

2007-B a 2012-A

207395612

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“Recuperación de las fracciones de alto valor agregado a partir de
desechos (cutícula) de camarón, con énfasis en la proteína”**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN MODALIDAD TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

JUAN CARLOS TAMAYO PARTIDA

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO; OCTUBRE DE 2013



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD. BIOL. 183/2012

**C. JUAN CARLOS TAMAYO PARTIDA
PRESENTE**


Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **Tesis e Informes** opción: **Tesis**, con el título "**Recuperación de las fracciones de alto valor agregado a partir de desechos (cutícula) de camarón, con énfasis en la proteína**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo a **M.C. Jesús Angel Andrade Ortega**, y como asesor(s) a: **M.C. Carlos Alberto Ramírez Barragán**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 25 de septiembre, del 2012.


**DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA


**M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente.-

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis con el título: **“Recuperación de las fracciones de alto valor agregado a partir de desechos (cutícula) de camarón, con énfasis en la proteína”** que realizó el pasante **Juan Carlos Tamayo Partida** con número de código **207395612** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.



Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal. 3 de septiembre de 2013.

M. en C. Jesús Angel Andrade Ortega
 Director del trabajo

M. en C. Carlos Alberto Ramírez Barragán
 Asesor

adgr
 3-sept-2013

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán		3/09/2013
Dr. Conrado Soto Velazco		03/09/13
Dra. Sandra Luz Toledo González		04/09/13
Supl. M. en C. Carlos Alberto Ramírez Barragán		03/Sep/2013

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Jesús Angel Andrade Ortega por ser un gran amigo, maestro y ejemplo; gracias por todos los consejos y conocimiento compartido, gracias por ser ese guerrero incansable que siempre busca alumnos y los convierte en profesionistas; gracias por sembrar el conocimiento en la mente y por infundir la pasión por la ciencia en el corazón de los que te rodean.

A mi novia Sonia Angélica García Peña por indicarme el camino correcto, por apoyarme, por aguantarme, por alentarme desde el principio hasta el final de éste trabajo.

A la Universidad de Guadalajara, al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, gracias a todos las maestras y maestros que contribuyeron a mi formación académica.

Al Departamento de Madera, Celulosa y Papel, al Centro de Investigación en Biomateriales, gracias a Angélica Iturria Luna y Carlos Alberto Ramírez Barragán por sus consejos y por su apoyo.

A mi familia por apoyarme en momentos de necesidad, en especial a mis tíos Sergio Tamayo Partida y Jaime José Luis Tamayo Partida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Angelina Carolina Rodríguez Aranda, Giuseppe Rafael Galindo Rodríguez, Juan Carlos González Orozco, Juana Victoria Gómez Villalobos, Federico Guillermo Rivas Enríquez, Margarita Ayala Carrillo, Francisco Zamora Rea, Ana Marina Torres García, Yesenia Sánchez Olague, Marco Antonio Castellanos Márquez, Hugo Enrique Mercado Contreras, Luis Ramón Bravo García, María de Lourdes Arellano Sandoval, Karla Fabiola Martínez Vizcarra, Ali Yesenia Amaral Brambila, María de Lourdes Delgado Aceves, Felipe Romo Paz, Francisco Javier Rocha Canal, Anaira del Carmen Topete Torres, y a todos los demás que han estado apoyando siempre a nuestro grupo de trabajo.

A mis amigos y compañeros de la carrera por hacer cada semestre interesante y divertido, a Félix Tobías Meza Valencia, Mario Alberto Flores Flores, Fernando García Sánchez, Víctor Hugo Siordia Sánchez, Laura Iveth Pavón Rocha, Martha Guadalupe Martínez Degollado, Mónica Ivett Toledo García, Diego Alfonso Hernández Rodríguez, y a todos mis demás compañeros de generación. A mis amigos y músicos Rafael Mendoza, Francisco Arias, Gerardo Álvarez, Juan Loera, y a todos mis conocidos que me apoyaron en este camino para realizar mi tesis.

A mis sinodales la Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán, Dra. Sandra Luz Toledo González y el Dr. Conrado Soto Velasco.

DEDICATORIA

A mi mama que tanto quiero, Alicia Tamayo Partida, por darme la vida, por apoyarme siempre, por enseñarme que hay que luchar siempre y no rendirse por más complicado que sea el panorama. Por tu esfuerzo y dedicación... ¡Muchas gracias mamá!

A mi familia, amigos y maestros.

A los que se ya no están y los extrañamos mucho:

A mi papás Juan Jiménez y Daniel Tamayo.

A Luis Sergio Tamayo, descansa en paz primo, te adelantaste en el camino, y sin embargo, algún día te alcanzaremos, deja los pendientes para los que nos quedamos, vete tranquilo.

A la Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias, gran ejemplo, maestra y sinodal.

**“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo,
involúcrame y lo aprendo.”**

Benjamín Franklin (1706-1790).

**“Recuperación de las fracciones de alto valor
agregado a partir de desechos (cutícula) de
camarón, con énfasis en la proteína”**

POR

JUAN CARLOS TAMAYO PARTIDA

ZAPOPAN, JALISCO, OCTUBRE DE 2013

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Desechos de camaron.....	3
2.2 Pigmentos carotenoides	3
2.2.1 Astaxantina	4
2.3 Minerales.....	5
2.4 Proteínas.....	6
2.4.1 Metodologías para la recuperación, análisis y cuantificación de proteínas	8
2.4.1.1 Precipitación salina de proteínas.....	8
2.4.1.2 Análisis espectrofotométricos y espectrofluorométricos	9
2.4.1.3 Método de biuret	9
2.4.1.4 Método de ninhidrina.....	10
2.4.1.5 Espectrofluorometría.....	11
2.4.1.6 Digestiones químicas (método preparativo).....	11
2.4.1.6.1 Método de Nessler	12
2.4.1.6.2 Método de la sal de fenol	12
2.5 Quitina.....	12
2.5.1 Análisis de espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Programa experimental de trabajo	21
6.2 Acondicionamiento de la materia prima	22
6.3 Extracción de lípidos/pigmentos.....	22
6.3.1 Aislamiento de lípidos/pigmentos.....	24
6.3.2 Material despigmentado.....	25
6.4 Remoción de minerales.....	26
6.4.1 Minerales hidrolizados.....	26
6.5 Extracción de proteína	26
6.5.1 Recuperación de proteína.....	27
6.5.2 Precipitación salina	29
6.6 Aislamiento de la quitina	29
6.7 Caracterización básica	29
6.7.1 Determinación de humedad	30
6.7.2 Determinación de cenizas	30
6.8 Análisis espectrofotométricos de los licores de proteína	30
6.8.1 Método de biuret	30
6.8.2 Método de Ninhidrina.....	31
6.8.3 Determinación de proteína con espectrofluorometría	32
6.8.4 Análisis de contenido de nitrógeno	33
6.8.4.1 Digestiones químicas	34
6.8.4.2 Método de Nessler	35
6.8.4.3 Método de la sal de fenol	35
6.9 Análisis FTIR de proteínas y quitina	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1 Caracterización básica inicial.....	37
7.2 Cuantificación de lípidos/pigmentos.....	37

7.3 Desmineralización.....	41
7.4 Desproteínización, recuperación y cuantificación de proteína.....	44
7.4.1 Recuperación de proteína sólida	45
7.4.2 Análisis espectrofotométricos para determinar proteína	47
7.4.3 Determinación de la concentración de proteína hidrolizada mediante método de la sal de fenol	48
7.4.3.1 Análisis de licores sometidos a precipitación salina de proteínas	53
7.4.4 Análisis FTIR de proteína	57
7.5 Cuantificación y caracterización de quitina	63
7.5.1 Análisis FTIR de quitina	65
7.6 Caracterización básica final del material	70
7.6.1 Contenido de humedad	71
7.6.2 Contenido de minerales.....	73
8. CONCLUSIONES	77
9. PERSPECTIVAS.....	80
10. LITERATURA CITADA	81
Anexo A	91
Anexo B	93
Anexo C	94
Anexo D	96
Anexo E	98
Anexo F.....	99

LISTADO DE GRÁFICAS, FIGURAS Y CUADROS

Gráfica 1. Producción de camarón en México.....	2
Figura 1. Estructura del pigmento astaxantina.....	4
Cuadro 1. Contenido de aminoácidos de los desechos de camarón.....	8
Figura 2. Complejo formado por la interacción de ion cobre y los péptidos que conforman las proteínas en la reacción de biuret.....	10
Figura 3. Estructura del polisacárido quitina.....	13
Figura 4. Estructura de la quitosana.....	14
Figura 5. Esquema general de la metodología.....	21
Cuadro 2. Componentes añadidos para la curva de calibración de aminoácidos.....	32
Cuadro 3. Preparación de las soluciones de caseína.....	33
Cuadro 4. Volúmenes que se tomaron de la solución madre de cloruro de amonio para obtener los puntos de la curva de calibración de nitrógeno.....	34
Figura 6. Despigmentación.....	39
Cuadro 5. Resultados de la etapa de extracción de lípidos/pigmentos.....	40
Grafica 2. Cuantificación de lípidos.....	41
Cuadro 6. Resultados de la etapa de remoción de minerales.....	43
Gráfica 3. Porcentajes de remoción de minerales.....	44
Cuadro 7. Datos de la remoción y recuperación de proteína.....	45
Gráfica 4. Comparación de proteína obtenida según el método de recuperación.....	47
Gráfica 5. Curva de calibración de cloruro de amonio empleada para determinar la concentración de proteína de las muestras.....	50
Cuadro 8. Contenido de proteína calculado a partir del análisis de las muestras pertenecientes a los licores de desproteínización del lote 9.....	50
Cuadro 9. Contenido de proteína calculado a partir del análisis de las muestras pertenecientes a los licores de desproteínización del lote 10.....	51
Cuadro 10. Contenido de proteína de las muestras analizadas.....	51
Gráfica 6. Contenido de proteína de las muestras de los licores de primera y segunda desproteínización.....	52
Cuadro 11. Comparación entre la proteína estimada antes de las pruebas y la proteína determinada por espectrofotometría.....	53
Cuadro 12. Contenido de proteína en los licores de desproteínización sometidos a precipitación salina.....	55
Gráfica 7. Curva de calibración de cloruro de amonio empleada para determinar la cantidad de proteína remanente en las muestras sometidas a precipitación salina.....	55

Cuadro 13. Concentración de proteína en las muestras y porcentaje de remoción mediante la precipitación salina.	56
Gráfica 8. Concentración de proteína en las muestras antes de la precipitación salina y después de la precipitación y remoción de la proteína.	57
Grafica 9. Espectro infrarrojo de caseína en polvo.	59
Gráfica 10. Espectro infrarrojo de proteína del lote nueve aislada a partir de la primera etapa de desproteínización.	60
Gráfica 11. Espectros infrarrojos de las proteínas recuperadas en la primera etapa de desproteínización.	61
Gráfica 12. Espectros infrarrojos de las proteínas recuperadas en la segunda etapa de desproteínización.	62
Cuadro 14. Resultados de la recuperación y caracterización de la quitina.	63
Gráfica 13. Comparación del peso de las quitinas recuperadas a partir de cada lote.	65
Gráfica 14. Espectro infrarrojo de quitina del lote nueve.	67
Gráfica 15. Espectro infrarrojo de quitina.	67
Gráfica 16. Espectros infrarrojos de las quitinas obtenidas.	68
Gráfica 17. Comparación de los porcentajes de acetilación de las quitinas obtenidas.	69
Cuadro 15. Caracterización básica de la harina de cutícula de camarón en cada una de las etapas de tratamiento hasta la obtención de quitina.	70
Gráfica 18. Porcentajes de los componentes de la harina de cutícula de camarón.	71
Cuadro 16. Porcentajes de contenido de humedad en las muestras, desde el material inicial hasta la quitina.	72
Gráfica 19. Perfil de humedad de la cutícula de camarón a lo largo de la metodología.	73
Cuadro 17. Porcentajes de contenido de minerales (en base seca) en las muestras, desde el material inicial hasta la obtención de quitina.	74
Gráfica 20. Perfil de contenido de minerales de la cutícula de camarón desde la materia prima hasta la obtención de quitina.	76
Cuadro 18. Datos para el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de remoción de minerales.	93
Cuadro 19. Datos de los cálculos realizados para obtener la concentración de proteína disuelta en los licores de desproteínización.	94
Cuadro 20. Resultados de los cálculos realizados para obtener la concentración de proteína de los licores con pH ácido que se sometieron a precipitación salina.	96
Cuadro 21. Datos para el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación de los pesos de las quitinas.	98

Éste trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Biomateriales perteneciente al Departamento de Madera, Celulosa y Papel (Centro Universitario de Ciencias Exactas en Ingenierías), bajo la dirección del M. en C. Jesús Angel Andrade Ortega y la asesoría del M. en C. Carlos Alberto Ramírez Barragán.

RESUMEN

México es el sexto productor de camarón a nivel mundial, la producción alcanzó las 181,000 t en el año 2009, en donde más del 60% correspondió a la acuicultura. Hasta un 50% del peso del camarón corresponde al exoesqueleto y vísceras, estos componentes que se consideran desechos son retirados en el procesamiento para su consumo alimenticio. Los desechos de camarón están constituidos principalmente por cuatro fracciones de alto valor agregado que son proteína, quitina, minerales y pigmentos/lípidos. Debido a una creciente demanda de recursos naturales y a la gran cantidad de desechos generados por la industria pesquera, es necesario el desarrollo de métodos económicos y ecológicos que permitan la recuperación de los componentes aprovechables a partir de residuos. Éste trabajo se centró en el estudio de la cutícula de camarón para la obtención y cuantificación de productos de alto valor agregado, en especial la fracción proteica.

La metodología comprendió la caracterización y cuantificación de la cutícula de camarón en cada etapa, mediante determinación de humedad y cenizas (minerales). Partiendo de 10 g de material (base seca) en promedio, las etapas comprenden la remoción y cuantificación de lípidos/pigmentos; remoción de minerales; extracción, recuperación y cuantificación de proteína; recuperación, caracterización y cuantificación de quitina. Para la cuantificación de proteína se aplicaron métodos colorimétricos en donde destaca el método de sal de fenol.

Los resultados indicaron que la composición promedio de la materia prima fue de 8.6% de agua, 27.4% de minerales, 2.2% de lípidos/pigmentos y 61.8% que corresponde a quitina, proteína y otros compuestos no identificados (minerales o lípidos). Se logró la recuperación de proteína, los mejores resultados se ubicaron en un rango entre 13.7 y 32.2%, en función al método aplicado. La cantidad de quitina recuperada fue del 90.68% en promedio, mientras que el grado de acetilación estuvo entre 90.7 y 99.2%.

Las metodologías empleadas permitieron la obtención de productos de alto valor agregado con características óptimas, en especial proteína y quitina, estos biomateriales pueden ser aprovechados en diversas áreas relacionadas a la industria y la investigación, siguiendo los fundamentos de la química verde.

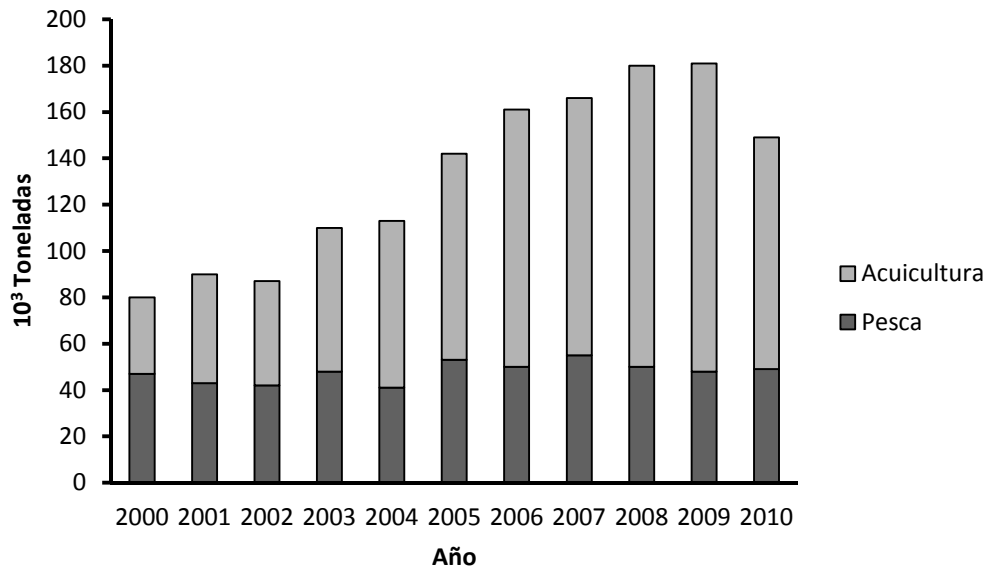
1. INTRODUCCIÓN

México es el sexto productor de camarón a nivel mundial, éste crustáceo se ubica en primer lugar en la generación de divisas entre los productos pesqueros nacionales. Para el año 2009 la producción camaronera sobrepasó las 181,000 t, lo cual estableció una cifra record (Gráfica 1); de éstas, más del 60% correspondió a la acuicultura, lo que denota el crecimiento que ha tenido esta actividad en los últimos años. En el año 2010 los estados con mayor producción acuícola fueron Sonora y Sinaloa, entre ambos aportaron el 86.7% (87,092 t) de la producción total (SIAP, 2012).

