

Métodos de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón

*Araceli Pinelli Saavedra, Alma Rosa Toledo Guillén, Ingrid Rebeca Esquerro Brauer, Alma Rosa Luviano Silva,
Inocencio Higuera Ciapara*

Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México

RESUMEN. Los desechos de cáscara de camarón procedentes de las plantas congeladoras de Guaymas Sonora, Mex., fueron estudiadas como fuente de biopolímeros de quitina de alto valor agregado. En la Parte I, se estudió el efecto de las diferentes condiciones de aislamiento de la quitina y las características químicas. La proteína y materia mineral fueron eliminados con tratamiento álcali y ácido respectivamente.

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2x3 para evaluar el efecto de las variables de proceso. Fueron utilizadas concentraciones de 0.4% y 2% de NaOH durante la desproteínización, HCl en concentraciones de 3% y 5% a temperaturas de 40, 50 y 60°C durante la desmineralización. En base al contenido de cenizas, quitina y rendimiento de quitina, las mejores condiciones de proceso de desproteínización fueron NaOH al 2%, y desmineralización con HCl al 5% a 50°C.

En la Parte II, se evaluaron los mejores métodos de aislamiento de quitina y quitosano reportados en la literatura, así como el mejor de aquellos usados en la parte I, para un escalamiento a planta piloto. La pureza de las muestras de quitina fueron analizadas en términos de contenido de proteína residual, cenizas y quitina. Dos procesos fueron establecidos para producir quitina de alta calidad (0,00% proteína, 0,01% cenizas, 99,99% quitina), y quitina de grado práctico (0,00% proteína, 0,09% cenizas, 99,13% quitina).

Ambos productos fueron considerados aceptables y su producción podría ser a escala piloto siempre y cuando se optimicen las condiciones de proceso.

Palabras clave: Cáscara de camarón, biopolímeros, desproteínización, desmineralización.

SUMMARY. Shrimp shell waste as a source of chitin biopolymers. Shrimp shell waste obtained from several industrial freezing-purchasing plants of Guaymas, Sonora, Méx., was studied as a source of value-added chitin biopolymers. In part I, the effect of different isolation conditions on the chitin yield and chemical characteristic, was investigated. Protein and mineral matter were removed with alkali and acid treatment respectively.

A 2x2x3 factorial a way of a completely randomized design was used in order to evaluate the effect of the process variables, namely, NaOH concentration (0.4 and 2%) during the deproteinization and HCl concentration (3 and 5%) carried out at 40, 50 and 60°C. The best processing conditions were desproteinization with 2% NaOH, and demineralization with 5% HCl at 50°C, in terms of final ash and chitin content and yield.

In part II, a selection of methods of isolation of chitin and chitosan was studied in order to establish the best conditions for scaling up a process to pilot plant level. The processing conditions were selected from reported methods as well as from those defined in part I. Purity of chitin samples was determined in terms of residual protein, ash and chitin each one to produce high quality chitin (0,00% protein, 0,01% ash, 99,99% chitin) and standard grade chitin (0,00% protein, 0,09% ash, 99,13% chitin).

Both products were considered as of adequate quality and their manufacture process could be scaled up by further optimization of the processing conditions.

Key words: Shrimp shell, biopolymers, deproteinization, demineralization.

INTRODUCCION

La quitina es el polisacárido natural más abundante en la naturaleza que contiene aminoazúcares, y está asociado con proteínas y minerales. En la actualidad este biopolímero se obtiene industrialmente aislándolo de desperdicios generados en el procesamiento de crustáceos, tales como caparazones de camarón y jaiba (1).

En México, el camarón proveniente del litoral del Pacífico se exporta en parte en la categoría pelado-desvenado, lo que genera una cantidad considerable de cáscara que es desechada, la cual contiene cantidades significativas de quitina que con un método y tecnología apropiada podría utilizarse con buenos resultados.

