



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo A.C.**

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y PROPIEDADES
FUNCIONALES DE QUITINA EXTRAÍDA DE
CAPARAZÓN DE CAMARÓN (*Penaeus sp.*)**

POR

KARLA GUADALUPE MARTINEZ ROBINSON

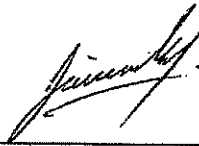
TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

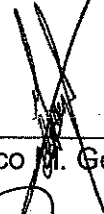
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis de Karla Guadalupe Martínez Robinson, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Director de tesis



Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia



Dr. Waldo M. Argüelles Monal



Dr. Inocencio Higuera Ciapara

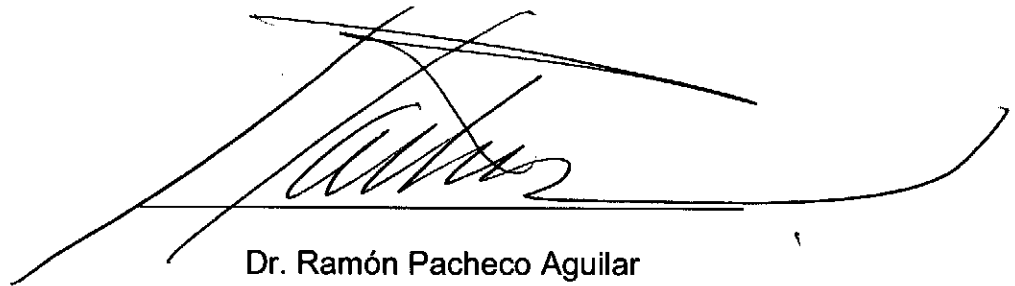


M.C. Leticia Félix Valenzuela

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.**, por permitirme alcanzar una meta más, pero sobre todo por ser mi segunda casa por más de 13 años.

Al **Dr. Jaime Lizardi Mendoza** director de tesis, por permitirme la oportunidad de entrar en el mundo de la quitina, compartir sus conocimientos y su paciencia por mi rueda de la fortuna de emociones, “gracias jefe”.

Al comité de tesis **Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia, Dr. Waldo M. Argüelles Monal, Dr. Inocencio Higuera Ciapara, M.C. Leticia Félix Valenzuela**, por su aportación y apoyo en la realización de esta tesis.

A **Q.B. Alma Consuelo Campa Mada y M.C. Alma Rosa Toledo Guillén** por su apoyo técnico.

A las **Dras. Yolanda López y Elizabeth Carvajal** y al **Dr. Agustín Rascón** por su apoyo y paciencia a lo largo de estos dos años.

Al grupo de Pesqueros en especial a **M.C. Guillermina García, M.C. María Elena Lugo y M.C. Gisela Carvallo** por su apoyo técnico y permitirme el uso de su laboratorio.

Al **Dr. Martín Jara** por su apoyo en los análisis de metales. Al **Dr. Tomas Madera** por la realización de las imágenes de SEM. A **M.C. Orlando Tortoledo** por su apoyo en los análisis de aminoácidos.

A toda la **CTAOA** y a toda la **comunidad CIAD** por su apoyo en la realización de esta tesis y por que confiaron en mí.

En especial a todo el **Grupo de Biopolímeros**, a los estudiantes que están Ana Luisa, Jorge, Neydeli, Gonzalo, Ana Luque, Claudia, Adriana y que estuvieron Rita, Paco con flanders y la ley de Murphy.... por su comprensión y apoyo.

A mi esposo **René Ángel** por su apoyo y su insistencia de que realizara este posgrado, por que sin su impulso, no lo habría logrado.

A todas **Mis Amigas** que estuvieron dándome ánimo y ayudando a tomarme un relax, en especial a Myriam, Comalle (Alma Campa), Keyla, Susy, las viejas pin... del café, Sofía y Sahara. *Gracias, amigas!!!* Porque *“Los mejores amigos son como las estrellas, aunque no siempre se ven, sabes que están ahí”*.

“Pero tú Señor, eres mi escudo protector, eres mi Gloria, eres quien me reanima.”

Salmo 3:3

DEDICATORIA

A Díos:

Por todas las bendiciones que día a día me regala, además de ser la luz en mi vida, mi fuente de inspiración y permitirme alcanzar un logro más en mi vida.

A mi madre:

María Antonieta Robinson, por tu gran apoyo a lo largo de toda mi vida, por ser un ejemplo de lucha y perseverancia, pero sobre todo por escucharme y estar siempre ahí. Gracias mamá!!!

A mi esposo:

René Ángel Silvas, por brindarme su apoyo y comprensión para dedicar tiempo a esta tesis, pero sobre todo Gracias por tu amor!!!!

A toda mi familia:

Tías, hermanas, suegros y cuñados, a todos y cada uno de ellos muchas gracias por su apoyo.

A todas aquellas personas:

Que me apoyaron de una u otra forma, y por miedo a omitir alguna y no darle el mérito, a todos muchas gracias :o)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	5
Quitina	5
Historia	5
Ocurrencia en la Naturaleza.....	5
Características Fisicoquímicas.....	6
Propiedades	12
Aplicaciones	14
Obtención de Quitina	16
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Materia Prima.....	22
Obtención de Quitinas	22
Quitina Extraída (Qn Ex)	22
Quitina Aislada (Qn As).....	22
Quitina Microcristalina (Qn Mi)	23
Caracterización Fisicoquímica	23
Morfología	23
Densidad Aparente Compactada	24
Análisis Proximal	25
Grado de Acetilación	28
Peso Molecular.....	29
Cristalinidad.....	29
Propiedades Funcionales	30
Capacidad de Absorción de Agua	30
Capacidad de Absorción de Lípidos.....	30
Reactividad.....	30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Caracterización Físicoquímica	32
Morfología	32
Densidad Aparente Compactada	36
Análisis Proximal	36
Grado de Acetilación	40
Peso Molecular.....	43
Cristalinidad.....	44
Propiedades Funcionales	45
Solubilidad.....	45
Capacidad de Absorción de Agua	45
Capacidad de Absorción de Lípidos.....	46
Reactividad.....	46
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de obtención de quitina	3
Figura 2. Modelo esquemático de la estructura fibrilar de las paredes cuticulares de los artrópodos. A) Quitina; B) Interacción de quitina con proteína en forma de fibrillas; C) Fibras entrecruzadas reforzadas por mineralización; D) Reacomodo jerárquico; E) Patrones visibles (Raabe y col., 2005.)	6
Figura 3. Estructura química de a) Quitina y b) Celulosa	7
Figura 4. Esquema de los arreglos de las zonas cristalinas α y β de quitina	8
Figura 5. Esquema de color, utilizado para estimar el color de la muestra	24
Figura 6. Apariencia de las quitinas obtenidas: a) Quitina extraída (Qn Ex) y b) Quitina aislada (Qn As)	33
Figura 7. Imágenes de SEM, donde: a) Qn Ex, b) Qn As y c) Qn Mi	34
Figura 8. Cromatograma obtenido por HPLC. A) Qn Ex, B) Qn As y C) MP	39
Figura 9. Espectros de FTIR de las distintas muestras de quitina	41
Figura 10. Espectros de RMN ^{13}C CP/MAS de las distintas muestras de quitina	42
Figura 11. Gráfica de las ecuaciones Huggins, Kraemer y “punto único” correlacionadas para obtener la $[\eta]$	43
Figura 12. Diafractogramas de rayos X de las distintas muestras de quitina	44
Figura 13. Curva de desacetilación termoquímica de las distintas quitinas obtenidas. Qs-Qn As: quitosano a partir de quitina aislada; Qs-Qn Ex: quitosano de quitina extraída y Qs-Qn Mi: quitosano de quitina microcristalina	47
Figura 14. Curva de depolimerización enzimática con lisozima de huevo de las distintas quitinas obtenidas	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de quitina y quitosano en algunas áreas industriales	15
Tabla 2. Resumen de métodos termoquímicos de aislamiento de quitina reportados.....	18
Tabla 3. Resumen de métodos biotecnológicos de aislamiento de quitina reportados.....	21
Tabla 4. Resultados de color de las distintas muestras de quitina	35
Tabla 5. Análisis proximal de las distintas quitinas.....	36
Tabla 6. Contenido de aminoácidos en la MP y muestras de quitinas	38
Tabla 7. Contenido de metales en la MP y las muestras de quitina	40
Tabla 8. Características fisicoquímicas de las quitinas obtenidas	41
Tabla 9. Solubilidad de las muestras de quitina en distintos medios.....	45
Tabla 10. Viscosidad intrínseca y peso molecular viscosimétrico de los quitosanos obtenidos de las distintas quitinas	48

RESUMEN

Los métodos que se utilizan para obtener quitina se consideran metodologías de aislamiento, pues se basan en la remoción de proteínas y minerales. El Grupo de Biopolímeros ha propuesto un método de extracción de quitina, basado en la disolución de la cáscara de camarón. Es por esto que el objetivo del presente trabajo fue determinar las características fisicoquímicas y propiedades funcionales básicas de quitina extraída directamente de desechos de camarón. Se comparó esta quitina con quitina aislada obtenida por métodos termoquímicos tradicionales. Además se preparó una quitina microcristalina partiendo de quitina aislada la cual se utilizó para hacer comparaciones adicionales de las propiedades funcionales. Las características fisicoquímicas muestran resultados similares entre quitina extraída y quitina aislada. La pureza de los productos de ambos procesos fue similar, alrededor del 90 %. La proteína remanente en quitina extraída fue menor al 1 %, siendo los principales aminoácidos remanentes histidina y arginina. La materia inorgánica remanente en quitina extraída fue de 1.5 %, siendo el calcio el mineral predominante. El grado de acetilación para quitina extraída fue estimado en 90 % mientras que para quitina aislada fue del 70 %. El peso molecular de la quitina extraída resultó tres veces menor que el de quitina aislada. El índice de cristalinidad de la quitina extraída fue similar a la de la quitina microcristalina y considerablemente menor a la de quitina aislada. Pruebas de cinética de desacetilación de las quitinas obtenidas permitieron observar que la quitina extraída se desacetila en menor tiempo. Además, se hizo una cinética de depolimerización enzimática con lizosima de huevo, donde la quitina extraída fue la más susceptible a la acción de dicha enzima comparada con la quitina aislada.

Palabras clave: quitina, quitina extraída, quitina aislada, características fisicoquímicas.

INTRODUCCIÓN

México ha producido en promedio 106 mil toneladas (peso vivo) de camarón por año durante la última década (INEGI, 2010). Esta producción mantiene una tendencia creciente. El aumento en la producción se debe principalmente a los esfuerzos que se han desarrollado en acuicultura. En este sentido destacan los estados de Sonora y Sinaloa que aportan más del 80 % de la producción total de camarón cultivado. Sin embargo, si se considera que del total de la producción menos del 50 % es consumible, se tiene una fuente importante de material orgánico con gran potencial contaminante, el cual generalmente es desechado.

Si los desechos de camarón se vierten al mar puede provocarse una eutrofización y consecuentemente una alta demanda de oxígeno e incremento de patógenos (Beaney y col., 2005). Si, por otra parte, los desechos se depositan en contenedores o se entierran, esto puede generar un problema de salud pública. Actualmente sólo una pequeña porción de estos desechos se utilizan como harinas para alimentos de peces y ganado, así como para la elaboración de concentrados proteicos y saborizantes.

El cefalotórax y el exoesqueleto son los principales descartes en el proceso de congelación y venta del camarón. Además de agua, que representa hasta el 80-90 % del peso fresco, estas estructuras contienen proteínas (13-58 % ps), sales inorgánicas (20-72 % ps), lípidos (0.8-12 % ps) y del 14 al 35 % de quitina (Pastor, 2004). Las proporciones de los componentes pueden variar dependiendo de diversos factores como especie, época del año, alimentación, clima, etc. Tanto la proteína como pigmentos presentes en la fracción lipídica pudieran ser recuperados para generar productos de valor agregado. De igual manera, la quitina tiene el potencial para ser un subproducto aprovechable de los desechos de camarón.

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Al igual que ésta, la principal función de la quitina en la naturaleza es la de formar estructuras de soporte y protección a los organismos que las contienen (Kurita, 2006). Químicamente es un polisacárido formado por glucosas unidas con enlaces $\beta(1-4)$ y en su carbono 2 un grupo acetamido como sustituyente. Sus características fisicoquímicas le confieren propiedades estructurales como la capacidad de formar geles, fibras, películas y partículas de diferente forma y tamaño. Otras propiedades importantes que presenta son: biodegradable, no tóxica, antimicrobiana, biocompatible, entre otras. Lo anterior ha sido base para que la quitina sea utilizada en distintas aplicaciones, como por ejemplo: en agricultura como fertilizante, en el tratamiento de aguas residuales, en la industria cosmética, etc. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes para su utilización es que la quitina es insoluble en la mayoría de los solventes comunes. Se han reportado distintos solventes y mezclas para disolverla, pero han presentado algunas desventajas como la degradación del polímero o incompatibilidad de los disolventes con sistemas biológicos. Entre los sistemas de solventes propuestos está el uso de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a bajas temperaturas, la cual no modifica la estructura de la quitina en tiempos cortos.

La producción de quitina a escala industrial se lleva a cabo a partir de desechos de crustáceos (jaiba, camarón, langosta). Comúnmente el proceso de obtención involucra dos pasos básicos: la disolución de sales inorgánicas y la eliminación de proteínas presentes en el exoesqueleto. En la Figura 1 se muestra el esquema general del proceso de obtención de quitina. Dependiendo cómo se lleven a cabo estos pasos los procesos se pueden clasificar en termoquímicos y biotecnológicos. En los procesos termoquímicos se utilizan reactivos químicos, temperatura y diversos procesos físicos para aislar quitina. Se han reportado numerosas variaciones en los reactivos y condiciones utilizados tanto en la etapa de desmineralización como desproteización.

Muchas de estas variaciones se han implementado con la idea de mejorar el rendimiento o facilitar la recuperación de otros productos de interés. Por otra parte, los procesos biotecnológicos son aquellos que utilizan fermentaciones o compuestos derivados de éstas para propiciar la desmineralización o desproteínización de los caparazones. Estos procesos tienden a ser más amigables con el medio ambiente, pero generalmente requieren más tiempo de proceso y la quitina obtenida es de menor calidad.