Las especies que predominan en la pesca son camarón café del Pacífico (*Penaeus californiensis* Holmes, 1900) y café del Golfo (*P. aztecus* Ives, 1891); en acuicultura se producen principalmente camarón blanco (*P. vannamei* Boone, 1931) y azul (*P. stylirostris* Stimpson, 1874), ambos del Pacífico (Cifuentes *et al.*, 1997; SIAP, 2012).

El procesamiento del camarón consiste, la mayoría de las veces, en la remoción del cefalotórax (vísceras incluidas) y la cáscara o cutícula, que representan un 40-50% en peso del animal (Espinosa, 1997; Lee *et al.*, 1999). Los desperdicios de camarón, debido a los altos volúmenes de producción, se convierten en un severo problema ecológico en lugares cercanos a las zonas de captura, cultivo, y plantas de procesamiento del país, ya que son arrojados al aire libre (en altamar, puertos pesqueros, tiraderos municipales, etc.) donde son descompuestos por la acción de microorganismos (Armenta *et al.*, 2002; Ramírez-Cruz *et al.*, 2003).

Producción de camarón en México



Gráfica 1. Producción de camarón en México del año 2000 al año 2010, en donde se observa el crecimiento que ha tenido la acuicultura (datos tomados de SIAP, 2012).

Los residuos son una fuente importante de recursos aprovechables, constituidos por fracciones que tienen un alto valor agregado; como las proteínas, la quitina y pigmentos carotenoides, que junto con minerales como el carbonato de calcio (CaCO_3) forman el exoesqueleto del camarón (Pastor, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Desechos de camarón

Los desechos de camarón están constituidos principalmente por cuatro compuestos: proteína, quitina, minerales y pigmentos; reconocidos como fracciones de alto valor agregado, debido a sus propiedades físicas y químicas. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios se centran en la carne y el cefalotórax de éste crustáceo, en cambio el presente trabajo de investigación se enfoca en la cutícula que ha sido menos estudiada.

2.2 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son compuestos isoprenoides, con una estructura básica de 40 carbonos. Son moléculas altamente hidrofóbicas con poca o nula solubilidad en agua, tienen la capacidad de absorber la luz solar en el rango que va de los 400-500 *nm*, donde alcanzan un estado de excitación energético mayor, lo que les confiere una intensa coloración amarilla, naranja o roja (Britton, 1995).

Estos pigmentos se pueden encontrar en forma libre o disueltos en la fracción lipídica de los tejidos, en enlaces glucosídicos, como ésteres de ácidos grasos y llegan a formar complejos con proteínas, lo que los hace más estables.

El grupo de los carotenoides se degrada fácilmente, ya que son sensibles al oxígeno, a la luz directa, altas temperaturas y sustancias ácidas o alcalinas (Badui, 1990). Los animales no son capaces de sintetizarlos *de novo*, por lo que se ven en la necesidad de adquirirlos a partir de la ingesta de otros organismos, en especial de las plantas; el

camarón no es la excepción, ya que incorpora carotenoides y otros pigmentos en su dieta.

2.2.1 Astaxantina

Sachindra *et al.* (2005) reportaron que la astaxantina es el carotenoide predominante en los residuos de camarón y que el contenido varía según la especie; sin embargo, su concentración que es de alrededor de 35-135 $\mu\text{g/g}$, se considera muy baja en comparación a otros compuestos como la quitina o la proteína.

La astaxantina (Figura 1) es denominada 3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β - β' -caroteno, y se distingue de otros pigmentos por tener una cadena poliénica de once dobles enlaces conjugados, que son los responsables de su coloración roja. Presenta anillos cíclicos en los extremos y grupos funcionales hidroxilos en los carbonos 4 y 4' (Herrera-Andrade *et al.*, 2010). Se puede encontrar en cuatro configuraciones diferentes, la forma 3S-3'S es la que se encuentra en mayor proporción en los camarones (Herrera-Andrade *et al.*, 2011).

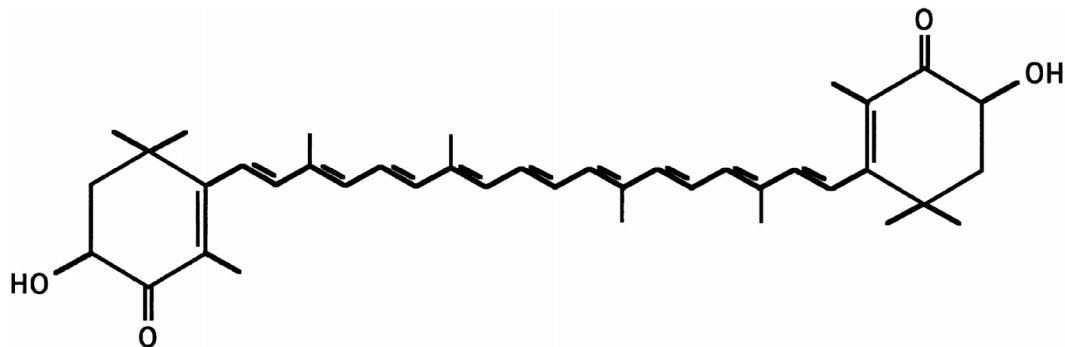


Figura 1. Estructura del pigmento astaxantina, presenta once dobles enlaces responsables de su coloración roja.

En años recientes la astaxantina se ha colocado en el primer sitio en la lista de los pigmentos más consumidos, esto debido a que se ha reportado que su ingesta tiene propiedades benéficas. En animales, como en el caso del salmón, es responsable del color característico de su carne, además se emplea en granjas de camarón como suplemento alimenticio de estos organismos y en granjas avícolas para pigmentar la yema de huevos. Para el ser humano es un poderoso antioxidante, antiinflamatorio, precursor de la vitamina A, revitalizador del sistema inmune y ayuda en la prevención de enfermedades como el cáncer, entre otras (Capelli & Cysewski, 2007).

La extracción de pigmentos, a partir de la cáscara de camarón, se realiza comúnmente mediante el uso de solventes como acetona, éter de petróleo, éter etílico, hexano, entre otros; ya que estos tienen afinidad por las sustancias liposolubles como los carotenoides (Sachindra, 2006).

2.3 Minerales

La dureza que presenta el exoesqueleto de los crustáceos se debe principalmente al complejo formado por la quitina y los minerales presentes como sales inorgánicas. El contenido de estos últimos varía según la especie y constituyen entre 30 y 55% de la masa total en base seca (Pastor, 2004). Estos minerales están representados en su mayoría por el calcio (Ca^{2+}).

Las fuentes principales del ion Ca^{2+} para el camarón son el agua y el alimento; la mayoría de las estructuras esqueléticas (como la cutícula) están compuestas por carbonato de calcio (CaCO_3) en forma de calcita, complejos de carbonato con

fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3\text{F}$), francolita ($\text{Ca}_{10}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x]\text{F}_{2+x}$) y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfato de calcio) en menor cantidad (Ehrlich *et al.*, 2009). El ion calcio se encuentra unido directamente a la quitina y al complejo proteína-quitina, lo que mantiene estable la estructura del exoesqueleto en las distintas capas que lo componen (Pastor, 2004).

Los minerales presentes en los desechos de crustáceos se remueven mediante la aplicación de tratamientos que involucran ácidos en solución (orgánicos o inorgánicos) como el ácido acético (CH_3COOH), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido clorhídrico (HCl), entre otros (Pastor, 2004).

2.4 Proteínas

Los residuos de crustáceos presentan diversos tipos de proteínas estructurales, como lipoproteínas y caroproteínas, además de los complejos quitina-proteína y minerales-proteína o metaloproteínas (Pastor, 2004).

El contenido de proteína en peso base seca reportado en algunos estudios es de 25-40% en cefalotórax y cutícula de camarón molidos (Kamata *et al.*, 1976), 40.83% en cutícula (Manni *et al.*, 2010^a), 46.5% en cefalotórax (Cira *et al.*, 2002), y 51.17-62.24% en cefalotórax (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005).

Pastor (2004) menciona que esta proteína es de excelente calidad y de alto valor económico. El uso que se le puede dar es variado, por ejemplo, Kamata *et al.* (1976) reportaron la recuperación de caroproteínas para estudiar su efecto en la dieta de salmónidos. Algunos estudios indican que el hidrolizado proteico puede ser utilizado como ingrediente nutritivo en medios de cultivo para el desarrollo de microorganismos

(Juárez *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2003); otras aplicaciones se relacionan principalmente con la industria farmacéutica y la cosmética (Bueno-Solano *et al.*, 2008).

La remoción química de proteína involucra el uso de bases fuertes como el hidróxido de sodio (NaOH) y el hidróxido de potasio (KOH). En una hidrólisis alcalina con NaOH los productos resultantes son una sal de sodio a partir del grupo carboxilo (ácido) y una amina, como se ilustra en la siguiente reacción [1]:



El agua rompe directamente los enlaces entre los grupos amino, además del enlace con la quitina. El NaOH funciona como un catalizador de la reacción, esta solución alcalina es utilizada a modo de solvente y rompe las estructuras oligoméricas de las proteínas, lo que cambia su estructura a una forma soluble (Lim *et al.*, 1999). Estos hidrolizados son ricos en péptidos y aminoácidos libres, lo que indica su alto valor nutricional tanto para consumo humano, como para consumo animal (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005).

El valor nutricional de la proteína depende del tipo y cantidad de aminoácidos disponibles (Cuadro 1), estas biomoléculas, una vez aisladas, tienen aplicaciones médicas, por ejemplo son útiles en el tratamiento de padecimientos renales, gastrointestinales, endocrinos y dermales; además, se sabe que en la industria alimenticia pueden ser aplicados como intensificadores del sabor (Quitain *et al.*, 2001).

Quitain *et al.* (2001) reportan la obtención principalmente ácido aspártico, histidina y glutamina al trabajar con cutícula de camarón.

Cuadro 1. Contenido de aminoácidos de los desechos de camarón reportado en la literatura, los aminoácidos marcados con (*) son considerados esenciales para el ser humano.

Aminoácido	(%) ^a	(%) ^b	(%) ^c	(mg/g) ^d	(mg/100mg) ^e
Asp	9.20	13.4	10.74	34.6	2.67
Thr*	4.20	4.5	4.28	12.1	-
Ser	3.96	5.2	4.53	4.6	0.25
Glu	15.95	16.4	15.46	38.8	2.99
Pro	6.17	4.5	3.44	25.8	0.78
Gly	8.41	8.2	4.29	21.8	1.65
Ala	6.34	6.0	5.29	36.1	1.62
Cys	0.95	<1.0	1.59	-	-
Val*	4.64	5.2	4.42	16.9	2.11
Met*	2.62	<1.0	2.84	16.4	1.50
Ile*	4.86	4.5	3.26	18.3	0.95
Leu*	9.69	7.5	7.57	11.8	1.99
Tyr	3.61	3.0	3.64	66.4	0.64
Phe*	4.20	4.5	4.56	10.0	1.29
His	3.17	6.7	1.90	9.0	0.20
Lys*	6.64	6.0	6.17	-	0.93
Arg	5.38	4.5	6.31	22.2	-
Trp*	-	<1.0	1.26	-	-

a. Dayal *et al.*, 2005. b. Zhao *et al.*, 2011. c. Kamata *et al.*, 1976. d. Bueno-Solano *et al.*, 2008. e. Chen *et al.*, 2008.

2.4.1 Metodologías para la recuperación, análisis y cuantificación de proteínas

2.4.1.1 Precipitación salina de proteínas. Uno de los principales métodos que se utiliza para recuperar la proteína hidrolizada, en un medio acuoso, es la precipitación de ésta mediante la adición de soluciones ácidas o ácidos concentrados, o con soluciones alcalinas que modifiquen el pH del medio, a esto se denomina “*pH sifth*”. Éste método se basa en el hecho de que los aminoácidos que componen las proteínas presentan una carga eléctrica, en el extremo amino presentan carga positiva (debido a la formación de un grupo amoniaco por la atracción de un átomo de hidrógeno), mientras que en el

extremo carboxilo presentan carga negativa (debido a la pérdida de un átomo de hidrógeno); la carga eléctrica de cada proteína se ve afectada por el cambio de pH. Una vez que la carga neta es igual a cero la solubilidad de la proteína disminuye drásticamente lo que provoca que se precipite, a esto se conoce como punto isoeléctrico de las proteínas, cada proteína presenta un punto isoeléctrico específico en función a los aminoácidos que la conforman (Dennison, 2002; Pastor, 2004).

Otro método de importancia es la concentración de proteínas mediante el uso de sales como el cloruro de sodio (NaCl). Las partículas de sal tienden a saturar la solución, lo que provoca un cambio en la solubilidad de la proteína. Si se añade en principio una concentración baja de sales la proteína aumenta su solubilidad, lo que se conoce como “salting in”, al incrementar la concentración salina la proteína se vuelve menos soluble y precipita, a esto se le denomina “salting out” (Dennison, 2002).

2.4.1.2 Análisis espectrofotométricos y espectrofluorométricos. Existen varias técnicas para determinar la concentración de las proteínas, una de éstas es el análisis espectrofotométrico que consiste básicamente en colorear una muestra y medir su absorbancia, o en otros casos, y gracias a las propiedades de las proteínas se mide su fluorescencia. A continuación se mencionan algunos de estos métodos.

2.4.1.3 Método de biuret. Éste método se basa en la formación de un complejo que brinda una coloración violeta debido a la interacción del ion cobre (Cu^{2+}) con los enlaces peptídicos de las proteínas en un medio altamente alcalino (Figura 2), la intensidad de la coloración es proporcional a la concentración de proteína; con un espectrofotómetro se mide la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (Owusu-Apenten, 2002). Gornall

et al. (1949) mencionan que prácticamente no existen otras sustancias que no sean de origen proteico que puedan reaccionar con el reactivo de biuret, ninguna que cause una interferencia significativa.

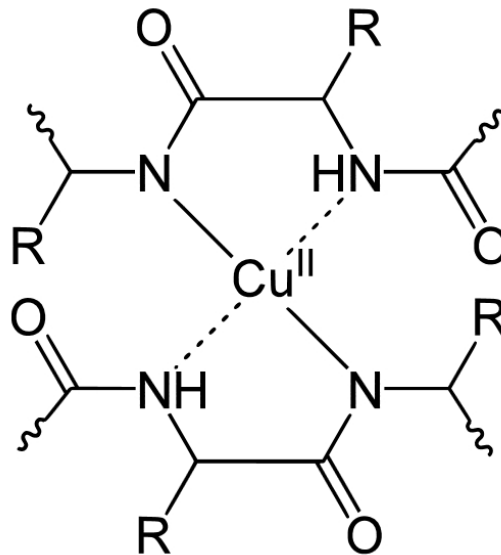


Figura 2. Complejo formado por la interacción de ion cobre y los péptidos que conforman las proteínas en la reacción de biuret.

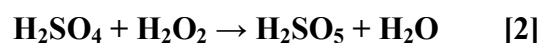
Existen diversas formulaciones para la preparación del reactivo de biuret, la mayoría involucran el uso de una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH) y un compuesto que contenga el ion Cu^{2+} , por ejemplo el sulfato de cobre (CuSO_4).

2.4.1.4 Método de ninhidrina. Éste método colorimétrico se usa principalmente para el análisis de aminoácidos y para la cuantificación de proteínas, la ninhidrina reacciona con grupos α -amino en una reacción de tres pasos que genera un aldehído, dióxido de carbono (CO_2) y ninhidrina reducida (hidrindantina). Se produce una coloración

denominada púrpura de Ruhemann, en donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de aminoácidos o proteínas, la absorbancia se mide a 570 nm (Nigam & Ayyagari, 2007).

2.4.1.5 Espectrofluorimetría. La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la *absorción* de radiación electromagnética en una longitud de onda que va de 200 a 400 nm. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental y liberan su exceso de energía en forma de fotones, lo que se conoce como *emisión* y se presenta en un rango que va de 400 a 650 nm (Medina, 2008). Ésta técnica se basa en que las proteínas y péptidos, los cuales están conformados por aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptófano, y tirosina (cuyas absorciones se presentan a 282, 353 y 304 nm respectivamente), son intrínsecamente fluorescentes cuando son irradiados con luz ultravioleta (Held, 2003; Lakowicz, 1999), esto permite que la concentración de estas moléculas pueda ser medida en una longitud de onda específica.

2.4.1.6 Digestiones químicas (método preparativo). Otra forma de analizar el contenido de proteínas es mediante la digestión o degradación química de los compuestos orgánicos que las contienen, como una etapa preparativa para el análisis propiamente dicho. El objetivo es disociar los elementos que componen una muestra hasta la obtención de nitrógeno amoniacal (NH₃/NH₄), esto se logra mediante altas temperaturas y agentes oxidantes como el ácido sulfúrico concentrado y el peróxido de hidrógeno, lo que da lugar a un compuesto denominado ácido peroximonosulfúrico (Hach Company, 1999) como se muestra en la reacción [2]:



2.4.1.6.1 Método de Nessler. Se basa en la reacción colorimétrica del tetrayodomercuriato (II) de potasio (K_2HgI_4) con el nitrógeno amoniacal. Se produce una coloración amarillo-café cuya intensidad es proporcional a la cantidad de nitrógeno en la muestra, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 460 nm (Jover & García, 2004).

2.4.1.6.2 Método de sal de fenol. Se basa en la reacción del nitrógeno amoniacal con el ácido hipocloroso ($HClO$) y el fenóxido o fenolato de sodio ($C_6H_5O^- Na^+$), usando sulfato manganoso ($MnSO_4$) como catalizador para formar un compuesto denominado indofenol, que presenta una coloración azul. El indofenol tiene un rango de absorbancia de entre 600 y 660 nm , la máxima λ se presenta a los 630 nm (Villegas *et al*, 2006). El intervalo de validez del método oscila entre 0.0001 y $0.001\text{ g N-NH}_3/L$.