La quitina es un biopolímero de cadena larga constituido por unidades de N-acetilglucosamina, unida por enlaces β -1-4 y junto con su derivado deacetilado más importante quitosano, constituyen parte de la dieta alimenticia. Ambos están contenidos en mariscos, champiñones, levaduras y algunos quesos, por lo que se cree que estos polímero no son tóxicos. Recientemente se ha descubierto que además ofrecen una gran variedad de aplicaciones potenciales en la industria de los alimentos, y otras basadas en sus propiedades catiónicas, biológicas y químicas (2).

El propósito del presente trabajo fue estudiar la influencia de diversas condiciones de extracción sobre el rendimiento y características químicas de quitina de pureza relativamente alta (grado práctico), a partir de cáscara de camarón (*Penaeus*

sp), además de estandarizar metodologías reportadas en la literatura con la finalidad de establecer un proceso de producción para la obtención de quitina (grado práctico y alta calidad) a nivel piloto. Esto, ante la necesidad de incrementar la competitividad de la industria camaronesa nacional y dado el creciente número de aplicaciones que se han ido encontrando a estos biopolímeros en el mundo actual.

MATERIALES Y METODOS

Una muestra de cáscara de camarón del género *Penaeus*, proveniente de la operación pelado-desvenado, realizada en plantas congeladoras del Puerto de Guaymas, Sonora, México, se utilizó como materia prima en estos estudios. La cáscara se trató térmicamente a 80°C por 30 minutos con la finalidad de inactivar enzimas hidrolíticas. Posteriormente se secó en un secador túnel Proctor & Schwartz modelo K16978 durante 18 horas a 70°C y se molió en un molino de martillo Wiley modelo 4 con tamaño de partícula 200 micras.

Se han reportado varios procedimientos para la extracción de quitina de origen marino (2-3). En el tratamiento químico, la proteína, el carbonato de calcio y la quitina pueden separarse y procesarse en distintas etapas, en las que se utilizan soluciones cáusticas para eliminar proteínas seguidas de ácidos para remover la materia mineral.

Este trabajo se llevó a cabo en dos partes, las cuales se describen a continuación:

Parte I

Desproteínización. A la cáscara seca se le extrajo la proteína utilizando una solución de NaOH al 0,4% y 2%, con una relación soluto: solvente de 1:7. Se mezcló con un agitador magnético a una temperatura de 60°C (± 1) durante 60 minutos, filtrándose y lavándose después con agua destilada hasta eliminar el NaOH (pH 7,0-7,5).

Desmineralización. Para remover la materia mineral presente en la cáscara se agregó HCl al 3% y 5% y se sometió a un tratamiento térmico por 120 minutos, a 40, 50 y 60°C. Posteriormente se hicieron varios lavados hasta eliminar el ácido y después se secó en una estufa de convección VWR modelo 1430, a 50°C por 18 horas.

Caracterización de Quitina. En todas las muestras obtenidas se llevaron a cabo determinaciones del contenido de quitina por el método de Black & Schwartz (4) y del porcentaje de cenizas por un período de 6 horas a 900°C en un mufla (5). El rendimiento de quitina para cada corrida se calculó de acuerdo a la relación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Quitina obtenida (g)}}{\text{Quitina disponible en muestra original (g)}} \times 100$$

donde:

Quitina obtenida = (g quitina base seca) (% quitina determinada)

Quitina disponible = (g de cáscara) (0.39)*

*0.39 valor potencial de quitina en caparazones de mariscos (6).

El rendimiento se utilizó como una medida de eficiencia del proceso, ya que relaciona tanto la cantidad de quitina como de pureza en términos de materia mineral residual.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 concentraciones de NaOH x 2 concentraciones de HCl x 3 temperaturas) con dos repeticiones por celda, los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza (7).

Parte II

En la literatura publicada no se da una secuencia detallada del proceso de extracción de quitina con tiempos, temperaturas o relaciones soluto-solventes. Además, la información es de carácter general y aplicada a desperdicios de otros crustáceos, no se enfoca a camarón azul (*Penaeus stylirostris*) o café (*Penaeus californiensis*). Por lo anterior, se requirió probar ciertas variables de proceso, con el objeto de estandarizar las técnicas elegidas y la resultante en la Parte I, para así establecer un proceso de producción en planta piloto considerando dos grados de pureza, uno práctico y otro de alta calidad.

