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

PRODUCCIÓN DE LACTATO DE CALCIO DURANTE LA DESMINERALIZACIÓN DE EXOESQUELETO DE JAIBA Y SU EFECTO SOBRE LA QUITINA AISLADA

POR:

NEYDELI ADRIANA AYALA MENDIVIL

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora. Noviembre 2012

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis de Neydeli Adriana Ayala Mendivil, 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

Dra. Elizabeth Carvajal Millán
Asesor

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Asesor

Dr. Waldo M. Argüelles Monal
Asesor

Dra. Yolanda Leticia López Franco
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). 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 General del CIAD.

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

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por otorgarme la beca económica que me permitió cursar la maestría durante estos dos años.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., por permitiré alcanzar un grado más en mi formación académica.

Al Proyecto FOMIX-Sonora clave No. 80891 por el financiamiento de este trabajo.

Al Dr. Jaime Lizardi Mendoza director de tesis, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por compartirme sus conocimientos, por su persistencia, paciencia y motivación.

Al comité de tesis Dra. Elizabeth Carvajal Millán, Dra. Maribel Plascencia Jatomea, Dr. Waldo M. Argüelles Monal y Dra. Yolanda Leticia López Franco, por su apoyo y aportación en la realización de este trabajo.

A M.C. Karla Guadalupe Martinez Robison, M.C. Alma Rosa Toledo Guillén y Q.B. Alma Consuelo Campa Mada por su apoyo técnico y amistad.

A Ana Luisa Martinez, Jorge Marquez y Joana Gil por su apoyo y ayuda en la realización de este proyecto, por su amistad y comprensión, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas ¡Gracias amigos!

A Cesar Castañeda, gracias por tu apoyo, cariño, paciencia y tolerancia en momentos difíciles.

A mis hermanos y a mis padres, por el apoyo que siempre me han brindado para que pueda seguir adelante.

¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de mi estudio.

A mis hermanos Amanda Ayala Mendivil, Angeles Aline Ayala Mendivil y Ramón Ángel Ayala Mendivil, por el ánimo, apoyo y alegría que me brindan, me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mis padres, Ramón Ángel Ayala García y Adriana Mendivil Gastelum, quienes me dieron la vida, quienes sin esperar nada lo dieron todo. A quienes rieron conmigo en mis triunfos y lloraron también en mis fracasos. A quienes me guiaron por un camino de rectitud y me enseñaron también que es lo mejor.

ÍNDICE

APROBACIÓN ii

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL iii

AGRADECIMIENTOS iv

DEDICATORIA v

ÍNDICE vi

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE TABLAS xi

RESUMEN xii

ABSTRACT xiv

INTRODUCCIÓN 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

- Exoesqueleto de Jaiba 4
- Quitina 6
  - Características fisicoquímicas 7
  - Aplicaciones 10
- Procesos de Obtención de Quitina 11
  - Desproteinización 11
  - Desmineralización 12
- Lactato de Calcio 14

MATERIALES Y MÉTODOS 17
Materia Prima 17
Esquema Experimental 17
Desmineralización con Ácido Láctico 18
Optimización 18
Análisis estadístico 22
Proceso de Recuperación del Lactato de Calcio 22
Desmineralización con Ácido Clorhídrico 23
Desproteinización 23
Identificación y Caracterización Fisicoquímica de los Productos 23
Identificación por espectroscopia de infrarrojo 23
Análisis proximal 24
Caracterización fisicoquímica de la quitina 26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27
Optimización de la Desmineralización 27
Recuperación del Lactato de Calcio 35
Identificación y caracterización del lactato de calcio 36
Determinación de calcio 38
Identificación y Caracterización de la Quitina 38
Identificación química por FTIR 39
Grado de acetilación 39
Peso molecular 40
Análisis proximal 41
CONCLUSIONES 42

PERSPECTIVAS 43

REFERENCIAS 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales niveles estructurales y elementos de la microestructura del exoesqueleto de jaiba. 5

Figura 2. Estructura química de la quitina. 7

Figura 3. Orientación de las cadenas de las configuraciones polimórficas de quitina. 8

Figura 4. Representación esquemática de las etapas de adhesión (I) y descalcificación (II), durante la desmineralización. 13

Figura 5. Estructura química del lactato de calcio 15

Figura 6. Proceso de aislamiento de quitinas y producción de lactato de calcio. 18

Figura 7. Efecto de la concentración de ácido láctico (%) y la relación sólido a líquido (g:mL) sobre el porcentaje de desmineralización del exoesqueleto de jaiba a 3 diferentes tiempos de reacción: (A) 1 h, (B) 2 h y (C) 3 h. 31

Figura 8. Efecto de la concentración de ácido láctico y tiempo de reacción sobre el porcentaje de desmineralización. (A) Relación sólido a líquido de 1:20, (B) Relación sólido a líquido de 1:25 y (C) Relación sólido a líquido de 1:30. .. 32

Figura 9. Efecto del tiempo de reacción y la relación sólido a líquido sobre el porcentaje de desmineralización. (A) Concentración de 8 %, (B) Concentración de 10 % y (C) Concentración de 12 %. 33

Figura 10. Proceso de recuperación del lactato de calcio contenido en el sobrenadante de la desmineralización. 36

Figura 11. Espectro de infrarrojo del lactato de calcio deshidratado obtenido.(A) Lactato de calcio comercial marca Sigma Aldrich. (B) Lactato de calcio producido. 37

Figura 12. Espectros de infrarrojo de las distintas muestras de quitina. (A) Quitina-C y (B) Quitina-L. 40

Figura 13. Esquema general del proceso de producción de lactato de calcio durante el aislamiento de quitina. 43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Influencia del grado de acetilación y el peso molecular de la quitina y su derivado el quitosano sobre sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. 9

Tabla 2. Variables y niveles del DCCR usadas en la desmineralización de exoesqueleto de jaiba con ácido láctico. 20

Tabla 3. Variables independientes codificadas y no codificadas del DCCR y resultados experimentales del porcentaje de desmineralización del exoesqueleto de jaiba. 21

Tabla 4. Diseño de experimentos y porcentaje de desmineralización. Los valores de porcentaje de desmineralización son el promedio de tres mediciones. 28

Tabla 5. Coeficientes del modelo de predicción del porcentaje de desmineralización. 29

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático de superficie de respuesta de la desmineralización. 30

Tabla 7. Grado de acetilación y peso molecular viscosimétrico de las quitinas obtenidas. 41

Tabla 8. Composición química del exoesqueleto de jaiba y productos. 41

RESUMEN

En la industria pesquera durante el procesamiento de la jaiba se generan grandes cantidades de residuos. Estos residuos, que oscilan entre el 50 y 70 % del total de la pesca, estos han sido utilizados como una fuente de quitina, proteína y pigmentos, pero no de minerales a pesar de ser este el componente mayoritario. Los procesos de obtención de quitina incluyen una etapa de desmineralización del caparazón de jaiba lo que generalmente se realiza mediante tratamiento con ácido. El uso de ácidos orgánicos en la etapa de desmineralización permite producir sales orgánicas que podrían ser utilizadas en la industria alimentaria. El objetivo de este trabajo fue utilizar ácido láctico para la desmineralización de exoesqueleto de jaiba y producir lactato de calcio, además ver el efecto de esta desmineralización sobre la quitina aislada. La etapa de desmineralización fue optimizada mediante la metodología de superficie de respuesta para tres factores (concentración de ácido láctico, tiempo de reacción y relación sólido a líquido), la variable de respuesta fue el porcentaje de desmineralización. El análisis de varianza mostró que el modelo fue significativo (p=0.000) mientras que la falta de ajuste no lo fue (p=0.069). El coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.9421. Las condiciones óptimas de desmineralización encontradas fueron: una concentración de 7% de ácido láctico, un tiempo de reacción de 3.5 h y una relación de sólido a líquido de 1:33 g:mL. Empleando estos datos como condiciones experimentales se obtuvo un porcentaje de desmineralización de 99.3, comparable con lo obtenido por el método convencional. Se estandarizó la recuperación del lactato de calcio contenido en el sobrenadante de la desmineralización con un rendimiento promedio de 75% (p/p), este fue identificado por Espectroscopia de Infrarrojo

con Transformada de Fourier. En la caracterización fisicoquímica de quitinas, se encontró la quitina obtenido por el método convencional contenía una pequeña cantidad de impurezas, con un 98,85% de quitina en su composición. La quitina obtenida por el método propuesto resultó con 90,89% de quitina; esta contenía proteínas y lípidos. No se encontraron diferencias en el grado de acetilación, pero en el peso molecular de la quitina obtenida por el método propuesto era ligeramente más pequeño que la quitina obtenida por el método convencional.

Palabras clave: quitina, desmineralización, ácido láctico, lactato de calcio.

ABSTRACT

Processing of crab generates considerable quantities of solid waste. The fraction regarded as waste is approximately 50% (wet weight) of the processed biomass. This offal has been used as source of protein, pigments and chitin; however its main constituent, the mineral salts, are not usually recovered. Most conventional processes for chitin isolation involves the use of strong acids for the demineralization (DM) step, commonly hydrochloric acid. Using organic acids particularly lactic acid for DM the recovery of the resulting mineral compounds is feasible. In this work, the lactic acid was used to demineralize the crab shells (CS) in order to produce calcium lactate, which can be used as an additive in food. Demineralization conditions were optimized using response surface methodology, considering reaction time, lactic acid concentration and solid to liquid ratio as main factors. At the end of the treatment calcium lactate was recovered from the reaction liquid. Conventional DM method was also performed as reference. The correlation coefficient R^2 (0.9421) and the optimal levels of the three independent variables for maximum DM were: a lactic acid concentration of 7.17 %, reaction time of 3.5 h and 1:33 solid to liquid ratio. Demineralization of milled dry CS at such conditions results in a 99.3% of DM. Was possible to obtain yield of over 75% (dry weight) of calcium lactate from the DM of CS, this product was identified by FTIR. In the physicochemical characterization of chitins, the chitin obtained by conventional method was found to have low impurities content and 98.85 % of chitin. The chitin obtained by proposed method had 90.89% of chitin; it retained a proteins and lipids. No differences were found on the acetylation degree, but in the molecular weight of

the chitin obtained by proposed method was slightly smaller than the chitin obtained by conventional method.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la industria pesquera genera una gran cantidad de residuos orgánicos derivados del procesamiento y la comercialización de diversos productos alimenticios de origen marino. Estos residuos al ser desechados, representan un problema ambiental. Una porción importante de estos productos alimenticios son derivados de crustáceos como langosta, camarón y jaiba. Los desechos orgánicos generados durante su procesamiento están compuestos principalmente por su exoesqueleto (Kim y Mendis, 2006). En el caso de la jaiba el porcentaje considerado de residuo representa casi un 50 % de la producción (base húmeda).

México es el principal productor de jaiba en Iberoamérica, en el año 2010 se produjeron alrededor de 23 mil toneladas y su producción ha mantenido una tasa de crecimiento promedio anual superior al 2 % durante los últimos 10 años. Cabe resaltar que solo cuatro estados de la república, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Veracruz, aportan el 80 % de esta producción, y por lo tanto es en estos estados donde se generan mayor cantidad de residuos (CONAPESCA, 2010).

Debido a su composición y biodisponibilidad, estos residuos pueden ser aprovechados como materia prima para la obtención de productos químicos de alto valor agregado (Pastor de Abram et al., 2004). El exoesqueleto de jaiba está compuesto principalmente por quitina, proteínas, sales minerales y pigmentos. La quitina es el componente de mayor interés debido a las características fisicoquímicas y propiedades funcionales que posee, las cuales son la base para una gran cantidad de aplicaciones propuestas en campos muy diversos (Rinaudo, 2006).

Existen numerosos estudios sobre métodos para el aislamiento de la quitina y la recuperación de otros componentes de los desechos de crustáceos. Por lo general, la mayoría de los métodos consisten en dos etapas: la remoción de sales minerales llamada desmineralización y la separación de la proteína o desproteinización. Una tercer etapa opcional es la decoloración, que consiste en la degradación o extracción de los pigmentos presentes (Aranaz et al., 2009).

Los métodos más utilizados para la producción de quitina son los termoquímicos. Estos involucran el uso de ácidos inorgánicos para la desmineralización y soluciones alcalinas concentradas para la desproteinización. Este tipo de métodos son preferidos a nivel industrial debido a su eficiencia y rendimiento. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentra que estos métodos dificultan la recuperación de otros subproductos y además generan efluentes corrosivos contaminantes (Das y Ganesh, 2010). Debido a esto, se han desarrollado métodos alternativos para el aislamiento de quitina y aprovechamiento de otros componentes. Métodos biotecnológicos, como tratamientos enzimáticos y fermentación microbiológica, han sido reportados por numerosos estudios (Wang et al., 2011; Oh et al., 2008; Cira et al., 2002). En general se ha encontrado que mediante los métodos biotecnológicos es posible desmineralizar y desproteinizar los residuos de crustáceos sin generar efluentes corrosivos. Así mismo, estos métodos facilitan la recuperación de otros componentes como la proteína y pigmentos carotenoides; sin embargo, no resultan tan eficientes para la recuperación de quitina comparados con los métodos termoquímicos convencionales.

Existen reportes en la literatura sobre el aprovechamiento de la fracción proteica y pigmentos de los residuos de crustáceos durante el proceso de aislamiento de quitina (Brük et al., 2011). Sin embargo, pocos estudios incluyen la recuperación de los minerales, principalmente sales de calcio, a pesar de ser el componente mayoritario en la mayoría de los casos, como en el exoesqueleto de jaiba.

La utilización de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o acético, ha sido estudiada en métodos para la obtención de quitina. Durante la desmineralización del exoesqueleto, el ácido orgánico utilizado disuelve las sales de calcio presentes en la matriz quitinosa. Durante este proceso se da la formación de una sal compuesta por el ácido orgánico y el calcio presente; por ejemplo, en el caso del tratamiento con ácido de láctico se produce lactato de calcio (Lee y Kim, 2003).

