{meq} \times 100) / M$$

Donde:

V= ml de HCl usados en la titulación.

N= Normalidad de la solución valorada de HCl.

Meq = miliequivalentes de nitrógeno, 0.014 g.

M= Peso de la muestra [g].

Ref.: A.O.A.C.; 1984

ANEXO 7. DETERMINACION DE GRASA. METODO DE GERBER.

FUNDAMENTO

Cuando se añade la leche al ácido sulfúrico en un tubo graduado especial (butirómetro), con lo que se disuelve la caseína. La grasa por medio de la centrifugación se mide directamente en la escala. La adición de alcohol amílico facilita la separación de la grasa. El ácido sulfúrico debe ser lo suficientemente fuerte para carbonizar la materia orgánica.

MATERIAL Y EQUIPO

- Centrífuga.
- Baño maria.
- Termómetro.
- Pipeta volumétrica de 11 ml.
- Butirómetro para leche.
- Bayoneta.

REACTIVOS

- Acido sulfúrico (Densidad = 1.812 [g/cm³])
- Alcohol isoamílico

PROCEDIMIENTO

Colocar cuidadosamente 10 ml de ácido sulfúrico en el butirómetro, procurando no mojar el cuello. Agregar 11 ml. de suero deslizando por las paredes, evitando que se mezcle con el ácido. Adicionar 1 ml de alcohol isoamílico, tapar el butirómetro fuertemente con ayuda de la bayoneta y envolverlo con una frañela, agitar con precaución.

Llevar el butirómetro a la centrífuga y hacerla funcionar a 1000-1200 rpm, de 3-5 minutos, sacar el butirómetro y llevarlo a un baño de agua a 60-70 °C durante 5 minutos con el tapón hacia abajo.

Hacer la lectura de la grasa separada aumentando o disminuyendo la presión del tapón, para lograr que la parte inferior de la columna de la grasa se encuentre en una de las divisiones de la escala; informar el contenido de grasa tomando la lectura directamente de la escala del butirómetro.

Ref. : A.O.A.C. : 1984

ANEXO 8. DETERMINACION DE LACTOSA (LANE-EYNON).

FUNDAMENTO.

Lane-Eynon es un método volumétrico para la determinación de azúcares, consiste en usar disoluciones alcalinas de cobre que se reducen a óxido cuproso, o agentes oxidantes suaves, que reacciona con las aldosas. Consiste en determinar el volumen de disolución de azúcar que se necesita para reducir 10 ó 25 ml de disolución de Fehling, en presencia de azul de metileno como indicador interno. El aire se elimina de la mezcla reaccionante manteniendo el líquido hirviendo durante la valoración.

MATERIAL Y EQUIPO.

- Bureta de 50 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Pipeta volumétrica.
- Espátula.
- Parrilla eléctrica.
- Balanza analítica.

REACTIVOS.

- Azul de Metileno al 1%.
- Solución de Fehling A (69.27 g de sulfato de cobre por Lt. de agua).
- Solución de Fehling B (346 g de tartrato de sodio y potasio + 100 g de hidróxido de sodio por Lt de agua).
- Lactosa anhidra.
- Ferricianuro de potasio al 10%.
- Acetato de zinc al 20%.

PROCEDIMIENTO.

Medir en un matraz erlenmeyer 5 ml de solución de fehling A y B, adicionando perlas de ebullición. Titular con una solución

de lactosa al 1 % usando una bureta de 50 ml. hasta que el color azul casi desaparezca, agregar 3 gotas de azul de metileno y continuar titulando hasta que se observe el precipitado rojo ladrillo.

Con los ml gastados y la ayuda de tablas se obtiene el factor para la lactosa.

Pasar 10 ml de muestra a un matraz aforado de 100 ml, añadir 50 ml de agua destilada, 5 ml de acetato de zinc al 20% y 5 ml de ferricianuro de potasio al 10%, mezclar y llevar al aforo con agua destilada y agitar.

Filtrar y colocar el filtrado en una bureta de 50 ml, titular con esta solución hasta que el color azul casi desaparezca, agregar 3 gotas de azul de metileno y continuar titulando hasta que se observe el precipitado rojo ladrillo.

CALCULOS.

$$\% \text{ de lactosa} = F \times V \times 1000 / G \times M$$

DONDE:

F = factor de lactosa.

V = volumen [ml].

G = mililitros de la solución empleados en la titulación.

M = masa de la muestra [g].