La desmineralización con ácido sulfuroso, empleada por Johnson y Peniston (8), es económicamente atractiva sólo en operaciones comerciales muy grandes, pues su principal ventaja la constituye un sistema de recirculación bastante costoso. Para operaciones comerciales de pequeña y mediana escala el HCl sigue siendo la única opción viable.

Con el propósito de eliminar el carbonato de calcio y sales inorgánicas presentes y proteínas se prefiere un procedimiento que incluye una etapa de desmineralización con HCl seguida de desproteínización con NaOH, y no el proceso combinado en el que se desmineraliza con EDTA y se desproteíniza con bacterias (9). Whistler (10) indicó que la desproteínización con álcali puede usarse y se prefiere cuando el producto final es quitosano. Basados en estos criterios se escogieron las extracciones que emplean soluciones acuosas de NaOH y HCl.

En todos los experimentos se desproteínizó antes de desmineralizar, con la ventaja de así maximizar el uso benéfico del álcali para mejorar el rendimiento y la calidad, así como para evitar la contaminación de proteína presente en los efluentes de la desmineralización (8).

En la etapa de decoloración se evaluó el uso de etanol en vez de peróxido de hidrógeno, de acuerdo a la técnica de Whistler (10, para la cual se hizo una comparación hedónica en aspecto y calidad, de las quitinas obtenidas con el peróxido de hidrógeno sugerido).

En la Tabla 1 se presentan las condiciones de extracción seguidas en la Parte II del trabajo de laboratorio.

TABLA 1
Condiciones de extracción seguidas en la parte II del trabajo de laboratorio

	Desproteínización	Desmineralización	Decoloración
T1 ^a	1 Tratamiento NaOH al 2% (1:7) ^d , t=1 hora T=60°C	1 Tratamiento HCl al 5% (1:7) ^d , t=2 horas T=50°C	1 Tratamiento H ₂ O ₂ al 3% (1:7) ^d , t=48 horas
W1 ^b	3 Tratamientos NaOH al 5% (1:7) ^d , t=30-45 min T=85-90°C	1 Tratamiento HCl al 5% (1:7) ^d , t=24 horas	1 Tratamiento H ₂ O ₂ al 3% (1:7) ^d , t=20 horas
W2 ^b	3 Tratamientos NaOH al 5% (1:7) ^d , t=30-45 min T=85-90°C	1 Tratamiento HCl al 5% (1:7) ^d , t=24 horas	2 Tratamientos C ₂ H ₅ OH al 95% (1:42) ^d , t ₁ =4 h. t ₂ =2 horas
W3 ^b	3 Tratamientos NaOH al 5% (1:6) ^d , (1:4) ^d , (1:4) ^d t=30-45 min T=85-90°C	1 Tratamiento HCl al 5% (1:7) ^d , t=24 horas	1 Tratamiento H ₂ O ₂ al 5% (1:10) ^d , t=6 horas
A1 ^c	2 Tratamientos NaOH 1N (1:50) ^d , t ₁ =6 horas t ₂ =30 horas, T=60°C	2 Tratamientos HCl 2N (1:50) ^d , t=24 horas	1 Tratamiento C ₂ H ₅ OH al 95% (1:42) ^d , t=6 horas
A2 ^c	2 Tratamientos NaOH 1N (1:50) ^d , t ₁ =6 horas t ₂ =30 horas, T=53°C	2 Tratamientos HCl 2N (1:50) ^d , t=24 horas	1 Tratamiento C ₂ H ₅ OH al 95% (1:42) ^d , t=6 horas

- a Modificación de la técnica establecida en la Parte I del Trabajo de Laboratorio (corrida 8).
b Modificación de la técnica de Whistler (1973).
c Modificación de la técnica de Shimahara et al. (1984).
d Relación soluto-solvente.

Caracterización química de quitina. Las quitinas aisladas se caracterizaron en términos de: contenido de proteína, conforme a la técnica de Takiguchi et al. (11), porcentaje de cenizas, de acuerdo a Rutherford et al. (12) y contenido de quitina según Naczky y Shahidi (13).