La producción de lactato de calcio durante la etapa de desmineralización con ácido láctico en el proceso de aislamiento de quitina del exoesqueleto de jaiba, podría dar un valor agregado al proceso. A diferencia de otras sales de calcio, el lactato de calcio puede recuperarse eficientemente del efluente de la desmineralización. El lactato de calcio es comúnmente utilizado en diversas industrias. Se utiliza como aditivo y fortificante en alimentos, así como excipiente en farmacéutica (Lee y Kim, 2003; Gao et al., 2009)

Con base en lo antes mencionado, se considera que la producción de lactato de calcio podría ser incorporada al proceso de obtención de quitina sin afectar las características fisicoquímicas de la misma. El objetivo del presente trabajo fue producir lactato de calcio durante la desmineralización del exoesqueleto de jaiba con ácido láctico y evaluar el efecto sobre la quitina obtenida. Para esto se requiere: a) establecer los parámetros de operación óptimos para una desmineralización eficiente del exoesqueleto de jaiba utilizando ácido láctico; b) estandarizar un proceso recuperación y purificación del lactato de calcio contenido en el efluente de la desmineralización y c) producir quitina por el método convencional para comparar las características fisicoquímicas de la quitina obtenida por el método propuesto.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Exoesqueleto de Jaiba

México es el principal productor de jaiba en Iberoamérica, tan solo en el 2010 se produjeron 22,817 toneladas. Esta producción se ha mantenido con una tasa de crecimiento anual promedio de 2.1% del año 2000 al 2010, siendo los estados de Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Veracruz, son los que más aportan a esta producción (CONAPESCA, 2010). Durante el procesamiento de la jaiba, más del 48% (base húmeda) del volumen es considerado residuo (Pastor de Abram et al., 2004). Estos residuos se componen principalmente por el exoesqueleto del crustáceo y son de naturaleza perecedera, por lo que consecuentemente tienen un efecto contaminante. En el mar pueden ocasionar problemas de eutroficación y su acumulación en tierra favorece el crecimiento de algunos microrganismos patógenos que pueden generar problemas de salud pública (O'Keefe et al., 1996; Islam et al., 2004).

Debido a su composición química estos residuos pueden ser aprovechados para obtener diversos productos (Beaulieu et al., 2009). El exoesqueleto de jaiba está compuesto principalmente por quitina, proteína y sales minerales, así como otros componentes presentes en menor cantidad como pigmentos y lípidos (Brük et al., 2011). Los componentes principales se encuentran altamente organizados en distintos niveles como se puede apreciar en la Figura 1 (Yen et al., 2009). En el primer nivel se encuentran las moléculas de quitina organizadas de forma antiparalela formando estructuras microcristalinas. En el segundo nivel, las moléculas de quitina se encuentran formando fibras con 18 a 25 moléculas de ancho envueltas en proteína. El

tercer nivel de organización consiste en la agrupación de estas fibras en capas sucesivas con distinta orientación que dan lugar a la cutícula, la cual consiste en dos estructuras llamadas epicutícula y endocutícula (Figura 1). La epicutícula no contiene quitina y está compuesta por lipoproteínas y material calcáreo que le imprime dureza y resistencia. En la endocutícula, las moléculas de quitina se encuentran organizadas en tres secciones sucesivas: la capa pigmentada con depósitos granulares de pigmentos tipo melaninas y está fuertemente calcificada; la denominada capa calcificada; y la capa descalcificada constituida por asociaciones de fibras de quitina y proteína. Por lo general, el espacio entre las fibras se encuentra relleno con proteínas y formaciones minerales, en su mayoría de carbonato de calcio de tamaño micro y nanoscópico (Raabe et al., 2005; Ehrlich et al., 2009).

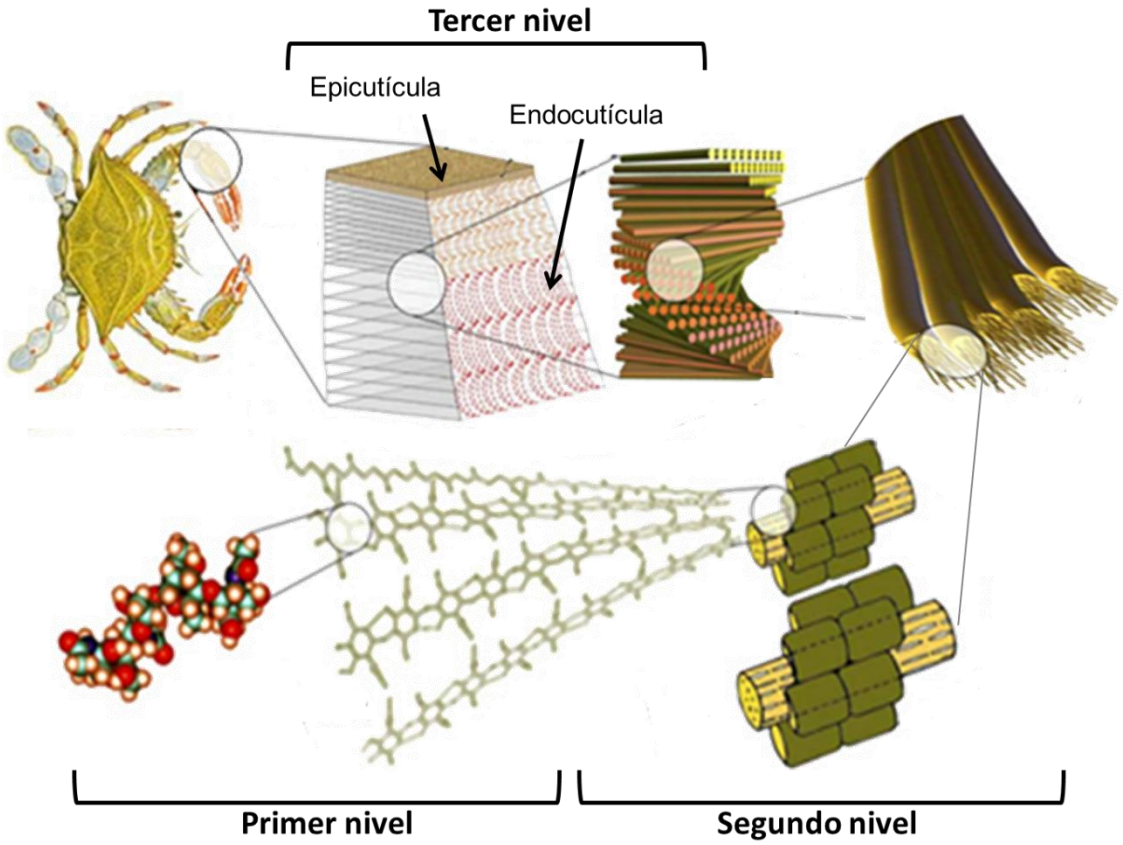

Figura 1. Principales niveles estructurales y elementos de la microestructura del exoesqueleto de jaiba.

En la cutícula de crustáceos, la quitina se encuentra formando diversos complejos con proteínas, pigmentos y sales inorgánicas. Pastor de Abram et al. (2004) hicieron una recopilación de artículos que reportan diferentes tipos de interacción entre quitina y proteína. Entre estos están: la formación de un grupo amida entre el grupo amino no acetilado de la quitina y un grupo carboxílico de la cadena proteica; la formación de bases de Schiff; la formación de enlaces de N-glucosídicos y O-glucosídicos involucrando asparagina y serina, respectivamente; también la existencia de un enlace a través del grupo carboxílico de ácido N-acetilmurámico con el grupo amino de un residuo terminal de alanina. Por otra parte, se considera que la interacción entre la quitina y las sales de calcio es una de las principales causas de la dureza del exoesqueleto de crustáceos; sin embargo, no se ha profundizado sobre la naturaleza de la interacción entre estos compuestos.

En general, el exoesqueleto de jaiba esta compuesto por 30-40% de proteína, 30-50% de material inorgánico y 15-30% de quitina (Youn et al., 2009; Brük et al., 2011). La proporción de los componentes principales del exoesqueleto de jaiba varía en rangos muy amplios en función de factores bióticos (especie, género, etapa de desarrollo y su condición fisiológica) y abióticos (clima y época del año). Una característica distintiva del exoesqueleto de jaiba es el alto contenido de materia mineral. Sin embargo, es la quitina el componente de mayor interés debido a que ha sido identificado como un polisacárido biológicamente activo y por lo tanto valioso para numerosas aplicaciones (Isogawa et al., 2009).

Quitina

La quitina es un polisacárido estructural ampliamente distribuido en la naturaleza, particularmente en el exoesqueleto de artrópodos, en moluscos, así como en la pared celular de algunos hongos y otros microrganismos (Brük et al., 2011). Se considera como la segunda biomolécula más abundante después

de la celulosa; sin embargo la quitina presenta una tasa de regeneración en la biosfera de casi el doble que la de la celulosa (Pastor de Abram et al., 2004). A nivel industrial, la quitina se obtiene del exoesqueleto de crustáceos y es comúnmente utilizada para la producción de su derivado quitosano.

Características fisicoquímicas

La quitina es un polisacárido lineal compuesto de unidades de N-acetil-D-glucosamina (>50%) y D-glucosamina (<50%) unidos por enlaces glucosídicos β (1→4) (Figura 2). Su peso molecular puede alcanzar el rango de 10^6 g/mol. Dependiendo de la orientación de las cadenas de quitina y su ocurrencia en la naturaleza, esta presenta diferentes estructuras microcristalinas clasificadas como α, β y ɣ (Figura 3) (Yen et al., 2009). Las características y parámetros estructurales de los distintos polimorfos de quitina han sido demostrados por estudios de difracción de rayos X y de electrones (Rinaudo 2006). La quitina α es la más abundante y es por esto la obtenida a nivel industrial, ya que es la que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos. La quitina β puede ser extraía de pluma de calamar y la quitina ɣ de hongos y levaduras (Kumirska et al., 2011).

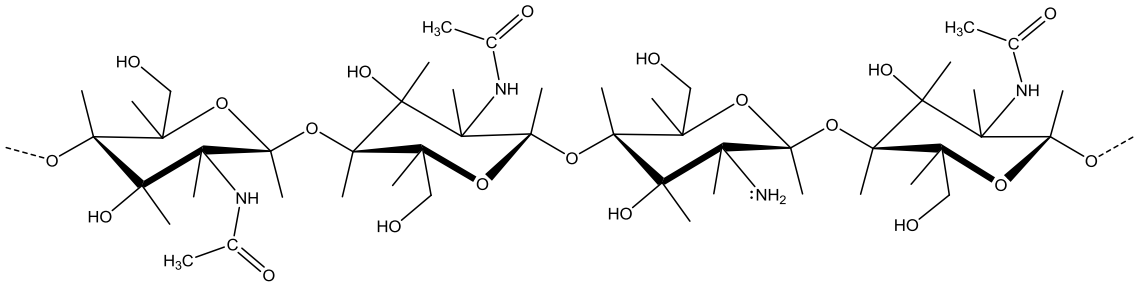

Figura 2. Estructura química de la quitina.

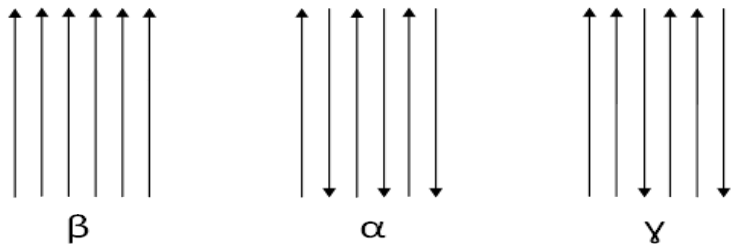

Figura 3. Orientación de las cadenas de las configuraciones polimórficas de quitina.

El grado de acetilación (GA) y el peso molecular (PM) de la quitina son características que dependen principalmente de la fuente y del método de obtención utilizado. Estos son parámetros de gran importancia debido a que definen no sólo sus propiedades fisicoquímicas, sino también sus propiedades biológicas. (Tabla 1). Es por esto que, de manera general, el GA y PM del polímero son parámetros críticos para su función en sus distintas aplicaciones (Dash et al., 2011).

El grado de acetilación se refiere a la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina en relación con las unidades de D-glucosamina del biopolímero (Guinesi y Cavalheiro, 2006). La quitina se puede desacetilar químicamente bajo condiciones alcalinas y alta temperatura (Tsaih y Chen, 2003). Para la medición del GA existen diversas técnicas; pero las de mayor relevancia y comúnmente usadas son la espectroscopia infrarroja, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia de resonancia magnética nuclear, valoración potenciométrica y valoración conductimétrica (Aranaz y Harris, 2009).

El peso molecular de la quitina presenta polidispersión, es decir, en una muestra dada se encontrará una distribución de pesos moleculares. Esto se debe a que las moléculas presentan distintos tamaños en los tejidos naturales; además, este puede ser modificado durante el proceso de obtención. Es por esto que, generalmente, los valores reportados son promedios estadísticos. Para la determinación del PM se utilizan distintos métodos, como por ejemplo viscosimetría, dispersión de luz, ultracentrifugación y cromatografía de permeación en gel, entre otros. De ser necesario se puede modificar el PM ya

sea por medios químicos, empleando normalmente condiciones ácidas (Einbu y Vårum 2007), o por medio de reacciones enzimáticas (Muzzarelli et al., 1999). Una despolimerización extensiva de la quitina puede llevar a la obtención de oligómeros solubles en agua o N-acetilglucosamina.

Tabla 1. Influencia del grado de acetilación y del peso molecular de la quitina y su derivado el quitosano sobre sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Propiedad	Característica del polímero
Solubilidad	Bajo GA
Cristalinidad	Alto GA
Viscosidad	Alto PM, bajo GA
Biodegradabilidad	Alto GA, bajo PM
Biocompatibilidad	Bajo GA
Antimicrobiano	Bajo GA, alto o bajo PM
Analgésico	Bajo GA
Antioxidante	Bajo GA, bajo PM
Hemostático	Bajo GA
Mucoadhesión	Bajo GA, alto PM
Permeabilidad	Bajo GA, alto PM
Antitumoral	Bajo PM

.