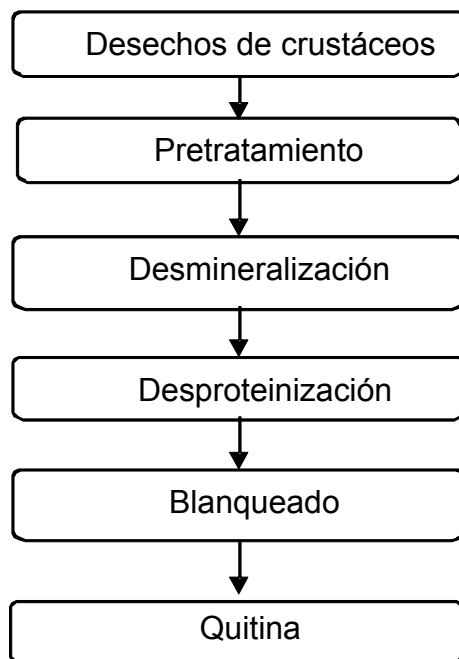


Figura 1. Esquema general de obtención de quitina

Los métodos para obtener quitina, tanto termoquímicos como biotecnológicos, se basan en la remoción de los compuestos que se encuentran formando una matriz compleja en el exoesqueleto de camarón junto con la quitina. En los distintos procesos para obtención de quitina reportados se hace uso de manera indistinta de los términos extracción y aislamiento. Sin embargo, en los procesos reportados lo que se lleva a cabo es un proceso de aislamiento, ya que se separa el material inorgánico, proteínas y otros compuestos, dejando

sin modificación la matriz formada por quitina. Esto mantiene el arreglo fibrilar y microcristalino de la quitina, lo que la hace poco reactiva e insoluble en la mayoría de los solventes comunes. En cambio, cuando se trata de una extracción los compuestos de interés se solubilizan en el medio quedando libres de su estructura compacta para posteriormente ser recuperados.

En el Grupo de Biopolímeros de CIAD se desarrolló un método de extracción de quitina, que se basa en la disolución de ésta en NaOH a bajas temperaturas directamente de los caparazones de camarón. Por lo anterior, se plantea como hipótesis de trabajo que la quitina extraída presenta propiedades fisicoquímicas y funcionales distintas a la quitina aislada. Para poder comprobar la hipótesis se planteó como objetivo general el caracterizar fisicoquímicamente y evaluar las propiedades funcionales de la quitina extraída a partir de cáscara de camarón. Como referencia se utilizó quitina aislada por métodos termoquímicos obtenida de la misma fuente, que a su vez fue empleada para obtener quitina microcristalina. Ambas fueron caracterizadas fisicoquímicamente y se evaluaron sus propiedades funcionales de manera semejante a la quitina extraída.

ANTECEDENTES

Quitina

Historia

La quitina fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811 a partir de hongos superiores y por su origen la denominó “fungina” (Chandy y col., 1990). El nombre quitina (del griego *chiton*, que significa cubierta o envoltura) se debe a Odier, que en 1823 la aisló a partir de escarabajos en soluciones alcalinas. En 1859, Rouget observó que tratando quitina con hidróxido de sodio concentrado obtenía un nuevo producto al que denominó “quitina modificada”, y que era soluble en ácidos orgánicos. Pero no fue hasta 1894, cuando Hoppe-Seyler sometió la quitina a reflujo a 180 °C en hidróxido de potasio observando que el producto que se formaba era soluble en ácido acético y clorhídrico; a este producto lo denominó quitosano (Roberts, 1992; Paul, 2000).

Ocurrencia en la Naturaleza

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. De hecho es el segundo polímero natural más abundante, sólo superado por la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable. La quitina se localiza de forma natural principalmente como componente fibroso del exoesqueleto de muchas clases de invertebrados (Figura 2). Algunos grupos de animales que contienen quitina son: artrópodos (insectos y crustáceos), anélidos y moluscos. La quitina también puede encontrarse en la pared celular de algunos hongos (ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetes), así como en microalgas (diatomeas) (Fang y col., 2004; Raabe y col., 2005).

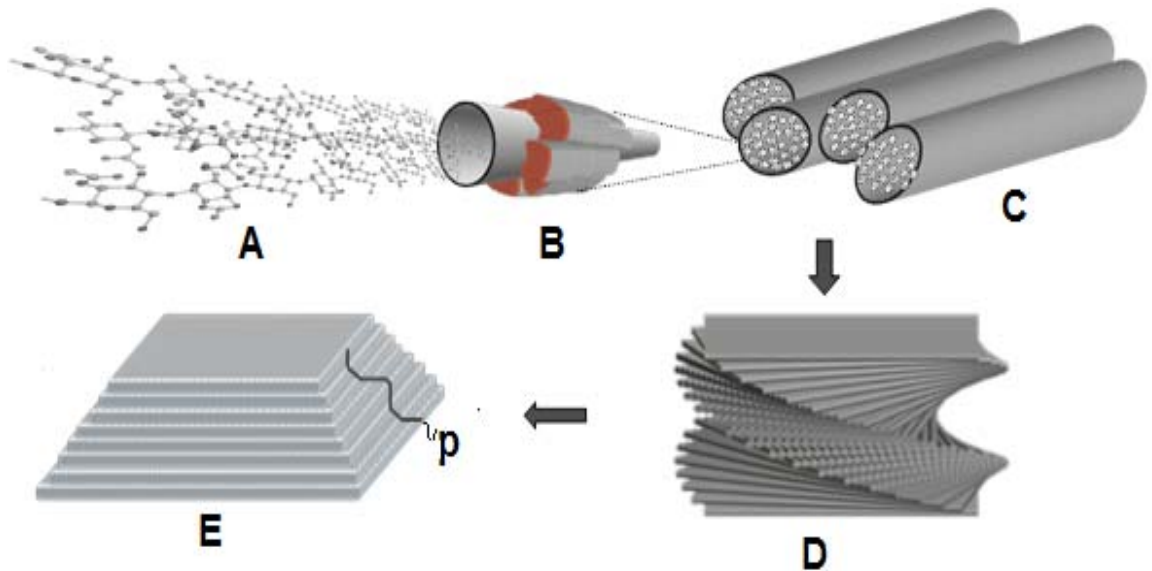


Figura 2. Modelo esquemático de la estructura fibrilar de las paredes cuticulares de los artrópodos. A) Quitina; B) Interacción de quitina con proteína en forma de fibrillas; C) Fibras entrecruzadas reforzadas por mineralización; D) Reacomodo jerárquico; E) Patrones visibles (Raabe y col., 2005.)

Características Fisicoquímicas

Estructura química. La quitina es un polisacárido catiónico lineal, compuesto por unidades de 2-acetoamido-2-deoxi- β -D-glucopiranososa (GlcNAc) y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucopiranososa (GlcN), unidos por enlaces glucosídicos β (1-4). Su peso molecular puede alcanzar el rango de 10^6 Da. La estructura química de la quitina está relacionada con la de la celulosa, donde el grupo hidroxilo secundario del carbono 2 de las glucosas está sustituido por un grupo acetamido (Figura 3). De manera semejante ambos biopolímeros desempeñan funciones estructurales, ya que actúan como materiales de soporte y defensa en los organismos que los contienen (Rudrapatnam y Farooqahmed, 2003; Kurita, 2006).

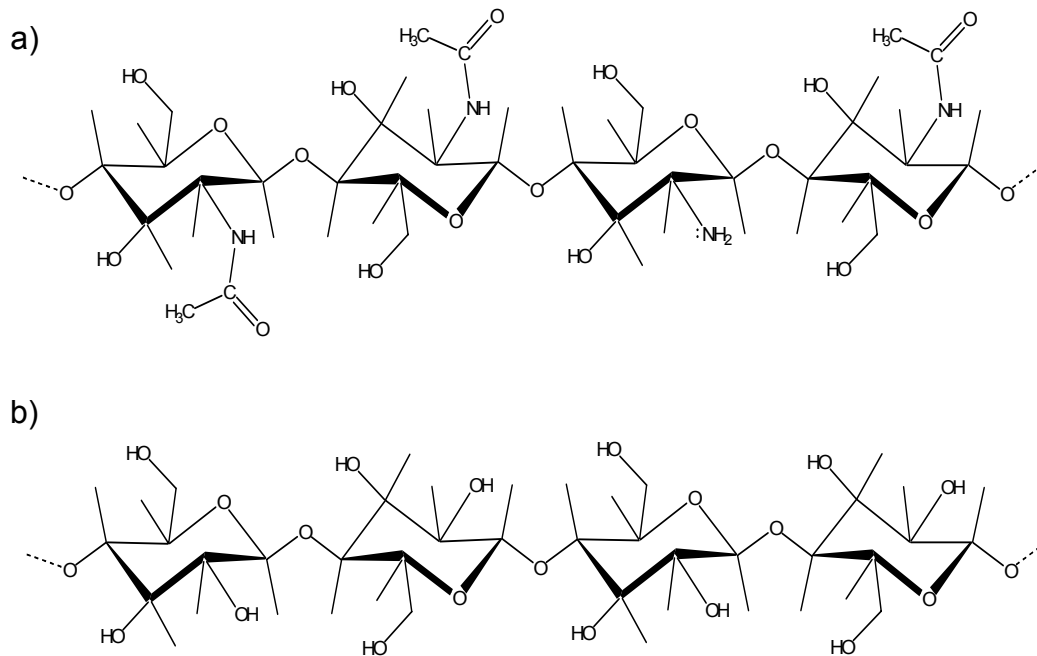


Figura 3. Estructura química de a) Quitina y b) Celulosa

Cristalinidad. La quitina se encuentra en la naturaleza formando una matriz sólida hidratada en forma de fuertes fibras, que están compuestas predominantemente por regiones amorfas pero que incluyen zonas organizadas microcristalinas. Las fibras son formadas por cadenas de quitina que se encuentran empaquetadas y asociadas lateralmente mediante múltiples enlaces de puentes de hidrógeno. Las zonas cristalinas de la quitina pueden presentarse en tres formas polimórficas, denominadas α , β y γ quitina, que se diferencian en la disposición y empaquetamiento de las cadenas. La forma α es la más abundante, ya que se encuentra en los exoesqueletos de los artrópodos y en los hongos, mientras que la forma β es casi exclusiva de la pluma del calamar, de algunas diatomeas y de ciertas especies de las profundidades marinas. Las tres formas se pueden diferenciar mediante el análisis del patrón de difracción de rayos X (Peniche y col., 2008).

La estructura cristalina tipo α es más estable y rígida que la β . En la α quitina, las cadenas del biopolímero se disponen en forma antiparalela (Figura 4). Esto le permite un mejor arreglo estérico ayudando así a la formación de numerosos enlaces de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares entre los grupos acetoamido del C-2 y los grupos hidroxilo de los carbonos C-3 y C-6 de las cadenas. La β quitina tiene una estructura menos compacta y más abierta, debido a la disposición paralela de sus cadenas. En consecuencia, esta forma polimórfica se hincha fácilmente en agua lo que le permite ser más reactiva y más degradable (Peniche, 2006; Galed, 2005).

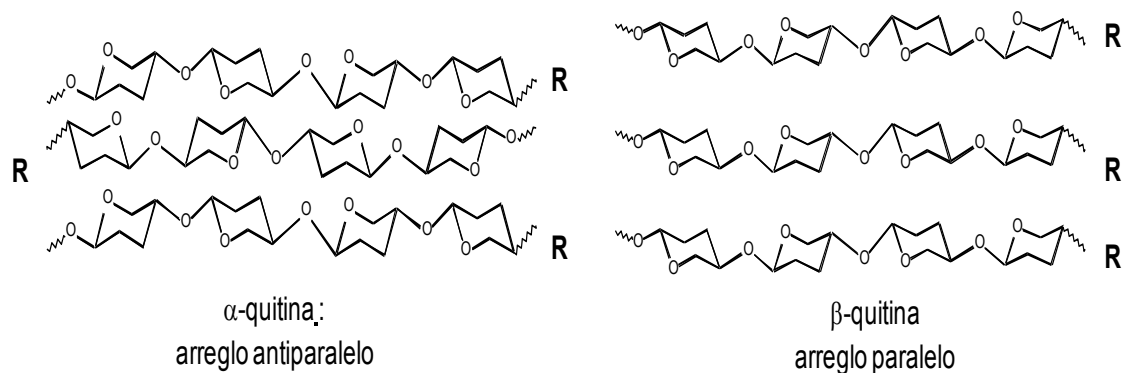


Figura 4. Esquema de los arreglos de las zonas cristalinas α y β de quitina

Peso molecular. La quitina es naturalmente polidispersa, es decir, que una muestra dada está formada por cadenas de distinto peso molecular. En los caparazones de crustáceos, además de la variación natural por especie, estado de madurez y procesos fisiológicos, entre otros, la quitina está sujeta a continuos procesos de síntesis y degradación. Aunado a esto, el proceso de extracción puede incluir condiciones que degradan la cadena. Debido a esta variabilidad, el peso molecular de la quitina se reporta como un promedio estadístico de la masa molecular estimada por los distintos métodos disponibles.

Los métodos por los cuales podemos determinar el peso molecular son: viscosimetría, dispersión de luz y cromatografía de permeación en gel, entre otros. La viscosidad intrínseca es el método sencillo y con bajo requerimientos de equipamiento. Sin embargo, este es un método indirecto que requiere la determinación de constantes obtenidas de muestras de pesos moleculares conocidos, analizadas por métodos directos como el de dispersión de luz. Para determinar el peso molecular promedio viscosimétrico se debe obtener la viscosidad intrínseca ($[\eta]$). Una vez calculada se relaciona con el peso molecular de acuerdo a la ecuación de Mark- Houwink-Sakurada:

$$[\eta]=KM_v^\alpha \quad (1)$$

Donde M_v es el peso molecular promedio viscosimétrico, mientras K y α son las dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del sistema disolvente utilizado y la temperatura (Pastor, 2004; Lizardi-Mendoza, 1998; Peniche, 2006).

El método de dispersión de luz permite determinar de forma directa el peso molecular promedio en peso M_v del polímero. Además, puede proporcionar otros datos como radio de giro promedio z ($(S^2)_z^{1/2}$) y el segundo coeficiente del virial (Γ_2), el cual proporciona información acerca de las interacciones solvente-polímero. Este es un método absoluto que permite determinar las constantes K y α que se utilizan en viscosimetría capilar (Roberts, 1992). La determinación del peso molecular por este método consiste en determinar la dispersión de la luz de las disoluciones poliméricas resultante de las fluctuaciones de densidad y concentración, utilizando distintas concentraciones de las soluciones del polímero (0,001-0,1 g/L). Además se mide la intensidad de la luz que se dispersa a través de las soluciones a 30° y 140 °C con un fotómetro de dispersión de luz a 632.8 nm. El peso molecular se puede calcular utilizando el gráfico Zimm procesado por un software específico.

Sin embargo, cuando existe agregación o asociación entre las moléculas la interpretación de los datos puede resultar complicado (Galed, 2005).

En el caso de la Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), se puede determinar el peso molecular y también se puede conocer la distribución de pesos moleculares. Este método consiste en hacer pasar una solución diluida del polímero a través de una columna rellena de un gel rígido poroso, donde las moléculas de mayor tamaño eluyen primero y las de menor tamaño tardarán en salir. La forma de monitorear al polímero que está saliendo es utilizando un detector, que comúnmente es de índice de refracción. Una desventaja que presenta este método es que se requieren patrones de pesos moleculares comerciales.