RESULTADOS Y DISCUSION

Parte I

Los resultados del aislamiento de quitina se analizaron por medio de un análisis de varianza. Para establecer las condiciones óptimas del aislamiento de quitina se consideraron el contenido de quitina, cenizas (materia mineral) y rendimiento como parámetros de calidad.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos de contenido de quitina, cenizas y rendimiento.

TABLA 2
Contenido de quitina, cenizas y rendimiento.
Parte I del trabajo de laboratorio

Corrida	HCl g/100	NaOH g/100	Temperatura °C	Quitina g/100	Cenizas g/100	Rendimien- to g/100
1	3	0,4	40	84,76	6,83	85
2	5	0,4	40	73,60	0,48	74
3	3	2	40	83,61	6,43	97
4	5	2	40	82,83	0,10	88
5	3	0,4	50	71,91	9,60	83
6	5	0,4	50	81,15	0,36	65
7	3	2	50	76,24	3,10	79
8	5	2	50	83,88	0,41	94
9	3	0,4	60	76,87	13,45	86
10	5	0,4	60	66,60	0,02	70
11	3	2	60	88,55	4,55	90
12	5	2	60	66,17	0,16	72

La corrida en negritas fue seleccionada como la mejor

Quitina. Los resultados para este parámetro mostraron que las tres variables estudiadas tienen un efecto significativo ($p < 0,001$) en el proceso sobre la cantidad final de quitina. La interacción % HCl-temperatura de desmineralización resultó significativa ($p < 0,001$); resultando que la combinación óptima es la concentración alta de HCl (5%) a temperatura de 50°C.

Cenizas. Para este parámetro los resultados indican que hay un efecto significativo ($p < 0,001$) para los tres factores, para las tres interacciones dobles y para la interacción triple (% HCl-% NaOH-temperatura de desmineralización) indicando esta última que no es posible analizar aisladamente ninguna de las variables. En este caso únicamente se pueden seleccionar las quitinas provenientes de aquellas corridas que minimizan el contenido final de cenizas, que es menor al 1%, como reporta la literatura (14). Los resultados muestran claramente que la concentración alta de HCl (5%) favorece la eliminación de materia mineral.

Rendimiento. Los resultados para este parámetro mostraron la misma tendencia que los anteriores, ya que la interacción triple (% HCl-% NaOH-temperatura de desmineralización) resultó altamente significativa ($p < 0,001$).

Al conjuntar los datos obtenidos en las 12 corridas experimentales con los tres parámetros evaluados (quitina, cenizas, rendimiento) para seleccionar las condiciones óptimas de aislamiento de quitina grado práctico, las corridas 2, 4 y 8, se eligieron como las mejores (Tabla 2). Sin embargo, la corrida 8 al presentar un mayor rendimiento (94%), un contenido relativamente bajo de materia mineral (0,41%) y un alto contenido de quitina (83,88%) resultó la más adecuada para

producir quitina de grado práctico a mayor escala.

Parte II

Los resultados obtenidos, que permiten evaluar la pureza de las muestras de quitina obtenidas y la eficiencia en las etapas de extracción, se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3
Caracterización de las quitinas extraídas.
Parte II del trabajo de laboratorio

Método	Proteína g/100	Cenizas g/100	Quitina g/100
T	2,3	0,4100	84,7912
W1	0,0	0,0949	99,1310
W2	0,0	13,4035	84,9789
W3	0,0	0,1397	99,0116
A1	0,0	0,0101	99,9936
A2	0,0	0,0199	99,8597

Las corridas en negritas fueron las seleccionadas.

En los datos presentados se observa que en la corrida A₁ se obtuvieron resultados altamente satisfactorios, ya que presentan un mayor grado de pureza (proteína 0,00%; cenizas 0,01% y quitina 99,99%) comparados con los otros tratamientos, por lo que se seleccionó esta metodología para un posterior procesamiento en planta piloto de quitina de alta calidad.