2.5 Quitina

La quitina (Figura 3) es un copolímero de unidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina (las cuales predominan a lo largo de la cadena) y *D*-glucosamina unidas mediante enlaces glucosídicos β -(1-4).

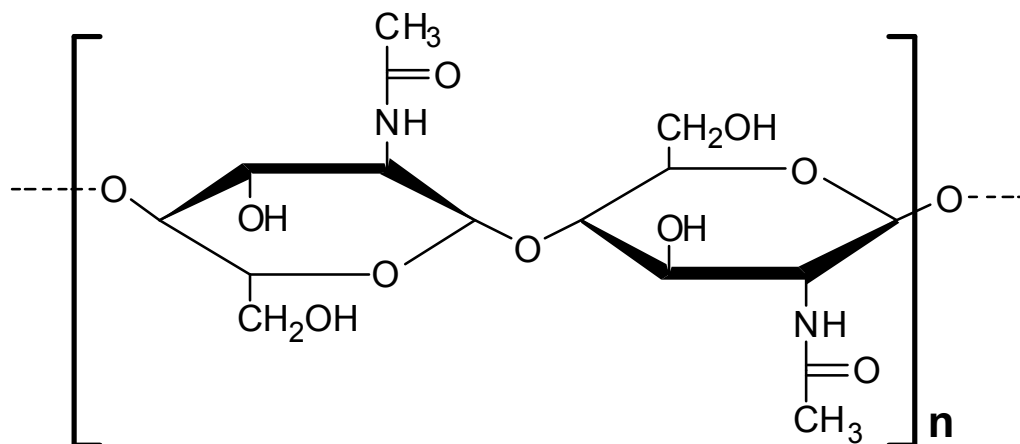


Figura 3. Estructura del polisacárido quitina, aquí se muestra un dímero de la cadena.

Éste polisacárido estructural es, después de la celulosa, el biopolímero más abundante en la naturaleza. Anualmente se generan 10^{11} t de quitina al año en forma de desechos y se estima que su uso industrial llega a las 10,000 t anuales (Se-Kwon, 2011).

La quitina forma complejos con otras moléculas orgánicas como pigmentos, proteína y carbonato de calcio (CaCO_3). Es uno de los principales componentes de la estructura esquelética de algunos invertebrados como insectos, crustáceos y otros artrópodos; junto con los minerales da soporte o sirve de defensa a estos organismos. Se presenta además en hongos como los ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y en algunas algas microscópicas como las diatomeas (Pastor, 2004).

En residuos de camarón el contenido de quitina en peso base seca reportado es de 20% (Manni *et al.*, 2010^b) y 22.6% (Hoffman *et al.*, 2010), ambos en cutícula, estos porcentajes dependen en gran medida de la especie, edad, sexo, cultivo/zona de captura, y dieta de los especímenes.

En los últimos años la quitina ha sido objeto de múltiples estudios debido a sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y funcionales. Este polisacárido posee un alto nivel de cristalinidad, y se clasifica en 3 formas que varían dependiendo del acomodo de las cadenas. En la α -quitina (la más abundante) las cadenas están en posición anti-paralela, en la β -quitina son paralelas y en la γ -quitina hay dos cadenas paralelas en un sentido y una en un sentido opuesto.

El aislamiento de la quitina involucra varias etapas, el procedimiento tradicional consiste en la remoción de minerales, proteínas y lípidos/pigmentos; el orden de cada una de estas fases altera el rendimiento final en la obtención de éste polisacárido (Pastor, 2004; Yarbeh, 1991).

Uno de los principales derivados de la quitina es la quitosana (Figura 4), la cual se obtiene mediante la remoción de los grupos acetilo de la quitina, a este procedimiento se le denomina desacetilación, para este fin se aplican tratamientos alcalinos a altas temperaturas (Pastor, 2004).

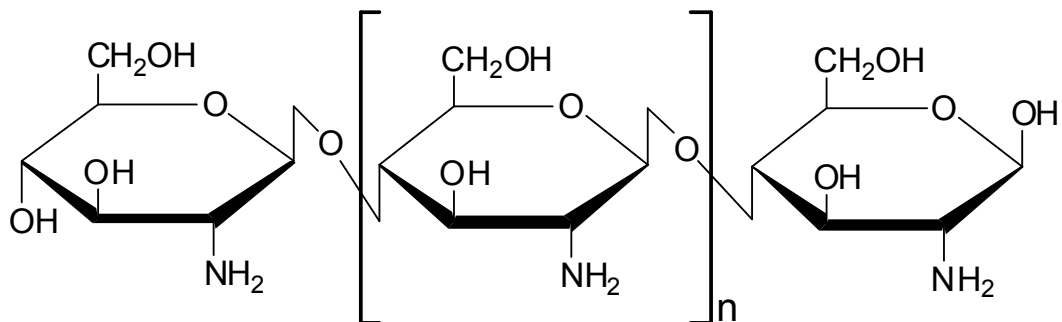


Figura 4. Estructura de la quitosana, derivado principal de la quitina, destaca la ausencia del grupo acetilo presente en la molécula de quitina.

Tanto la quitina como la quitosana tienen una gran cantidad de aplicaciones, en la actualidad abarcan campos tan variados como la alimentación; medicina (producción de material para suturas, gasas y vendajes con recubrimientos, cremas bactericidas, etc.); agricultura (recubrimiento de semillas, sistemas liberadores de fertilizantes, agentes bactericidas/fungicidas, germinación de semillas, etc.); cosmética (agentes hidratantes de la piel, aditivos bactericidas para jabones y similares, capsulas adelgazantes, etc.), control ambiental (floculantes, coagulantes y quelantes para remoción de contaminantes en el agua, etc.), etc. (Lárez, 2006; Pastor, 2004). Existen diversas técnicas para el análisis de la estructura y composición de la quitina, en donde destaca la espectroscopia infrarroja.

2.5.1 Análisis de espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).

La espectroscopia IR (infrarroja) es una técnica que permite estudiar la absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y una muestra, en un rango de longitud de onda de 2,500 a 25,000 *nm* (4,000 a 400 cm^{-1}). Se basa en la posibilidad que tienen las moléculas de rotar y vibrar a distintas frecuencias. Los equipos que manejan esta técnica cuentan con un software que mediante transformadas de Fourier presenta un espectro. En el infrarrojo se manifiestan bandas asociadas a los enlaces entre los elementos presentes en una molécula, cada uno tiene un comportamiento particular frente a la luz infrarroja, esto puede decirse que es su huella digital (Piqué & Vázquez, 2012).

Es importante destacar que éste trabajo se centra en la recuperación de los pigmentos y quitina, pero sobre todo se hace énfasis en la recuperación y cuantificación de proteína. Los pigmentos son un material que a pesar de sus propiedades se encuentran en cantidades muy bajas y es complicado aislarlos; de la quitina por su parte se conocen muy bien los métodos de obtención y es común tener altos rendimientos. Por otro lado de la proteína contenida en la cutícula de camarón, a pesar de ser un componente abundante, no existe en la literatura un método que permita el 100% de su recuperación, y es común que en los procesos industriales para la obtención de quitina/quitosana se descarte ésta proteína a pesar de su importancia. Al tomar en cuenta lo mencionado anteriormente, en la metodología empleada en ésta investigación se probaron diversos métodos para estimar el contenido de proteína y optimizar su recuperación.

3. JUSTIFICACIÓN

El constante aumento de la población a nivel mundial hace necesario el aprovechamiento de todos los recursos naturales, sin embargo, se sabe que estos tienden a agotarse rápidamente debido a la sobreexplotación a la que están sometidos, en especial los recursos no renovables; por lo que es necesario buscar fuentes alternativas para la obtención de productos de alto valor agregado.

La creciente preocupación por el cuidado del medio ambiente ha hecho posible que investigadores e industriales den más importancia a los desechos provenientes de la pesca y de la acuicultura, lo que ha llevado a la recuperación de nutrientes y sustancias bioquímicas aprovechables como quitina, pigmentos, peptonas, etc. (Gagné, 1993). Los investigadores han desarrollado dos líneas principales para el aislamiento de estas sustancias, una se enfoca en el uso de microorganismos o enzimas. Sin embargo, estos procesos resultan complicados de controlar, ya que se requiere de condiciones especiales y de reactores que son muy costosos para la industria. Otra línea se enfoca en el uso de agentes físico-químicos, lo que resulta menos costoso y si se hace uso de reactivos que no afecten al medio ambiente el beneficio es mayor.

Un alto porcentaje de la masa total de la producción de camarón se convierte en desechos, representados principalmente por el cefalotórax y la cutícula de camarón. Estos desperdicios son arrojados a mar abierto o son depositados en lugares al aire libre donde se convierten en un severo problema de contaminación ambiental, ya que por su alto contenido en proteínas (hasta un 50% de su peso en base seca) son atractivos para

los microorganismos y como lo mencionan Kandra *et al.* (2012), se descomponen rápidamente por su naturaleza alcalina (pH 7.5-8.0).

Por lo tanto es necesario intervenir para desarrollar técnicas y metodologías menos dañinas para el ambiente, que permitan un mejor aprovechamiento de los componentes de alto valor agregado que forman parte de los desperdicios camaroneros, haciendo así más sustentables las actividades de captura y cultivo del camarón en México.

4. HIPÓTESIS

Es posible el aprovechamiento integral, y la optimización de los porcentajes de recuperación de las fracciones de alto valor agregado (en especial la fracción proteica), a partir de desechos de camarón.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener y cuantificar las fracciones de alto valor agregado presentes en residuos de camarón (cutícula), haciendo énfasis en la fracción proteica.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la materia prima (harina de cutícula de camarón).
2. Obtener y cuantificar los lípidos y pigmentos presentes en los residuos de camarón (cutícula).
3. Remover los minerales de la cutícula de camarón.
4. Remover, recuperar y cuantificar la proteína de la cutícula de camarón.
5. Obtener, cuantificar y caracterizar el biopolímero quitina/quitosana.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Programa experimental de trabajo

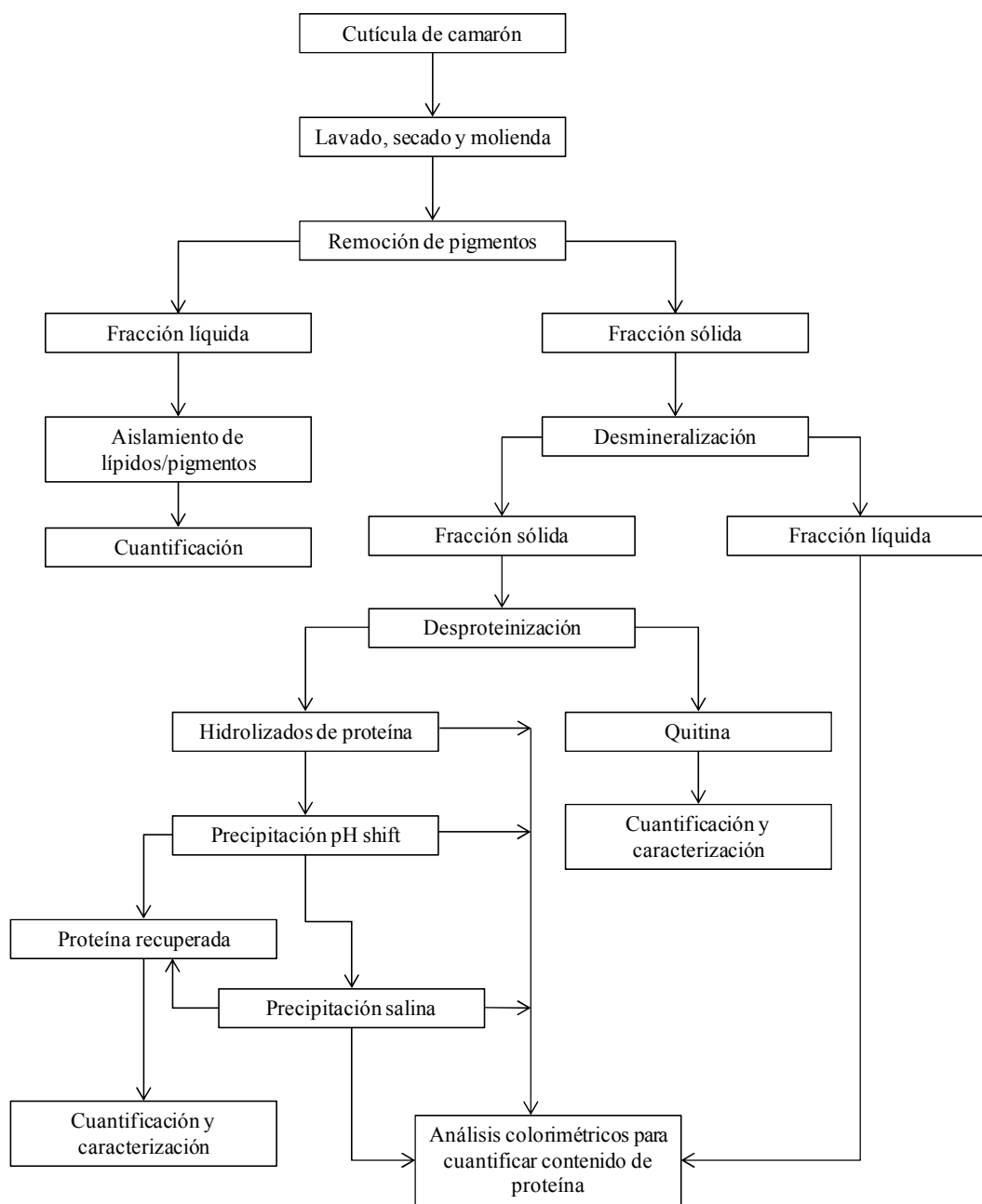


Figura 5. Esquema general de la metodología empleada para la realización de este trabajo de investigación.

En la Figura 5 se muestra un diagrama con la metodología empleada en éste trabajo de investigación así como las etapas que la componen, a continuación se describe a detalle cada una de ellas.

Nota: En el anexo A (página 91) se mencionan todos los materiales, equipos y reactivos utilizados.

6.2 Acondicionamiento de la materia prima

La materia prima empleada fue la cutícula o cáscara de camarón, ésta se obtuvo en calidad de descarte por parte de un restaurante local de mariscos. La cáscara se lavó con agua corriente para eliminar restos de carne, vísceras y otros componentes no deseados; posteriormente se secó al sol para eliminar el exceso de humedad. Los residuos secos se procesaron en un molino Wiley® hasta obtener una harina con un tamaño de partícula que pasa la malla del número 60 (equivalente a 0.25 mm), para facilitar la acción de los reactivos en los diferentes tratamientos, puesto que un material con partículas de estas dimensiones presenta una mayor superficie de contacto.

La harina de cutícula de camarón se dividió en diez lotes de 10 g c/u (base seca) en promedio, los lotes se empaquetaron en bolsas selladas para mantener temporalmente el contenido de humedad y las características del material intactas.

6.3 Extracción de lípidos/pigmentos

Para extraer los lípidos se trató la harina de cutícula de camarón con la mezcla de solventes mencionada por Sachindra *et al.* (2006), consistente en n-hexano e isopropanol (alcohol isopropílico) en relación 60:40 (v/v), se utilizó ésta mezcla debido a que se reportó como la más efectiva para el aislamiento de la astaxantina. Los tratamientos se

llevaron a cabo durante un lapso de 4 h, se probaron tres métodos para extraer los lípidos, denominados *ELI* (extracción de lípidos) los cuales se describen a continuación.

ELI1.- Se aplicó para los lotes uno y dos, se colocó la harina junto con la mezcla de solventes dentro de frascos de vidrio con tapa en relación líquido:sólido de 2.5:1, se montaron en un sistema con agitación magnética y a temperatura ambiente; al finalizar la extracción se filtraron a vacío con papel filtro estándar, obteniendo dos fracciones, una líquida y una sólida.

ELI2.- En el caso de los lotes tres y cuatro, la extracción de lípidos se llevó a cabo con un equipo Soxhlet a una temperatura promedio de 85°C, la relación de líquido:sólido fue de 9:1 para permitir el sifoneo de los solventes; al concluir el periodo de tiempo se separaron fácilmente las fracciones ya que la harina al estar contenida dentro de un filtro gooch quedó aislada automáticamente de los solventes, por lo que no se requirió de un filtrado posterior para separar las fracciones resultantes.

ELI3.- Éste método se aplicó para los lotes cinco hasta el diez, se utilizaron matraces balón previamente pesados (con la finalidad de cuantificar los lípidos), en la parte superior de cada matraz se colocó un sistema de enfriamiento para condensar los solventes ya que éstos tienden a evaporarse con gran facilidad a temperatura ambiente, la relación líquido:sólido fue de 5:1, el sistema se montó con agitación magnética, una vez transcurrido el lapso del tratamiento se filtró a vacío el contenido de los matraces con papel filtro Whatman® número 41, obteniendo dos fracciones (sólida y líquida).

A partir de aquí se trabajó con las fracciones obtenidas por separado, se comenzó primero por la fracción líquida para aislar los lípidos/pigmentos extraídos.

6.3.1 Aislamiento de lípidos/pigmentos

Para la separación de los componentes de la fracción líquida (mezcla de solventes, lípidos y pigmentos), se emplearon los tres métodos que se describen a continuación los cuales se denominaron *ALP* (aislamiento de lípidos y pigmentos).