Grado de acetilación (GA). Se define como el contenido de residuos acetilados con respecto al total de residuos que forman la cadena de quitina. Puede expresarse en porcentaje o fracción molar. Se han desarrollado numerosos métodos para determinar GA de quitina basados en diversas técnicas como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C CP/MAS, potenciometría y espectroscopia UV primera derivada. Otras técnicas alternativas incluyen análisis elemental, análisis térmico, cromatografía de permeación de gel y dicroísmo circular (Brugnerotto y col., 2001).

Debido a su sencillez, el método de FTIR es uno de los más utilizados. La estimación del GA empleando espectros de infrarrojo generalmente consiste en relacionar una banda de absorción asociada a los enlaces del grupo acetamido con una banda de referencia interna. Como ejemplo, Brugnerotto y col. (2001) tomaron como base una banda característica de quitina localizada a 1320 cm^{-1} y como referencia la banda a 1420 cm^{-1} , sus resultados se correlacionaron con datos de GA obtenidos por RMN. De esto obtuvieron la siguiente ecuación:

$$\text{DA}(\%) = 31.92 \times (A^{1320} / A^{1420}) - 12.20 \quad (2)$$

En todas las determinaciones por FTIR es importante seleccionar adecuadamente las líneas base en el cálculo de la absorbancia, para lograr resultados precisos (Brugnerotto y col., 2001; Pastor, 2004).

La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en las propiedades magnéticas del núcleo atómico. La rotación de una carga crea un campo eléctrico débil que en presencia de un campo magnético externo trata de alinearse con este, pero debido a su momento angular se genera un movimiento de precesión. La velocidad de este movimiento es proporcional a la fortaleza del campo magnético externo. Para el caso de los polímeros, a la RMN en estado sólido se aplica la técnica de “giro de ángulo mágico” (MAS) ya que las interacciones espaciales intermoleculares y de acoplamiento dipolar generan banda anchas provocando así una baja resolución. Adicionalmente se aplica la técnica de “polarización cruzada” (CP) donde la magnetización es transferida de los núcleos de ^1H a los de ^{13}C , produciendo una relajación vía protones, lo que permite realizar un mayor número de lecturas (Tonelli, 1993).

La espectroscopia de ^{13}C -RMN de muestras sólidas es un método no invasivo. Se realiza trabajando con un desacoplador de protón de alto poder para la polarización cruzada (CP) y un accesorio de rotación de muestra de alta velocidad de ángulo mágico (MAS). El CP elimina las interacciones dipolares entre ^1H y ^{13}C , mientras que el MAS promedia las interacciones dipolares y la anisotropía del desplazamiento químico lo que permite obtener espectros de alta resolución (Duarte y col., 2001). La resonancia magnética nuclear de ^{13}C con CP-MAS en estado sólido se ha empleado en diversos estudios sobre cristalinidad y estructura conformacional de quitina y quitosano. Se ha establecido una asignación de picos para este tipo de espectros de los dos polimorfos más comunes de quitina. A partir de estos análisis es posible determinar la conformación estructural y de composición de las muestras, con las que puede calcularse su grado de acetilación. El grado de acetilación se

obtiene directamente del valor de las integrales del C metílico con respecto a las integrales de los carbonos del anillo (Várum y col., 1991).

Propiedades

Solubilidad. Otra característica que comparte la quitina con la celulosa es su insolubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos comunes. Ambos polímeros se pueden solubilizar en una mezcla compuesta por N,N-dimetilacetamida (DMAc) con cloruro de litio (LiCl). El mecanismo de disolución de la quitina en este solvente puede explicarse como sigue: En el solvente los iones litio (Li^+) se asocian con el oxígeno del carbonilo del DMAc. Este complejo débil solvata a los polielectrolitos formados por la asociación entre los iones cloro y los grupos lábiles de protones de la cadena de quitina. Esto tiene como consecuencia la ruptura de los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura cristalina de la quitina, permitiendo su disolución (Poirier y col., 2002). El sistema solvente DMAc-LiCl, es el más utilizado para obtener soluciones de quitina; sin embargo, este sistema solvente presenta algunas desventajas: las soluciones son inestables en presencia de humedad y el DMAc es considerado un solvente orgánico tóxico con posibles efectos carcinogénicos.

Otro solvente en el que se puede disolver quitina es el hidróxido de sodio (NaOH) en frío. No obstante, existen pocas investigaciones reportadas acerca de este tipo de sistema solvente de quitina. Sannan y col. (1975) comenzaron a investigar la disolución de quitina en suspensiones de hidróxido con hielo, obteniendo una solución que denominaron quitina alcalina. Este tipo de disolución se ha empleado como un paso precursor para las reacciones de derivatización de la quitina. Einbu y col. (2004) modificaron la técnica descrita por Sannan y col. (1975) para obtener soluciones de quitina. Al hacer un análisis del comportamiento de este polisacárido en solución, concluyeron que

el sistema NaOH y hielo puede ser considerado como un sistema solvente adecuado para quitina.

Propiedades estructurales. En la naturaleza la quitina cumple la función de formar estructuras que proporcionan soporte, flexibilidad, resistencia y una barrera impermeable a los organismos que la poseen. Las estructuras formadas de quitina son muy diversas ya que pueden ser duras y rígidas o flexibles y frágiles. El arreglo estructural de la quitina proporciona una ruta para formar numerosas estructuras. Las propiedades mecánicas de la quitina se pueden comparar tanto con fibras naturales como sintéticas (Wegst, 2004).

Las capacidades estructurales de la quitina le permiten producir diversos materiales por si misma o bien mezclándola con otros polímeros. Sin embargo, la quitina no posee propiedades termoplásticas por lo que es necesaria su disolución para obtener distintos materiales como geles, películas y fibras, entre otros materiales moldeables. Las propiedades mecánicas de estos van a depender de las características fisicoquímicas de la quitina de donde se originaron, como peso molecular, GA y ordenamiento de las cadenas (Lizardi-Mendoza, 2007).

Reactividad. La presencia de grupos funcionales susceptibles a ser modificados en la cadena de la quitina ha permitido la obtención de diversos derivados. Esto, sobretodo, con la finalidad de incrementar su solubilidad en distintos sistemas solventes. Los métodos comunes para la modificación química de la quitina son llevados a cabo en condiciones heterogéneas. Este tipo de reacciones presenta algunas desventajas como: bajo grado de reacción, falta de uniformidad estructural y degradación parcial del polímero. Alternativamente se han propuesto métodos en fase homogénea, ya que presenta un mejor control de la reacción, pero la poca solubilidad de la quitina limita el número de posibles reacciones (Zou y col., 2005; Shigemasa y col., 1999).

Una de las reacciones de modificación de quitina más utilizada es la desacetilación, para producir su derivado desacetilado llamado quitosano. Esta reacción consiste en remover el grupo acetilo de los grupos aminos bajo condiciones heterogéneas, en medio alcalino (NaOH ó KOH) a altas temperaturas (100-110 °C). No obstante, una posible desventaja es que la reacción puede disminuir el tamaño de la molécula. Otra reacción que produce derivados de quitina solubles es la inclusión de grupos tosil (p-toluensulfonil) a la molécula en el C-6. La reacción se lleva a cabo a 0 °C, poniendo a reaccionar quitina alcalina con cloruro de tosilo en cloroformo. Esta reacción produce una quitina parcialmente soluble en agua y a medida que se incrementa el grado de sustitución la quitina es soluble en solventes orgánicos. Usualmente la quitina tosilada es utilizada para elaborar otros derivados (Kurita, 2001).

Aplicaciones

En los últimos 6 años se ha incrementado el número de solicitudes registradas en las principales agencias de propiedad intelectual en el mundo relacionadas con aplicaciones de la quitina y quitosano. Los principales países en los que se originan este tipo de patentes son Estados Unidos, Japón, Corea, y algunos países de la Unión Europea. En el mercado existe una consolidación importante en la demanda de materias primas (quitina semipurificada de grado comercial) para la elaboración de quitosanos funcionales y se estima que esto continuará en los próximos años a medida que se investiguen mas aplicaciones (Higuera y col., 2007).

Por su insolubilidad en solventes comunes, los usos de la quitina tienden a restringirse al estado sólido. Las principales aplicaciones se centran en adsorción y formación de complejos, como es el caso de tratamiento de aguas residuales. La quitina presenta propiedades funcionales atractivas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no tóxica y cualidades mecánicas, por lo que se ha estudiado la utilización de este polisacárido en aplicaciones

biomédicas, textiles y cosméticas, entre otras (Schultz y col., 1998; Xie y col., 2001; Pastor, 2004). Una porción considerable de quitina producida en el mercado se destina a la obtención de glucosamina. Este derivado es utilizado como un suplemento dietético por su capacidad de reducir dolor y rigidez de articulaciones, en pacientes que presentan artritis (Word guide 2003-2005; Higuera y col., 2007). La mayor parte de la quitina es convertida en quitosano por medio de una desacetilación termoquímica. El quitosano, a diferencia de la quitina, forma soluciones acuosas en ácidos diluidos en donde se comporta como polielectrolito, motivo por el cual tiene más aplicaciones. En la Tabla 1 se enlistan algunas de las aplicaciones de quitina y quitosano, así como su campo de acción.

Tabla 1. Aplicaciones de quitina y quitosano en algunas áreas industriales

CASOS DE APLICACIÓN	USOS
Tratamiento de agua y efluentes industriales	Remoción de iones metálicos y pesticidas: remoción de fenoles, radioisótopos, PCBs y colorantes.
Fabricación de papel	Tratamiento de superficies, papel fotográfico
Medicina	Gasas, algodón hilos de sutura, lentes de contacto.
Cosmética	Maquillaje, esmalte de uñas loción de baño, cremas.
Bioteología	Inmovilización de enzimas y células, separación de proteínas, cromatografía y recuperación celular.
Agricultura	Recubrimientos de semillas y frutas (películas), fertilizante, fungicida.
Alimenticia	Remoción de colorantes, conservantes, estabilizante.

Fuente: (Pastor, 2004)

Obtención de Quitina

La quitina comercial se obtiene a partir de desechos de crustáceos de la industria pesquera, siendo las principales fuentes los caparazones de cangrejo, camarón, langostino y langosta. El exoesqueleto de los crustáceos consiste mayoritariamente en un 18-58 % de proteínas, 20-72 % de carbonato y fosfato de calcio, 0.8-12 % de lípidos y un 14-35 % de quitina. Estos porcentajes van a depender de la especie, estación de captura del animal, hábitat y condiciones ambientales.

Los procesos reportados manejan indistintamente los términos de extracción y aislamiento, para referirse al procedimiento de obtención de la quitina. Aislamiento se define como la acción de dejar un compuesto solo, separado de la combinación o medio que se encuentra. Tomando esto en cuenta, la obtención de quitina se lleva a cabo a través de aislamiento, ya que los procesos se enfocan en remover proteínas, sales inorgánicas y demás compuestos. Por otra parte, el término de extracción se refiere a obtener compuestos mediante la utilización de disolventes u otros medios. Al momento sólo se tiene conocimiento de un reporte sobre el uso de HCl concentrado para disolver cáscara de camarón y recuperar quitina de la solución resultante (Díaz, 2007).

Existe una gran variedad de métodos para el aislamiento de quitina, los cuales se basan en dos pasos básicos: la separación de proteína o desproteínización y la eliminación de sales minerales o desmineralización (Figura 1). En estas etapas los caparazones de crustáceos son tratados en fase heterogénea. El proceso de obtención puede complementarse con algunos pasos adicionales como el tratamiento de muestra, eliminación de pigmentos y operaciones de manejo del material. Las principales fuentes de variación entre los distintos métodos reportados son las condiciones de reacción, tiempo y

fuente de obtención. En general, los métodos de aislamiento pueden agruparse en métodos termoquímicos y biotecnológicos, que se describen a continuación.

Procesos termoquímicos. Los métodos termoquímicos emplean reactivos químicos y temperatura para remover las proteínas y minerales de los desechos de crustáceos. Se han reportado numerosas variaciones de este tipo de métodos. Entre las variaciones observadas se encuentran: cambiar el orden de las etapas de desproteinización y desmineralización, iniciar el proceso con la extracción de pigmentos, uso de diferentes concentraciones de los reactivos empleados y distintas temperaturas de proceso, uso de diversos solventes o aditivos, entre otros. Como ejemplo, en la Tabla 2 se enlistan algunas de las variaciones de los métodos termoquímicos reportados para la obtención de quitina en los últimos años.

A continuación se hace una descripción general del método termoquímico. Habitualmente se tiene una etapa inicial de pretratamiento o preparación de la materia prima. Esta puede consistir en lavados, secado y molienda de la muestra. Los lavados se realizan con agua corriente para reducir el contenido de impurezas o tejido muscular adherido. El secado típicamente se da entre 60 a 80 °C para reducir humedad y así facilitar su manejo. La molienda es el proceso para reducir el tamaño de partícula para facilitar el acceso de los reactivos a la matriz de los caparazones y de esta manera hacer más eficiente el proceso (Pastor, 2004; Roberts, 1992).

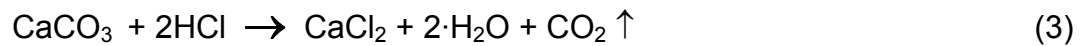
Para eliminar el componente inorgánico de los desechos de crustáceos, en su mayoría sales de calcio (carbonato), se han utilizado soluciones diluidas de distintos tipos de ácidos, principalmente de ácido clorhídrico (HCl), a temperatura ambiente. En esta etapa es importante que la cantidad de ácido utilizado sea estequiométricamente igual o mayor al contenido de sales de la materia prima para lograr la reacción completa. Algunos investigadores han

Tabla 2. Resumen de métodos termoquímicos de aislamiento de quitina reportados

Pretratamiento	Concentración de reactivo, Temperatura y Tiempo de reacción		Referencia
	Desmineralización	Deproteínización	
Molienda Lavado, secado y molido a 250 µm Molienda y Tamizado Desecado y reducción de tamaño Congelamiento Secado a 60 °C, 18 h. Molienda a 149 µm Molienda directa y congelación Secado a 30 °C y molienda	HCl 1 N, 100 °C, 20 h	NaOH 1 N, 80°C, 36 h; seguido de Na ₂ CO ₃ 0.4 %, 80 °C, 12 h	Sajomsang y col., 2010
	HCl 1.8 N, TA, 12 h	NaOH 10 %, TA, 2 h	Escorcia y col., 2009
	HCl 0.25 M, TA	NaOH 1 M, 70 °C, varios ciclos	Al sagheer y col. 2009
	HCl 0.28 N, 75-80 °C	NaOH 3 %	Belandria y Morillo, 2008
	HCl 1 M	NaOH 1 M, 105-110 °C	Abdou y col., 2008
	HCl 0.25 M, frío	NaOH 1 M, 95 °C, 2 h, 4 ciclos	Rødde y col., 2008
	HCl 1 M, 125 °C, 2 h	NaOH 15 %, 65 °C, 3 h	Battisti y Campana, 2008
	HCl 6 %, 20, 40, 60 y 80 °C	NaOH 6%, 20, 40, 60 y 80 °C	Abdullin y col., 2008
		SDS 1 % + Na ₂ CO ₃ 0.25 % + AVS 1 %, 1-2 h	Flores y col., 2007
		NaOH 4 %, 50 °C, 3 ciclos de 12 h	Rao y col., 2007
	NaOH 0.30 M, 1 h, NaOH 4.36 M, 3 h, 65-85 °C	Lavall y col., 2007	

TA. Temperatura ambiente
 SDS. Dodecilsulfato de sodio
 Na₂CO₃. Carbonato de sodio
 AVS. Aceite vegetal saponificado

reportado que si se utilizan temperaturas superiores a las del medio ambiente se provoca la degradación del polímero (Williams, 2002). La desmineralización con ácido clorhídrico puede ser descrita por la siguiente reacción (Díaz, 2005):



La remoción de las proteínas residuales y las asociadas a las fibras de la quitina se lleva a cabo usualmente por hidrólisis, empleando soluciones acuosas alcalinas. Se han utilizado concentraciones de 1 hasta 10 %, a temperaturas en un rango de 65 a 100 °C. El tiempo del tratamiento puede variar desde media hora hasta 72 h. Sin embargo, se considera que el uso de temperaturas muy altas o tiempos de reacción prolongados tienden a provocar la ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial de la quitina (García, 1997; Roberts, 1992; Peniche y col., 2008 (b), Escorcía y col., 2009). Un procedimiento opcional es la recuperación de los péptidos o proteínas presentes en el medio de reacción. Esto consiste en la precipitación isoeléctrica de las mismas después de la digestión alcalina. Se ha reportado que la proteína recuperada del desecho de camarón, por medio de extracción alcalina y precipitación isoeléctrica, tiene un perfil de aminoácidos similar al de caseína, excepto por el contenido de cistina y metionina (García, 1997).