Una de las principales propiedades de la quitina es ser un polisacárido neutro e insoluble en disolventes habituales (soluciones acuosas y solventes orgánicos). Para disolver la quitina es necesario utilizar sistemas de solventes poco comunes como el sistema aprótico formado por mezclas de dimetilacetamida y cloruro de litio (DMAc-LiCl) (Pillai et al., 2009). Se ha reportado que el hidróxido de sodio al 10 % a bajas temperaturas funciona como buen disolvente de la quitina (Einbu et al., 2004). Otro sistema solvente

reportado para quitina es el metanol saturado con cloruro de calcio (Flores et al., 2007). Recientemente se ha dado a conocer la disolución de quitina en líquidos iónicos basados en butil metil imidazol (Xie et al., 2006; Qin et al., 2010). También Pastor de Abram et al. (2004) reportan que es posible solubilizarla en algunas sales neutras, solventes orgánicos y ácidos fuertes, bajo ciertas condiciones.

Aplicaciones

La quitina y su principal derivado, el quitosano, poseen un conjunto de propiedades funcionales distintivas. Gracias a estas se han desarrollado una enorme cantidad de aplicaciones en áreas muy diversas (Kumar, 2000). A continuación se enlistan algunos ejemplos: En el área de cosméticos se utiliza en el cuidado del cabello y la piel. En la ingeniería ambiental, el quitosano se ha utilizado como agente quelante y floculante debido a su naturaleza policatiónica. En la industria del papel, debido a su biodegradabilidad y no toxicidad se han elaborado materiales para empacar alimentos y otros productos. En la industria textil, derivados de quitina han sido producidos y utilizados para dar características especiales a los textiles. En el área de alimentos, al ser compuestos no tóxicos, se han utilizado como agentes gelificantes, emulsificantes, fibra dietaria, entre otros. En la agricultura, se ha encontrado que aceleran el crecimiento de los cultivos e inhiben algunos patógenos. En aplicaciones biomédicas, han sido utilizados en áreas como la ingeniería de tejidos, tratamiento de quemaduras, materiales de curación, piel artificial y en farmacéutica en sistemas de liberación controlada (Dutta et al., 2004). Es evidente el crecimiento de las investigaciones sobre estos biopolímeros en años recientes, estas se han enfocado principalmente en la producción, caracterización y desarrollo de aplicaciones (Aranaz y Harris, 2009).

Procesos de Obtención de Quitina

Como se mencionó anteriormente, el exoesqueleto de jaiba es una de las principales fuentes para la producción de quitina y la gran mayoría de los métodos para su obtención pueden clasificarse como procesos de aislamiento. En otras palabras, estos se basan en la remoción secuencial de los componentes del exoesqueleto hasta obtener quitina como remanente sólido. En el proceso de aislamiento podemos encontrar dos operaciones básicas: la separación de la proteína, conocida como desproteinización, y la eliminación de la materia inorgánica, conocida como desmineralización (Pastor de Abram et al., 2004). En la literatura existen numerosos reportes sobre métodos químicos y biotecnológicos utilizados para la obtención de quitina. Estos varían en el orden de operaciones, tiempo, temperatura, relación sólido a líquido, concentración y tipo de reactante para cada operación. Debido a que es el método químico el más utilizado a escala industrial, a continuación se presentan más detalladamente los principales procesos de obtención.

Desproteinización

Para la desproteinización química se utilizan soluciones alcalinas, generalmente NaOH (1-10% p/v) a temperatura entre los 65 y 100 °C, durante 1 a 24 horas. Existen numerosos estudios donde se varían diversos parámetros como la relación sólido a líquido, el número de tratamientos consecutivos y la utilización de otras sustancias para llevarla a cabo. Los tratamientos termoquímicos han demostrado su eficiencia para eliminar la fracción de proteína presente en el exoesqueleto. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos se basan en la hidrólisis de las proteínas y estas sufren modificaciones químicas sustanciales. Como consecuencia de esto, resulta más complicado recuperar las proteínas y péptidos resultantes; además, el valor nutricional de estos se ve reducido (Gyung-Hyun et al., 2011).

Tratamientos biotecnológicos han sido propuestos para facilitar la recuperación de proteínas durante la desproteinización de desechos de

crustáceos. Procesos como la digestión enzimática y fermentaciones con bacterias proteolíticas han sido estudiados. En el caso del exoesqueleto de jaiba se ha reportado una desproteinización de hasta 30%, lo cual sugiere a los métodos biotecnológicos como pretratamiento para la obtención de quitina. Una de las ventajas de estos estos es que propician operaciones más amigables con el medio ambiente y facilitan la recuperación de la fracción proteica (Gyung-Hyun et al., 2011).

Desmineralización

La materia inorgánica es el principal componente en el exoesqueleto de jaiba, por lo tanto, la etapa de desmineralización es de gran importancia. Para esta, generalmente se utilizan ácidos inorgánicos, siendo el ácido clorhídrico el más utilizado en la industria. La concentración del ácido, la relación sólido a líquido y el tiempo de reacción, suelen variar en numerosos estudios dependiendo de las condiciones de la materia prima (Pastor de Abram et al., 2004). La desmineralización con ácido clorhídrico se logra a través de la reacción química que se presenta en la Ecuación 1. Mediante está ecuación es posible calcular el requerimiento estequiométrico del ácido necesario para reaccionar con la cantidad de carbonato de calcio presente. Por lo tanto es muy importante la determinación del contenido de minerales en el exoesqueleto de la jaiba ya que puede variar con la especie, condición fisiológica y las condiciones ambientales.

$$CaCO_3 + 2\,HCl \rightarrow CaCl_2 + H_2O + CO_2 \qquad (1)$$

Las características fisicoquímicas y propiedades de la quitina son de gran importancia y están influenciadas directamente por el método de obtención utilizado. Los métodos químicos presentan algunas desventajas principalmente la posible degradación de los productos y la generación de efluentes contaminantes. Es por esto que se considera importante la investigación de métodos de desmineralización alternativos y la optimización de estos. El uso de ácidos orgánicos para el proceso de desmineralización es una opción prometedora. Entre las posibles ventajas de utilizar ácidos orgánicos se

encuentra que pueden producirse a partir residuos, se consideran menos perjudiciales para el medio ambiente y pueden preservar las características de los componentes. Adicionalmente, las sales orgánicas producidas durante el proceso pueden ser consideradas como subproducto (Mahmoud et al., 2007).

Entre los ácidos orgánicos estudiados para la desmineralización se encuentran el ácido láctico y el ácido acético; sin embrago, se ha reportado una mayor eficiencia de desmineralización con el ácido láctico (Woo-Jin et al., 2005). Se ha propuesto que la desmineralización con ácidos orgánicos consiste en dos fases: adhesión y descalcificación. La adhesión resulta de la interacción del ácido con sustratos que contienen sales de calcio. Posteriormente procede la reacción de sustitución, lo que lleva a la formación de sales solubles de calcio. En la Figura 4 se esquematiza el proceso de desmineralización partiendo del carbonato de calcio contenido en el exoesqueleto de jaiba.

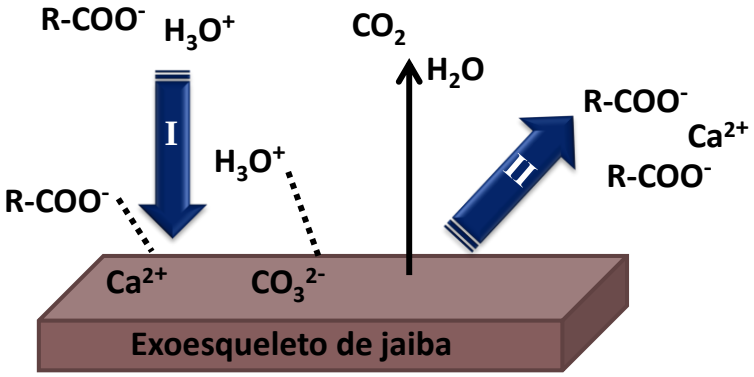

Figura 4. Representación esquemática de las etapas de adhesión (I) y descalcificación (II), durante la desmineralización.

En la primera fase del proceso de desmineralización, el grupo carboxilo del ácido orgánico forma un enlace iónico con el Ca en la superficie del material. Este paso está en gran medida determinado por el pKa del ácido utilizado. Al mismo tiempo, las sales de calcio son extraídas por el H_3O^+ en la superficie del material y llevadas a la solución. Dependiendo de la velocidad de difusión de los complejos de ácido-calcio en la solución, ocurren las dos fases del proceso o solo se limita a la primera, donde el ácido permanece adherido a

la superficie de la matriz resultando una descalcificación limitada (Yoshioka et al., 2002; Yoshida et al., 2001). Durante la desmineralización con estos ácidos se llevan a cabo reacciones donde se producen compuestos que pueden ser utilizados posteriormente (Ecuación 2).

$$2(C_3H_6O_3) + CaCO_3 \rightarrow Ca(C_3H_5O_3)_2 + H_2O + CO_2 \qquad (2)$$

Estudios previos sobre las desmineralizaciones con ácidos orgánicos mencionan que el ácido láctico puede desmineralizar el exoesqueleto de jaiba; sin embargo, no con la eficiencia que se logra con el ácido clorhídrico (Das y Ganesh, 2010). Además, se menciona que es posible la obtención de lactato de calcio. Sin embargo, no se logró encontrar referencias que reporten el análisis y aprovechamiento del lactato de calcio producido durante la desmineralización de exoesqueletos de crustáceos.

Típicamente los subproductos de la desmineralización no son aprovechados. Al emplear ácido clorhídrico para esta se produce cloruro de calcio (Ecuación 1), el cual es desechado en los efluentes del proceso de obtención de quitina, esto debido principalmente a que la recuperación de esta sal es complicada. El uso el ácido láctico representa una opción prometedora debido a que en condiciones adecuadas es posible una desmineralización eficiente del exoesqueleto de jaiba. Además, se podría incorporar la producción de lactato de calcio al proceso de aislamiento de quitina, durante la etapa de desmineralización. El lactato de calcio producido, una sal con diversas aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, puede ser recuperado mediante procesos simples de precipitación (Kubantseva et al., 2004).

Lactato de Calcio

El lactato de calcio es una sal cálcica del ácido láctico que tiene una solubilidad en agua de 3,4 g por 100 g de agua a 20°C y que aumenta considerablemente al incrementar la temperatura. Su nombre químico sistemático es dilactato de calcio o sal cálcica del ácido 2-hidroxipropanoico

(Figura 5). Su fórmula molecular es $C_6H_{10}CaO_6$, con un peso molecular es 218.22 g/mol, típicamente se presenta en forma pentahidratada.

Industrialmente se produce por la reacción del ácido láctico con carbonato de calcio o hidróxido de calcio. El lactato de calcio es una sustancia clasificado como GRAS ("Generalmente reconocido como seguro", por sus siglas en inglés) para uso general como aditivo en los alimentos por la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos (Igoe, 2011)

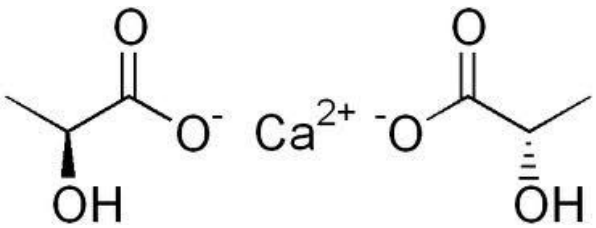

Figura 5. Estructura química del lactato de calcio

Estudios *in vivo* han demostrado que presenta buena biodisponibilidad en el organismo cuando es usada como suplemento de calcio (Gao et al., 2009). Patwardhan et al. (2001), compararon esta propiedad con otras sales de calcio diferentes en un sistema *in vivo* y encontraron que al ser suplementados, el lactato de calcio presenta mayor biodisponibilidad con respecto al carbonato de calcio. Otros autores concuerdan en que la fortificación de alimentos con lactato de calcio representa una opción ideal para la retención de calcio en el cuerpo humano (Singh et al., 2007; Ranhotra et al., 1997). Los alimentos pueden ser enriquecidos con calcio para ayudar a personas con intolerancia a la lactosa y a otras que prefieren no consumir las fuentes tradicionales de calcio (productos lácteos). El enriquecimiento se ha llevado a cabo en varios sistemas modelos de alimentos como el pan, tortilla y en jugos de frutas y verduras, en los cuales la alternativa es viable y aceptada por los consumidores. Estos alimentos pueden proporcionar cantidades significativas de calcio para llegar a la ingesta óptima; además, a su vez, pueden cumplir otras funciones una vez consumidos (Ranhotra et al., 1997; Yuk et al., 2008). Con esto, personas con

problemas de osteoporosis y deficiencias de calcio podrían ser beneficiadas. Además de los efectos antes mencionados, existen reportes donde se ha utilizado lactato de calcio como fuente de calcio en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer. Viñas-Salas et al. (1998) encontraron que una dieta suplementada con calcio inhibe la carcinogénesis del cáncer de colon inducido por dimetilhidracina, lo cual fue corroborado en otros estudios (Penman et al., 2000).