ALP1.- En el caso de los lotes uno y dos las mezclas líquidas obtenidas se colocaron en matraces balón previamente pesados, se llevaron a un rotavapor en donde se evaporaron los solventes a 35°C y por gravimetría se cuantificaron los lípidos/pigmentos adheridos a la pared de los matraces.

ALP2.- La fracción líquida recuperada de la extracción de lípidos del lote cinco se puso en refrigeración a 4°C durante 24 h, esto provocó que se separaran los pigmentos de la fracción lipídica; mediante una filtración a vacío con papel filtro Whatman® del número 41 se aislaron las grasas, el papel se dejó a temperatura ambiente para evaporar los restos de solventes, una vez removidos los solventes se pesó el papel en una balanza analítica y de ésta manera se cuantificaron los lípidos.

Para evitar la degradación los pigmentos aislados se guardaron en refrigeración a 4°C, en frascos ámbar sellados y protegidos de la luz directa. Las mezclas líquidas provenientes de los lotes tres y cuatro, y del seis al diez no fueron procesadas en cuanto a su separación debido a:

- 1.- La complejidad de las condiciones necesarias para separar cada mezcla y obtener los componentes íntegros y puros.
- 2.- El tiempo a invertir para lograr el cometido.
- 3.- La obvia desventaja al tratarse de compuestos que se encuentran a muy bajas concentraciones en comparación a otras fracciones como la proteína y la quitina, y por lo tanto los altos costes para su recuperación.

A partir de aquí se trabajó con la harina proveniente de la extracción de lípidos.

6.3.2 Material despigmentado

Para remover los residuos de solventes presentes en la harina (compuesta de minerales, proteína y quitina) se aplicaron dos métodos diferentes, denominados *RDS* (remoción de solventes), los cuales se describen a continuación.

RDS1.- Se lavaron 4 veces las harinas de los lotes uno y dos con 25 mL de agua desionizada en agitación magnética y haciendo recambio de agua entre cada lavado, finalmente se drenó el agua con un sistema de vacío y el resto de líquido se evaporó a temperatura ambiente.

RDS2.- La harina de los lotes tres hasta el diez, se dejó a temperatura ambiente para evaporar los restos de n-hexano e isopropanol.

Una vez que se evaporaron los solventes de la harina sin lípidos, la cual en adelante será referida como despigmentada, se procedió a cuantificarla y se pasó a la etapa de remoción de minerales.

6.4 Remoción de minerales

La harina despigmentada se sometió a un tratamiento de desmineralización mediante una solución de ácido acético (CH_3COOH) 1*N*, la proporción de líquido:sólido fue de 20:1. Se colocó la harina junto con la solución ácida en un vaso de precipitados, el sistema se montó con agitación mecánica (mediante una propela) dentro de un baño maría a una temperatura de 60°C durante 60 min. Al finalizar la remoción de minerales se dejó enfriar el sistema a temperatura ambiente, una vez frío se separaron las fracciones con una filtración simple mediante una bolsa de tela doble diseñada para éste fin. La fracción sólida se lavó con agua desionizada hasta llevarla a pH neutro, se puso en cajas de Petri y se dejó secar a temperatura ambiente; una vez seca la harina desmineralizada se cuantificó por gravimetría y se llevó a la etapa de extracción de proteínas.

6.4.1 Minerales hidrolizados

La fracción líquida resultante de la etapa de desmineralización (con pH ácido) se guardó en frascos ámbar y se refrigeró a 4°C para su posterior análisis con los métodos de biuret, ninhidrina y otros análisis colorimétricos descritos más adelante.

6.5 Extracción de proteína

Las harinas desmineralizadas, compuestas por proteína y quitina se trataron con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1*M*, con una relación líquido:sólido de 20:1, a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°C), y con agitación magnética; el tratamiento se aplicó en dos etapas consecutivas de 24 h cada una, se drenó y reemplazó la solución de hidróxido de sodio entre cada etapa. Al finalizar el tratamiento se hizo un filtrado con bolsas de tela para separar las fracciones resultantes. A partir de aquí se

trabajó haciendo énfasis en la fracción líquida (licor) para poder aislar la proteína removida, el manejo de la fracción sólida se describe más adelante.

6.5.1 Recuperación de proteína

Los licores o hidrolizados proteicos alcalinos provenientes tanto de la primera como de la segunda desproteínización se sometieron a un cambio de pH (*pH shift*) con ácido acético (CH_3COOH) concentrado para precipitar la proteína contenida en el medio líquido. Se montó un sistema con agitación magnética y se añadió gota a gota el ácido, partiendo de un pH inicial de 12 se llevó hasta 4.9, para optimizar la precipitación de proteína se enfriaron los licores acidificados a 4°C durante 15 min. La recuperación de la proteína sólida precipitada se realizó mediante cinco métodos diferentes, denominados *RP* (recuperación de proteína) descritos a continuación.

RP1.- La proteína precipitada de los lotes uno y dos fue recuperada mediante una filtración simple con bolsas de tela, una vez filtrada se puso en cajas de Petri y se secó a 45°C durante 24 h.

RP2.- Se realizó una filtración a vacío con papel filtro Whatman® del número 41 para recuperar la proteína precipitada del lote tres, posteriormente dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h, y se cuantificó por gravimetría.

RP3.- Los licores de desproteínización del lote cuatro se vertieron en tubos de ensayo de 10 mL de capacidad (previamente pesados), se añadió ácido acético concentrado para precipitar la proteína dentro de los mismos tubos, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Concluida la centrifugación se drenó el sobrenadante, después se realizaron lavados con agua

desionizada para neutralizar el pH; una vez lavada la proteína se drenó el agua, se secaron los tubos a 45°C por 24 h y se cuantificó la proteína recuperada.

RP4.- Éste método se aplicó para recuperar la proteína de los lotes cinco y seis, la fracción proteica se aisló mediante una filtración con bolsas de tela, posteriormente se lavó con agua desionizada en múltiples ocasiones, se puso en cajas de Petri y se secó a 45°C durante 24 h.

RP5.- La proteína de los lotes nueve y diez se filtró por gravedad con papel filtro Whatman® del número 41, la proteína recuperada se sometió a tres lavados para purificarla, primero se lavó con agua desionizada, después con éter etílico y finalmente con etanol al 50%. Una vez lavada la proteína se removió del papel y se puso en cajas de Petri, por último se dejó en una estufa de vacío y se secó a 30°C por un lapso de 24 h.

La proteína recuperada y seca de los lotes cinco, seis, nueve y diez se redujo a polvo con un mortero, se cuantificó por gravimetría y se reservó para su análisis mediante espectroscopia infrarroja (FTIR).

Se guardó en refrigeración una parte de los licores obtenidos antes y después de la precipitación de proteína, con la finalidad de realizar análisis espectrofotométricos que permitieran calcular la concentración de proteína (descritos más adelante). Una fracción de los licores de desproteínización acidificados se reservó para la etapa de precipitación salina, para optimizar la recuperación de la proteína remanente en éstos licores.

6.5.2 Precipitación salina

Se tomaron alícuotas de 10 mL de los licores de desproteínización acidificados (a los cuales se precipitó la proteína con ácido acético y después se removió la misma), se colocaron en tubos de ensaye, se añadió lentamente cloruro de sodio (NaCl) hasta llegar a una concentración de 2.5 M en el interior del sistema, los tubos se agitaron en un vórtex para disolver el cloruro de sodio, una vez disuelto se enfriaron a 4°C durante 15 min y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 min. Finalmente se recuperó una cantidad del sobrenadante para conocer la cantidad de proteína remanente (se comparó con el licor acidificado antes de la precipitación salina) mediante análisis espectrofotométricos.

6.6 Aislamiento de quitina

Al finalizar el proceso de remoción de proteína con hidróxido de sodio se obtuvo una fracción sólida que básicamente es quitina, como se mencionó antes, ésta se separó de los licores de desproteínización mediante un filtrado con tela y se lavó con agua desionizada hasta un pH neutro; la quitina así obtenida se cuantificó y caracterizó.

6.7 Caracterización básica

Se determinaron los porcentajes de humedad y de cenizas (minerales) de la materia prima así como del material sólido obtenido en cada una de las etapas hasta la obtención del biopolímero quitina/quitosana (a excepción de los lípidos y proteína).

6.7.1 Determinación de humedad

La humedad se determinó al pesar 0.1 g de harina (por duplicado) en crisoles de porcelana y se colocaron en una estufa a 100°C durante 4 h; posteriormente se sacaron los crisoles y se dejaron enfriar en un desecador por una hora, una vez fríos se pesaron en una balanza analítica y mediante gravimetría se determinó el porcentaje de agua en la muestra.

6.7.2 Determinación de cenizas

El contenido de cenizas/minerales se determinó gravimétricamente, como lo menciona Pastor (2004), al someter la harina sin humedad a una temperatura de 800°C durante 4 h, hasta la obtención de cenizas blancas.

6.8 Análisis espectrofotométricos de los licores de proteína

Se analizaron los licores provenientes de las etapas de desmineralización, desproteización (antes y después del cambio de pH) y precipitación salina, mediante los métodos de biuret, ninhidrina, espectrofluorometría, Nessler y sal de fenol, los cuales se describen a continuación.

6.8.1 Método de biuret

La técnica de biuret se aplicó como se menciona a continuación:

El reactivo de biuret se preparó como lo menciona Owusu-Apenten (2002), se solubilizaron 1.5 g de sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio) y 0.375 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 125 mL de agua desionizada con agitación

mecánica constante, posteriormente se añadieron 75 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10% (w/v), finalmente se aforó a 250 mL con agua desionizada.

Así mismo se realizó una curva de concentración con caseína, a partir de una solución madre al 2% de concentración (w/v), en donde se disolvieron 0.5281 g de caseína en agua desionizada y se aforó a 25 mL. Partiendo de ésta solución madre se hicieron diluciones a concentraciones de 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4% de proteína (caseína) para los puntos de la curva.

En tubos de ensaye con tapa se añadieron 1 ml de la solución de proteína (perteneciente a la curva de concentración o a la muestra a analizar), 4 mL del reactivo de biuret y se ajustó el volumen a 10 mL con agua desionizada; para el blanco se añadió 1 mL de agua desionizada en lugar de la solución de proteína. Los tubos se llevaron a 37°C en un baño maría, se dejaron 15 min para fijar el color. Posteriormente se leyó la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro USB4000®.

6.8.2 Método de ninhidrina

Se preparó una solución de ninhidrina al 2.7% (w/v) en etanol absoluto y se mezcló con buffer de acetato 0.2 M (con pH de 5.2), ésta solución se guardó en un frasco ámbar bien cerrado y se refrigeró a 4°C para evitar la rápida oxidación de los componentes.

Para la construcción de la curva de concentración de aminoácidos, se preparó una solución madre de ácido aspártico a 200 μ M, disuelto en ácido acético (CH₃COOH) al 0.05% (v/v), la curva constó de cinco puntos de concentración (Cuadro 2).

Para desarrollar la coloración (púrpura de Ruhemann), que inicialmente permitió construir la curva de calibración de aminoácidos y posteriormente estimar la concentración de los mismos en la proteína de las muestras, se añadieron en tubos de ensaye los siguientes componentes en orden: primero se añadió la solución de aminoácido según lo mencionado en la Cuadro 2, para el caso de las muestras analizadas se añadieron 2 mL, posteriormente se añadió agua desionizada y por último la solución de ninhidrina. Los tubos de ensaye se calentaron durante 30 min en agua hirviendo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadió etanol al 50% para terminar de oxidar la ninhidrina que no reaccionó con los aminoácidos. Se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm en el espectrofotómetro USB4000®.

Cuadro 2. Componentes añadidos para la curva de calibración de aminoácidos.

Componente	Tubo Blanco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
<i>Aminoácido</i> (mL)	0.0	0.6	1.0	1.4	1.8	2.0
<i>H₂O</i> (mL)	4.0	3.4	3.0	2.6	2.2	2.0
<i>Ninhidrina</i> (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
<i>Etanol al 50%</i> (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

6.8.3 Determinación de proteína con espectrofluorometría

Para conocer la concentración de proteína mediante espectrofluorometría se diseñó una curva de calibración. Se preparó una solución madre de 20 mg/mL de caseína en ácido acético (CH₃COOH) 1 N (se utilizó el ácido acético 1 N para igualar las condiciones de las muestras a analizar), se tomaron volúmenes de la solución madre de caseína, se pusieron en matraces y se aforaron a 5 mL con ácido acético 1 N (Cuadro 3). El blanco se hizo con 2 mL de ácido acético 1 N.

Cuadro 3. Preparación de las soluciones de caseína que representan los puntos de la curva de calibración.

Punto	Volumen tomado de solución de caseína (mL)	Concentración de caseína en el matraz (mg/mL)
1	0.5	2
2	1.0	4
3	1.5	6
4	2.0	8
5	2.5	10

En tubos de ensaye se añadieron los siguientes componentes en orden: 2 mL de blanco, soluciones de caseína o solución problema y 5 mL de agua desionizada; los tubos se agitaron en un agitador vórtex, y finalmente se leyó la fluorescencia a 591.01 *nm* con el espectrofluorímetro USB2000®.

6.8.4 Análisis de contenido de nitrógeno

El método de Nessler y el método de sal de fenol se basan en el marcado de nitrógeno para su análisis espectrofotométrico. Se requiere de una digestión química previa de las muestras para reducirlas a nitrógeno en forma de amonio o amoniaco (nitrógeno amoniacal), de un tratamiento para marcar o colorear el nitrógeno y de espectroscopia para medir la absorbancia y determinar la concentración.

Para ambos métodos se diseñó una curva de calibración. Primero se preparó una solución madre de cloruro de amonio (NH_4Cl) al pesar exactamente 0.3819 g puros (el reactivo se secó a vacío para eliminar la humedad y así tener un peso seco exacto) los cuales se disolvieron en agua desionizada y se aforaron a 100 mL. El cloruro de amonio tiene 26.185% de nitrógeno, por lo tanto, en los 100 mL de solución hay 0.1 g de nitrógeno o 0.001 g de N/mL. De ésta solución madre se tomaron volúmenes específicos

(Cuadro 4) y se aforaron a 25 mL con agua desionizada para obtener las concentraciones que equivalen a los puntos de la curva.

Cuadro 4. Volúmenes que se tomaron de la solución madre de cloruro de amonio para obtener los puntos de la curva de calibración de nitrógeno.

Punto	Volumen (mL)	Concentración (g/mL de N)	Concentración (g/mL de proteína)
1	5	0.0002	0.00125
2	10	0.0004	0.00250
3	15	0.0006	0.00375
4	20	0.0008	0.00500

Los gramos/mililitro de proteína se calcularon al tomar en cuenta que la masa de una proteína se compone en promedio de 16% de nitrógeno, de tal forma que se multiplicó la concentración de g/mL de nitrógeno por 100 y se dividió entre 16.

6.8.4.1 Digestiones químicas. Se tomaron 2 mL de cada solución de cloruro de amonio que representan los puntos de la curva de concentración, así como 2 mL que corresponden a muestras de los licores de desmineralización o desproteinización, según sea el caso; se depositaron en matraces de digestión, se añadieron 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado y en el caso del blanco sólo se omitió la adición de soluciones nitrogenadas. Las muestras se digirieron en un equipo Digesdahl® a 460°C, después de alcanzar la temperatura máxima se añadieron 5 mL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) a 396 g/L para catalizar la reacción, una vez digeridas las muestras se aforaron los matraces de digestión a 100 mL con agua desionizada.

6.8.4.2 Método de Nessler. Se tomaron 0.4 mL de la muestra digerida y se pusieron en frascos ámbar con tapa, posteriormente se añadieron 24.6 mL de alcohol polivinílico $(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$ a concentración de 0.1 g/L, y finalmente 1 mL de reactivo Nessler; los frascos se agitaron manualmente durante 1 min, se dejaron reaccionar durante 20 min para el completo desarrollo de la coloración y se leyó la absorbancia a 460 nm en el espectrofotómetro USB4000®.

6.8.4.3 Método de sal de fenol. Se utilizó el método mencionado en Greenberg *et al.* (1992) y estandarizado por Leyva-Reyes (2008), se aplicaron modificaciones para determinar concentración de proteína en licores de desproteización. Primero se procedió a llevar a pH neutro las muestras digeridas (ácidas), para ello se tomaron 3.125 mL de cada muestra y se pusieron en un vaso de precipitados con 30 mL de agua desionizada en agitación magnética, se añadieron gota a gota soluciones de hidróxido de sodio a diferentes concentraciones (desde 0.001 a 1 M) hasta llegar a un pH en un rango de entre 6.8 y 7. Una vez que se llevaron a pH neutro las muestras se depositaron en matraces y se aforaron a 50 mL con agua desionizada, a partir de éste punto se tomaron alícuotas de 10 mL de cada muestra. El método de sal de fenol se aplicó como se describe a continuación: las alícuotas se depositaron en un vaso de precipitados con agitación magnética, se añadieron en orden los siguientes compuestos: 50 µL de sulfato manganeso (MnSO_4), 0.6 mL de ácido hipocloroso (HClO) y 0.75 mL de sal de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^- \text{Na}^+$); ésta mezcla se dejó en agitación durante 10 min hasta el desarrollo de la coloración, posteriormente se midió la absorbancia a 630 nm con el espectrofotómetro USB4000®.