El exoesqueleto de crustáceos, además de proteína y minerales, contiene cierta cantidad de lípidos que incluyen pigmentos lipídicos, principalmente carotenoides como astaxantina, luteína y β -caroteno. En la extracción de quitina la eliminación de estos pigmentos es un paso considerado opcional. Consiste en utilizar solventes orgánicos polares, como el etanol. Una vez extraídos los pigmentos pueden ser recuperados ya que tienen considerable valor comercial (Pastor, 2004; Pinelli y col., 1998).

Procesos biotecnológicos. Otro tipo de estrategias para la eliminación de proteínas y minerales presentes en los caparazones de crustáceos emplea procesos biotecnológicos, como fermentaciones y uso de enzimas. De manera

semejante que para el aislamiento de tipo termoquímico, para los procesos biotecnológicos se ha reportado el uso de una gran variedad de condiciones de proceso. En la Tabla 3 se muestran las variaciones más recientes que se han investigado. Algunos autores reportan que la calidad de quitina obtenida por este tipo de métodos es baja, comparada con la obtenida por el proceso termoquímico. Sin embargo, el quitosano obtenido a partir de este tipo de quitina presenta propiedades físico-químicas similares al obtenido de quitinas del método termoquímico (Beaney y col., 2005).

Tabla 3. Resumen de métodos biotecnológicos de aislamiento de quitina reportados

Pretratamiento	Fermentación	Desmineralización y Deproteinización			Referencia
	Sustrato, Bacteria y Tiempo de reacción	Concentración de reactivo	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción	
Congelado y molienda	Sucrosa 10 %, <i>L. plantarum</i> , 144 h, 35 °C	HCl 0.25 M NaOH 1 M	70	20 min 24 h	Pacheco y col., 2011
Secado y molienda	<i>L. lactis</i> , <i>T. turnirae</i>	HCl 1 M NaOH 1 M	70	30 min 3 h	Ozhan y col., 2010
Secado	<i>L. plantarum</i>	Ácido láctico <i>A. niger</i>	40 37	24 h 3 días	Sunita y Ganesh, 2010
Molienda a un tamaño de partícula de 5 mm	Sucrosa 10 %, <i>L. plantarum</i> , 144 h				Pacheco y col., 2009
Secado y molienda a < 100 µm	pH 7, <i>B. cereus</i> y <i>E. acetylicum</i> , 24 h, 37 °C				Sorokulova y col., 2009
Cocinado a 90 °C por 20 min y molienda	pH 8, DEP, 3 h, 40-90 °C	HCl 1.5 M	25	6 h	Manni y col., 2009
Lavado con solución clorada y congelación	Sucrosa 10-30 %, <i>Pediococcus sp</i>				Choorit y col., 2008
Cocinado por 1 h y secado a 163 °C (1 h) y molienda	pH 8-9, JD., <i>L. helviticus</i> , 24 h, 30 °C				Adour y col., 2008
Secado a 50 °C por 24 h	PECLG, <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilis</i> , <i>L. rhamneous</i> , 7 días, 30 °C y 5 % de CO ₂	NaOH 2 %	90	2 h	Khanafari y col., 2008

DEP. Digestión con enzimas proteasas

JD. Jugo de dátil

PECLG. Peptona, extracto de carne, levadura, glucosa

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

El exoesqueleto de camarón se obtuvo de la empresa Empromar, ubicada en carretera a Bahía de Kino, Sonora, México. La muestra fue transportada en hielo y una vez que llegó a las instalaciones de CIAD fue congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador (marca Torrey). La muestra congelada se molió (molino Hobart modelo 4152) y se congeló de nuevo. Posteriormente se lavó con agua corriente hasta eliminar la mayoría de los residuos de material orgánico (músculo, hepatopáncreas, etc.). El material lavado se volvió a congelar, hasta ser utilizado en el proceso de obtención de las quitinas.

Obtención de Quitinas

Quitina Extraída (Qn Ex)

Se preparó una solución con exoesqueleto de camarón empleando NaOH a baja temperatura. La quitina se recuperó mediante neutralización utilizando HCl. La mezcla obtenida se centrifugó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 10,000 rpm (centrifuga marca Beckman modelo J2-21). La quitina recuperada se lavó hasta eliminar el exceso de sal y se congeló para secarla mediante liofilización (Freeze Dry System, marca Labconco).

Quitina Aislada (Qn As)

La quitina se aisló mediante la técnica descrita por Beaney y col. (2005). Para el proceso de desmineralización, el exoesqueleto se puso en contacto en una relación 1:15 (p/V) con ácido clorhídrico (HCl) 1 M durante 3 h a temperatura ambiente. Después de ese tiempo, se lavó con agua corriente hasta pH neutro. Para el proceso de desproteínización, el exoesqueleto

desmineralizado fue tratado con hidróxido de sodio (NaOH) 15 % en una proporción 1:10 (p/V), por un periodo de 3 h a una temperatura de 65 °C. Al finalizar, la quitina se lavó hasta pH neutro y se congeló para secarla en un liofilizador (Freeze Dry System, marca Labconco).

Quitina Microcristalina (Qn Mi)

Para preparar Qn Mi se partió de Qn As utilizando la técnica descrita por Beaney y col. (2007). Se colocaron 5 g de Qn As en 200 mL de HCl concentrado a 4 °C. La mezcla se agitó vigorosamente hasta que la temperatura alcanzó los 37 °C. Posteriormente la mezcla se dispersó en 3 L de agua fría y se mantuvo a 4-7 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo la mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 10 min (centrífuga marca Hermle modelo z300). La quitina recuperada se dializó en membranas (marca VWR Spectra/Por) con tamaño de poro de 3500 Da, hasta que la conductividad del dializado fue igual a la del agua bidestilada. La Qn Mi se secó por liofilización. La Qn Mi se preparó para ser utilizada como referencia de una quitina con índice de cristalinidad modificado.

Caracterización Físicoquímica

Morfología

Microscopia. Para observar las diferencias morfológicas de las quitinas obtenidas, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM), donde se hizo la toma de imágenes utilizando un microscopio Phillips XL30, perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CIMVESTAV) de Mérida, Yucatán. El voltaje de aceleración fue 25 kV y la resolución del equipo es de 3.5 nm. Las muestras se tomaron de modo ambiental sin recubrimiento.

Color. Para medir esta cualidad de las tres quitinas y la materia prima (MP) se utilizó un colorímetro portátil (marca Konika Minolta modelo CR-400), el cual registró los valores de los parámetros L, a y b. L indica la luminosidad, donde los valores más bajos (0) representan el color negro o la opacidad de la muestra en cambio valores altos (100) indican una muestra luminosa o blanca. Los valores de a representa el cambio de color verde a rojo y el b el cambio de amarillo al azul y los valores varían de -60 a +60 para ambos parámetros. En la Figura 5 se muestra el esquema de colores que se utilizó como base para obtener las tonalidades de las muestras.



Figura 5 Esquema de color, utilizado para estimar el color de la muestra

Densidad Aparente Compactada

Para la determinación de la densidad aparente compactada (Tap density) se utilizó una probeta cilíndrica de 25 mL. Esta se pesó y posteriormente se le adicionó la muestra lentamente, hasta el volumen marcado de 25 mL. Una vez que la muestra quedó distribuida uniformemente se registró el peso. Después la

muestra se comprime con la ayuda de un aditamento de base plana y de diámetro ligeramente menor al diámetro interno de la probeta. Este procedimiento se repite 3 veces y se registra el volumen final de la muestra compactada. Para calcular el índice de compresividad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{DAC (g/mL)} = 100 (V_0 - V_f) / V_0 \quad (4)$$

Donde V_0 es el volumen inicial y V_f es el volumen final de la muestra compactada.

Análisis Proximal

El análisis proximal de las muestras comprendió la determinación de humedad, ceniza (material inorgánico), lípidos, nitrógeno total, metales y aminoácidos. A partir de los valores de nitrógeno total se estimó el contenido de proteína y quitina de acuerdo al método reportado por Díaz-Rojas y col. (2005). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y los reactivos utilizados fueron grado reactivo, exceptuando los utilizados para la determinación de aminoácidos por HPLC.

Humedad. La humedad se determinó gravimétricamente. Las muestras se secaron en una estufa de convección de aire (marca RIOSSA modelo HS41) a 100 °C durante 12 h, según el método de la AOAC 991.01 (1990).

Material inorgánico. Para la determinación de material inorgánico se utilizó la técnica descrita por Peniche (2006). Las muestras se incineraron a 800 °C (mufla marca Thermolyne modelo 1500 Furnace) por 4 h, midiendo la cantidad de cenizas obtenidas mediante el método gravimétrico.

Contenido de lípidos. Se utilizó la técnica descrita por la AOAC 7. 060 (1990) para la determinación del contenido total de lípidos presentes en la muestra. Según la técnica se estima el total del extracto etéreo por gravimetría.

Nitrógeno total. Para obtener el contenido de nitrógeno total en las muestras se utilizó la técnica de combustión de nitrógeno 992.15 de la AOAC (2000). Se pesó aproximadamente 500 mg de muestra para posteriormente ser incinerada a 850 °C y analizada en un equipo marca LECO modelo FP-528.

Estimación de contenido de quitina y proteína. Para estimar que parte del Nitrógeno total le corresponde a proteína y que porción a quitina, se utilizó la estimación descrita por Díaz-Rojas y col. (2005), donde utiliza una relación estequiométrica aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Proteína} = (N_T \times C_q + K - 100) \times C_p / (C_q - C_p) \quad (5)$$

$$\text{Quitina} = (N_T \times C_q + K - 100) \times C_q / (C_p - C_q) \quad (6)$$

Donde: N_T es la proporción de nitrógeno total presente en la muestra; K es la proporción de material no nitrogenado (materia inorgánica, grasa y humedad); C_p es el factor de conversión de nitrógeno proteico, para este caso se utilizó el valor de 6.25 y C_q es el factor de conversión de nitrógeno presente en quitina, el cual corresponde al nitrógeno teórico, que se ajusta de acuerdo a su grado de acetilación.

Aminoácidos. Para la determinación de aminoácidos se siguió la técnica descrita por Vázquez-Ortiz y col. (1995). Se pesaron 30 mg de muestra que se hidrolizaron con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6 M, por 4 h a 150 °C. Posteriormente las muestras se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en buffer de citrato pH 2.2. Antes (2 min) de realizar la inyección al HPLC la muestra se pone en contacto con el reactivo O-ftaldehído (OPA) para activar la fluorescencia y se le agrega ácido alfa-aminobutírico como estándar interno. Las muestras se analizaron en un HPLC Varian 9012, utilizando una columna Microsorb C18 marca Varian de 10 cm x 4.6 mm y 3 μ m. Metanol grado HPLC 99 % pureza (J.T. Baker) y buffer de acetato de sodio pH 7.2 como fase móvil. Se utilizó un detector de fluorescencia (marca Fluorichrom modelo 430020-02) a

455 nm. La cuantificación de cada aminoácido se llevó a cabo mediante factor utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de aminoácido } (\mu\text{M/mL}) = SI \times A \times 0.05 \times SE \quad (7)$$

Donde SI es el área bajo la curva del estándar interno, A es el área de la muestra y SE es el área del estándar externo.

Metales. Para la determinación de metales se siguió la técnica descrita por Jara y col. (2009). Se utilizó un equipo de absorción atómica marca Varian modelo DUO AA 240 FS, con generador de vapor para hidruros y mercurio modelo VGA 77. Para la realización del análisis se pesaron 200 mg de muestra que fueron hidrolizados con ácido nítrico concentrado bajo presión. La solución obtenida se aforó a un volumen de 50 mL con agua destilada. Para la determinación de Calcio (Ca) y Magnesio (Mg) se tomaron 10 mL de la muestra que se aforaron con cloruro de lantano (LaCl_3) al 0.0072 M a un volumen de 50 mL. Se hizo la medición en flama de acetileno con óxido nitroso. Para la determinación de Zinc (Zn), se utilizó la muestra hidrolizada diluida y se midió utilizando flama de acetileno. Para Potasio (K) y Sodio (Na), las muestras se diluyeron en Cloruro de litio (LiCl) al 0.216 N, midiéndolos por flama de acetileno. Para la determinación de Mercurio (Hg) se utilizó emisión en frío con argón; las muestras fueron reducidas con dicromato de potasio y con cloruro estañoso. El equipo fue calibrado antes de cada medición con una curva estándar para cada metal. Para calcular la concentración se utilizó la siguiente ecuación:

$$[\text{Metal}] = (LF \times V) / (P \times F) \quad (8)$$

Donde LF es la lectura del equipo para cada muestra, V es el volumen de afore de la muestra, P es el peso de la muestra y F es el factor de dilución.

Grado de Acetilación

El grado de acetilación (GA) de las quitinas se determinó mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN). Para la determinación de GA por FTIR, las muestras de quitinas se secaron a 60 °C en una estufa de convección (marca Lindberg/blue). Posteriormente la muestra se molió en un mortero de ágata y se mezcló con Bromuro de potasio (KBr) grado espectroscópico, hasta obtener una mezcla homogénea. Se obtuvieron pastillas comprimiendo la mezcla en una prensa hidráulica (marca ICL). Espectros de infrarrojo en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} se obtuvieron por transmisión en un equipo FTIR (marca Nicolet modelo protegé 460 espectrometer E.S.P). Para la estimación del GA a partir de los espectros de FTIR se utilizó el procedimiento reportado por Brugnerutto y col. (2001), ecuación (2).