Además de su aportación nutricional, también se ha estudiado el efecto antimicrobiano del lactato de calcio en los alimentos. Existen estudios sobre su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens, Escherichia coli* y *Salmonella* en carnes, jugos y en frutos frescos cortados, reduciendo así el riesgo de enfermedades e intoxicaciones alimentarias (Aran 2001; Daengprok et al., 2002; Velugoti et al., 2007; Yuk et al., 2008; Gómez-López et al., 2010). Otra de las aplicaciones estudiadas del lactato de calcio es en el mantenimiento de los marcadores de calidad (textura, turgencia, color, oscurecimiento, olor, sabor y vida de anaquel) en frutos frescos cortados (Luna-Guzmán y Barrett, 2000). Estudios realizados en zanahoria, pera, melón y lechuga reportan la eficiencia del lavado de los productos frescos cortados con solución de lactato de calcio. Este ayuda a reducir el fenómeno de la pérdida de turgencia, debido a la formación de complejos de iones de calcio con las pectinas de la pared celular y lámina media, lo que lleva a la estabilización de la membrana celular proporcionando un efecto reafirmante. Además, el lactato de calcio presenta la ventaja de no influir en el sabor del alimento (Rico et al., 2007; Alandes et al., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

En el presente estudio se utilizó exoesqueleto de jaiba proporcionado por la empresa Biopigmentos S. A. de Cd. Navojoa, Sonora. Este se encontraba seco y molido con un tamaño de partícula menor a 1 mm. El exoesqueleto de jaiba se lavó con agua hasta eliminar la mayoría de los residuos de material orgánico y se puso a secar a 60 °C durante 24 h.

El ácido láctico, ácido clorhídrico y todos los productos químicos utilizados para la caracterización fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU).

Esquema Experimental

El proceso para el aislamiento de quitinas y producción de lactato de calcio a partir de exoesqueleto de jaiba se esquematiza en la Figura 6 y se detalla a continuación.

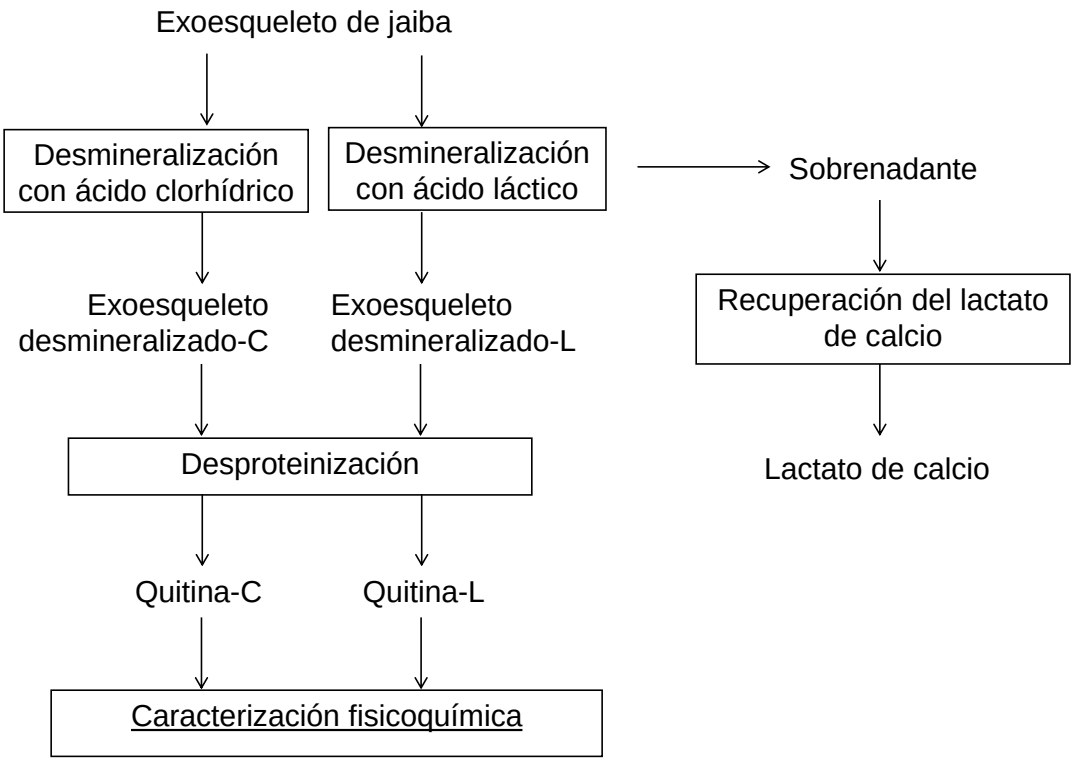

Figura 6. Proceso de aislamiento de quitinas y producción de lactato de calcio.

Desmineralización con Ácido Láctico

Para la desmineralización con ácido láctico se realizó una optimización de los parámetros concentración de ácido láctico, tiempo de reacción y relación sólido a líquido. Las condiciones obtenidas fueron utilizadas para la desmineralización durante la obtención de quitina; los sólidos obtenidos se nombraron Exoesqueleto desmineralizado-L.

Optimización

Con la finalidad de encontrar las condiciones de operación que permitan una desmineralización óptima del exoesqueleto de jaiba con ácido láctico, se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MSR). Se planteó un diseño central compuesto rotatorio (DCCR) para tres variables independientes, este diseño ya ha sido utilizado en otros estudios de optimización de desmineralización con ácido clorhídrico (Chang y Tsai, 1997; Choorit et al.,

2008). El DCCR ofrece una distribución razonable de puntos de datos en toda la región de interés, es sensible a la detección de posibles curvaturas, permita investigar la idoneidad de la ecuación de regresión estimada, permita la construcción secuencial de diseños de orden superior y asegura la simplicidad en los cálculos de las estimaciones de los parámetros del modelo (Montgomery, 2005).

Las variables independientes utilizadas en el diseño fueron: concentración del ácido láctico (X_1), tiempo de reacción (X_2) y relación sólido a líquido (X_3). Cada variable fue codificada en cinco niveles (-1.682, -1, 0, +1 y +1.682) de acuerdo al diseño. Los niveles de concentración de ácido láctico, tiempo de reacción y relación sólido a líquido se ubicaron dentro de los valores mínimos y máximos de 8-12 %, 1-3 h y 1:20-1:30 g:mL, respectivamente (Tabla 2), estos valores fueron establecidos en base a experimentos preliminares La variable de respuesta (Y) del diseño fue el rendimiento de desmineralización del exoesqueleto de la jaiba y fue calculado con la siguiente ecuación reportada por Ghorbel-Bellaaj et al. (2011):

$$\%\, Desmineralización = \frac{C_{\mathrm{i}}EJ_{\mathrm{i}} - C_{\mathrm{f}}EJ_{\mathrm{f}}}{C_{\mathrm{i}}EJ_{\mathrm{i}}} \times 100 \qquad (1)$$

Donde:

C_i es la proporción inicial de cenizas en el exoesqueleto de jaiba. EJ_i es el peso inicial del exoesqueleto de jaiba. C_f es la proporción residual de cenizas. EJ_f es el peso del exoesqueleto de jaiba después de la desmineralización.

Tabla 2. Variables y niveles del DCCR usadas en la desmineralización de exoesqueleto de jaiba con ácido láctico.

Variable	Niveles codificados de las variables				
	-1.68	-1	0	1	1.68
X1; Concentración de ácido láctico (%)[a]	6.6364	8	10	12	13.3636
X2; Tiempo de reacción (h)	0.31821	1	2	3	3.68179
X3; Relación sólido:líquido (g:mL)	1:16	1:20	1:25	1:30	1:33

[a]Gramos de ácido láctico en 100 mL de solución.

En la Tabla 3 se muestra el diseño conceptual del DCCR y los tratamientos experimentales plateados seguidos para la optimización de la desmineralización con ácido láctico. El diseño incluye seis corridas experimentales con los puntos axiales de las variables y cinco repeticiones del punto central (0,0,0) para la estimación del error experimental.

Tabla 3. Variables independientes codificadas y no codificadas del DCCR y resultados experimentales del porcentaje de desmineralización del exoesqueleto de jaiba.

Corrida*	X1; Concentración de ácido láctico (%)a	X2; Tiempo de reacción (h)	X3; Relación sólido a líquido (g:mL)
1	8 (-1.0)**	1 (-1.0)	1:20 (-1.0)
2	12 (1.0)	1 (-1.0)	1:20 (-1.0)
3	8 (-1.0)	3 (1.0)	1:20 (-1.0)
4	12 (1.0)	3 (1.0)	1:20 (-1.0)
5	8 (-1.0)	1 (-1.0)	1:30 (1.0)
6	12 (1.0)	1 (-1.0)	1:30 (1.0)
7	8 (-1.0)	3 (1.0)	1:30 (1.0)
8	12 (1.0)	3 (1.0)	1:30 (1.0)
9	6.6364 (-1.68)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
10	13.3636 (1.68)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
11	10 (0.0)	0.31821 (-1.68)	1:25 (0.0)
12	10 (0.0)	3.68179 (1.68)	1:25 (0.0)
13	10 (0.0)	2 (0.0)	1:16.5910 (-1.68)
14	10 (0.0)	2 (0.0)	1:33.409 (1.68)
15	10 (0.0)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
16	10 (0.0)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
17	10 (0.0)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
18	10 (0.0)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
19	10 (0.0)	2 (0.0)	1:25 (0.0)
20	10 (0.0)	2 (0.0)	1:25 (0.0)

Análisis estadístico

El análisis estadístico y la presentación de resultados del porcentaje de desmineralización se hicieron utilizando el paquete estadístico Minitab versión 15. Los resultados experimentales del diseño se ajustaron mediante un análisis de regresión múltiple a un modelo polinomial de segundo orden. Esto debido a que en estudios previos se ha reportado que experimentos de desmineralización se ajustan al modelo de segundo orden para el análisis de los datos, debido a la curvatura que presentan en la superficie (Tetteh, 1991).

La fórmula del modelo propuesto es la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (2)$$

Donde:

β_0 es una constante. β_1, β_2, β_3 son los coeficientes lineales. β_{11}, β_{22}, β_{33} son los coeficientes cuadráticos. β_{12}, β_{13}, β_{23} son los coeficientes de interacción.

Proceso de Recuperación del Lactato de Calcio

La solución sobrenadante de la etapa de desmineralización se filtró al vacío utilizando papel filtro Whatman No. 4. Después se calentó a 100 °C hasta tener una concentración aproximada de 100 mg/mL de lactato de calcio (la concentración aproximada se calculó considerando las cenizas retiradas del exoesqueleto de jaiba en base al porcentaje de desmineralización). Se pasó a enfriarlo a 4 °C durante 72 h, transcurridas estas 72 h se pudo observar la formación de los cristales, los cuales se lavaron con etanol al 50 % (v/v) y se pusieron a secar a 60 °C en una estufa de convección de aire (marca Lindberg/blue) durante 12 h.

Desmineralización con Ácido Clorhídrico

Para comparar las características de la quitina aislada a partir de Exoesqueleto desmineralizado-L, se obtuvo quitina aislada por el método termoquímico (convencional). Se siguió la metodología reportada por Beaney et al. (2005); el exoesqueleto de jaiba fue tratado con ácido clorhídrico 1M en una relación sólido a líquido de 1:15. La reacción fue llevada a cabo durante dos horas a temperatura ambiente. Después los sólidos fueron lavados hasta neutralidad y se nombraron Exoesqueleto desmineralizado-C.

Desproteinización

Con el fin de completar el aislamiento de quitina se siguió la metodología reportada por Beaney et al. (2005). Los exoesqueletos desmineralizados-C y L fueron tratados con hidróxido de sodio (NaOH) al 15 % (p/v) en una relación 1:10 (p:v) durante 3 h, a una temperatura de 65 °C. Al finalizar, la quitina se lavó hasta pH neutro y se secó a 60 °C durante 24 h. Las quitinas obtenidas después de la desproteinización fueron llamadas Quitina-C y Quitina-L, respectivamente.

Identificación y Caracterización Fisicoquímica de los Productos

Se realizó una identificación y caracterización fisicoquímica de los productos, Quitina-C, Quitina-L y Lactato de calcio producidos. Las mediciones de peso molecular viscosimétrico y grado de acetilación se realizaron solo en las quitinas.

Identificación por espectroscopia de infrarrojo

Se realizó una identificación del lactato de calcio producido y de las quitinas aisladas por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier

(FTIR). Las muestras de quitina y lactato de calcio se secaron a 60 °C en una estufa de convección de aire (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.) (Brugnerotto et al., 2001; Cassanas et al., 1991).

Análisis proximal

Se determinó el contenido de humedad, ceniza (material inorgánico), lípidos, nitrógeno total y minerales. A partir de los valores de nitrógeno total se determinó el contenido de proteína y quitina de acuerdo al método reportado por Díaz-Rojas et al. (2006). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y los reactivos utilizados fueron grado reactivo.

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).

Ceniza. Para la determinación de ceniza se utilizó la técnica descrita por Peniche (2006). Las muestras se incineraron a 800 °C durante 4 h y se midió la cantidad de cenizas mediante el método gravimétrico.

Lípidos. Se utilizó la técnica descrita por la AOAC (1990) en el método 7.060. Según la técnica se estima el total del extracto etéreo por gravimetría.

Nitrógeno total. 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

descrita por Díaz-Rojas et al. (2006), donde utiliza una relación estequiométrica aplicando las ecuaciones 3 y 4.

$$\text{Proteína} = \frac{N_T C_Q + K - 100}{C_Q - C_P} \times C_P \qquad (3)$$

$$\text{Quitina} = \frac{N_T C_Q + K - 100}{C_P - C_Q} \times C_Q \qquad (4)$$

Donde:

N_T es la proporción de nitrógeno total presente en la muestra; K es la proporción de material no nitrogenado (cenizas, lípidos y humedad); Cp es el factor de conversión de nitrógeno proteico, para este caso se utilizó el valor de 6.25 como factor de conversión; Cq 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.

Minerales. Se siguió la técnica descrita por (Jara-Marini et al., 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 se tomaron 10 mL de la muestra y se aforaron con cloruro de lantano ($LaCl_3$) 0.0072 M a un volumen de 50 mL. Se hizo la medición en flama de acetileno con óxido nitroso. Para calcular la concentración se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Mineral} = \frac{LF \times V}{P \times F} \qquad (5)$$

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; F es el factor de dilución.