6.9 Análisis FTIR de proteínas y quitina

Las proteínas sólidas recuperadas y las quitinas obtenidas de los diferentes lotes se analizaron con el espectrómetro Spectrum GX®, para ello se requirió de 0.1 g (base seca) de material aproximadamente. Se obtuvieron los espectros infrarrojos y se usó el software del mismo equipo para el análisis de las señales los grupos funcionales de cada muestra, así como la determinación del grado de acetilación de las quitinas; los espectros obtenidos se compararon con espectros infrarrojos de materiales similares que han sido reportados en la literatura.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización básica inicial

Los análisis realizados a la harina de cutícula de camarón sin tratar o materia prima, indicaron que en promedio tiene 8.60% de humedad y 27.4% de minerales (30.04% con respecto a la materia seca), al considerar esto se comenzó con la extracción de lípidos.

7.2 Cuantificación de lípidos/pigmentos

Se decidió iniciar la metodología con la extracción de lípidos al estimar que la remoción de éstas grasas en la primera etapa facilita la separación y purificación de las demás fracciones de alto valor agregado que componen a la cutícula de camarón, en especial la proteína y la quitina. Pastor (2004) menciona que algunas variedades de crustáceos presentan una cantidad variable de lípidos que puede interferir con la pureza de las proteínas en caso de intentar recuperarlas.

Los resultados obtenidos en ésta etapa presentaron variaciones en función al método de extracción de lípidos (*ELI*) aplicado a cada lote, en el Cuadro 5 se muestran los datos recabados en ésta primera fase de la metodología, tanto los pesos como los porcentajes son en base seca.

Al finalizar la extracción de lípidos posterior a la aplicación de los métodos *ELI1* y *ELI3* se observó una separación de fases, en donde el sobrenadante presentó una coloración naranja debido principalmente a la presencia del pigmento astaxantina (Figura 6) que de acuerdo a lo mencionado por Sachindra *et al.* (2005) es el carotenoide más abundante en los desechos de camarón. Por otra parte se observó que el uso del equipo soxhlet (método *ELI2*) para la extracción de la astaxantina provocó la degradación de la misma,

a diferencia de lo reportado por Liu *et al.* (2013) quienes emplearon el equipo soxhlet para extraer la astaxantina a partir de microalgas marinas con acetona; por lo que la degradación de pigmentos en el método *ELI2* posiblemente se debió a la naturaleza de los solventes aunado a la alta temperatura empleada.

Los resultados de los tratamientos para la extracción de lípidos confirman que el aislamiento de los mismos no es la opción más viable, principalmente por el bajo contenido de pigmentos.

Como se mencionó en la metodología, sólo se analizaron y cuantificaron directamente los lípidos/pigmentos provenientes de los lotes uno, dos y cinco. Se observó que el método *ELI3* resultó la forma más indicada para la remoción de lípidos ya que presentó las ventajas siguientes:

- 1.- No degrada el pigmento astaxantina.
- 2.- Requiere de una menor cantidad de solventes para la extracción de lípidos en comparación con el método *ELI2*, por lo tanto hay menos inversión en reactivos y menos contaminación hacia el ambiente.
- 3.- Impide la evaporación de los solventes debido al sistema de condensación que posee.

En principio la proporción de la mezcla de solventes con respecto a la harina de cutícula de camarón se aplicó de acuerdo a lo que mencionan Sachindra *et al.* (2006), es decir 2.5:1 (*ELI1*). Sin embargo, al utilizar el equipo soxhlet (*ELI2*) se requirió de un volumen mayor de solventes para el sifoneo de los mismos por lo que la relación se cambió a 9:1. Después de observar que posterior al uso del soxhlet se degradaron los pigmentos se

empleó el método *ELI3*, y se estableció la relación de líquido:sólido a 5:1 para optimizar la remoción de las grasas.

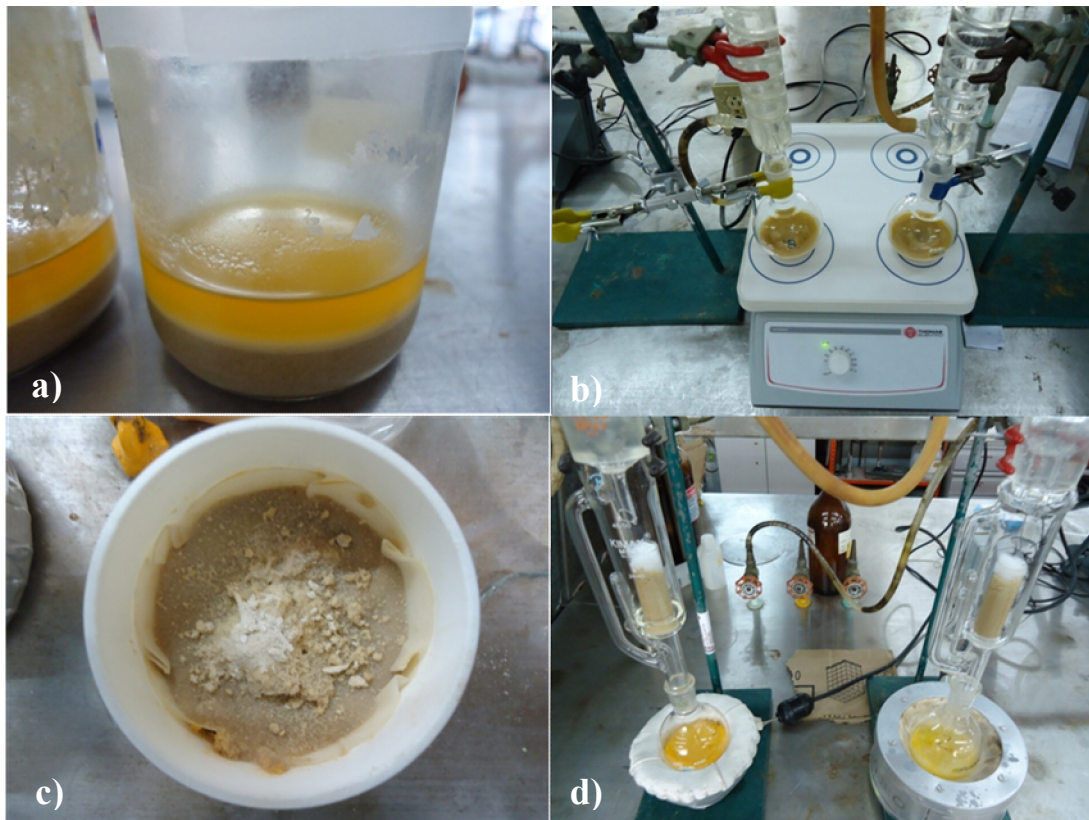


Figura 6. Despigmentación: a) *ELI1*, la coloración del sobrenadante se debe en su mayoría al pigmento astaxantina. b) *ELI3*. c) *ELI3*, harina despigmentada posterior a la filtración de los solventes. d) *ELI2*.

Los lípidos se cuantificaron por peso directo de los mismos (métodos *ALP1* y *ALP2*) y mediante el cálculo de la diferencia que existe entre la masa inicial (materia prima) y la masa final (harina despigmentada). Después de observar los resultados obtenidos y comparar con el procedimiento seguido por Sachindra (2003) para la cuantificación de lípidos, se determinó que la mejor manera de cuantificar los mismos, es por peso directo y no por diferencia de peso, porque

puede darse el caso de contaminación por transferencia o pérdida de masa en la harina a tratar; en relación a lo anterior se promedió el contenido de grasas en la materia prima con los datos de porcentaje de lípidos de los lotes uno, dos y cinco.

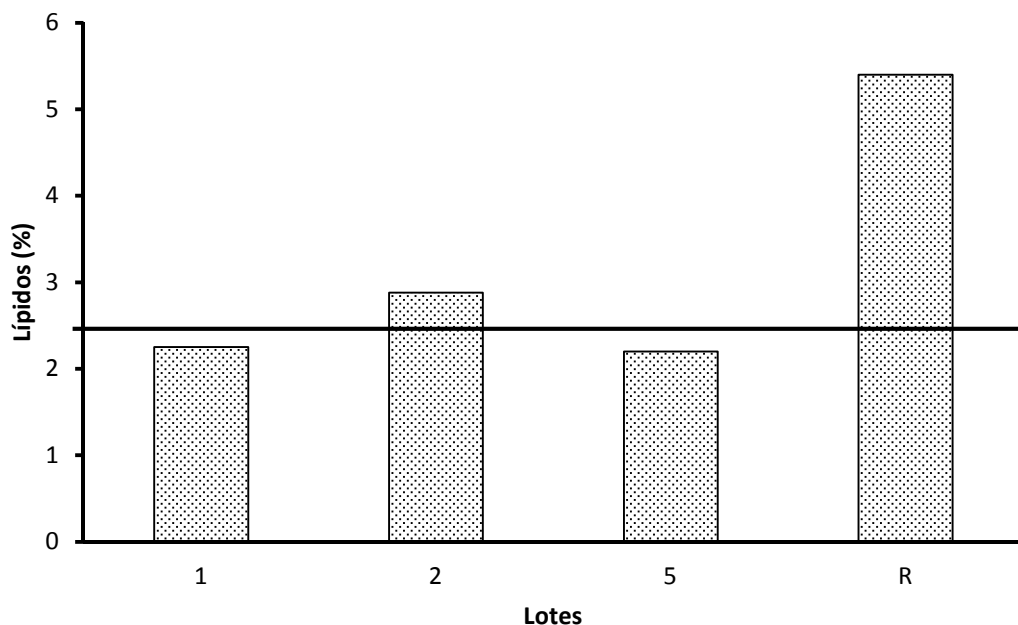
Cuadro 5. Resultados de la etapa de extracción de lípidos/pigmentos.

Lote	Método de extracción de lípidos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Método de remoción de solventes	Lípidos cuantificados (g)	Lípidos (%)
1	<i>ELI1</i>	10.0	5.8112	<i>RDS1</i>	0.2250 ^a	2.25
2	<i>ELI1</i>	10.0	6.5887	<i>RDS1</i>	0.2883 ^a	2.88
3	<i>ELI2</i>	10.0	9.8569	<i>RDS2</i>	0.1431 ^b	1.43
4	<i>ELI2</i>	10.0	9.7187	<i>RDS2</i>	0.2813 ^b	2.81
5	<i>ELI3</i>	10.0	9.3609	<i>RDS2</i>	0.2174 ^a	2.17
6	<i>ELI3</i>	10.0	9.6291	<i>RDS2</i>	0.5065 ^b	5.06
7	<i>ELI3</i>	10.0	9.5189	<i>RDS2</i>	0.4961 ^b	4.96
8	<i>ELI3</i>	10.0	9.6486	<i>RDS2</i>	0.3721 ^b	3.72
9	<i>ELI3</i>	9.6225	9.5170	<i>RDS2</i>	0.1055 ^b	1.10
10	<i>ELI3</i>	9.6094	9.4758	<i>RDS2</i>	0.1336 ^b	1.39

a. Cuantificación mediante peso directo de lípidos. b. Cuantificación con respecto a la diferencia de masa antes y después de la extracción.

El promedio de lípidos fue 2.43% con respecto al peso inicial de la harina; Sachindra (2003) menciona que la cutícula de camarón contiene en promedio 5.2% de lípidos, si la cutícula con la que se trabajó presentara un contenido similar de grasas, se estima que se removió aproximadamente el 46.7% de lípidos; sin embargo cabe destacar que el trabajo de Sachindra se enfocó a especies de camarón endémicas de la India, y que presentan un contenido de lípidos diferente al de las especies consumidas en México.

Con respecto a lo mencionado, en la Gráfica 2 se hace una comparación entre el porcentaje de lípidos de la cutícula de camarón cuantificados en el presente trabajo y el porcentaje promedio de lípidos reportado por Sachindra (2003).



Grafica 2. Cuantificación de lípidos, la línea representa el promedio de grasas removidas (2.43%) en éste trabajo; “R” es el promedio del porcentaje total de lípidos reportado por Sachindra (2003).

Posterior a la extracción de lípidos se aplicaron dos métodos para remover los restos de solventes presentes en la fracción sólida (harina despigmentada), en el caso de los lotes uno y dos se registró un peso final menor en comparación al peso final de los lotes subsiguientes debido principalmente a la aplicación del método *RDS1* (que consistió en lavar el material con agua desionizada) en donde se eluyeron algunos componentes de la harina despigmentada, en especial proteínas, por lo que se optó por emplear el método *RDS2* para remover los residuos de solventes de los lotes restantes.

7.3 Desmineralización

En ésta etapa se optó por emplear ácido acético (CH_3COOH) para remover los minerales, principalmente por ser un ácido de origen orgánico que contamina menos al

ser comparado con un compuesto muy utilizado como el ácido clorhídrico (HCl) que es inorgánico, además es más fácil de manejar que el EDTA que también es de origen orgánico pero que tiene un alto peso molecular por lo que se requiere de cantidades elevadas de éste compuesto para la preparación de soluciones; ambos reactivos son utilizados para la desmineralización de desechos de camarón. Cira *et al.* (2002) y Espinoza (1997) mencionan que el uso de tratamientos enzimáticos y el uso de microorganismos en los procesos de obtención de pigmentos, proteína y quitina, son efectivos para la remoción de minerales, sin embargo, éstos tratamientos son más costosos, requieren de condiciones complejas (pH, temperatura, nutrientes, condiciones de luz y humedad) para su funcionamiento y de un lapso de tiempo mayor para dar resultados.

Las condiciones moderadas con las que se llevó a cabo la remoción de minerales (60 minutos, 60°C) permitieron obtener una harina desmineralizada con características óptimas para el aislamiento de proteína y de quitina. Pastor (2004) menciona que el ácido que se emplea habitualmente para la desmineralización es el ácido clorhídrico a diferentes concentraciones, a temperatura ambiente o con calor, y con lapsos que van desde 30 min hasta varios días; lo que a diferencia del tratamiento aplicado es más agresivo y afecta la integridad del material resultante, en especial afecta a la quitina, ya que puede provocar la despolimerización y la desacetilación de la molécula.

El uso de un ácido orgánico dio excelentes resultados, la remoción de minerales fue de hasta 96.1% en promedio. Como todos los lotes recibieron el mismo tratamiento se partió de los datos obtenidos (Cuadro 6) para calcular el coeficiente de variación, siendo éste de 2.4% (consultar anexo B, página 93). El porcentaje de remoción de minerales de

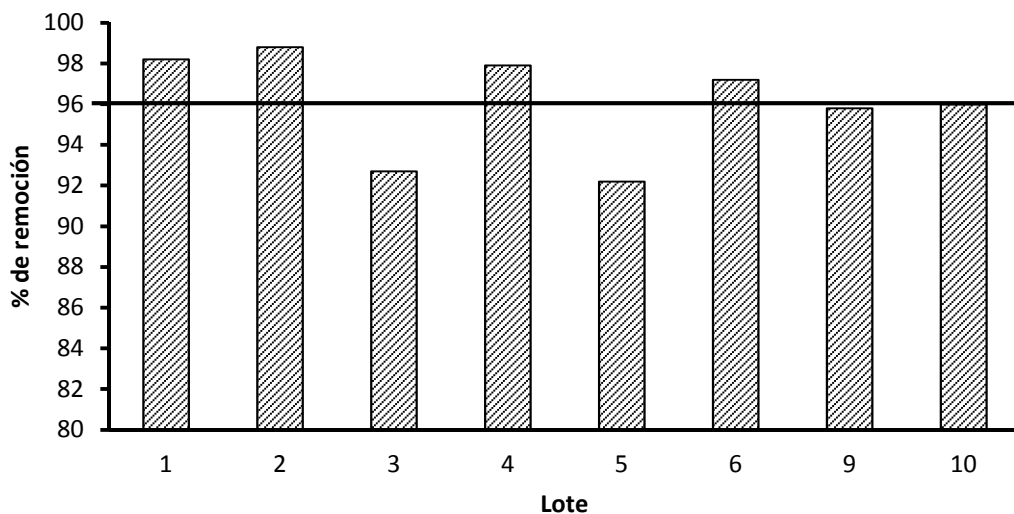
los lotes siete y ocho (marcados con asterisco en el Cuadro 6) se omitió al momento de realizar los cálculos anteriores, ya que presentan una desviación importante, debida posiblemente a la manipulación de las harinas.

Cuadro 6. Resultados de la etapa de remoción de minerales (porcentajes con respecto al material en base seca).

Lote	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Cenizas iniciales (%)	Cenizas finales (%)	Remoción de minerales (%)
1	5.2508	3.4007	32.90	0.60	98.20
2	6.0857	3.7803	30.75	0.37	98.80
3	9.6388	5.8040	28.70	2.10	92.70
4	9.4826	5.6344	28.50	0.60	97.90
5	8.8291	5.4191	28.90	2.25	92.20
6	9.1566	5.2768	28.90	0.80	97.20
7	9.0754	5.2851	30.50	4.05	*86.80
8	9.2739	5.6006	28.80	3.40	*88.20
9	8.9678	5.7602	31.00	1.30	95.80
10	8.9693	5.7471	29.90	1.20	95.99

**Resultados omitidos debido a la desviación importante que presentan.*

En la Gráfica 3 se observan los porcentajes de remoción de minerales de cada lote y se comparan con el promedio de remoción calculado, destacan los lotes uno, dos, cuatro y seis por ser los que presentaron la mayor remoción.



Gráfica 3. Porcentajes de remoción de minerales, la línea indica el promedio de remoción de los mismos.

7.4 Desproteínización, recuperación y cuantificación de proteína

Antes de iniciar con la etapa de remoción de proteína se estimó el contenido de ésta en la harina desmineralizada, y se asumió lo siguiente:

- 1.- Que el material a tratar esta constituido únicamente por tres fracciones, es decir por proteína, quitina y una pequeña cantidad de minerales remanentes.
- 2.- Que la solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M remueve exclusivamente proteínas.
- 3.- Que la harina desproteínizada está compuesta por quitina y minerales remanentes únicamente. Por lo tanto, la diferencia entre la masa sólida que se somete al proceso y la masa sólida lavada y seca que se obtiene al final puede ser denominada como proteína hipotética.