Para la determinación del GA por Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -CP-MAS en estado sólido se obtuvieron los espectros bajo contacto simple a 50.32 MHz en un equipo Bruker CXP-200, con un accesorio para la polarización cruzada y giro de ángulo mágico (CP-MAS) tipo Bruker-z32DR-MAS-DB, perteneciente al Departamento de Química de la Universidad de Arizona. La muestra en polvo se empacó en una celda de cerámica y fue sometida a un giro de 4.5 MHz. El tiempo de contacto para la polarización cruzada fue de 2.5 ms. Los desplazamientos químicos de ^{13}C se calibraron indirectamente y refirieron al valor de cero para tetrametilsilano (TMS). El grado de acetilación se obtuvo directamente del valor de las integrales del C metílico con respecto a las integrales de los carbonos del anillo de acuerdo a la ecuación:

$$\text{GA} = I_{\text{CH}_3} / (I_{[\text{C}1-\text{C}6]} / 6) \quad (9)$$

Donde I_{CH_3} corresponde a la integral del C metílico e $I_{[\text{C}1-\text{C}6]}$ a la suma de las integrales de los C1 al C6.

Peso Molecular

Para determinar la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) y a partir de esta calcular el peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) de las muestras de quitina se siguió la metodología descrita por Einbu y col. (2004). Para ello se preparó una solución de quitina a 2.25 mg/mL en NaOH frío. Esta se analizó en un viscosímetro tipo Ubbelohde de tamaño de capilar ASTM 1 colocado en un baño de agua (marca Koehler Instrument Company Inc.) a temperatura constante de 20 °C. Mediciones a 5 concentraciones distintas se utilizaron para determinar la $[\eta]$ utilizando las ecuaciones de Huggins, Kraemer y “punto único”. El M_v de cada muestra se calculó con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (ecuación 1) empleando las constantes $K= 0.10$ y $\alpha= 0.68$.

Cristalinidad

Se obtuvieron los patrones de cristalinidad de las distintas quitinas, empleando un equipo de difracción de rayos X (marca Panalytical modelo X'Pert PRO). Las muestras se midieron en el intervalo de 4 a 40° 2θ a 100 s por paso y con una velocidad de barrido de 0.021 °/s. Se utilizó una rejilla antiescater programable, fija en el rayo reflejado de 1/32 y un detector X'Celerator con corriente de 40 kV y 35 mA.

El índice de cristalinidad de las quitinas se calculó de acuerdo a Zhang y col. (2005), mediante la siguiente ecuación:

$$IC (\%) = [(I_{110} - I_{am})/I_{110}] \times 100 \quad (10)$$

Donde I_{110} es la máxima intensidad a $2\theta = 13^\circ$ y I_{am} es la intensidad de la difracción amorfa a $2\theta = 16$.

Propiedades Funcionales

Capacidad de Absorción de Agua

El método descrito en AOAC 88-04 (1995) sirvió como base para determinar la capacidad de absorción de agua (CAA) de las distintas quitinas. Se pesaron 10 mg de muestra en un tubo para microcentrifuga, se añadió agua hasta que la muestra estuviera completamente humedecida, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min (microcentrifuga marca Thermo Sorval Pico). Se descartó el sobrenadante y se pesó la muestra húmeda. El cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$CAA = (P_f - P_i) / P_i \quad (11)$$

Donde el P_f es el peso de la muestra húmeda y P_i es el peso de la muestra seca.

Capacidad de Absorción de Lípidos

Para determinar la capacidad de absorción de lípidos (CAL) se siguió la misma técnica que para determinar CAA, empleando aceite mineral en lugar de agua.

Reactividad

Para estimar el grado de reactividad de las distintas quitinas se realizaron pruebas de desacetilación termoquímica y degradación enzimática. Los procedimientos empleados se detallan a continuación.

Desacetilación termoquímica. Se pesaron 10 g de Qn As, 5 g de Qn Ex e igual cantidad de Qn Mi. Cada quitina se hizo reaccionar con NaOH al 50 % (p/p) a 100 °C en una proporción 1:30 (p/V). Se tomaron muestras de quitina tratada a distintos tiempos de reacción (15, 30, 45, 60, 90, 120 y 140 min). En cuanto se colectó la muestra se enfrió rápidamente agregando hielo, se lavó

hasta pH neutro y se pusieron a secar a 60°C por 24 h. Se estimó el GA de cada muestra mediante el análisis de FTIR.

Degradación enzimática. Se evaluó el efecto de lizosima de clara de huevo (Sigma) sobre las distintas quitinas. Para esto se adaptaron las metodologías descritas por Muzzarelli (1997) y Kurita y col. (2000). Se dispersaron 0.5 % de quitina en buffer de acetato a pH 4.5; a esta mezcla se le adicionó 2 mL de lizosima a una concentración de 2 mg/mL. Se dejó reaccionando por 6 días, tomando muestras del medio de reacción a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. A las 72 h se le agregó 1 mL más de enzima a la misma.

Se determinó la cantidad de carbohidratos totales presentes en las muestras, mediante la técnica de fenol sulfúrico (Dubois y col., 1956), para observar la producción de monómeros y oligómeros solubles por efecto de la enzima sobre la quitina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de exoesqueleto de camarón se obtuvieron tres tipos distintos de quitina. Fue posible obtener quitina extraída al disolver el polisacárido directamente del exoesqueleto de camarón. Esta quitina extraída se recuperó de la solución alcalina por medio de neutralización. Al realizar el análisis proximal se observó que su pureza era baja, por lo que fue necesario un tratamiento adicional de desmineralización y desproteización a fin de obtener material con la pureza suficiente para su caracterización analítica. Por otra parte, utilizando la misma materia prima se aisló la quitina empleando un método termoquímico tradicional. Esto con la finalidad de poder realizar una comparación entre las quitinas obtenidas por los distintos métodos. Partiendo de esta quitina aislada se preparó quitina microcristalina, que sirvió como una segunda referencia de una quitina con un patrón de cristalinidad modificado. A la materia prima, quitina extraída y aislada se les hizo una caracterización fisicoquímica completa. A la quitina extraída, aislada y microcristalina se les determinaron sus propiedades funcionales básicas. A continuación se describen los resultados obtenidos.

Caracterización Fisicoquímica

Morfología

Las quitinas obtenidas se hicieron pasar a través de un agitador de tamices. El 63 % de las partículas de la materia prima (MP) tienen un tamaño mayor a 2.36 mm, para quitina aislada (Qn As) fue del 50 %, mientras que sólo un 2 % de las partículas de quitina microcristalina (Qn Mi) tienen ese tamaño. Aparentemente el proceso termoquímico para obtener quitina no modifica el tamaño de su partícula, pero el tratamiento con ácido concentrado degrada la estructura de la quitina aislada. Por su parte, todas las partículas de quitina

extraída (Qn Ex) pasaron a través de la malla con tamaño de poro de 850 μm , indicando la pérdida de la estructura original presente en la cáscara de camarón.

En la Figura 6 se puede observar la apariencia de Qn As, la cual se presenta en forma de hojuelas de tamaño variable pero considerablemente mayor a las partículas de Qn Ex. Las hojuelas de Qn As presentan una coloración ligeramente rosa. Por su parte, las partículas de Qn Ex presentan un color anaranjado, que puede deberse a la presencia de pigmentos remanentes en las partículas del polisacárido.

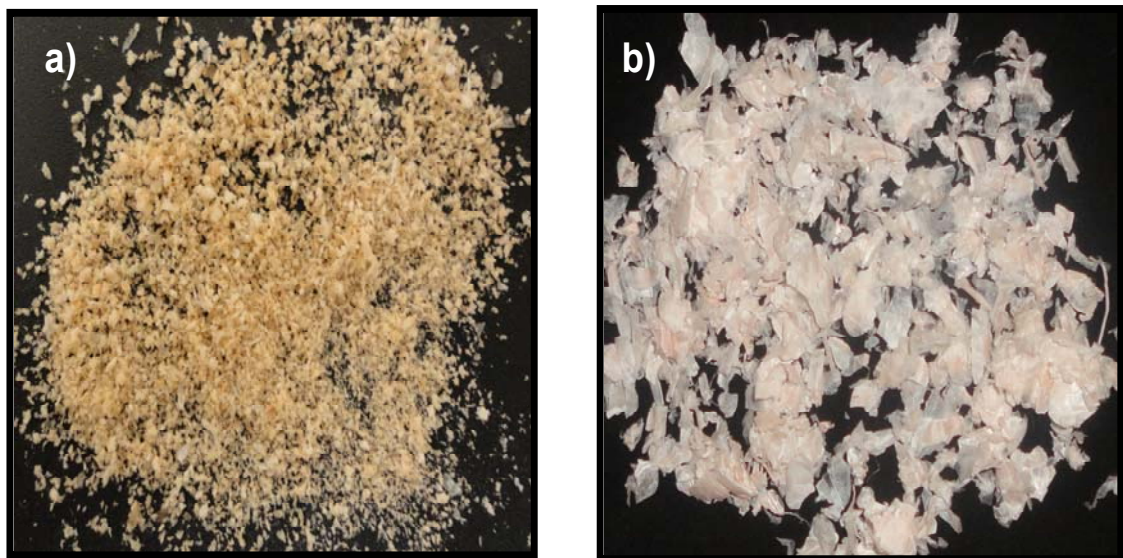


Figura 6. Apariencia de las quitinas obtenidas: a) Quitina extraída (Qn Ex) y b) Quitina aislada (Qn As)

Microscopia electrónica de barrido. Se observó la morfología de las tres distintas quitinas obtenidas utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM). En la Figura 7 se puede apreciar que las partículas de Qn Ex tienen una estructura rugosa con un amplio intervalo de tamaño de partícula. En cambio, en la imagen de Qn As la presencia de una partícula aparentemente proveniente de la antena del camarón indica que la estructura original del

exoesqueleto tiende a mantenerse aun después del proceso de aislamiento. Sin embargo, el tratamiento con ácido concentrado para obtener Qn Mi sí modifica considerablemente la estructura de la Qn As. La Qn Mi está formada por hojuelas de tamaño comparable al de la Qn Ex; además, se pudo detectar la presencia de algunas partículas aparentemente porosas.

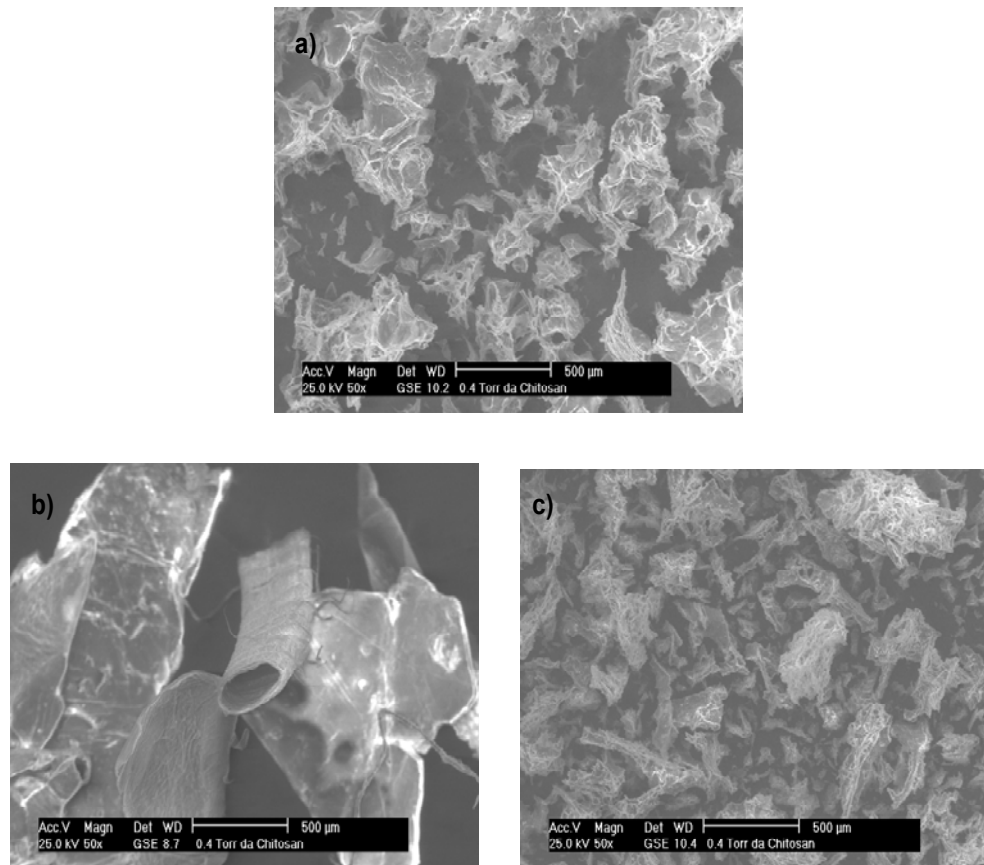


Figura 7. Imágenes de SEM, donde: a) Qn Ex, b) Qn As y c) Qn Mi

Color. Se hizo la determinación de color de las distintas muestras de quitina utilizando un colorímetro marca Konika, utilizando la escala de Hunter Lab. Como se puede observar en la Tabla 4, la luminosidad (parámetro L) de la quitina extraída sin purificar (Qn Ex S) presentó un valor por arriba del 50 % el cual no disminuyó al momento de que la muestra se desmineralizó y

desproteinizó (Qn Ex). En comparación, la Qn As resultó más luminosa con respecto a la Qn Ex, pero la Qn Mi fue la quitina que presentó más luminosidad ya que obtuvo más de 90 % en el parámetro L. De acuerdo a los parámetros a y b* las muestras Qn Ex S y la Qn Ex presentan un color naranja; en cambio los valores de estos parámetros de la Qn As y Qn Mi tienden hacia el centro del diagrama indicando que la muestra es más incolora.

El color presente en las muestras de Qn Ex S y Qn Ex indica la presencia de pigmentos remanentes. Estos pigmentos pudieron permanecer adheridos en la molécula de quitina durante el proceso de extracción. O bien, la quitina se separó efectivamente de los otros componentes del exoesqueleto pero al momento de que la quitina se recuperó, los pigmentos pudieron ser arrastrados y adsorbidos en ésta. Lo anterior conlleva a que es necesario realizar un proceso de blanqueado para eliminar o degradar los pigmentos remanentes en la Qn Ex.