Caracterización fisicoquímica de la quitina

Peso molecular. Para determinar la viscosidad intrínseca ([*η*]) y a partir de esta calcular el peso molecular promedio viscosimétrico (Mv) de las muestras de quitina se siguió la metodología reportada por Einbu et al. (2004). Para ello se preparó una solución de quitina a una concentración de 2.25 mg/mL en NaOH frío. Esta se analizó en un viscosímetro tipo Ubbelohde de tamaño capilar ASTM 1 colocado en un baño de agua (marca Koehler Intrument Company Inc.) a temperatura constante de 20 °C. Se realizaron mediciones a 5 concentraciones distintas y se utilizaron para determinar la [η] utilizando las ecuaciones de Huggins, Kraemer y "punto único". El Mv de cada muestra se calculó mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Ecuación 6).

$$[\eta] = \mathrm{KMv}^{\propto} \qquad (6)$$

Empleando las constantes K= 0.10 y α= 0.68 reportadas por Einbu et al. (2004).

Grado de acetilación. El grado de acetilación (GA) de las quitinas se determinó mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Se elaboraron las pastillas de quitina siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.7.1. Para la estimación del GA a partir de los espectros FTIR se utilizó el procedimiento reportado por Brugnerotto et al. (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo el esquema experimental planteado en la sección de materiales y métodos se obtuvieron dos quitinas a partir del exoesqueleto de jaiba: una aislada por el proceso convencional (Quitina-C) y otra por el proceso propuesto (Quitina-L). En el proceso propuesto se optimizó la desmineralización mediante el tratamiento del exoesqueleto de jaiba con ácido láctico utilizando la metodología de superficie de respuesta. Además, se estandarizó la recuperación del lactato de calcio producido en esta misma etapa. Tanto al exoesqueleto de jaiba como al lactato de calcio producido y a las quitinas aisladas se les determinaron sus características fisicoquímicas generales. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Optimización de la Desmineralización

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en problemas en los que una respuesta de interés es influenciada por diversas variables (Montgomery, 2005). La MSR es una técnica efectiva en los estudios de optimización de procesos que ya ha sido utilizada en la desmineralización de exoesqueletos de crustáceos por el método termoquímico (Chang y Tsai, 1997; Ghorbel-Bellaaj et al., 2011; Bhaskar et al., 2007). Sin embargo, en la literatura no se encontraron reportes previos sobre una optimización de los parámetros de desmineralización con ácido láctico, ni de una desmineralización efectiva con este mismo ácido.

Se optimizaron tres parámetros relevantes en la desmineralización: la concentración de ácido láctico, el tiempo de reacción y la relación sólido a líquido. La Tabla 4 muestra los valores experimentales del porcentaje de desmineralización obtenidos con los diferentes tratamientos del diseño. Estos datos fueron analizados por regresión lineal múltiple utilizando el software Minitab versión 15 y se ajustaron a un modelo cuadrático con la finalidad de generar la ecuación que predijera el porcentaje de desmineralización.

Tabla 4. Diseño de experimentos y porcentaje de desmineralización. Los valores de porcentaje de desmineralización son el promedio de tres mediciones.

Tratamiento	Concentración de ácido láctico (%)	Tiempo (h)	Relación sólido a líquido (g:mL)	Desmineralización (%)
1	8	1	1:20	81.9
2	12	1	1:20	97.1
3	8	3	1:20	90.9
4	12	3	1:20	94.7
5	8	1	1:30	91.9
6	12	1	1:30	97.1
7	8	3	1:30	96.4
8	12	3	1:30	98.8
9	6.6364	2	1:25	90.8
10	13.3636	2	1:25	98.1
11	10	0.31821	1:25	89.3
12	10	3.68179	1:25	95.9
13	10	2	1:16.5910	89.2
14	10	2	1:33.409	97.2
15	10	2	1:25	94.4
16	10	2	1:25	95.4
17	10	2	1:25	95.9
18	10	2	1:25	96.7
19	10	2	1:25	96.1
20	10	2	1:25	96.5

La ecuación cuadrática obtenida como modelo de predicción fue la siguiente:

$$Y = -0.238348 + 0.088409X_1 + 0.150394X_2 + 0.036374X_3 - 0.001028X_1^2 - 0.010643X_2^2 - 0.000339X_3^2 - 0.008808X_1X_2 - 0.001441X_1X_3 - 0.000094X_2X_3 \quad (7)$$

Donde: Y es el porcentaje de desmineralización; X_1 es la concentración de ácido láctico (%); X_2 es el tiempo (h); X_3 es la relación sólido a líquido (g:mL).

En la Tabla 5 se presenta la significancia de los términos del modelo (Ecuación 7), donde un valor de $p<0.05$ indica que el término es significativo (Ye y Jiang, 2011). Las interacciones concentración-tiempo y concentración-relación sólido a líquido tuvieron un efecto significativo sobre el porcentaje de desmineralización. No obstante cuando la concentración se mantuvo en su punto central, el tiempo de reacción y la relación sólido a líquido no presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Tabla 5. Coeficientes del modelo de predicción del porcentaje de desmineralización.

Variable	Coeficiente	Error Estándar	Valor-F	Valor-P
Constante	-0.238348	0.191685	-1.243	0.242
X_1	0.088409	0.022085	4.003	0.003
X_2	0.150394	0.036924	4.073	0.002
X_3	0.036374	0.008834	4.118	0.002
X_1^2	-0.001028	0.000892	-1.153	0.276
X_2^2	-0.010643	0.003568	-2.983	0.014
X_3^2	-0.000339	0.000143	-2.373	0.039
X_1X_2	-0.008808	0.002394	-3.679	0.004
X_1X_3	-0.001441	0.000479	-3.008	0.013
X_2X_3	-0.000094	0.000958	-0.098	0.924

La significancia estadística de la Ecuación 7 fue evaluada por el análisis de varianza (ANOVA) para modelos cuadráticos de superficie de respuesta y se encuentra resumida en la Tabla 6. El análisis de varianza nos muestra que la variación explicada por el modelo es significativamente mayor a la variación inexplicable (P=0.000) y la falta de ajuste no fue significativa (P=0.069). Baş y Boyacı (2007) reportaron que existen numerosas técnicas para verificar si el modelo utilizado es el adecuado; sin embargo, la capacidad global predictiva del modelo es comúnmente explica por el coeficiente de determinación (R^2) .El coeficiente de determinación fue de 0.9421, esto sugiere que el modelo explica de manera adecuada el 94% del total de la variación de los datos en la desmineralización, atribuido a las variables independientes. Solo el 6% del total de la variación no puede ser explicado por el modelo (Choorit et al., 2008; Guan y Yao, 2008).

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático de superficie de respuesta de la desmineralización.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-P
Regresión	9	0.029866	0.003318	0.000
Error residual	10	0.001834	0.000183	
Falta de ajuste	5	0.001485	0.000297	0.069
Error puro	5	0.000349	0.000070	
Total	19	0.031700		

R^2= 0.9421

Las representaciones gráficas de la superficie de respuesta se muestran en las Figuras 7, 8 y 9 para ayudar a visualizar el efecto de la concentración de ácido láctico, tiempo y relación sólido a líquido sobre la desmineralización respectivamente. La Figura 7 muestra la interacción entre la concentración de ácido láctico y relación sólido a líquido a tres diferentes tiempos de reacción. Se puede observar que a bajas concentraciones, el efecto de la relación sólido a líquido es más significativo y se requiere una alta relación sólido a líquido para

un porcentaje de desmineralización mayor. Es posible observar también que a tiempos de reacción mayores, se puede lograr un alto porcentaje de desmineralización a baja concentración y alta relación sólido a líquido (Figura 7C). Chang y Tsai (1997) reportan un efecto significativo similar para esta interacción, utilizando ácido clorhídrico para la desmineralización.

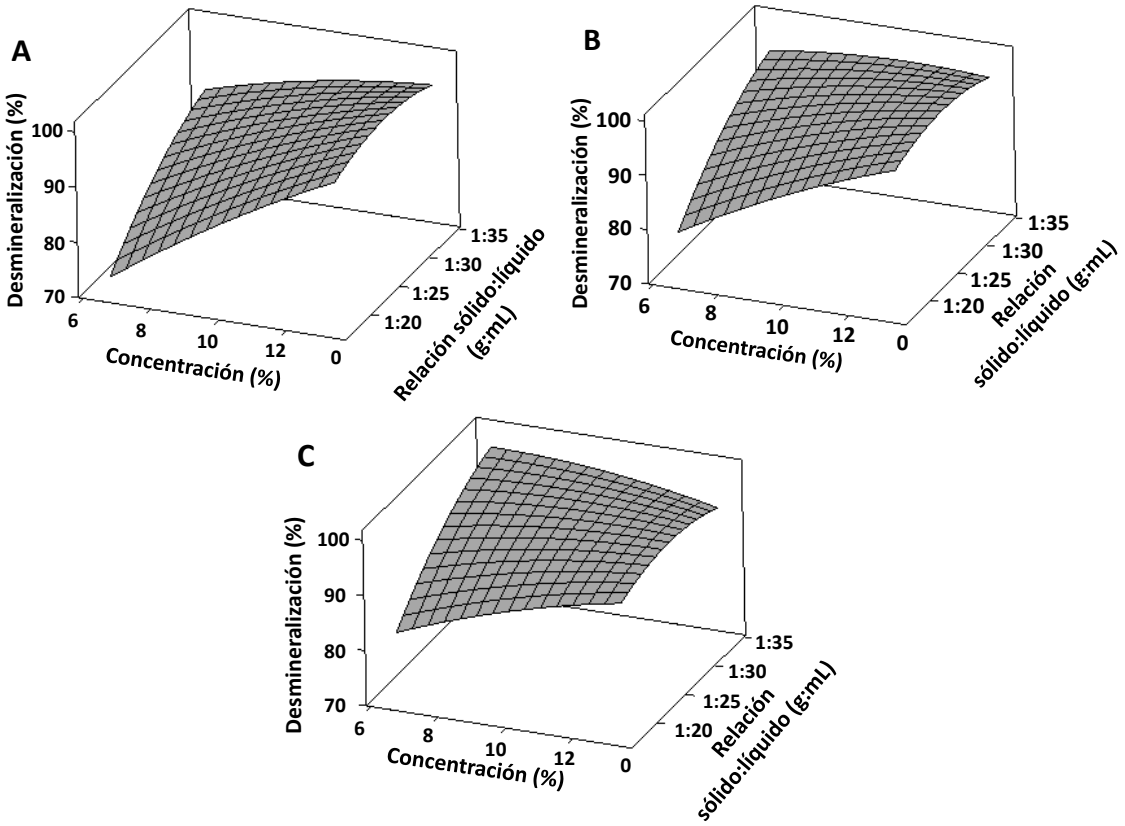

Figura 7. Efecto de la concentración de ácido láctico (%) y la relación sólido a líquido (g:mL) sobre el porcentaje de desmineralización del exoesqueleto de jaiba a 3 diferentes tiempos de reacción: (A) 1 h, (B) 2 h y (C) 3 h.

En la Figura 8 se muestra la interacción entre la concentración y el tiempo de reacción. Se puede observar que a baja concentración, el tiempo tiene un mayor efecto sobre el porcentaje de desmineralización. Además, comparando a diferentes niveles de relación sólido a líquido podemos ver el efecto positivo sobre el porcentaje de desmineralización al incrementar este

parámetro. Lo antes mencionado coincide con Percot et al. (2003) quienes realizaron una desmineralización con ácido clorhídrico a bajas concentraciones.

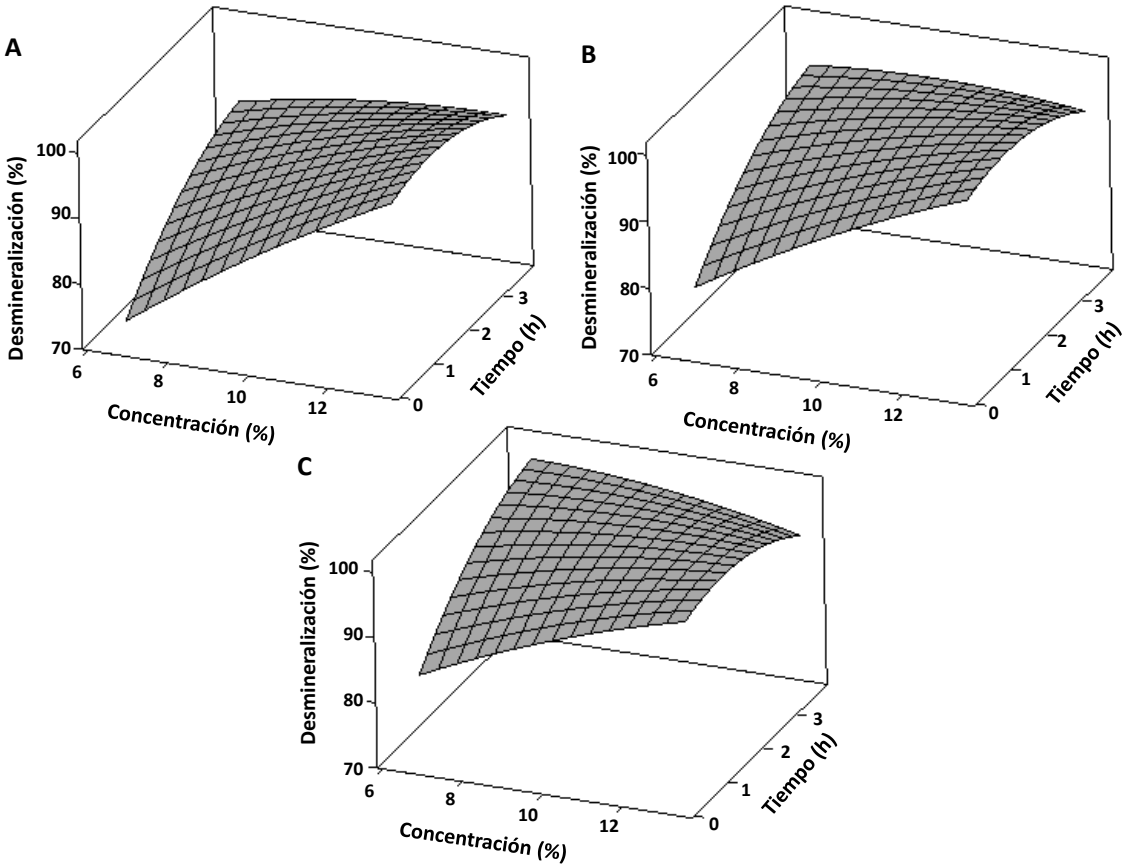

Figura 8. Efecto de la concentración de ácido láctico y tiempo de reacción sobre el porcentaje de desmineralización. (A) Relación sólido a líquido de 1:20, (B) Relación sólido a líquido de 1:25 y (C) Relación sólido a líquido de 1:30.