7.4.1 Recuperación de proteína sólida

Posterior al tratamiento de remoción de proteína se trabajó con la fracción líquida obtenida, a la que se denominó hidrolizados o licores proteicos, a éstos licores se les añadió ácido acético para precipitar la proteína, la cual se secó y se cuantificó. De acuerdo a lo mencionado por Pastor (2004) el uso de un ácido para la precipitación permite la recuperación de una proteína con mayor grado de pureza, aunado a esto el uso de ácido acético para la precipitación es adecuado por los motivos ya mencionados en la etapa de desmineralización.

En el Cuadro 7 se muestran los datos de remoción y recuperación de proteína, los gramos de proteína recuperados que se muestran en el cuadro equivalen a la suma de los gramos de proteína recuperada en la primera y segunda etapa de desproteínización. Los porcentajes de recuperación de proteína presentados son por una parte, con respecto al material inicial (harina desmineralizada) sometido a la desproteínización y por otra parte, son con respecto al contenido de proteína hipotética que se estimó en principio.

Cuadro 7. Datos de la remoción y recuperación de proteína.

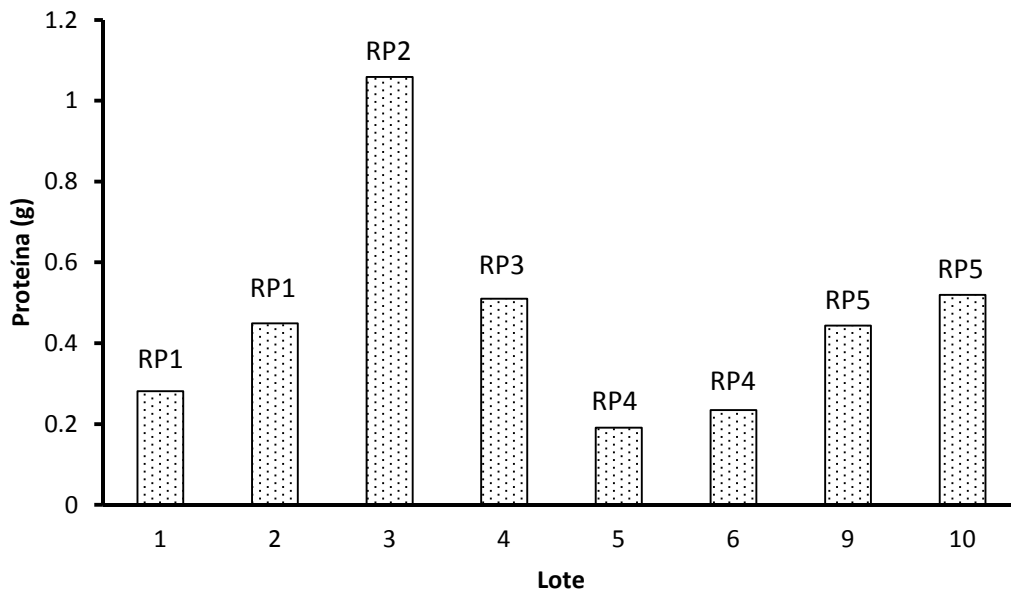
Lote	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Proteína hipotética (g)	Proteína recuperada (g)	Método de recuperación de proteína	Prot. rec. (%) respecto a prot. hipotética	Prot. rec. (%) respecto a material inicial
1	2.8809	1.5646	1.3163	0.2818	<i>RP1</i>	21.4	9.8
2	3.2543	1.7233	1.5310	0.4500	<i>RP1</i>	29.4	13.8
3	5.3069	2.0167	3.2902	1.0595	<i>RP2</i>	32.2	20.0
4	5.1198	2.1705	2.9493	0.5112	<i>RP3</i>	17.3	10.0
5	4.7533	2.0208	2.7325	0.1916	<i>RP4</i>	7.0	4.0
6	4.9069	1.8877	3.0192	0.2357	<i>RP4</i>	7.8	4.8
9	5.4715	1.9547	3.5168	0.4447	<i>RP5</i>	12.6	8.1
10	5.4527	1.9495	3.5032	0.5203	<i>RP5</i>	14.8	9.5

Es mejor considerar el porcentaje de recuperación de proteína con respecto a la proteína hipotética, debido a que ésta determina de manera más adecuada la eficiencia de cada proceso de recuperación. Como lo menciona Pastor (2004), en ésta etapa se remueven únicamente las proteínas ligadas por enlace covalente a la quitina, mientras que en las etapas anteriores debido a que los tratamientos no son específicos se pierden proteínas hidrosolubles no ligadas, unidas por puentes de hidrógeno y ligadas electrostáticamente a la cutícula de camarón; esto corrobora el por qué se debe considerar la relación porcentual entre la proteína recuperada y la proteína hipotética.

En la Gráfica 4 se muestra la cantidad de proteína aislada a partir de cada método de recuperación (*RP*). El método que más proteína recuperó fue *RP2*, sin embargo, presentó la desventaja de que la proteína quedó adherida al papel filtro, probablemente debido a lípidos remanentes (lipoproteínas) o debido a enlaces mecánicos, adsorción física o enlaces químicos entre las fibras de celulosa del papel y la proteína (Pervaiz, 2012). Destaca también el método *RP3*, que mediante centrifugación y posterior remoción del sobrenadante permitió cuantificar la proteína seca contenida en tubos de ensaye, en este caso el inconveniente fue que la proteína es difícil de retirar de los tubos, se intentó rehidratar con agua sin embargo no fue posible la recuperación total. El método *RP1* no se consideró debido a que los lotes uno y dos presentan una cantidad menor de proteína hipotética y por lo tanto el porcentaje recuperación de proteína no es comparable con el de los demás tratamientos.

Después de analizar detenidamente cual es el método más eficaz para la recuperación de proteína se observó que el método *RP5* cumple con ésta característica, además de permitir recuperar en promedio el 13.7% de proteína, presenta la ventaja de la obtención

de una proteína purificada. Éste porcentaje de recuperación se aproxima a lo reportado por Kamata *et al.* (1976) quienes obtuvieron un hidrolizado compuesto de agua, minerales y proteína a partir de desechos de camarón, al aplicar un tratamiento con ácido acético y temperatura, en donde la proteína representó el 14.4% en base seca.



Gráfica 4. Comparación de proteína obtenida según el método de recuperación.

7.4.2 Análisis espectrofotométricos para determinar proteína

Los métodos de biuret, ninhidrina y espectrofluorimetría aplicados para analizar los licores de desmineralización y de desproteínización no permitieron el análisis de la proteína directamente en el medio líquido en que se obtiene; el principal factor en contra es que se requiere que la proteína se encuentre aislada o en estado puro. Como mencionan Eckfeldt *et al.* (1984) en una investigación relacionada con el método de

biuret, no debe existir interferencia de elementos no proteicos en las muestras (contrario a lo mencionado por Gornall *et al.*, 1949). Otra de las posibles causas que impidieron la cuantificación de proteína, como lo describen Keller & Neville (1986), es que las técnicas de análisis colorimétrico de proteínas pueden presentar afinidad por un solo tipo de proteína y la presencia de otras proteínas o aminoácidos interfiere en el análisis.

El método de Nessler, en donde la proteína que se analiza es digerida y transformada a nitrógeno amoniacal, tampoco dio resultados concretos debido en parte al rango de concentración de nitrógeno que se maneja en éste método, ya que las cantidades de nitrógeno resultaron muy bajas para ser cuantificadas de esta manera (en el caso de los licores de desmineralización), como menciona Praus (2002) éste método en ocasiones puede dar falsos positivos, es menos selectivo y sensitivo que otros métodos para determinar concentración de nitrógeno.

7.4.3 Determinación de la concentración de proteína hidrolizada mediante el método de sal de fenol

Previo al análisis de las muestras mediante el método de sal de fenol se hicieron los siguientes planteamientos para estimar el contenido de proteína presente en los licores de desproteinización de los lotes nueve y diez, con la finalidad de conocer el volumen de licor a tomar o diluir para posteriormente, hacer la digestión química y permitir que los valores de absorbancia de las muestras a analizar quedaran dentro de la curva de calibración elaborada:

- 1.- A partir de los resultados de las etapas de desproteinización realizadas en los lotes uno al seis, se promedió un porcentaje de remoción de proteínas con

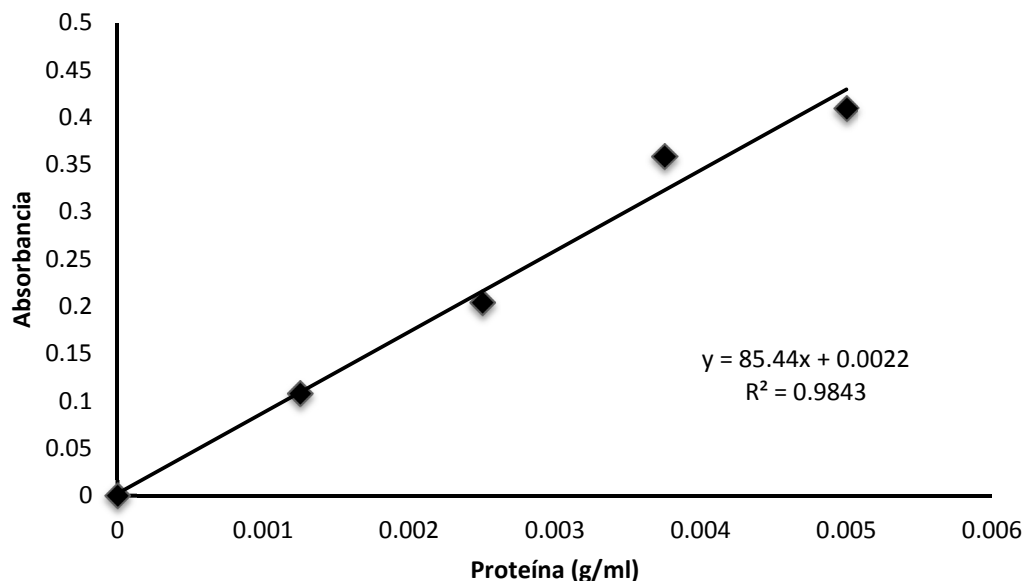
respecto a la harina desmineralizada, el cual fue de 59.7%. En base a esto se estimó la cantidad de proteína presente en los licores de desproteínización de los lotes nueve y diez, lo que resultó en 3.2665 g y 3.2553 g de proteína respectivamente (se hace hincapié en que estos valores son meramente teóricos).

2.- En la primera etapa de desproteínización se estimó que se remueve hasta un 80% de proteína en promedio y que en la segunda etapa se remueve el resto de la proteína (20%).

Para el análisis de las muestras los licores de desproteínización se clasificaron de acuerdo al número de lote al que pertenecen, si provienen de la primera o de la segunda etapa de desproteínización y según el pH de cada uno (básico: cuando contiene toda la proteína hidrolizada o ácido: cuando una fracción de la proteína ha sido precipitada y removida). Por ejemplo: “9-I-pHb” esto quiere decir que se trata de una muestra del lote 9, de la primera etapa de desproteínización, y que tiene pH básico.

Como se mencionó en la metodología se realizó una curva de calibración con cloruro de amonio (NH_4Cl) para determinar la concentración de proteína en las muestras, se obtuvieron los datos de absorbancia, y junto con la concentración de proteína de cada punto de la curva (Cuadro 4, página 34) se diseñó la Gráfica 5. La curva de calibración presentó una r^2 de 0.9843, mientras que la ecuación de la recta fue: $y = 85.44x + 0.0022$.

La concentración de proteína de las muestras se calculó mediante el despeje de la ecuación de la recta, y quedó de la siguiente manera: $x = (y - 0.0022) / 85.44$, en donde “y” es el valor de absorbancia de las muestras analizadas.



Gráfica 5. Curva de calibración de cloruro de amonio empleada para determinar la concentración de proteína de las muestras.

En los Cuadros 8 y 9 se muestran los datos de la concentración de proteína determinada a partir de las muestras analizadas, se promedió la cantidad de proteína de cada muestra y se realizó un cálculo para conocer el contenido de proteína presente en los licores de desproteinización iniciales (ver anexo C, página 94).

Cuadro 8. Contenido de proteína calculado a partir del análisis de las muestras pertenecientes a los licores de desproteinización del lote 9.

Repetición	9-I-pHb (g/mL)	9-I-pHa (g/mL)	9-II-pHb (g/mL)	9-II-pHa (g/mL)
1	0.0033918540	0.002432116	ND	0.004257959
2	0.0035323030	0.002525749	0.004503745	0.003520599
3	0.0033801500	0.002186330	0.004339888	0.003871723
4	0.0034269660	0.002443820	0.004211142	0.003824906
<i>Promedio</i>	0.0034328180	0.002397004	0.004351592	0.003868797

Cuadro 9. Contenido de proteína calculado a partir del análisis de las muestras pertenecientes a los licores de desproteínización del lote 10.

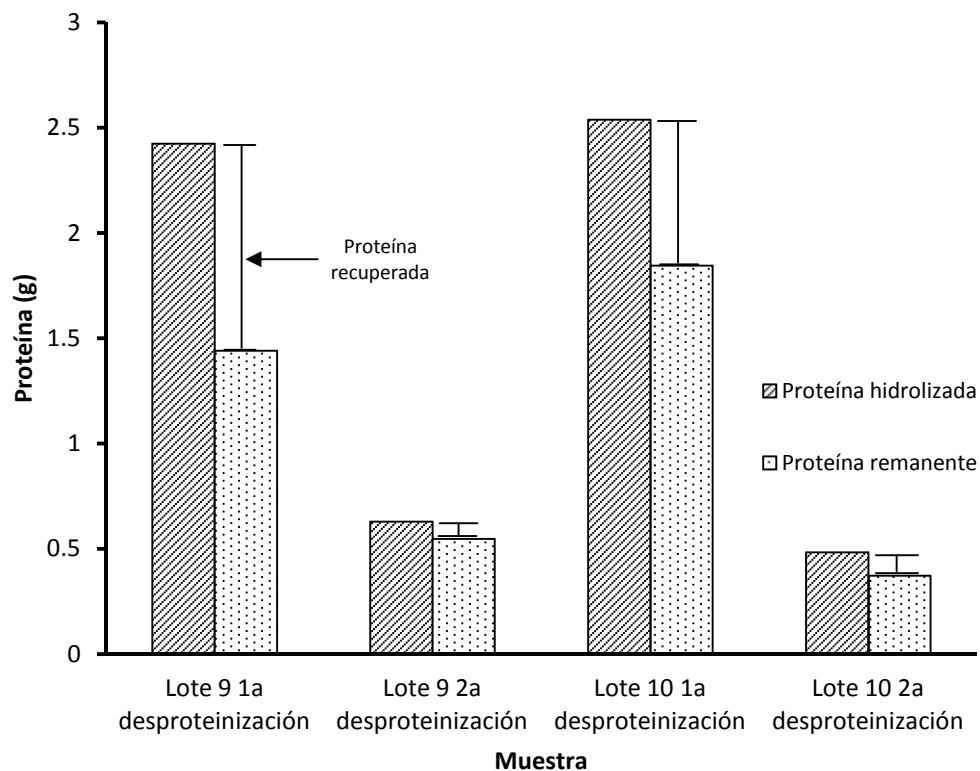
Repetición	10-I-pHb (g/mL)	10-I-pHa (g/mL)	10-II-pHb (g/mL)	10-II-pHa (g/mL)
1	0.003520599	0.0031343630	0.004293071	0.002162921
2	0.003625936	0.0030056180	0.003941948	0.001999064
3	0.003836610	0.0030992510	0.002970506	0.002993914
4	0.003649345	0.0029822100	0.003181180	0.002958801
<i>Promedio</i>	0.003658123	0.0030553600	0.003596676	0.002528675

La concentración de proteína en las muestras (obtenida a partir de los datos de absorbancia en el método de sal de fenol y una serie de cálculos que se muestran en el anexo C) se presenta en el Cuadro 10. En la Gráfica 6 se presentan estos mismos datos, en donde se compara la cantidad de proteína presente en los licores antes y después de la precipitación-separación con ácido acético.

Cabe mencionar que la cantidad de proteína que se precipita difiere de la cantidad de proteína que se recupera finalmente, esto se debe en parte a los lavados a los que se somete ésta proteína para su purificación.

Cuadro 10. Contenido de proteína de las muestras analizadas (ver anexo C).

Muestra	Proteína determinada por espectrofotometría (g)
9-I-pHb	2.425360543
9-I-pHa	1.442641296
9-II-pHb	0.630980840
9-II-pHa	0.549369174
10-I-pHb	2.540363194
10-I-pHa	1.845946667
10-II-pHb	0.485551260
10-II-pHa	0.374243900



Gráfica 6. Contenido de proteína de las muestras de los licores de primera y segunda desproteínización.

Al sumar los gramos de proteína de las muestras 9-I-pHb y 9-II-pHb, y 10-I-pHb y 10-II-pHb se obtuvo la cantidad de proteína presente en los licores de desproteínización antes de la precipitación, y por ende la cantidad de proteína real que se removió en la etapa de desproteínización. El lote nueve presentó 3.0563 g de proteína, mientras que el lote diez presentó 3.0259 g, valores cercanos a la estimación de contenido de proteína realizada antes de los análisis de las muestras.