Tabla 4. Resultados de color de las distintas muestras de quitina

Muestra	L	a	b
MP	59.66 ± 4.31	5.53 ± 1.09	20.18 ± 0.92
Qn As	87.16 ± 0.86	2.96 ± 0.8	8.44 ± 0.39
Qn Mi	92.14 ± 0.60	0.01 ± 0.06	6.58 ± 0.25
Qn Ex S	72.51 ± 1.55	8.96 ± 0.25	24.70 ± 0.53
Qn Ex	74.86 ± 0.31	13.21 ± 0.15	27.14 ± 0.30

± Desviación estándar

Densidad Aparente Compactada

Se determinó la densidad aparente compactada (DAC) de las distintas muestras de quitina obtenidas. La Qn Ex tiene una DAC de 0.12 g/mL, mientras que la Qn As se compactó a 0.075 g/mL; por su parte, la Qn Mi presentó una DAC de 0.17 g/mL. Estos resultados indican que las partículas recuperadas del proceso de disolución de la quitina, ya sea con ácido concentrado o bien con álcali frío, tienden a ser más densas. La densidad de las quitinas recuperadas de soluciones es comparable con la densidad de la cáscara de camarón (0.17 g/mL).

Análisis Proximal

La composición química de la MP y de las quitinas obtenidas se muestra en la Tabla 5. Se puede apreciar que a la quitina extraída sin purificar (Qn Ex S), obtenida directamente del proceso de extracción, retiene considerables cantidades de materia inorgánica, proteína y lípidos. Por lo anterior, fueron necesarios procesos adicionales de desmineralización y desproteización en condiciones menos drásticas que las utilizadas en el proceso para obtener Qn As, con el fin de determinar sus características fisicoquímicas adecuadamente.

Tabla 5. Análisis proximal de las distintas quitinas

Muestra	Humedad* (%)	Inorgánica (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Quitina (%)
MP	0.65 ± 0.03	16.99 ± 0.45	4.7 ± 0.05	31.55	43.67
Qn As	0.95 ± 0.06	0.41 ± 0.04	2.38 ± 0.27	8.16	88.09
Qn Ex S	0.86 ± 0.05	18.12 ± 0.29	19.26 ± 0.63	14.50	47.25
Qn Ex	0.31 ± 0.04	1.451 ± 0.023	8.35 ± 0.16	0.53	89.35

*. Humedad remanente
± Desviación estándar

La Qn Ex purificada y la Qn As tienen aproximadamente 90 % de pureza. Con procesos suaves de desmineralización y desproteínización fue posible disminuir el contenido de materia inorgánica y proteínas a valores comparables con los obtenidos para Qn As. Sin embargo, después del proceso de purificación de la quitina extraída no disminuyó el contenido de lípidos. En el proceso termoquímico para la obtención de quitina aislada la desmineralización logró remover un 97 % de material inorgánico, mientras que la desproteínización logró una reducción del 74 %, por lo que se obtuvo Qn As con un 90 % de pureza.

Los resultados obtenidos del contenido de materia inorgánica y proteínas de las Qn Ex y Qn As son similares a los reportados en la literatura. Por ejemplo, Ozhan y col. (2010) probaron dos estrategias diferentes para aislar quitina. La diferencia entre estas estrategias consistió en invertir el orden de los procesos de desmineralización y desproteínización. Para la estrategia de desmineralizar, primero obtuvieron una quitina con una pureza del 87 % comparado con 74 % para la quitina obtenida mediante la estrategia inversa. Dado lo anterior, la Qn Ex y Qn As obtenidas presentan un grado de pureza aceptable.

Aminoácidos. Se analizó el perfil de aminoácidos de la MP y las quitinas obtenidas mediante HPLC (Tabla 6). Los cromatogramas de MP, Qn As y Qn Ex se presentan en la Figura 8. La MP contiene todos los aminoácidos analizados, siendo histidina el aminoácido con mayor presencia, seguido de glutamato, arginina, tirosina y fenilalanina. La Qn Ex S, al igual que MP, contiene todos los aminoácidos analizados; histidina y arginina se mantienen como los aminoácidos más abundantes, pero tirosina y fenilalanina disminuyeron. El proceso de desproteínización y desmineralización que se llevó a cabo para obtener Qn As removió la gran mayoría de los aminoácidos presentes en la materia prima. Sólo los aminoácidos de histidina y arginina están presentes en cantidades detectables. Algo similar ocurre en Qn Ex, ya

que después de que fue purificada se eliminaron la mayoría de los aminoácidos predominando los mismos que para Qn As. Esto pudiera deberse a que dichos aminoácidos están directamente involucrados en los enlaces entre quitina y proteína en la matriz de la cascara de camarón.

Tabla 6. Contenido de aminoácidos en la MP y muestras de quitinas

AA's	% aminoácidos			
	MP	Qn As	Qn Ex S	Qn Ex
ASP	6.293	NC	5.055	NC
GLU	9.621	NC	7.372	NC
SER	5.432	NC	1.218	NC
HIS	9.774	82.91	50.213	80.70
GLI	4.896	NC	2.029	NC
TRE	5.295	NC	1.002	NC
ARG	9.392	17.09	12.866	19.30
ALA	6.097	NC	3.294	NC
TIR	8.185	NC	2.020	NC
MET	5.611	NC	1.495	NC
VAL	3.718	NC	2.192	NC
FEN	7.534	NC	1.336	NC
ISL	5.549	NC	2.870	NC
LEU	6.365	NC	4.358	NC
LIS	6.239	NC	2.680	NC

NC. No cuantificable

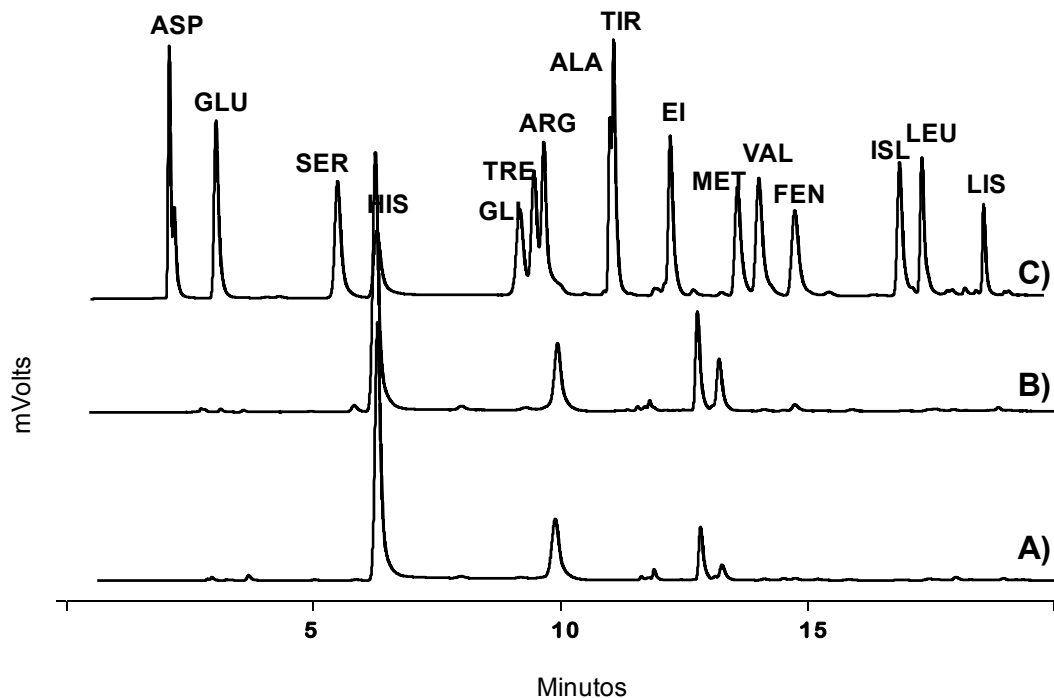


Figura 8. Cromatograma obtenido por HPLC. A) Qn Ex, B) Qn As y C) MP

Metales. Se analizaron los metales de Ca, Na, Mg, K, Zn y Hg a la materia prima y a las distintas muestras de quitina obtenidas. De igual forma que fueron analizadas las quitinas se trató una muestra estándar de ostión (Oyster 1566b, NIST) con concentración conocida de los metales, con la finalidad de validar el método. Los resultados del contenido de metales en quitina se enlistan en la Tabla 7. Como se puede observar, el Ca es metal predominante en la MP. En las muestras de quitina que sufrieron el tratamiento de desmineralización se tiene una reducción de Ca de aproximadamente 97 % con respecto a la MP. Además, este proceso elimina la mayor cantidad de Zn así como Na y K en las muestras de Qn Ex y Qn As. Al sagheer y col. (2009) así como Beaney y col. (2005), reportaron que el Ca fue el metal predominante seguido de Mg, K y Na en sus muestras desmineralizadas por procesos termoquímicos y biotecnológicos.

Tabla 7. Contenido de metales en la MP y las muestras de quitina

Muestra	Ca (g/Kg)	Na (g/Kg)	Mg (g/Kg)	K (g/Kg)	Zn g/Kg	Hg Ppm
MP	64.58±0.2	1.71±0.06	3.7±0.10	1.05±0.02	0.072±0.0	2.1±0.2
Qn As	1.36±0.08	0.22±0.02	0.12±0.02	0.05±0.00	0.007±0.0	3.46±0.1
Qn Ex S	1.32±0.05	13.14±0.2	2.14±0.02	0.27±0.01	0.22±0.02	2.79±0.2
Qn Ex	2.05±0.07	0.13±0.01	4.82±0.25	0.28±0.08	ND	2.73±0.1

ND. No detectado
± Desviación estándar

Grado de Acetilación

El grado de acetilación (GA) es el parámetro más importante para establecer la identidad química entre quitina y quitosano. La estimación del GA mediante FTIR se llevó a cabo utilizando las bandas de 1420 y 1310, empleadas en la metodología descrita por Brugnerotto y col. (2001). En la Figura 9 se muestran los espectros de absorbancia de luz infrarroja de las diferentes quitinas obtenidas. Como se puede apreciar en dicha figura las tres quitinas tienen el mismo patrón de FTIR. En la Tabla 8 se puede ver que el GA de la Qn Ex es más elevado que el de las otras quitinas. Además el proceso con ácido concentrado aparentemente no modificó el GA en la Qn Mi. Estos valores de GA se encuentran en el rango de los valores reportados por otros autores (Beaney y col., 2005; Pacheco y col., 2011 y Al sagheer y col., 2009) por lo que no hay diferencia marcada en el GA de las quitinas obtenidas por los distintos métodos.

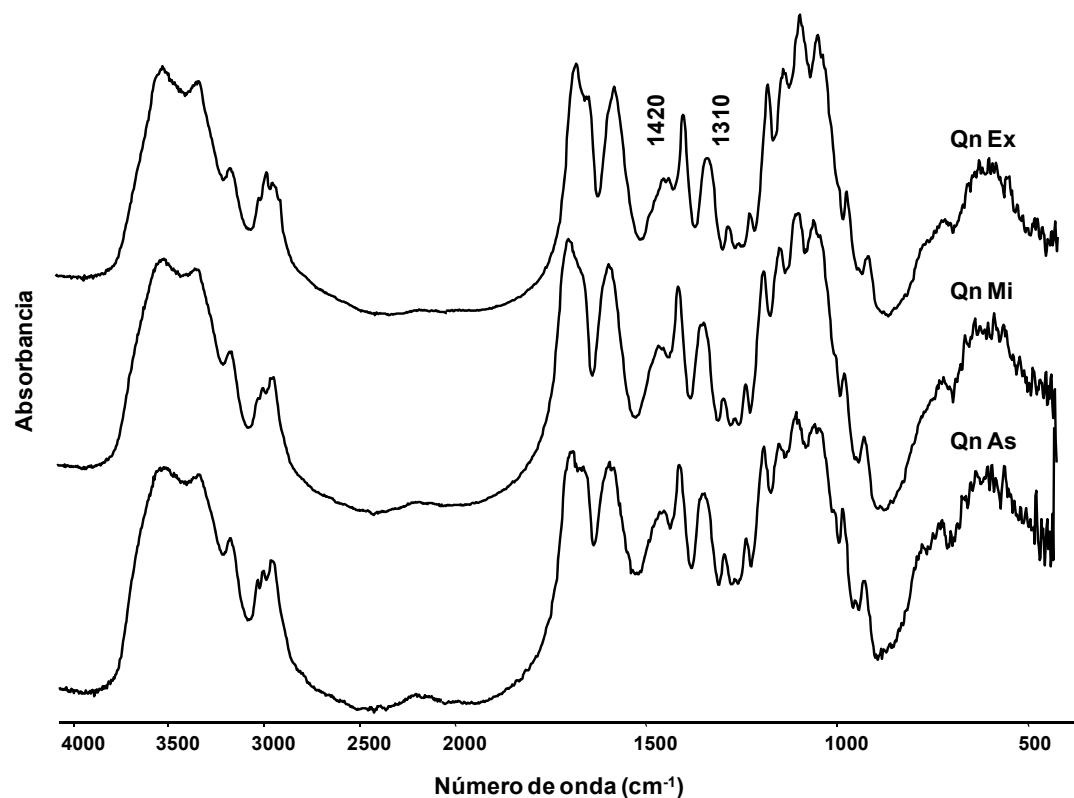


Figura 9. Espectros de FTIR de las distintas muestras de quitina

Tabla 8. Características fisicoquímicas de las quitinas obtenidas

Muestra	GA FTIR (%)	GA RMN ¹³ C CP/MAS (%)	[η] (mL/g)	M _v (gmol)	IC (%)
Qn Ex	90	99	498.6	2.74 × 10 ⁵	69.9
Qn As	70	98	1278.45	1.09 × 10 ⁶	85.7
Qn Mi	71	99	91.1	2.2 × 10 ⁴	69.8

Se determinó el GA de las distintas muestras de quitina mediante RMN de ^{13}C utilizando CP-MAS para las muestras en polvo. Como se puede apreciar en la Tabla 8, el GA determinado por este método observando que las muestras de quitinas están prácticamente acetiladas en su totalidad. En la Figura 10 se muestran los espectros de RMN de las distintas muestras de quitinas. Takai y col. (1988) así como Saito y col. (1981) asignaron los picos a los distintos carbonos presentes en la molécula de quitina y estos picos corresponden a las mismas ppm encontradas en las muestras de quitina que se analizaron.