El análisis estadístico no considera significativa la interacción entre el tiempo de reacción y la relación sólido a líquido. De forma general se puede observar que a la más alta concentración de ácido láctico probada ocurre la formación de un punto óptimo a tales condiciones de tiempo y relación sólido a líquido (Figura 9). Sin embargo, el análisis estadístico de estos datos muestra un parámetro de conveniencia de 0.95 bajo las condiciones de dicho punto óptimo (concentración de 12%, tiempo de reacción de 2 h y una relación sólido a líquido de 1:25 g:mL). Esto significa que la desmineralización bajo dichas condiciones tiende a ser sobrestimada. Por otra parte se puede observar que a

bajas concentraciones de ácido láctico (Figura 9A y 9B) se requiere un mayor tiempo de reacción y relación sólido a líquido para obtener un porcentaje de desmineralización más alto.

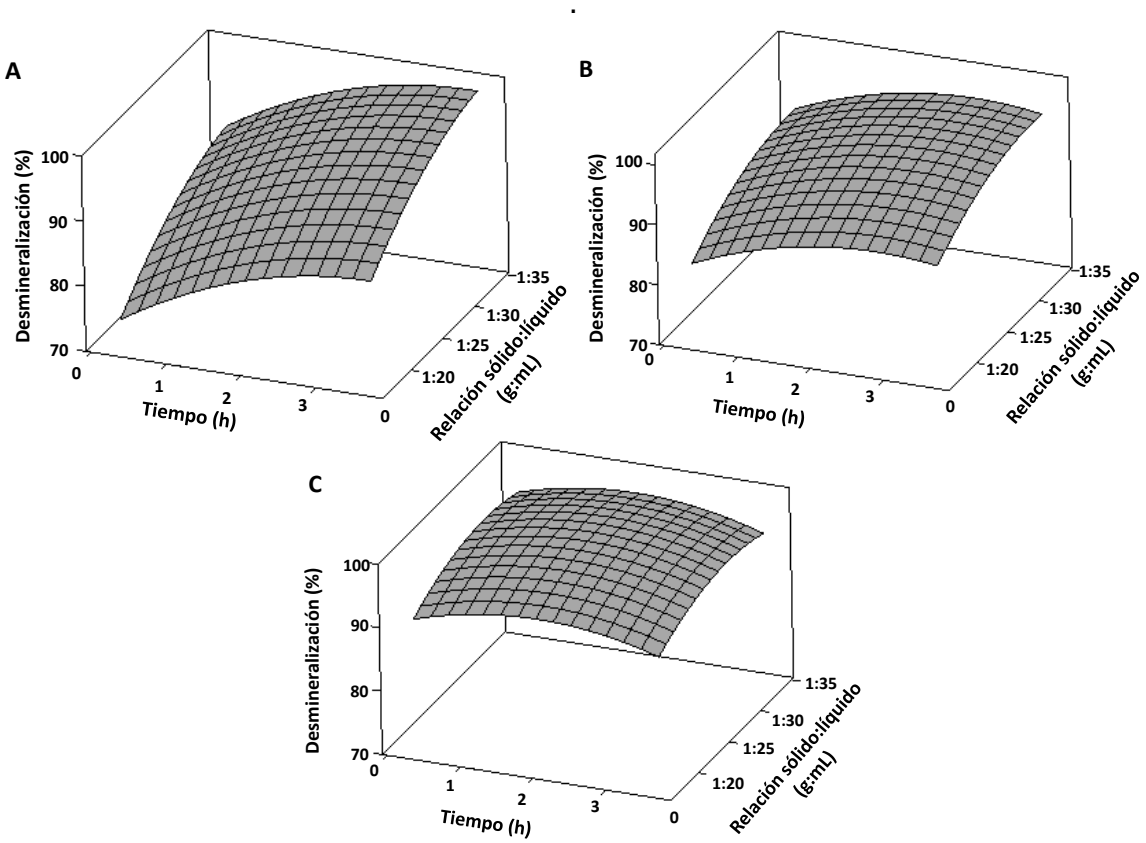

Figura 9. Efecto del tiempo de reacción y la relación sólido a líquido sobre el porcentaje de desmineralización. (A) Concentración de 8 %, (B) Concentración de 10 % y (C) Concentración de 12 %.

Las condiciones óptimas de operación determinadas por el análisis de superficie de respuesta para obtener un porcentaje máximo de desmineralización fueron: una concentración de ácido láctico de 7%, un tiempo de 3.5 h y una relación sólido a líquido 1:33. El porcentaje de desmineralización óptimo estimado bajo estas condiciones de desmineralización fue de 99.9%. Se realizaron 5 corridas experimentales en condiciones óptimas y se obtuvo un valor de desmineralización del exoesqueleto de jaiba de 99.3 %. Este valor se

encuentra por encima de lo reportado en otros estudios donde se utilizó ácido láctico para la desmineralización de exoesqueletos de crustáceos.

Mahmoud et al. (2007) obtuvieron 97.4% de desmineralización de exoesqueleto de camarón con ácido láctico a una concentración de 7.56%, relación sólido a líquido de 1:20, durante 2 h. En exoesqueleto de jaiba, Jung et al. (2005) lograron reducir el contenido de cenizas hasta un 5%, utilizando ácido láctico al 10%, durante 5 días. Sin embargo, el tiempo de reacción utilizado por estos autores es muy largo y puede ocasionar despolimerización y desacetilación parcial de la quitina (Percot et al., 2003). Das y Ganesh (2010) utilizaron ácido láctico producido por *Lactobacillus plantarum* separado por electrodiálisis a una concentración de 6.95%, relación 1:35 sólido a líquido y un tiempo de 24 h. Ellos no presentan los valores del contenido de cenizas residual o el porcentaje de desmineralización; sin embargo, mencionan que la desmineralización con ácido láctico requiere de un segundo tratamiento con ácido clorhídrico 0.5 M, lo cual sugiere que la desmineralización no fue completa. De manera general podemos observar que los resultados varían en estos trabajos, incluso en el trabajo de Das y Ganesh (2010), el cual asemeja con las condiciones utilizadas en la presente investigación. Esto se debe a que existen otros factores que influyen directamente en el porcentaje de desmineralización, como las condiciones de la materia prima, el tamaño de partícula y la pureza del ácido láctico.

En general, podemos observar que los métodos de desmineralización con ácidos orgánicos utilizan un exceso considerable del ácido requerido estequiométricamente. Para desmineralizar 10 g de exoesqueleto de jaiba se requieren como mínimo 8.2 g de ácido láctico para reaccionar con el carbonato de calcio. Bajo las condiciones óptimas del presente trabajo se agregó un exceso de ácido láctico de 220%. En el caso de los ácidos fuertes, en la literatura se recomienda agregar un exceso de 10 % del ácido estequiométricamente requerido como mínimo para reaccionar con el $CaCO_3$ contenido en el exoesqueleto (Pastor de Abram et al., 2004). Esto se debe a la reactividad del compuesto, el HCl es un ácido fuerte, por lo que en disolución

acuosa se ioniza completamente y la reacción de desmineralización se lleva a cabo rápidamente (Ehrlich et al., 2009). En el caso del ácido láctico (ácido débil) no es así, su valor de pKa es 3.86; es decir no se disocia completamente y solo la parte ionizada es la que lleva a cabo la reacción. De esta manera a la concentración utilizada de 0.78 M (o 71 g/L) se generan inicialmente solo 1.03×10^{-2} moles de ion lactato que es el que promueve la desmineralización. Es por este motivo que la reacción se realiza de forma más lente y se requiere una mayor concentración para obtener resultados similares a los que se obtienen con ácidos fuertes. Este se pudo observar en experimentos preliminares donde se utilizaron excesos menores a 20% por encima de lo requerido estequiométricamente y se obtuvo una desmineralización incompleta de 73%.

Recuperación del Lactato de Calcio

Para establecer un proceso de recuperación del lactato de calcio se realizó una revisión bibliográfica de procesos de formación de cristales del lactato de calcio. Kubantseva et al. (2004) reportaron la influencia de las bajas temperaturas y largos tiempos de almacenamiento sobre la formación de cristales de lactato de calcio en quesos. Li et al. (2009) utilizaron etanol al 50% para ayudar a la precipitación de los cristales de lactato de calcio, ya que este es insoluble en etanol. Mimouni et al. (2007) mencionaron que se requieren concentraciones supersaturadas de lactato de calcio para iniciar el proceso de cristalización, nucleación y crecimiento de los cristales. Con base en lo antes mencionado, se identificó la concentración del lactato de calcio, la temperatura y el tiempo como factores importantes en la formación y crecimiento de los cristales de lactato de calcio.

Se logró estandarizar la técnica de recuperación del lactato de calcio del sobrenadante de la desmineralización. El procedimiento se esquematiza en la Figura 10 y se describe a continuación. El sobrenadante de la etapa de

desmineralización se pasó por una filtración al vacío utilizando un papel filtro Whatman No. 4. Después se calentó a 100 °C hasta tener una concentración aproximada de 100 mg/mL. Posteriormente se dejó reposar a 4 °C durante 72 h; transcurrido este tiempo se observó la formación de los cristales de lactato de calcio. Estos cristales se lavaron con etanol al 50% y se pusieron a secar a 60 °C durante 12 h.

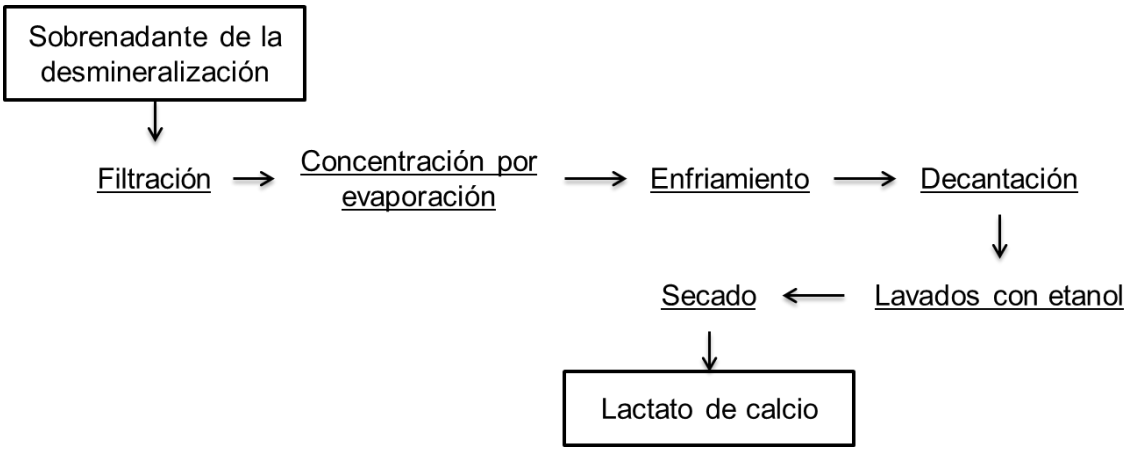

Figura 10. Proceso de recuperación del lactato de calcio contenido en el sobrenadante de la desmineralización.

El rendimiento de la recuperación del lactato de calcio proveniente de la desmineralización del caparazón de jaiba con ácido láctico fue del 75.5% peso seco. Este rendimiento no ha sido reportado anteriormente, Mahmoud et al. (2007) en su estudio de desmineralización de exoesuqleto de camarón con ácido láctico mencionaron la producción de lactato de calcio durante esta etapa. Sin embargo, no realizaron la recuperación y análisis de lactato de calcio.

Identificación y caracterización del lactato de calcio

Para la identificación del lactato de calcio obtenido se realizó un espectro de infrarrojo que se muestra en la Figura 11. En el espectro se muestra las bandas de absorción características del lactato de calcio. Además se compara con un espectro de lactato de calcio comercial marca Sigma Aldrich, observándose similitud de las bandas características de la molécula.