En el Cuadro 11 se muestra la cantidad de proteína estimada antes de la etapa de desproteínización (proteína hipotética) y la cantidad de proteína determinada mediante espectrofotometría con el método de sal de fenol.

Cuadro 11. Comparación entre la proteína estimada antes de las pruebas y la proteína determinada por espectrofotometría.

Lote	Proteína hipotética (g)	Proteína cuantificada mediante espectrometría (g)
9	3.2665	3.0563
10	3.2553	3.0259
Muestra		
9-I-pHb	2.6132	2.4254
9-II-pHb	0.6533	0.6310
10-I-pHb	2.6042	2.5404
10-II-pHb	0.5208	0.4855

El método de sal de fenol permitió además de lo anterior, conocer que en la primera etapa de desproteínización se remueve en promedio el 81.6% de proteína, lo que es muy cercano al 80% de remoción que se estimó en un principio.

Nota: los licores de desmineralización de los lotes nueve y diez y de los lotes anteriores no se analizaron mediante ésta técnica, ya que se emplearon y agotaron en las pruebas iniciales con los métodos espectrofotométricos previos.

7.4.3.1 Análisis de licores sometidos a precipitación salina de proteínas. Posterior al análisis de los licores de desproteínización mediante el método de sal de fenol y una vez conocida la concentración de proteína, se decidió hacer una precipitación salina para recuperar la proteína remanente en los licores ácidos. Se aplicó nuevamente el método

de sal de fenol para cuantificar la proteína que es precipitada y removida en ésta etapa, así como la proteína remanente.

Se tomaron alícuotas de 10 mL de las muestras 9-I-pHa y 9-II-pHa sometidas a precipitación salina y remoción de proteína. Previo a la digestión química se diluyeron las muestras para que quedaran dentro de la curva de concentración, se tomó un volumen y se aforó a 25 mL (consultar anexo D, página 96), posteriormente se digirieron 2 mL de cada muestra diluida.

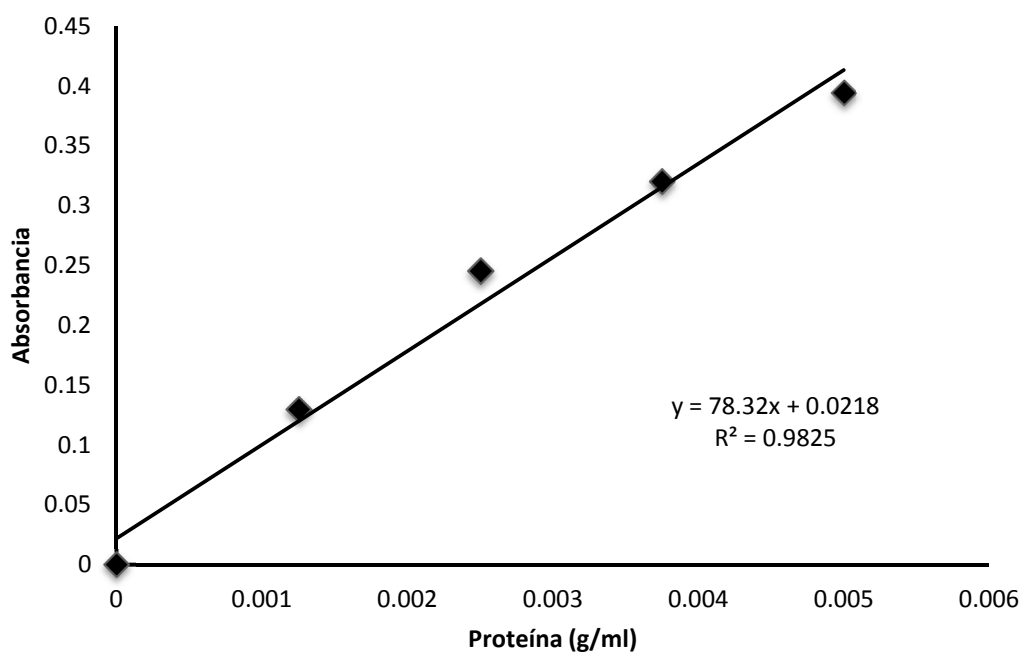
Se preparó otra curva de calibración con cloruro de amonio según lo mencionado en la Cuadro 4 (página 34), una vez obtenidas las absorbancias de los puntos de la curva se construyó la Gráfica 7, ésta presentó una r^2 de 0.9825 y una ecuación de la recta que fue: **$y = 78.32x + 0.0218$** .

La concentración de proteína de las muestras se calculó mediante el despeje de la ecuación, y quedó de la siguiente manera: **$x = (y - 0.0218) / 78.32$** , en donde “y” es el valor de absorbancia de las muestras.

En el Cuadro 12 se muestran los resultados de la concentración de proteína de las muestras sometidas a precipitación salina.

Cuadro 12. Contenido de proteína en los licores de desproteinización sometidos a precipitación salina.

Repetición	9-I-pHa (g/mL)	9-II-pHa (g/mL)
1	0.00284985	0.002351890
2	0.00300306	0.002454035
3	0.00264556	0.002888151
4	0.00305414	0.002926456
<i>Promedio</i>	0.00288815	0.002655133

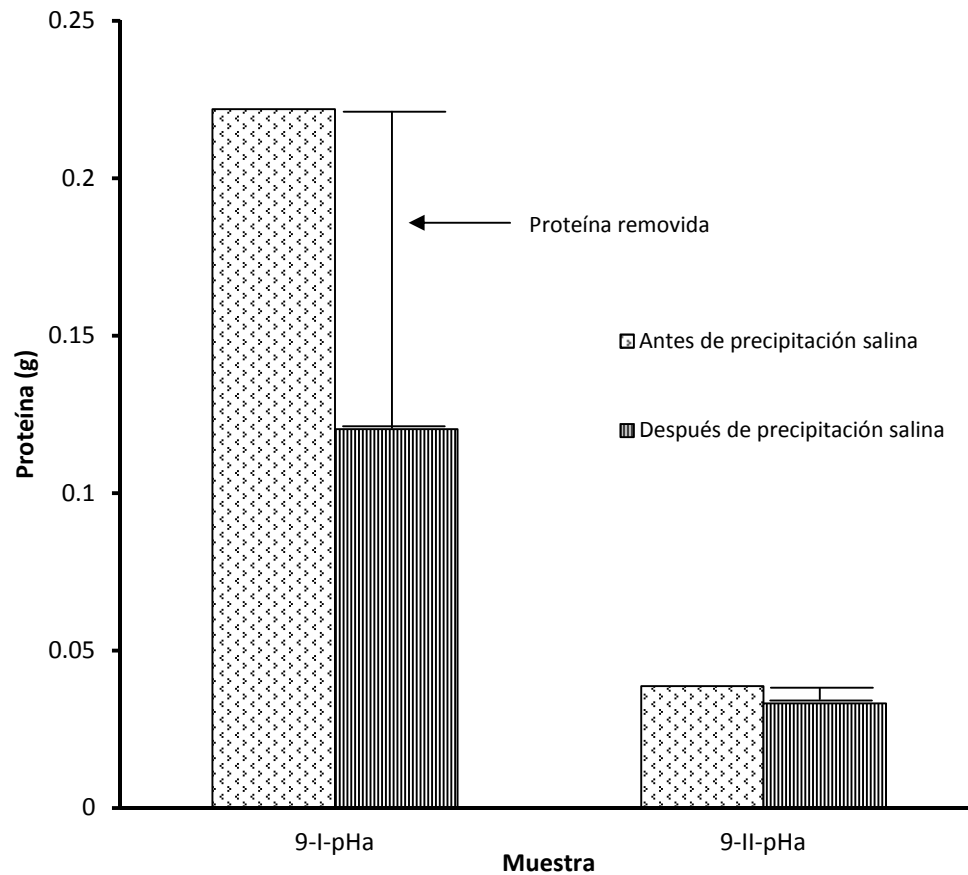


Gráfica 7. Curva de calibración de cloruro de amonio empleada para determinar la cantidad de proteína remanente en las muestras sometidas a precipitación salina.

Posterior a una serie de cálculos (anexo D) se determinó la concentración de proteína de las muestras, en el Cuadro 13 se muestran los resultados de concentración y remoción de proteína en ésta etapa. En la Gráfica 8 se observa que a pesar de que la concentración de cloruro de sodio (2.5 M) empleada para precipitar proteína es la misma en ambas muestras, la cantidad de proteína que es removida en el licor de la primera desproteización (9-I-pHa) y en el licor de la segunda desproteización (9-II-pHa) difieren significativamente, lo que puede deberse a lo reportado por Dennison (2002) quien menciona que entre más baja es la concentración de proteína en una solución, se requiere de una concentración de sal mayor para la precipitación.

Cuadro 13. Concentración de proteína en las muestras y porcentaje de remoción mediante la precipitación salina.

Muestra	Proteína antes de precipitar (g/10 ml)	Proteína después de precipitar (g/10 ml)	Cloruro de sodio (M)	Proteína removida (%)
9-I-pHa	0.22194481	0.120339632	2.5	45.8
9-II-pHa	0.03868800	0.033189160	2.5	14.2



Gráfica 8. Concentración de proteína en las muestras antes de la precipitación salina y después de la precipitación y remoción de la proteína.

7.4.4 Análisis FTIR de proteína

Se analizaron las fracciones sólidas recuperadas mediante la precipitación ácida en los licores de desproteínización, los espectros infrarrojos obtenidos con el espectrómetro Spectrum GX® confirman que el material recuperado es proteína, ya que en éstos espectros se presentan las señales características de las proteínas. De acuerdo con lo mencionado por Jabs (2005) y Shimadzu (2013) las bandas correspondientes a los picos más representativos de las proteínas son:

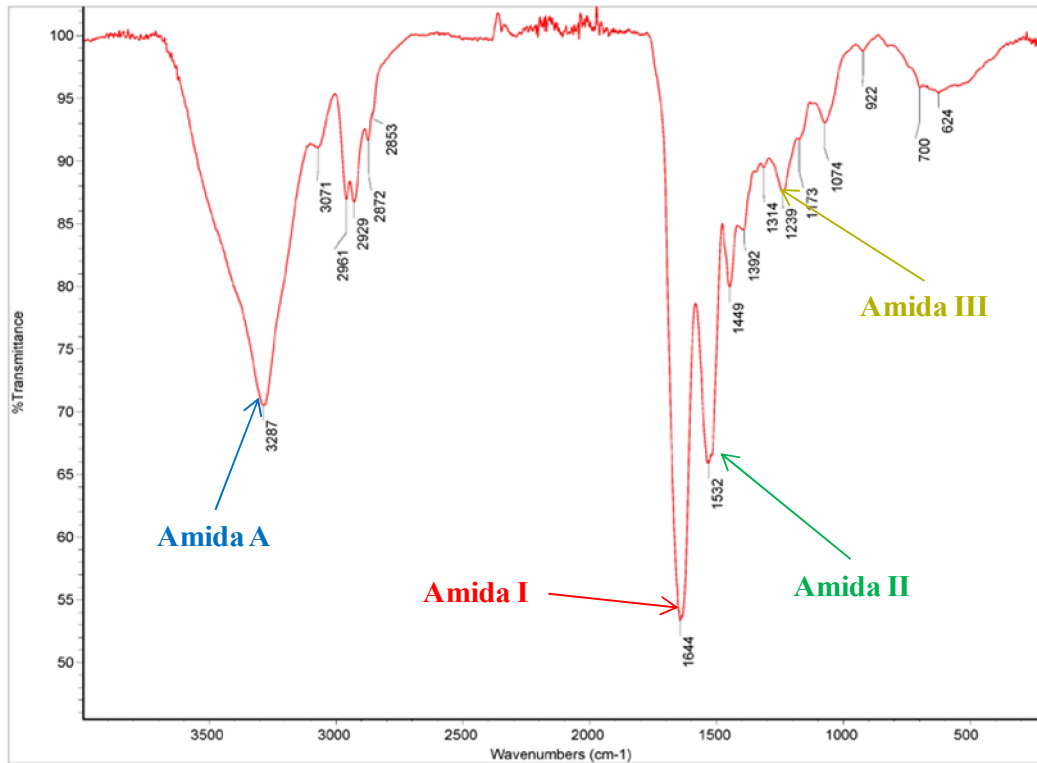
Amida I: se presenta en las regiones aproximadas a los 1600-1700 cm^{-1} . Se produce en un 75-80% por el estiramiento del grupo C=O de los enlaces peptídicos, está directamente relacionado con la conformación de la estructura base de las proteínas (estructura secundaria).

Amida II: se presenta en las regiones aproximadas a los 1510-1580 cm^{-1} . Es producida por el doblamiento del grupo N-H, en un 40-60%; el estiramiento del grupo C-N, en un 18-40%; y el estiramiento del grupo C-C, en un 10%.

Amida III y Amida V: se presentan en regiones aproximadas a los 1250-1350 cm^{-1} . Producidas por el doblamiento del grupo N-H y el estiramiento del grupo C-N; son bandas más complejas formadas por desplazamientos y dependientes del campo energético, la naturaleza de las cadenas laterales y los puentes de hidrogeno.

Amida A: se presenta en las regiones aproximadas a los 3200-3500 cm^{-1} . Se debe en un 95% al estiramiento del grupo N-H, no depende de la estructura de la proteína, pero es muy sensitivo a la presencia de enlaces de hidrógeno.

En la Gráfica 9 se observa un espectro infrarrojo de proteína (caseína), donde se muestran los picos correspondientes a las bandas Amida I, II, III y A.

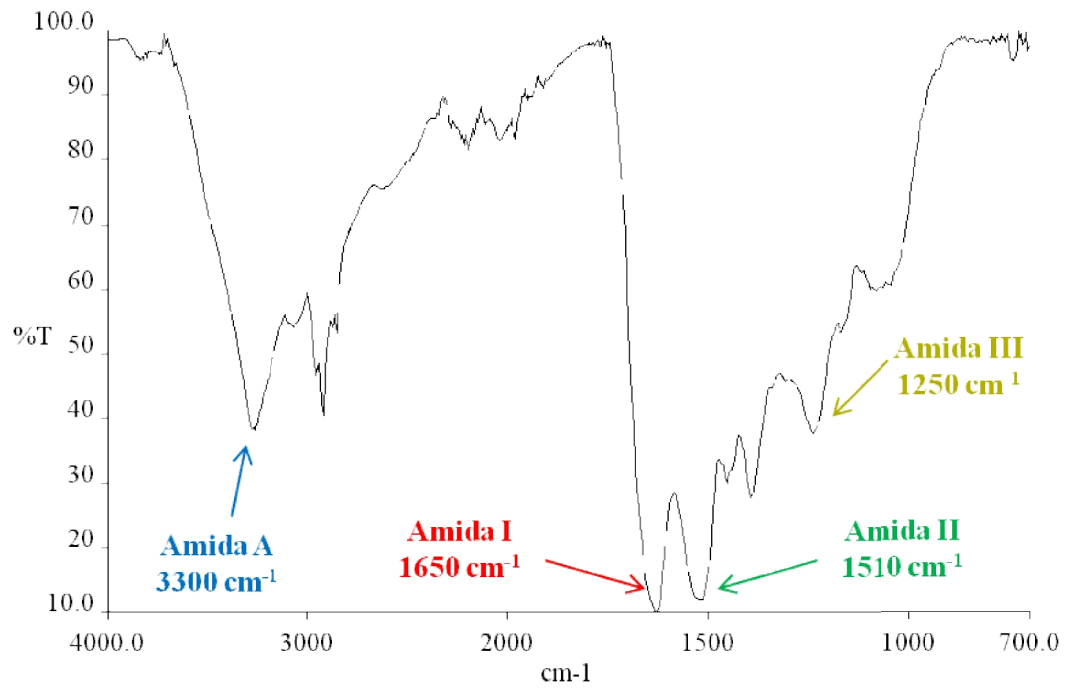


Grafica 9. Espectro infrarrojo de caseína en polvo, señalados con una flecha se destacan los picos que representan a los grupos funcionales más importantes (tomado y modificado de Vahur, 2012).