En cuanto a la producción de quitina de grado práctico, es importante considerar para elección de los procedimientos de extracción a nivel piloto, además de la calidad del producto final, los gastos de procesamiento en plantas; con este criterio se seleccionó la corrida W₃. Esta corrida como se muestra en la Tabla 1 requirió de una menor cantidad de NaOH, por utilizar un a relación soluto-solvente más baja que las restantes en la etapa de desproteinización y por presentar resultados satisfactorios.

Los resultados para la obtención de quitina de alta calidad de la extracción A₁ fueron superiores en calidad en cuanto a contenido de proteína (0,00%) y cenizas (0,001%) comparados con los resultados reportados por Shimahara y Takigushi (9) para proteína (0,00%) y cenizas (0,1%). Con respecto a la quitina grado práctico de la extracción W₃ se obtuvo igualmente un resultado superior con el contenido de proteína que fue de 0,14% comparado con lo reportado por Whistler (10), que fue de 0,4%-0,5% de proteína.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que las características logradas en las extracciones A₁ y W₃ resultaron satisfactorias, y puede intentarse partir de estas quitinas aisladas para obtener las de productos comerciales existentes, si una vez incorporadas a un

escalamiento, se llevan a cabo corridas experimentales para lograr su estandarización y características adicionales.

Es importante señalar que en un procesamiento en planta se debe tener especial cuidado en la recolección de la cáscara de camarón, ya que se descompone fácilmente. Es por ello que se sugiere que la cáscara de camarón sea tratada en las plantas congeladoras, para su posterior transporte o bien la recolección deberá hacerse en las primeras y últimas horas del día para minimizar la exposición a altas temperaturas de la cáscara de camarón.

REFERENCIAS

- Knorr D. Use of chitinous polymers in food, a challenge for food research and development. *Food Technology*, 1984; 38:1-85.
- Roberts GA. *Chitin Chemistry*. Mac. Millan Press Ltd. London, 1992; p.54-58.
- Ashford NA, Hattis D, Murray A. Industrial prospectis for chitin and protein from shellfish wastes. MIT Sea Grant Program. Cambridge Mass. USA. 1987.
- Black MM & Schwartz HM. Estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products, *Analyst* 1950; 75:185.
- Muzzarelli RA. Chitin. En: *Natural chelating polymers*. Pergamon, Press. 1973; p.417-450.
- Allan G, Fox JR & Kong N. A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. En: *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. Muzzarelli RA & Pariser ER (Eds) MIT Sean Grant Programm, 1978; p.p.64-78.
- Box GE, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experiments*. John Wiley & Sons Inc. 1978; p.372-354.
- Johnson EL & Peniston QP. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. En: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Martin REW, Flick GJ & Ward DR (Eds). Westport, Conn, The AVI Publishing Co. 1982; p.417-423.
- Shimahara K & Takiguchi Y. Preparation of crustacean chitin. En: *Methods in Enzymology* (Ed). Academic Press, Inc. 1988; p. 417-423.
- Whistler R L. Chitin. En: *Industrial Gums, Polysaccharides and Their Derivatives* (Ed). Academic Press, Inc. 1988; p.417-423.
- Takiguchi Y, Ohkouchi K, Yamshita H & Shimahara K. A new method for quantitative determination of protein associated with crustacean chitin. *Nippon Nogei, Kagaku Kaishi*. 1987; 61:437.
- Rutherford FA & Austin PR. Marine chitin properties and solvents. En: *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. Muzzarelli RA & Pariser ER (Eds). MIT Sean Grant Programm, 1978; p.182-192.
- Nacz M & Shahidi F. Chemical composition and chitin content of crustacean offal. En: *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability*. Voigt MN & Botta JR (Eds). Technomic Publishing Co., Inc. 1990; p.299-304.
- Muzzarelli RA. New derivates of chitin and chitosan. En: *New Developments in Industrial Polysaccharides*. Crescenze B, Dea ICM y Stivala SS (Eds). Gordon and Breach Science Publishers. 1985.

Recibido: 23-07-1996

Aceptado: 29-01-1998