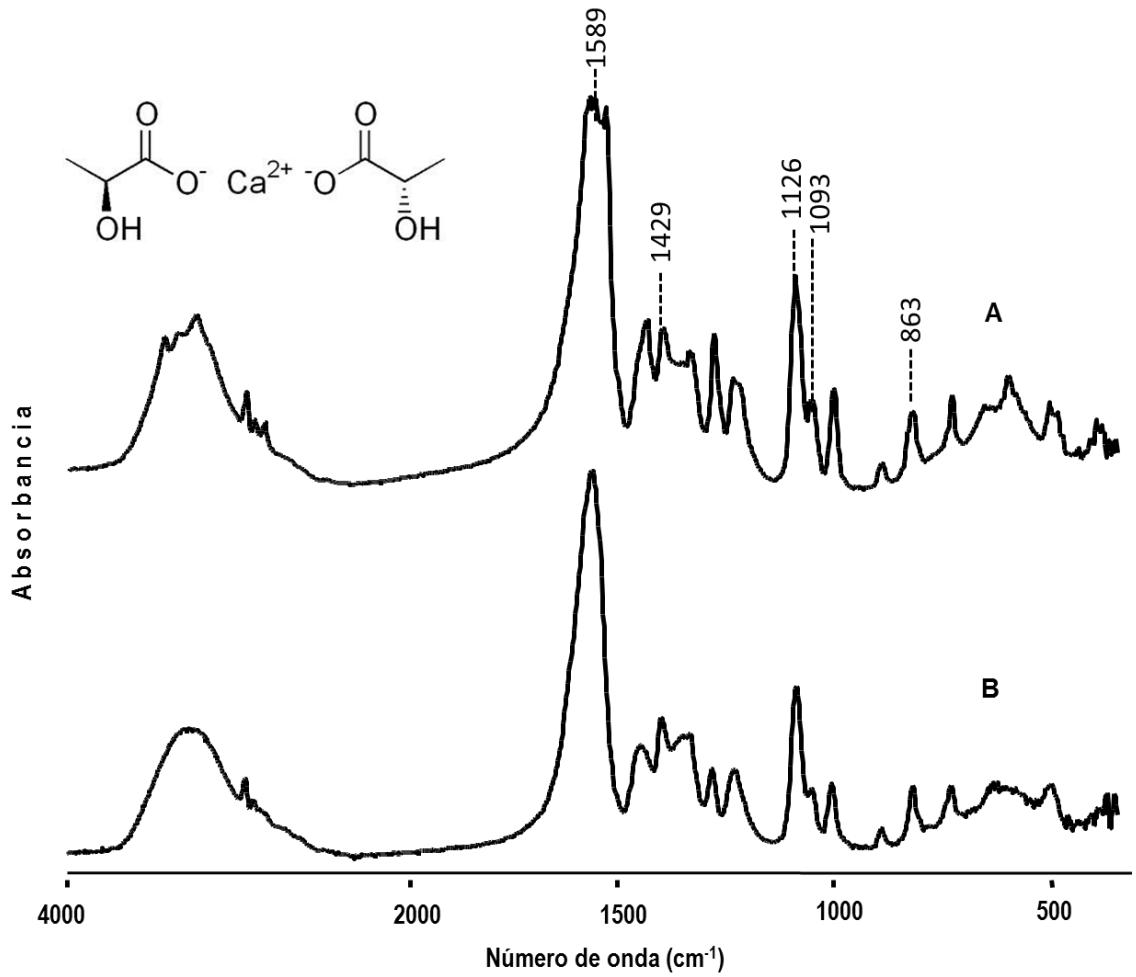

Figura 11. Espectro de infrarrojo del lactato de calcio deshidratado obtenido.(A) Lactato de calcio comercial marca Sigma Aldrich. (B) Lactato de calcio producido.

Las vibraciones de estiramiento de los enlaces de CO_2^- simétrico y asimétrico fueron observadas a 1589 y 1429 cm^{-1} respectivamente. Asimismo, el espectro de infrarrojo mostró dos bandas asignadas al enlace C-O al 1126 y 1093 cm^{-1}. Otra banda característica del grupo carbonilo fue observada a los 863 cm^{-1} en el espectro (Cassanas et al., 1991). Estas mismas bandas fueron reportadas por Ye-Kyung y Soon-Dong (2003) en un espectro de infrarrojo de lactato de calcio preparado mediante el tratamiento de cenizas de caracol con ácido láctico.

Determinación de calcio

El contenido de calcio en el lactato de calcio fue de 18.8% (p/p). El lactato de calcio [$(CH_3CHOH)_2Ca$] contiene una molécula de calcio y dos de ácido láctico , lo que corresponde a un peso molecular de 218.22 de los cuales 18.36% (p/p) corresponden al calcio. Ye-Kyung y Soon-Dong (2003) obtuvieron lactato de calcio a partir de una desmineralización de caracol con ácido láctico. Recuperaron el lactato de calcio del sobrenadante evaporando completamente el agua por calentamiento. El contenido de calcio en este lactato de calcio fue de 17.3 % (p/p). Estos resultados nos sugieren que el lactato de calcio producido por precipitación tiende a ser más puro comparado con el producido por evaporación. Esto se debe a que durante la evaporación no solo se concentra el lactato de calcio, sino que también el resto de los componentes presentes. Y durante la precipitación se propician las condiciones para que sea el lactato de calcio el que forme cristales y poderlos recuperar y lavar.

Los resultados del análisis proximal del lactato de calcio son los siguientes: 21.5% de humedad remanente, 26.3% de materia inorgánica, 2% de grasas y 0% de nitrógeno total. Podemos observar que durante el proceso de recuperación del lactato de calcio se recuperó también un porcentaje de grasa. Esto puede deberse a que durante la formación de los cristales de lactato de calcio, las condiciones de concentración y bajas temperaturas podrían estar propiciando la formación de estructuras cristalinas de los ácidos grasos en fase sólida (Gunstone, 1996).

Identificación y Caracterización de la Quitina

Se realizó una comparación de las características fisicoquímicas de la quitina producida mediante la desmineralización con ácido láctico (Quitina-L) y de la quitina producida por el método convencional (Quitina-C). Todo esto, para evaluar el efecto de las condiciones de desmineralización con ácido láctico sobre la quitina obtenida.

Identificación química por FTIR

Las quitinas obtenidas fueron identificadas por FTIR observando las bandas características de la molécula. En la Figura 12 se muestra el espectro de la Quitina-C y la Quitina-L. Se pueden apreciar las bandas características de un espectro de IR típico, a 3450 cm^{-1} el grupo -OH, a 2919 el grupo C-H, a 1655 cm^{-1} Amida I, a 1313 cm^{-1} la Amida III, a 1580 cm^{-1} Amida II, a 1154 cm^{-1} tensión asimétrica del puente C-O-C y a 1080 y 1032 cm^{-1} las vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranosa (Pastor de Abram et al., 2004).

Grado de acetilación

Para la determinación del GA se utilizaron las bandas de absorción en infrarrojo centradas a 1420 y 1310 cm^{-1} según a metodología descrita por Brugnerotto et al. (2001). El GA es el parámetro más importante para establecer la identidad química entre quitina y quitosano. De acuerdo al análisis de GA resultó que ambas quitinas están casi completamente acetiladas. Los resultados obtenidos concuerdan con Percot et al. (2003), quienes obtuvieron quitinas con GA de 99 ± 2 % en tiempos de reacción de 3 horas y una relación sólido a líquido de 1:40. En dicho estudio la desmineralización se llevó a cabo con ácido clorhídrico en condiciones diluidas (0.25 M). La mayoría de los estudios de desmineralización con ácidos orgánicos se han enfocado en estudiar la eficiencia de desmineralización; por lo que no se encontraron reportes sobre como se ve afectada la calidad de la quitina por el tratamiento aplicado.

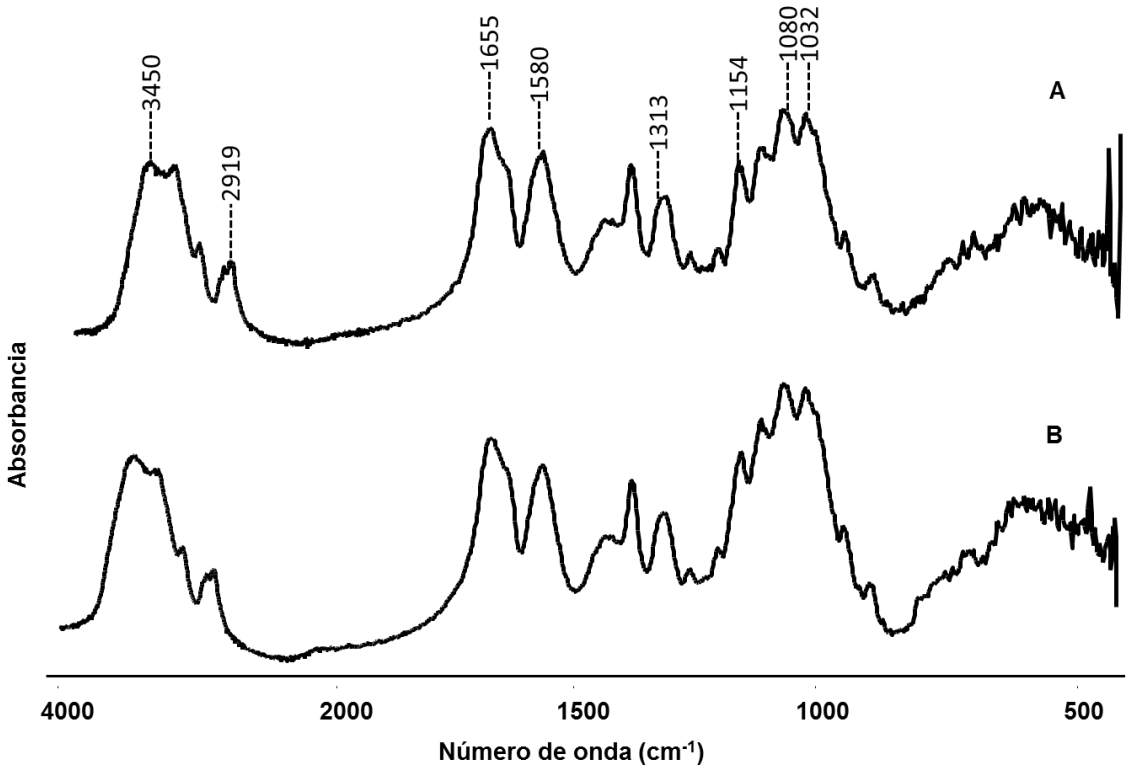

Figura 12. Espectros de infrarrojo de las distintas muestras de quitina. (A) Quitina-C y (B) Quitina-L.

Peso molecular

El la Tabla 7 se presenta el peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) de las quitinas obtenidas. Podemos observar que la quitina obtenida por el método termoquímico tiene un mayor peso molecular que la quitina obtenida con una desmineralización con ácido láctico. Las Quitina-C se encuentran dentro del rango de M_v reportado por Einbu et al. (2004) quienes obtuvieron quitinas con un M_v de 1×10^5 a 1.2×10^6 ($gmol^{-1}$); Sin embargo, la Quitina-L se encuentra por debajo de estos valores. Percot et al. (2003) mencionaron que tiempos de reacción mayores a 3 horas pueden ocasionar una despolimerización parcial en la quitina, incluso en condiciones diluidas. Tal es el caso de la Quitina-L durante su desmineralización el tiempo de reacción es de casi el doble que del método termoquímico.

Tabla 7. Grado de acetilación y peso molecular viscosimétrico de las quitinas obtenidas.

Muestra	GA FTIR (%)	Mv ($gmol^{-1}$)
Quitina-C	100	6.24×10^5
Quitina-L	100	5.49×10^4

Análisis proximal

La composición química del exoesqueleto de jaiba y de los productos se muestra en la Tabla 10. Se puede apreciar que el contenido de material inorgánico entre la Quitina-C y la Quitina-L es similar, esto sugiere que la desmineralización con ácido láctico es efectiva. El contenido de proteína y lípidos fue mayor en la Quitina-L, esto se ve reflejado en la estimación del contenido de quitina, donde la Quitina-C tuvo 98.85 % y la Quitina-L 90.89 %. Beaney et al. (2005) coinciden con este resultado, reportaron a la quitina obtenida por el método convencional con mayor pureza comparada con una quitina obtenida por un método biotecnológico.

Tabla 8. Composición química del exoesqueleto de jaiba y productos.

Muestra	Humedad remanente (%)	Proteína (%)	Quitina (%)	Material inorgánico (%)	Lípidos (%)
Exoesqueleto de jaiba	3.5 ± 0.0	1.57*	--	45.8 ± 2.1	2.9 ± 0.1
Quitina-C	1.3 ± 0.1	0.0	98.85	0.82 ± 0.06	2.4 ± 0.1
Quitina-L	1.7 ± 0.2	1.16	90.89	0.85 ± 0.13	5.41

*Porcentaje de nitrógeno total.

CONCLUSIONES

Se logró recuperar el lactato de calcio producido durante la desmineralización en el proceso de aislamiento de quitina a partir de exoesqueleto de jaiba. La quitina obtenida por este método, Quitina-L, presenta impurezas que la hacen de menor calidad comparada con la quitina obtenida por el método termoquímico, Quitina-C. Sin embargo, el proceso de obtención de la Quitina-L propuesto en este trabajo representa una tecnología amigable con el medio ambiente, ya que reduce en parte la generación de residuos durante la etapa de desmineralización. Además, la producción de lactato de calcio en esta misma etapa da un valor agregado al proceso. Por otra parte, las condiciones de desmineralización podrían modificarse en próximas investigaciones, con el fin de no afectar las características fisicoquímicas de la quitina.

PERSPECTIVAS

Para la obtención de quitina y producción de lactato de calcio de exoesqueleto de jaiba en un mismo proceso, se propone el siguiente esquema metodológico que se muestra en la Figura 13. En este se puede observar la incorporación de la producción de lactato de calcio al proceso de aislamiento de quitina. Podemos resaltar que el exceso de 220% de ácido láctico que se utiliza para la desmineralización puede ser recirculado al incorporarlo al proceso de purificación inicial, como se muestra en le Figura 13.