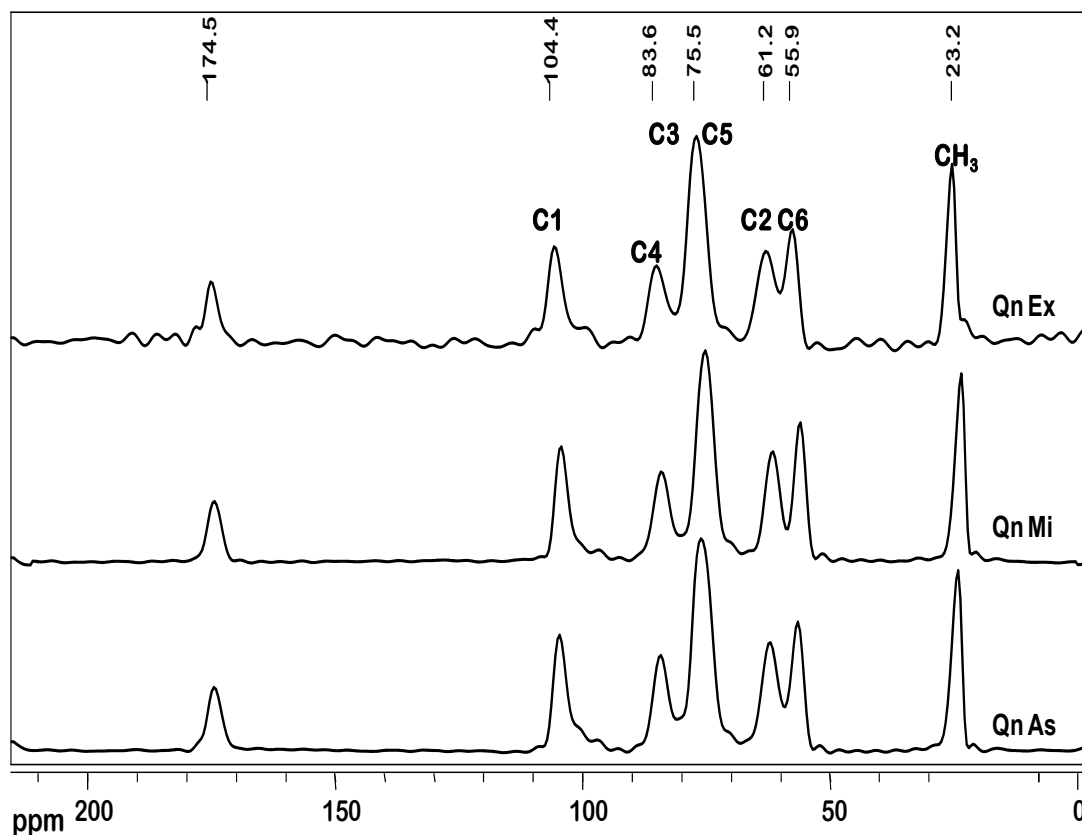


Figura 10. Espectros de RMN ^{13}C CP/MAS de las distintas muestras de quitina

Peso Molecular

El peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) se obtuvo calculando la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) de las quitinas en solución. Se obtuvieron los valores de la ecuación de Huggins, Kraemer y “punto único” que se graficaron con respecto a la concentración. El valor de $[\eta]$ se obtuvo extrapolando conjuntamente las gráficas al origen de la concentración, como se puede apreciar en la Figura 11. En la tabla 8 se puede observar los valores de $[\eta]$ y del M_v de las distintas muestras de quitinas. Estos valores, tanto de $[\eta]$ como de M_v , resultaron dentro del rango de valores calculados para distintas quitinas obtenidas por métodos termoquímicos (Einbu y col., 2004). Otras investigaciones encontraron un M_v similar al que se obtuvo para Qn As al analizar quitinas obtenidas de desechos de camarón en distintos meses del año (Rødde y col., 2008).

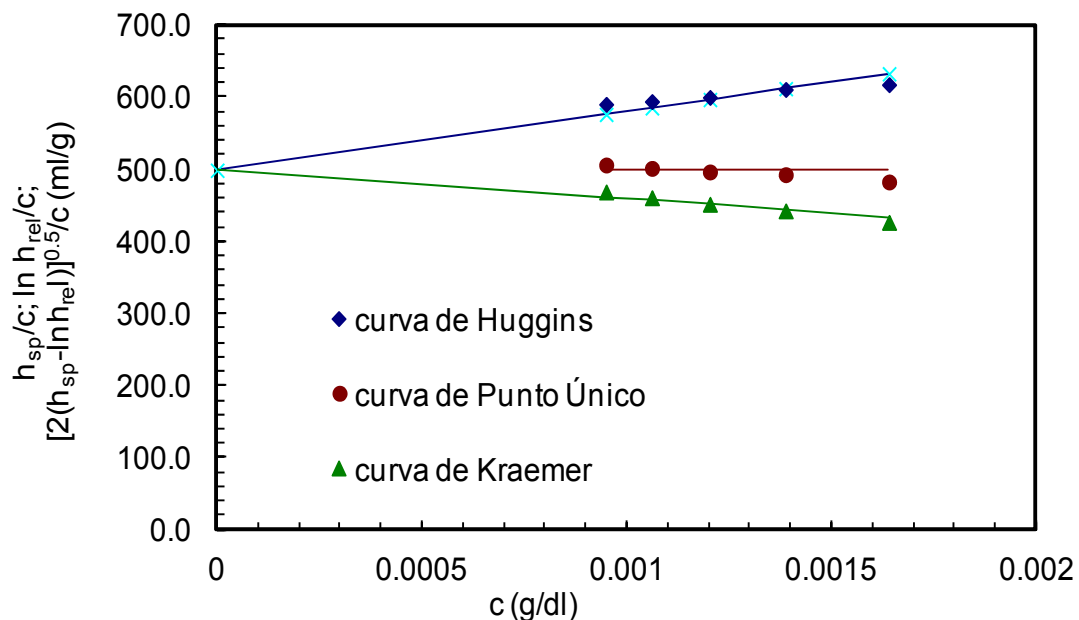


Figura 11. Gráfica de las ecuaciones Huggins, Kraemer y “punto único” correlacionadas para obtener la $[\eta]$

Cristalinidad

La determinación de cristalinidad es otro parámetro importante para la caracterización de la quitina. En la Figura 12 se muestran los difractogramas de rayos X obtenidos de las distintas muestras de quitina en polvo. Los difractogramas de las tres distintas quitinas son semejantes a los reportados en la literatura para α quitina, observándose señal a los 9, 19.2 y 26.3° 2θ , (Roberts, 1992). Como se puede apreciar, el patrón cristalino es prácticamente igual entre ellas indicando similar estructura cristalina. Esta estructura cristalina se repite aun cuando fueron obtenidas bajo condiciones diferentes. Se calculó el índice de cristalinidad (IC) de acuerdo a Zhang y col. (2005). En la Tabla 8 se puede observar los valores de IC de las distintas muestras de quitina obtenidas. El IC ha sido asociado con la reactividad de la quitina de manera que quitinas con IC altos suelen ser menos reactivas. En base a esto se pudiera esperar que el orden de reactividad de las quitinas obtenidas sería Qn As > Qn Mi \approx Qn Ex.

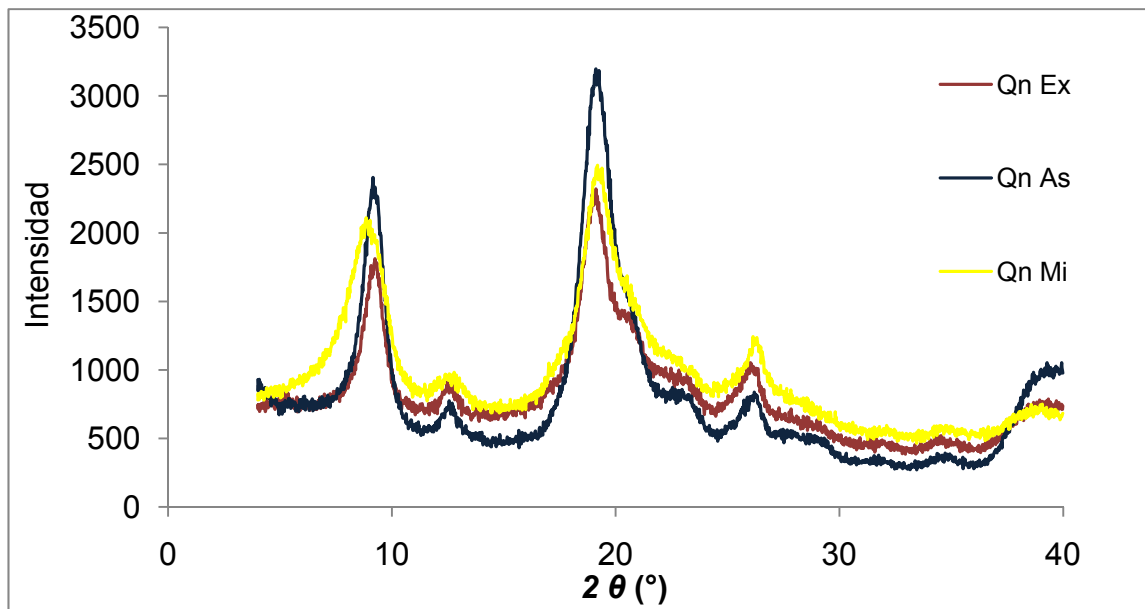


Figura 12. Diffractogramas de rayos X de las distintas muestras de quitina

Propiedades Funcionales

Solubilidad

Con el fin de observar la solubilidad de las distintas quitinas obtenidas se pusieron en contacto con diversos disolventes y se dejaron en agitación por 24 h, para posteriormente observar si se formó una solución. En la Tabla 9 se muestran los resultados. Como se puede apreciar, las tres quitinas son solubles en el sistema N,N-dimetilacetamida-LiCl (5 %) y en NaOH en frío. Tanto la Qn Ex como la Qn Mi formaron suspensiones coloidales en agua y HCl, lo cual puede ser debido al tamaño de partícula.

Tabla 9. Solubilidad de las muestras de quitina en distintos medios

Muestra	Solubilidad			
	agua	HCl	NaOH	DMAc/CILi
Qn As	-	-	+	+
Qn Ex	-*	-*	+	+
Qn Mi	-*	-*	+	+

*. Forma suspensiones coloidales

Capacidad de Absorción de Agua

La evaluación de la capacidad de absorción de agua (CAA) nos ayuda a caracterizar de forma más completa a la quitina, desde el punto de vista funcional. La estructura de la Qn Ex le permitió absorber agua en 7.98 veces su peso. En cambio, la Qn As fue la que absorbió más agua con 17.32 y la Qn Mi solo 10.39. Estas diferencias en la CAA se pueden deber al tipo y tamaño de partícula. Otra posible interferencia que pudiera afectar la CAA de la Qn Ex es la presencia de compuestos lipídicos.

Hidalgo y col. (2009) reportaron que quitinas obtenidas por métodos termoquímicos tienen una capacidad de absorción de agua de 20 %. Este comportamiento lo atribuyen a la presencia de Ca y proteínas remanentes en sus muestras. La absorción de agua en poliamidas depende de la cristalinidad del polímero y la naturaleza química de los sitios de unión. La quitina posee una estructura porosa con regiones amorfas y cristalinas, lo que facilita la absorción de agua en su superficie. Impurezas como elementos minerales (calcio) y proteínas pueden afectar la capacidad de absorción de agua en las quitinas, dependiendo de las fuentes y el proceso de obtención, lo que hace muy complejo el fenómeno (Fernández y col., 2004).

Capacidad de Absorción de Lípidos

También se determinó la capacidad de absorción de lípidos (CAL) a las distintas quitinas obtenidas. El comportamiento de la Qn Ex fue el de absorber más lípidos que agua, ya que su valor de CAL es mayor 2 puntos (9.98) que el de CAA. El efecto fue similar para la Qn As ya que también el CAL fue mayor en 2 unidades (20.49) que su CAA. En cambio, el comportamiento de la Qn Mi fue distinto ya que su CAL fue menor 3 unidades (7.48) con respecto a la CAA. Estudios previos muestran que la quitina es capaz de retener más lípidos incluyendo esteroides, alcoholes triterpénicos, campesterol, entre otros, que su derivado desacetilado el quitosano y otros derivados como el N-lauril-quitosano (Muzzarelli y col., 2000).

Reactividad

Desacetilación termoquímica. Una de las principales aplicaciones de la quitina en la industria es la elaboración de su derivado desacetilado llamado quitosano, por lo que la reacción de desacetilación es trascendental para obtener quitosanos de alta calidad. Para probar la reactividad de las distintas muestras de quitina se elaboró quitosano mediante una reacción heterogénea.

En la Figura 13 se puede observar la curva obtenida del grado de desacetilación determinado mediante FTIR contra los distintos tiempos de reacción.

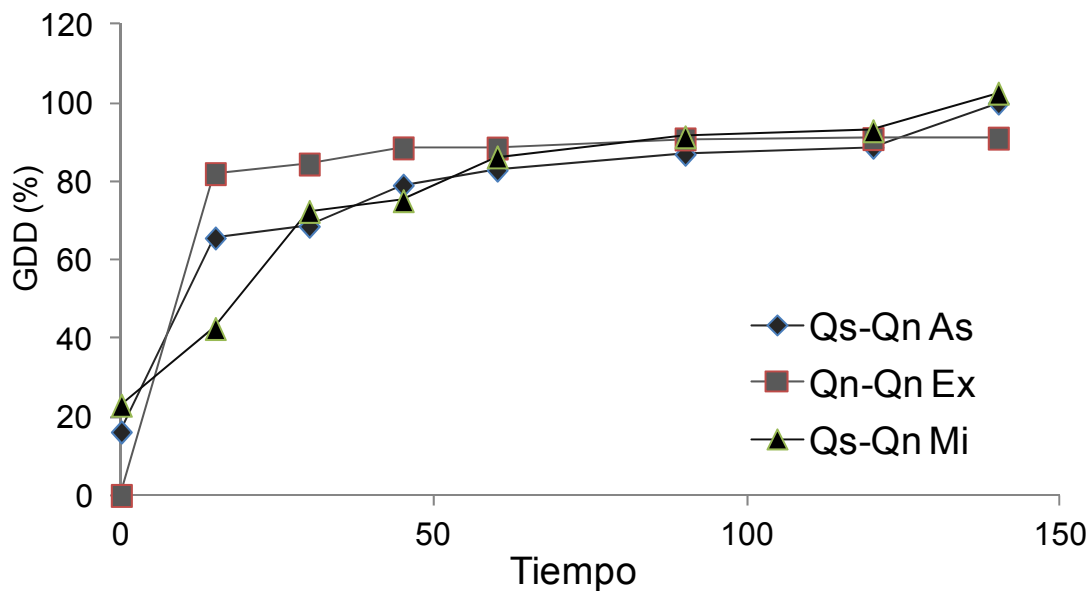


Figura 13. Curva de desacetilación termoquímica de las distintas quitinas obtenidas. Qs-Qn As: quitosano a partir de quitina aislada; Qs-Qn Ex: quitosano de quitina extraída y Qs-Qn Mi: quitosano de quitina microcristalina

La Qn Ex y la Qn As presentan un comportamiento similar en la curva de desacetilación termoquímica. Sin embargo, en los primeros 15 min la Qn Ex alcanza un GDD mayor que el de las otras quitinas. A partir de los 60 min las tres quitinas presentaron un comportamiento similar en la fase de estabilización de la reacción.

Se determinó el peso molecular viscosimétrico del quitosano obtenido a los 140 min de reacción, utilizando el método de Rinaudo y col. (1993). Los resultados se muestran en la Tabla 10, en donde se puede apreciar que la $[\eta]$ del quitosano de la Qn Ex es menor que la del quitosano de la Qn As. Lo mismo sucede con el M_v . Los resultados obtenidos para quitosano de Qn As son

similares a los reportados por Beaney y col. (2005) para quitosano obtenido a partir de quitina aislada por método termoquímico. Los espectros de FTIR que se obtuvieron para los quitosanos de las quitinas extraída y aislada son similares a los reportados en la literatura.