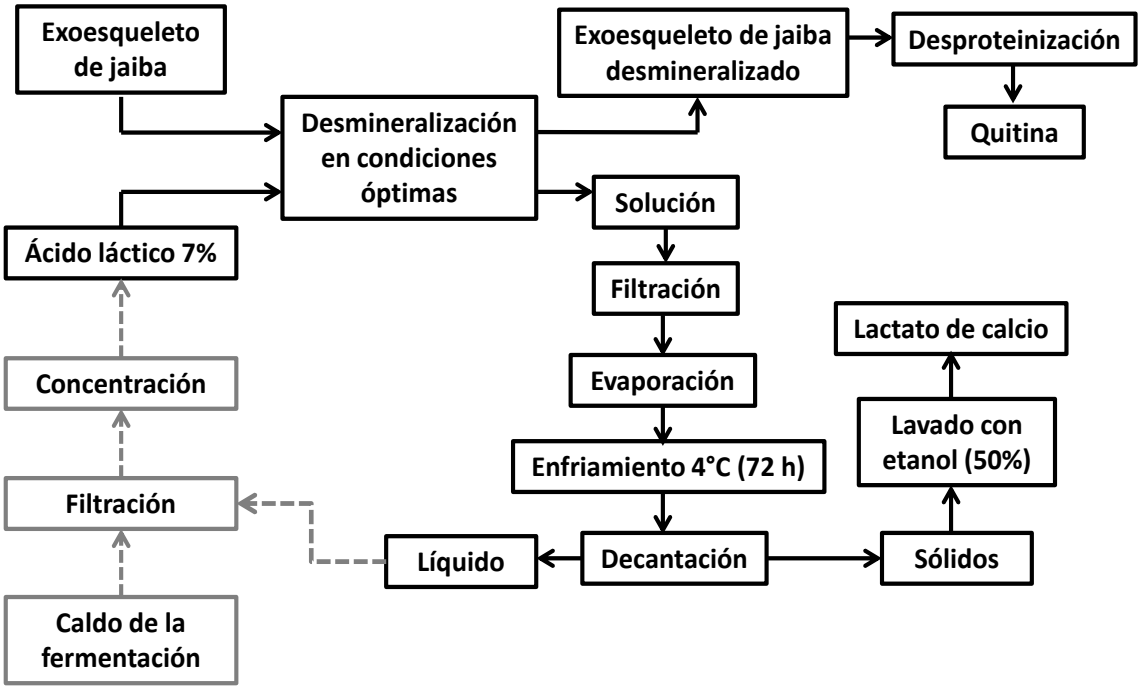

Figura 13. Esquema general del proceso de producción de lactato de calcio durante el aislamiento de quitina.

En este trabajo se propone utilizar ácido láctico producido a partir de otro tipo de residuos como es el caso del suero de leche o la remolacha azucarera (línea gris). Estos residuos ya han sido utilizados como sustrato para la producción de ácido láctico en otros estudios (Urribarrí et al., 2004; Serna y Rodriguez, 2005). En este trabajo se probó la utilización de ácido láctico contenido en un caldo residual de una fermentación proveniente de la producción de biomasa de *Lactoacillus casei*. Inicialmente el caldo contenía 2.9% de ácido láctico y se concentró hasta 7% para trabajar bajo las condiciones óptimas establecidas. Se logró una desmineralización de 98.4%, este resultado esta por encima de lo reportado en otros estudios donde se utilizaron métodos biotecnológicos o biológicos (Ghorbel-Bellaaj et al., 2011; Jung et al., 2007).

Sin embargo, en la siguiente etapa del proceso, en la cual el sobrenadante de la desmineralización se concentra para la recuperación del lactato de calcio no fue posible. Debido a que durante esta también se concentraron el resto de los componentes, pudiendo ser sustrato no aprovechado por el microrganismo, principalmente glucosa. Esto es un preliminar que da pie a nuevas investigaciones para producir ácido láctico a partir de residuos, implementando técnicas efectivas de purificación.

REFERENCIAS

Alandes L, Pérez-Munuera I, Llorca E, Quiles A, Hernando I. Use of calcium lactate to improve structure of “Flor de Invierno” fresh-cut pears. Postharvest Biology and Technology 2009; 53: 145-151.

Aran N. The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of Bacillus cereus and Clostridium perfringens in a “sous-vide” beef goulash under temperature abuse. International Journal of Food Microbiology 2001; 63: 117-123.

Aranaz I, Harris R. Functional characterization of chitin and chitosan. Current Chemical Biology 2009; 3: 203-230.

Baş D, Boyacı İH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology [Internet]. Journal of Food Engineering 2007; 78: 836-845.Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405007843

Beaney P, Lizardi-Mendoza J, Healy M. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 2005; 80: 145-150.

Beaulieu L, Thibodeau J, Bryl P, Carbonneau M-E. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (Chionoecetes opilio) by-product fractions: a source of high-valued biomolecules. Bioresource technology 2009; 100: 3332-42.

Bhaskar N, Suresh PV, Sakhare PZ, Sachindra NM. Shrimp biowaste fermentation with Pediococcus acidolactici CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. Enzyme and Microbial Technology 2007; 40: 1427-1434.

Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F, Argüelles-Monal WM, Desbrières J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer 2001; 42: 3569-3580.

Brük WM, Slater JW, Carney BF. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. 1st ed. Taylor & Francis Group; 2011.

CONAPESCA. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. Mexico: 2010.

Cassanas G, Morssli M, Fabrègue E, Bardet L. Vibrational Spectra of Lactic Acid and Lactates. Journal of Raman Spectroscopy 1991; 22: 409-413.

Chang KLB, Tsai G. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (Solenocera melantho) shell waste. Journal of agricultural and food chemistry 1997; 45: 1900-1904.

Choorit W, Patthanamanee W, Manurakchinakorn S. Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. Bioresource technology 2008; 99: 6168-73.

Cira L a, Huerta S, Hall GM, Shirai K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry 2002; 37: 1359-1366.

Daengprok W, Garnjanagoonchorn W, Mine Y. Fermented pork sausage fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. Meat Science 2002; 62: 199-204.

Das S, Ganesh AE. Extraction of chitin from trash crabs (Podophthalmus vigil) by an eccentric method. Current Research Journal of Biological Sciences 2010; 2: 72-75.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications [Internet]. Progress in Polymer Science 2011; 36: 981-1014.[cited 2012 Jul 20] Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967001100027X

Dutta P, Dutta J, Tripathi V. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications [Internet]. Journal of Scientific and Industrial … 2004; 63: 20-31.[cited 2012 Sep 7] Available from: http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5397

Díaz-Rojas EI, Argüelles-Monal WM, Higuera-Ciapara I, Hernández J, Lizardi-Mendoza J, Goycoolea FM. Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. Macromolecular bioscience 2006; 6: 340-7.

Ehrlich H, Koutsoukos PG, Demadis KD, Pokrovsky OS. Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part II. Decalcification. Micron (Oxford, England : 1993) 2009; 40: 169-93.

Einbu A, Naess SN, Elgsaeter A, Vårum KM. Solution properties of chitin in alkali. Biomacromolecules 2004; 5: 2048-54.

Einbu A, Vårum KM. Depolymerization and De-N-acetylation of Chitin Oligomers in Hydrochloric Acid. Biomacromolecules 2007; 8: 309-314.

Flores R, Barrera-Rodríguez S, Shirai K, Durán-de-Bazúa C. Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry. Journal of Applied Polymer Science 2007; 104: 3909-3916.

Gao M-T, Hirata M, Toorisaka E, Hano T. Development of a fermentation process for production of calcium-l-lactate. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2009; 48: 464-469.

Ghorbel-Bellaaj O, Hmidet N, Jellouli K, Younes I, Maâlej H, Hachicha R, et al. Shrimp waste fermentation with Pseudomonas aeruginosa A2: optimization of chitin extraction conditions through Plackett-Burman and response surface methodology approaches. International journal of biological macromolecules 2011; 48: 596-602.

Guan X, Yao H. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. Food Chemistry 2008; 106: 345-351.

Guinesi LS, Cavalheiro ÉTG. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples [Internet]. Thermochimica Acta 2006; 444: 128-133.[cited 2012 Jul 25] Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603106001638

Gunstone FD. Fatty Acid and Lipid Chemistry. 1st ed. UK: Blackie academic and professional; 1996.

Gyung-Hyun J, Ro-Dong P, Woo-Jin J. Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste. In: Se-Kwon K, editor(s). Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives. CRC Press; 2011. p. 37-43.

Gómez-López VM, Orsolani L, Martínez-Yépez A, Tapia MS. Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. LWT - Food Science and Technology 2010; 43: 808-813.

Igoe RS. Dictionary of Food Ingredients. 5th ed. Springer; 2011.

Islam MS, Khan S, Tanaka M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. Marine pollution bulletin 2004; 49: 103-10.

Isogawa D, Kuroda K, Ueda M. Challenge of conversion of waste crab shells to functional materials with bioactivities. Journal of Bioscience and Bioengineering 2009; 108: S52.

Jara-Marini ME, Soto-Jiménez MF, Páez-Osuna F. Trophic relationships and transference of cadmium, copper, lead and zinc in a subtropical coastal lagoon food web from SE Gulf of California. Chemosphere 2009; 77: 1366-1373.

Jung WJ, Jo GH, Kuk JH, Kim YJ, Oh KT, Park RD. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with Lactobacillus paracasei KCTC-3074 and Serratia marcescens FS-3. Carbohydrate Polymers 2007; 68: 746-750.

Kim S-K, Mendis E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. Food Research International 2006; 39: 383-393.

Kubantseva N, Hartel RW, Swearingen P a. Factors affecting solubility of calcium lactate in aqueous solutions. Journal of dairy science 2004; 87: 863-7.

Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers 2000; 46: 1-27.

Kumirska J, Weinhold MX, Thöming J, Stepnowski P. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. Polymers 2011; 3: 1875-1901.

Li Z, Zhang Y, Tan T. Preparation of edible nano calcium lactate crystal from crude l-lactic acid via chemical precipitation method. Journal of Bioscience and Bioengineering 2009; 108: S138.

Luna-Guzmán I, Barrett DM. Comparison of calcium chloride and calcium lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes. Postharvest Biology and Technology 2000; 19: 61-72.

Mahmoud NS, Ghaly AE, Arab F. Unconventional Approach for Demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitin Production. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2007; 3: 1-9.

Mimouni a, Bouhallab S, Famelart MH, Naegele D, Schuck P. The formation of calcium lactate crystals is responsible for concentrated acid whey thickening. Journal of dairy science 2007; 90: 57-65.

Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. 2da ed. Limusa Wiley; 2005.

Muzzarelli RA, Stanic V, Ramos V. Enzymatic Depolymerization of Chitins and Chitosans. 1999; 10

Oh K-T, Kim Y-J, Nguyen N, Jung W-J, Park R-D. Effect of crab shell size on bio-demineralization with lactic acid-producing bacterium, Lactobacillus paracasei subsp. tolerans KCTC-3074. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2008; 13: 566-570.

O'Keefe DM, Owens JM, Chynoweth DP. Anaerobic composting of crab-picking wastes for byproduct recovery. Bioresource technology 1996; 58: 265-272.

Pastor de Abram A, Agulló E, Mato R, Peniche C, Tapia C, Heras Á, et al. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. 1st ed. Pontifica Universidad Católica del Perú; 2004.

Patwardhan UN, Pahuja DN, Samuel AM. Calcium bioavailability: an in vivo assessment. Nutrition Research 2001; 21: 667-675.

Penman ID, Liang QL, Bode J, Eastwood MA, Arends MJ. Dietary calcium supplementation increases apoptosis in the distal murine colonic epithelium. Journal of Clinical Pathology 2000; 53: 302-307.

Percot A, Viton C, Domard A. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. Biomacromolecules 2003; 4: 12-18.

Qin Y, Lu X, Sun N, Rogers RD. Dissolution or extraction of crustacean shells using ionic liquids to obtain high molecular weight purified chitin and direct production of chitin films and fibers. Green Chem. 2010; 12: 968-971.

Raabe D, Sachs C, Romano P. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. Acta Materialia 2005; 53: 4281-4292.

Ranhotra GS, Gelroth JA, Leinen SD, Rao A. Bioavailability of calcium in a high calcium whey fraction. Nutrition Research 1997; 17: 1663-1670.

Rico D, Martín-Diana AB, Frías JM, Barat JM, Henehan GTM, Barry-Ryan C. Improvement in texture using calcium lactate and heat-shock treatments for stored ready-to-eat carrots. Journal of Food Engineering 2007; 79: 1196-1206.

Serna L, Rodriguez A. Producción biotecnológica de acido láctico: estado del arte. Ciencia y tecnología alimentaria 2005; 5: 54-65.

Singh G, Arora S, Sharma GS, Sindhu JS, Kansal VK, Sangwan RB. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. LWT - Food Science and Technology 2007; 40: 625-631.

Tetteh AY. Optimization studies on chitin extraction from crustacean solid wastes. Time 1991

Tsaih ML, Chen RH. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. Journal of Applied Polymer Science 2003; 88: 2917-2923.

Urribarrí L, Vielma A, Paéz G, Ferrer J, Mármol Z. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche , utilizando lactobacillus helveticus en cultivo continuo. Revista científica, FCV-LUZ 2004; XIV: 297-302.

Velugoti PR, Rajagopal L, Juneja V, Thippareddi H. Use of calcium, potassium, and sodium lactates to control germination and outgrowth of Clostridium perfringens spores during chilling of injected pork. Food Microbiology 2007; 24: 687-694.

Viñas-Salas J, Biendicho-Palau P, Piñol-Felis C, Miguelsanz-Garcia S, Perez-Holanda S. Calcium inhibits colon carcinogenesis in an experimental model in the rat. European Journal of Cancer 1998; 34: 1941-1945.

Wang S-L, Liang T-W, Yen Y-H. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. Carbohydrate Polymers 2011; 84: 732-742.

Woo-Jin J, Gyung-Hyun J, Ju-Hee K, Kil-Yong K, Ro-Dong P. Demineralization of red crab shell by chemical and biological treatments. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2005; 10: 67-72.

Xie H, Zhang S, Li S. Chitin and chitosan dissolved in ionic liquids as reversible sorbents of CO2. Green Chem. 2006; 8: 630-633.

Ye C-L, Jiang C-J. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Plantago asiatica L. by response surface methodology. Carbohydrate Polymers 2011; 84: 495-502.

Yen M-T, Yang J-H, Mau J-L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. Carbohydrate Polymers 2009; 75: 15-21.

Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Yoshioka M, Snauwaert J, Abe Y, et al. Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. Journal of dental research 2001; 80: 1565-9.

Yoshioka M, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Vanherle G, Nomura Y, et al. Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. Journal of biomedical materials research 2002; 59: 56-62.

Youn DK, No HK, Prinyawiwatkul W. Physicochemical and functional properties of chitosans prepared from shells of crabs harvested in three different years. Carbohydrate Polymers 2009; 78: 41-45.

Yuk H-G, Jo S-C, Seo H-K, Park S-M, Lee S-C. Effect of storage in juice with or without pulp and/or calcium lactate on the subsequent survival of Escherichia coli O157:H7 in simulated gastric fluid. International Journal of Food Microbiology 2008; 123: 198-203.