Tabla 10. Viscosidad intrínseca y peso molecular viscosimétrico de los quitosanos obtenidos de las distintas quitinas

Muestra	$[\eta]$ (mL/g)	M_v (gmol)
Qs-Qn Ex	400.20	7.8×10^4
Qs-Qn As	1713.81	53.4×10^5

Depolimerización enzimática con lisozima. En la naturaleza se llevan a cabo diversas reacciones enzimáticas para sobre matrices quitinosas. Sin embargo, no ha sido posible obtener reacciones enzimáticas eficientes a nivel laboratorio empleando quitina aislada como sustrato. Para estimar la reactividad con enzimas de las quitinas obtenidas, éstas se hicieron reaccionar con lisozima de huevo para observar el comportamiento de depolimerización. La reacción se monitoreó mediante la determinación analítica de los carbohidratos totales disueltos en el medio de reacción. Los resultados se muestran en la Figura 14, donde se graficó la concentración de carbohidratos contra el tiempo de reacción. Se puede observar que la Qn Ex es la más susceptible a la depolimerización, seguida de la Qn Mi. Sin embargo, el grado de depolimerización alcanzado es limitado aun para el caso de Qn Ex ya que sólo se logró reducir el 1.6 % de la masa inicial. Es notorio que la lisozima no tuvo efecto sobre la Qn As, ya que no se detectó la presencia de carbohidratos en el medio de reacción a ningún tiempo de reacción.

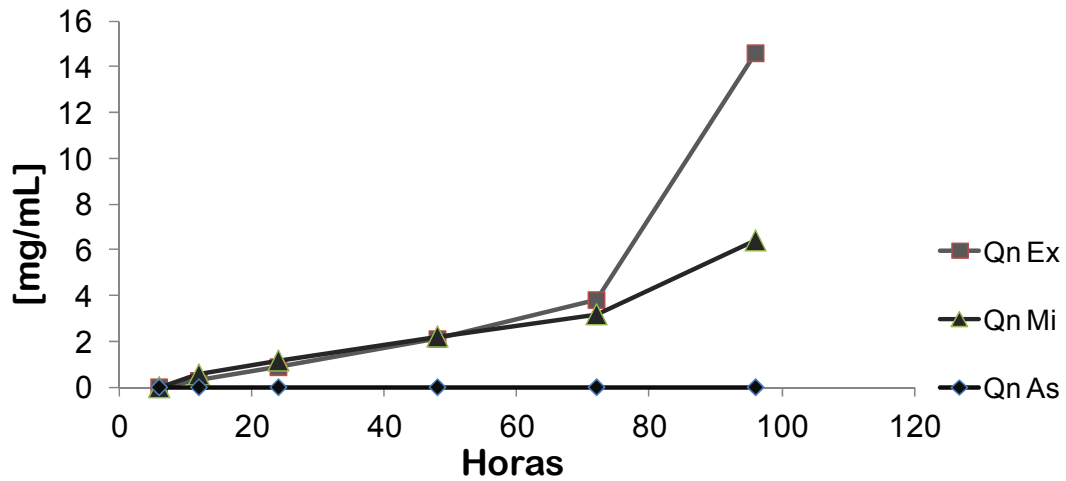


Figura 14. Curva de depolimerización enzimática con lisozima de huevo de las distintas quitinas obtenidas

Muzzarelli y col. (2000) analizaron la degradación enzimática de α y β quitina con lisozima. Encontraron que la β quitina es más susceptible a degradación enzimática que la α quitina. Otros autores coinciden que la enzima lisozima puede degradar quitina parcialmente desacetilada (Pangburn y col., 1982). Considerando lo anterior y los resultados obtenidos el grado de acción de la enzima lisozima depende de la cristalinidad de la quitina.

CONCLUSIONES

Se logró obtener una solución de quitina al disolver exoesqueleto de camarón en medio alcalino recuperando quitina extraída. Las características fisicoquímicas de la quitina extraída y de la quitina aislada resultaron similares entre ellas, pero el peso molecular promedio viscosimétrico de la quitina extraída es tres veces menor que el de la quitina aislada. La cristalinidad de la quitina extraída es menor que la de la quitina aislada pero es similar a la de la quitina microcristalina. Las propiedades funcionales de la quitina extraída también resultaron similares a la de quitina aislada. Sólo debe notarse que la quitina extraída alcanza un grado de desacetilación mayor en menor tiempo que las otras quitinas y resultó más susceptible a la depolimerización enzimática con lizosima.

REFERENCIAS

- Abdou E.S., Khaled S.A. Nagy, M.Z.E. 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99:1359-1367
- Abdullin V.F., Artemenko S.E., Ovchinnikova G.P., Arzamastsev O. S. 2008. Extraction processes in extraction of the biopolymer chitin from crab shells. *Fibre Chemistry*, 40: 513-516
- Adour L., Arbia W., Amrane A., Mameri N. 2008. Combined use of waste materials recovery of chitin from shrimp shells by lactic acid fermentation supplemented with date juice waste or glucose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83:1664-1669
- AL Sagheer F.A., AL Sughayer, M.A., Muslim, S. Elsabee, M.Z. 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabia Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77: 410-419
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, EUA
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15a. ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, EUA
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, EUA
- Battisti M.V. Campana-Filho S.P. 2008. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, 31:2014-2019
- Beaney P.D., Quan G., Thomas R.A.M., Healy M.I., Lizardi-Mendoza J. 2007. Modification of chitin properties for enzymatic deacetylation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82:165-173
- Beaney P., Lizardi-Mendoza J., Healy M. 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80:145-150
- Belandria Briseño J.C. Morillo de Montiel N.J. 2008 Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. *Revista Cubana de Química*, 20:17-25

- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F., Argüelles W., Desbrieres J., Rinaudo M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42:35-69.
- Chandy T., Chandra P.S. 1990. Chitosan as a Biomaterial. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 18:1-24
- Choorit W., Walailak P., Supranee M. 2008. Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. *Bioresource Technology*, 99: 6168-6173
- Díaz-Rojas E., Argüelles-Monal W, Higuera-Ciapara I, Hernández J., Lizardi-Mendoza J, Goycoolea F. 2006. Determination of Chitin and Protein contents During the Isolation of Chitin from Shrimp Waste. *Macromolecular. Bioscience*, 6:340-347
- Díaz S. L. 2007. Nuevo método para la obtención de quitina. *Ciencia y Tecnología*, 25:35-41
- Duarte M.L., Ferreira M.C., Marvão M.R., Rocha J., 2001, Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28: 359-363.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356
- Einbu A., Stine N.N., Arnljot E., Kjell M.V. 2004. Solution Properties of Chitin in Alkali. *Biomacromolecules*, 5:2048-2054
- Escorcía D., Hernández D. Sánchez M, Benavente M. 2009. Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas. *Nexo*, 22: 45-55
- Fang, F., Yu L., K. Hu. 2004. Influence of alkali-freezing treatment on the solid state structure of chitin. *Carbohydrate Research*, 339:2321-2324.
- Fernández Cervera M., Heinaämäki J., Räsänen, M., Maunu S.L., Karjalainen M., Nieto Acosta O.M., Iraizoz Colarte A., Yliruusi J. 2004. Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers*, 58:401-408
- Flores R., Barrera-Rodríguez S., Shirai K., Durán-de-Bazúa C. 2007. Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry. *Journal of Applied Polymer Science*, 104:3909-3916

- Galed C. G. 2005. Biopolímeros quitina/quitosano: optimización de los procesos de obtención y caracterización funcional. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Químicas del Departamento de Bioquímica y biología molecular, Universidad Complutense de Madrid
- García O. K. 1997. Caracterización fisicoquímica y estructural de quitina y quitosano obtenidos a partir de cáscara de camarón (*Penaeus* spp). Tesis de licenciatura del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora
- Hidalgo C., Fernández M., Nieto O.M., Paneque A.A., Fernández G., Llópiz J.C. 2009. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10:11-27
- Higuera-Ciapara I., Toledo A.R., Goycoolea F. 2007. Tendencias en propiedad intelectual y orientación de mercado para la quitina y quitosano. IV simposio Iberoamericano de Quitina, P-07.
- INEGI. 2010. El sector alimentario en México 2010, CONAPESCA. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca)
- Jara-Marini M.E., Soto-Jiménez M.F., Páez-Osuna F. 2009. Trophic relationships and transference of cadmium, copper, lead and zinc in a subtropical coastal lagoon food web from SE Gulf of California. *Chemosphere*, 77:1366-1373.
- Khanafari A., Marandi R., Sanatei Sh. 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by Chemical and microbial methods. *Iranian Journal Environmental Health Science & Engineering.*, 5:19-
- Kurita K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8:203-226
- Kurita K. 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26:1921-1971
- Kurita K., Kaji Y., Mori T., Nishiyama Y. 2000. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 42: 19-21
- Lavall R. L., Assis O.B.G., Campana-Filho S. P. 2007. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresource Technology*, 98:2465–2472

- Lizardi-Mendoza J. 2007. Structured porous materials of chitin and chitosan. Tesis doctoral de Facultad de Ingeniería y Ciencias Físicas de la Universidad de Queen's de Belfast
- Lizardi-Mendoza J. 1998. Implementación de tecnologías alternativas para la obtención de polisacáridos funcionales a partir de biodesechos pesqueros quitinosos. Tesis de Maestría del Departamento de Tecnología de Origen animal en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C
- Mahmoud N.S., Ghaly A.E., Arab F. 2007. Unconventional Approach for Demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitin Production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3:1-9.
- Manni L., Ghorbel-Bellaaj O., Jellouli K., Younes I., Nasri M. 2010. Extraction and Characterization of Chitin, Chitosan, and Protein Hydrolysates Prepared from Shrimp Waste by Treatment with Crude Protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:345-357
- Muzzarelli R.A.A., Frega N., Miliani M., Muzzarelli C., Cartolari M. 2000. Interactions of chitin, chitosan, N-lauryl chitosan and N-dimethylaminopropyl chitosan with olive oil. *Carbohydrate Polymers*, 43:263-268
- Muzzarelli R.A. 1997. Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysosyme, papain and lipase. *Chitin Handbook*, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds European Chitin Society
- Ozhan A., Elibol M. 2010. Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33: 393-399
- Pacheco N., Garnica-Gonzalez M, Gimeno M., Bárzana E, Trombotto S., Laurent D., Shirai K. 2011. Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, 12:3285-3289
- Pacheco N., Garnica-González M., Ramírez-Hernández J. Y., Flores-Albino B. Gimeno M., Bárzana E., Shirai K. 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100:2849-2854
- Pastor A. 2004. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones, CYTED Pontificia Univ. Católica del Perú/Fondo editorial Lima Perú.
- Paul W., Sharma C.P. 2000. Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. *STP. Pharma Science*; 10: 5-22.

- Peniche C., Argüelles-Monal W. Goycoolea F. M. 2008. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. In: "Monomers, Oligomers, Polymers and Composites from Renewable Resources". Belgman M.N. & A. Gandini eds. Elsevier. B.V. Ámsterdam. Pp. 517-542
- Peniche C. 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Tesis doctoral, Universidad de la Habana, La Habana Cuba
- Pinelli A., Toledo A.R., Esquerria R., Luviano A.R., Higuera-Ciapara I. 1998. Métodos de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 48:58-61
- Poirier M., Charlet G. 2002. Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. Carbohydrate Polymer, 50: 363-70
- Raabe D., Sachs C., Romano P. 2005. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. Acta Materialia, 53:4281-4292
- Rao Mukku S., Kyaw A.N., Trang S. T., Willem F.S. 2007. Optimum Parameters for Production of Chitin and Chitosan from Squilla (*S. empusa*). Journal of Applied Polymer Science, 103:3694-3700
- Rinaudo M., Milas M., Ledung P. 1993. Characterization of chitosan influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. International Journal of Biological Macromolecules, 15:281-285
- Roberts A.G. 1992. Chitin Chemistry. The Macmillan Press LTD, Hong Kong, pp 8-9.
- Rødde R.H., Einbu A., Kjell M.V. 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). Carbohydrate Polymers, 71:388-393
- Rudrapatnam N.T., Farooqahmed S.K. 2003. Chitin: The Undisputed Biomolecule of Great Potential. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43:61-87
- Saito H., Tabeta R., Hirano S. 1981. Conformation of chitin and N-acyl chitosans in solid state as revealed by ¹³C cross polarization/Magic Angle Spinning (CP/MAS) NMR Spectroscopy. Chemistry Letters, 10:1479-1482
- Sajomsang W., Gonil P. 2010. Preparation and characterization of α-chitin from cicada sloughs. Materials Science and Engineering, 30:357-363

- Sannan T., Kurita K. Iwakura Y. 1975. Solubility change by alkaline treatment and film casting, *Die. Macromoleculare Chemic*, 176:1991-1995
- Schulz P.C., Rodriguez M.S., Blanco L., Pistoneci M., Angulo E.1998. Emulsification properties of chitosan. *Colloid & Polymer Science*, 276:1179
- Shigemasaa Y., Usuia,H. Morimotoa M., Saimotoa H., Okamoto Y., Minamib S., Sashiwaa H. 1999. Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/*N,N*-dimethylacetamide. *Carbohydrate Polymers*, 39:237-243
- Sorokulova I., Krumnow A., Globa L., Vodyanoy V. 2009. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of Industry Microbiology Biotechnology*, 36:1123-1126
- Sunita D., Ganesh A. 2010. Extraction of Chitin from Trash Crabs (*Podophthalmus vigil*) by an Eccentric Method. *Current Research Journal of Biological Siences*, 52:72-75
- Takai M., Shimizu Y., Hayashi J. 1988. NMR and X-ray studies of chitin and chitosan in solid state. *Chitin and Chitosan*, pp.431–436
- Tonelli A. E. 1993. High resolution solid-state NMR studies of polymer chemical and physical structures, En: Ibbert, R. N. (Ed.) *NMR spectroscopy of polymers* p. 161. Blackie A & P, Chapman & Hall, Glasgow, UK
- Várum K.M., Anthonsen M.W., Grasdalen H., Smidsrod K. 1991. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetyled chitins (chitosans) by high-field NRM spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 217:19-23
- Vázquez-Ortiz, F.A.; Caire, G.; Higuera-Ciapara, I. Hernández, G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*, 18:2059-2068
- Wegst U. G. K. 2004. The mechanical efficiency of natural materials. *Philosophical Magazine*, 84:2167-2181
- Williams D.F. 2002. Chitin: fulfilling a biomaterials promise: E. Khor; Elsevier, Amsterdam. *Biomaterials*, 23:3914
- Word guide Chitin and Chitosan Market Worldwide: Annual Production Estimates for 2000-2010. Pub.Time: (2003/2005). Global Industry Analyst, Inc.

- Xie W., Xu P., Liu Q. 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11:1699-701
- Zhang Y., Changhu X., Yong X., Ruichang G., Zhang X. 2005. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340:1914-1917
- Zou Y., Khor E. 2005. Preparation of C-6 Substituted Chitin Derivatives under Homogeneous Conditions. *Biomacromolecules*, 6:80-87