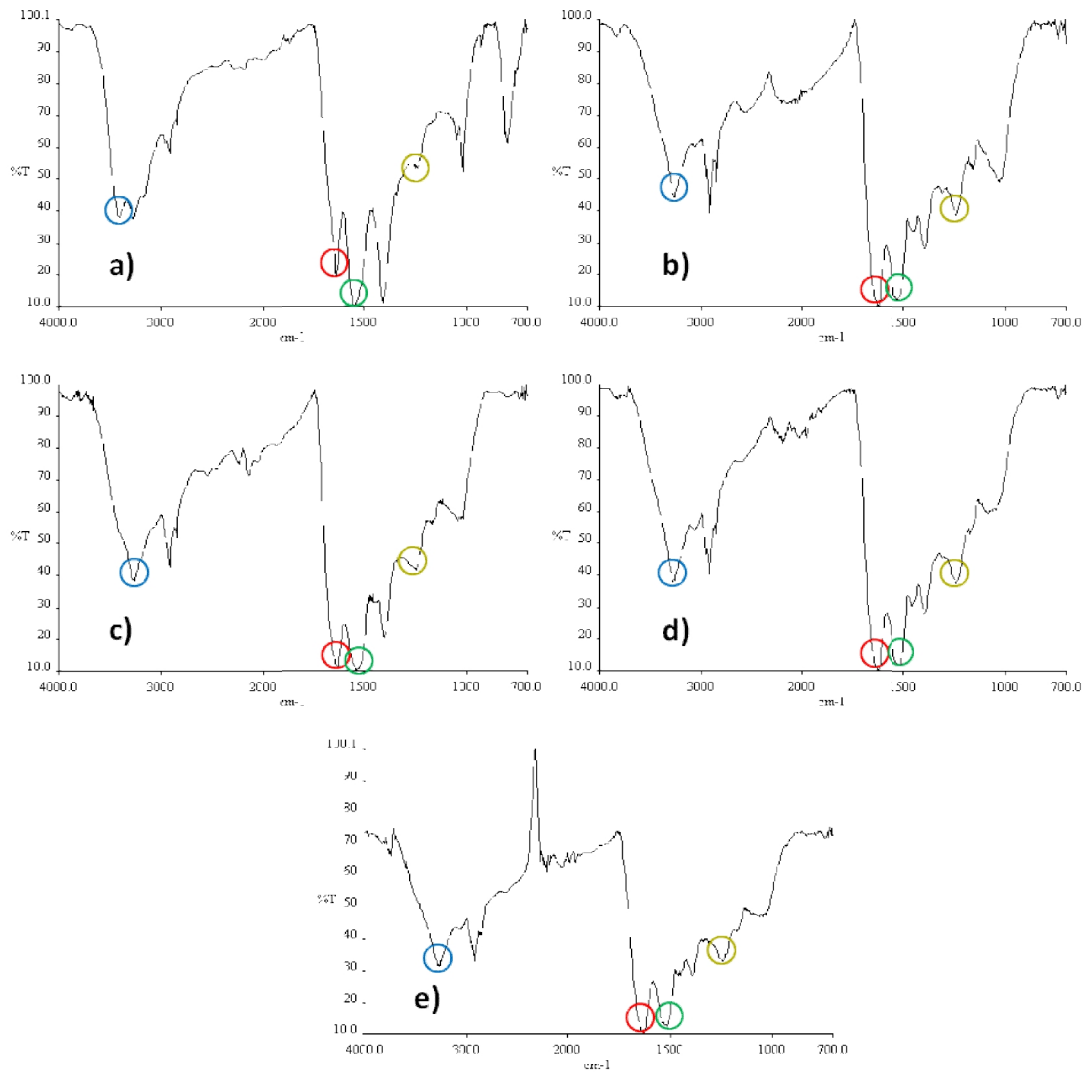
En la Gráfica 10 se muestra un espectro IR de proteína correspondiente al lote 9, ésta proteína fue obtenida en la primera desproteínización. Se pueden observar los picos que representan a Amida A, I, II y III, que como se mencionó antes, son representativos de los grupos funcionales que conforman la estructura de la proteína. Destaca la intensidad de Amida I que es indicador de la integridad de la proteína, lo que puede significar que las proteínas recuperadas no presentan desnaturalización de la estructura secundaria.

En la Gráfica 11 se presentan los espectros infrarrojos obtenidos a partir de las proteínas de la primera desproteínización de los lotes dos, cinco, seis, nueve y diez; mientras que en las Grafica 12 se presentan los espectros de proteína de la segunda desproteínización

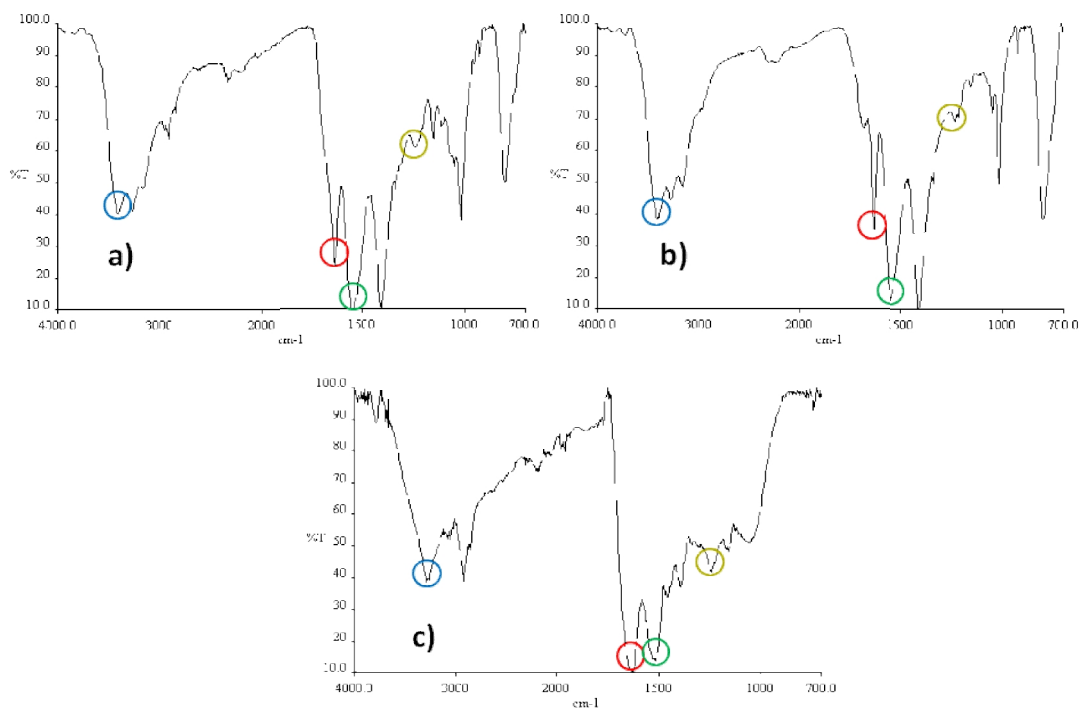
de los lotes uno, dos y nueve; en círculos de colores se encierran los picos que corresponden a las bandas más representativas.



Gráfica 10. Espectro infrarrojo de proteína del lote nueve aislada a partir de la primera etapa de desproteización.



Gráfica 11. Espectros infrarrojos de las proteínas recuperadas en la primera etapa de desproteización, a) lote dos, b) lote cinco, c) lote seis, d) lote nueve y e) lote diez; encerrados en círculos se muestran los picos que representan a las bandas más características de las proteínas, de izquierda a derecha: Amida A, Amida I, Amida II, y Amida III.



Gráfica 12. Espectros infrarrojos de las proteínas recuperadas en la segunda etapa de desproteinización, a) lote uno, b) lote dos y c) lote nueve; encerrados en círculos se muestran los picos que representan a las bandas más características de las proteínas, de izquierda a derecha: Amida A, Amida I, Amida II, y Amida III.

La diferencia de intensidad de algunos de los picos puede deberse en parte a los tratamientos y métodos aplicados para recuperar cada proteína individualmente. Además se observó que el oxígeno del ambiente tiende a oxidar rápidamente la proteína recuperada, ésta al secarse se oscurece y tiende a cristalizarse, tal vez provocado por la remoción de los pigmentos antioxidantes (astaxantina), lo que probablemente puede desencadenar en el rompimiento de algunas cadenas proteicas y llevar a un cambio de estructura o pérdida de la funcionalidad.

7.5 Cuantificación y caracterización de quitina

Al finalizar la etapa de desproteización se obtuvo mediante filtración una fracción sólida, siendo éste material el biopolímero quitina. En el Cuadro 14 se muestran los resultados de la cuantificación y caracterización de las quitinas obtenidas (en base seca), incluido el porcentaje o grado de acetilación que se analiza más adelante (análisis FTIR de quitina).

El promedio de quitina obtenida al finalizar la etapa de desproteización fue 1.9110 g en base seca, esto representa el 19.26% con respecto a la masa de la harina de cutícula de camarón inicial, cuyo promedio es 9.9232 g en base seca.

Manni *et al.* (2010^b) y Hoffman *et al.* (2010) reportan una recuperación de quitina promedio de 18.27% y 22.60% respectivamente, si se compara con el 19.26% obtenido en éste trabajo se puede establecer que el rendimiento de recuperación de quitina es de 90.68%.

Cuadro 14. Resultados de la recuperación y caracterización de la quitina.

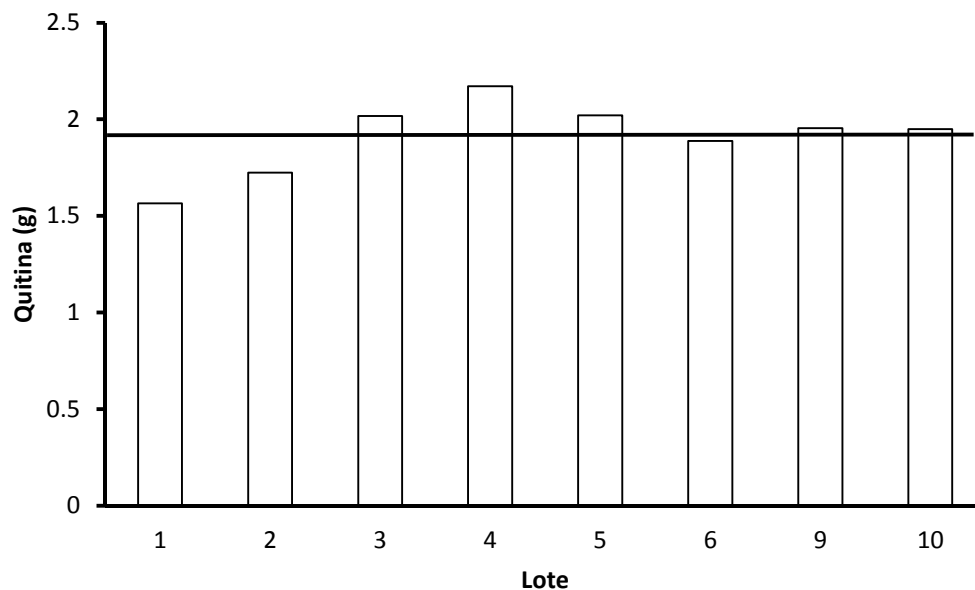
Lote	Quitina recuperada (g)	Quitina recuperada* (%)	Minerales (%)	Grado de acetilación (%)
1	1.5646	15.6	1.80	96.64
2	1.7233	17.2	1.60	99.20
3	2.0167	20.2	1.75	97.07
4	2.1705	21.7	2.00	98.05
5	2.0208	20.2	2.25	90.70
6	1.8877	18.9	1.90	96.57
9	1.9547	20.3	0.90	94.72
10	1.9495	20.3	0.80	99.17

*Porcentaje con respecto a la materia prima o material inicial.

El contenido de humedad promedio de las quitinas fue 3.34% y el grado de acetilación fue de 96.51%. Pacheco (2010) reporta un contenido de minerales en quitina de entre 6.23 y 19.48%, mientras que las quitinas obtenidas presentan 1.82% de minerales en promedio, lo que indica la alta pureza del material obtenido.

El análisis estadístico de los datos de la etapa de recuperación de quitina indica una desviación estándar de 0.1767 g y un coeficiente de variación de 9.24% (ver anexo E, página 98); ésta variación puede deberse a los tratamientos aplicados para la obtención del biopolímero y a la cantidad de harina de cada lote sometida al proceso de desproteínización.

En la Gráfica 13 se muestra la cantidad de quitina obtenida al final de la metodología y se hace una comparación con respecto a la media. Se observa que en general la recuperación de quitina de cada lote es muy cercana al promedio, a excepción de los lotes uno y dos, los cuales desde la etapa de remoción de pigmentos presentaron una desviación importante.



Gráfica 13. Comparación del peso de las quitinas recuperadas a partir de cada lote, la línea representa el promedio de recuperación.

7.5.1 Análisis FTIR de quitina

Se analizaron las quitinas obtenidas después de la etapa de desproteínización, con el espectrómetro Spectrum GX® se obtuvieron los espectros infrarrojos y con ayuda del software del equipo se determinó el grado de acetilación de cada quitina (Cuadro 14, página 63) mediante el método descrito por Palpandi *et al.* (2009), se aplicó la siguiente fórmula:

$$[(A_{1320} / A_{1420}) - (0.3822)] / (0.03133)$$

En donde:

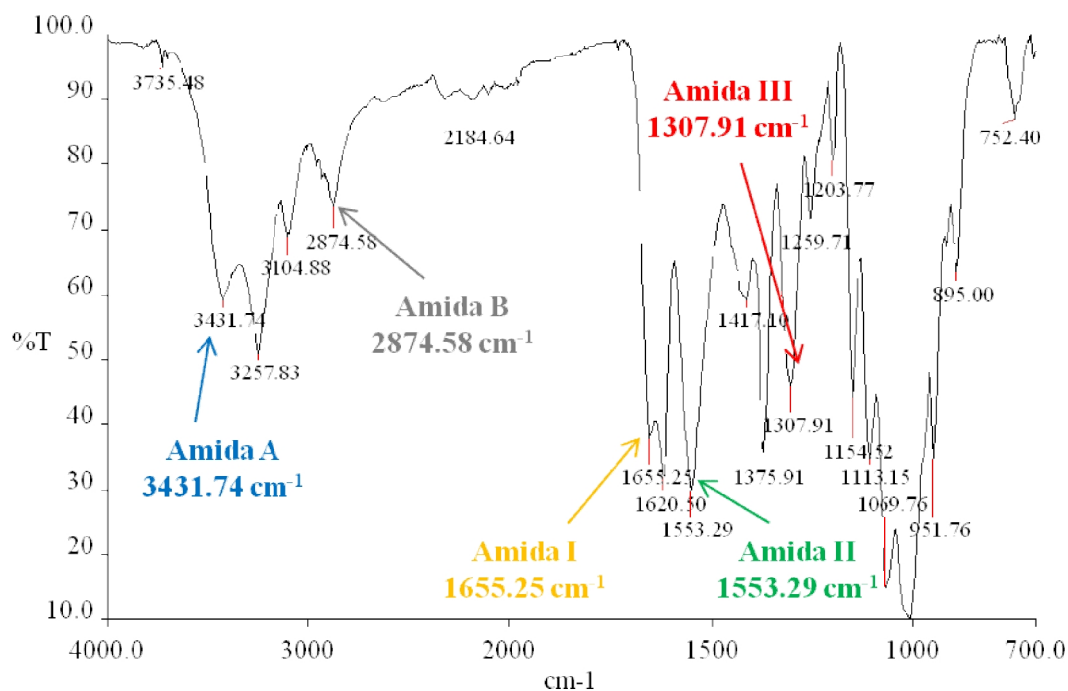
A_{1320} = área del pico presente en la región aproximada a 1320 cm^{-1} .

A_{1420} = área del pico presente en la región aproximada a 1420 cm^{-1} .

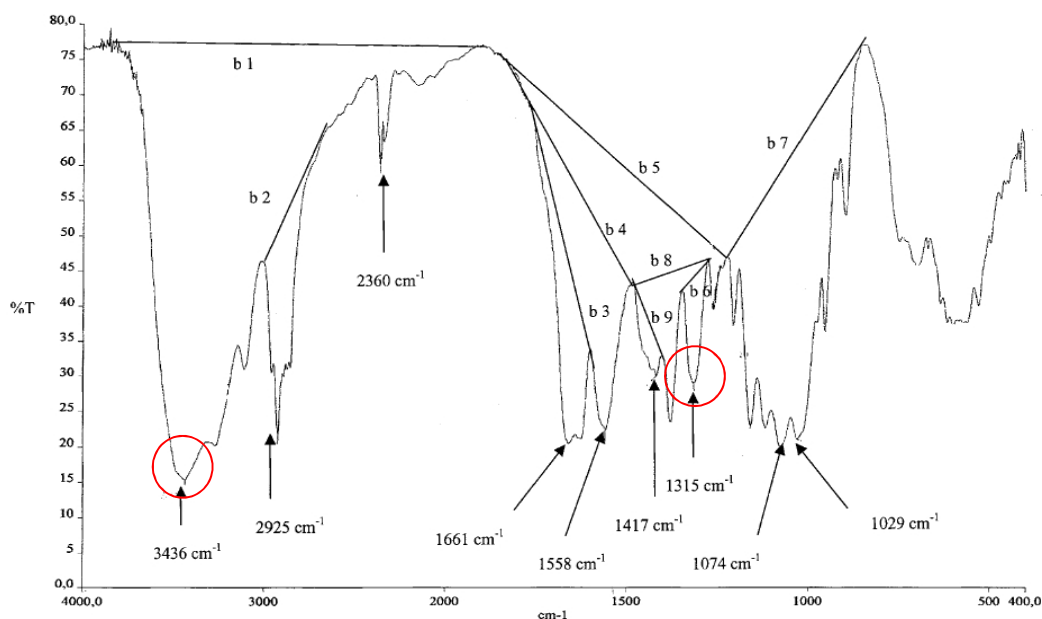
0.3822 y **0.03133** = son constantes determinadas experimentalmente por Palpandi *et al.* (2009).

En la Gráfica 14 se muestra un espectro infrarrojo de quitina que corresponde al lote número nueve, aquí se muestran las bandas de los picos más representativos, que de acuerdo a lo mencionado por Brugnerotto *et al.* (2001) y Palpandi *et al.* (2009) son: Amida I, presente en las regiones próximas a los 1600-1700 cm^{-1} ; Amida II, se presenta en las regiones próximas a los 1510-1580 cm^{-1} ; Amida III, presente en las regiones aproximadas a los 1300-1450 cm^{-1} , se forma por doblamiento del grupo CH_2 , y la deformación del grupo CH_3 ; Amida A, se presenta en las regiones próximas a los 3200-3500 cm^{-1} , se forma por el estiramiento de los grupos OH; Amida B, se presenta aproximadamente a los 2800-3100 cm^{-1} , se forma por el estiramiento simétrico del grupo CH_3 y el estiramiento asimétrico del grupo CH_2 .

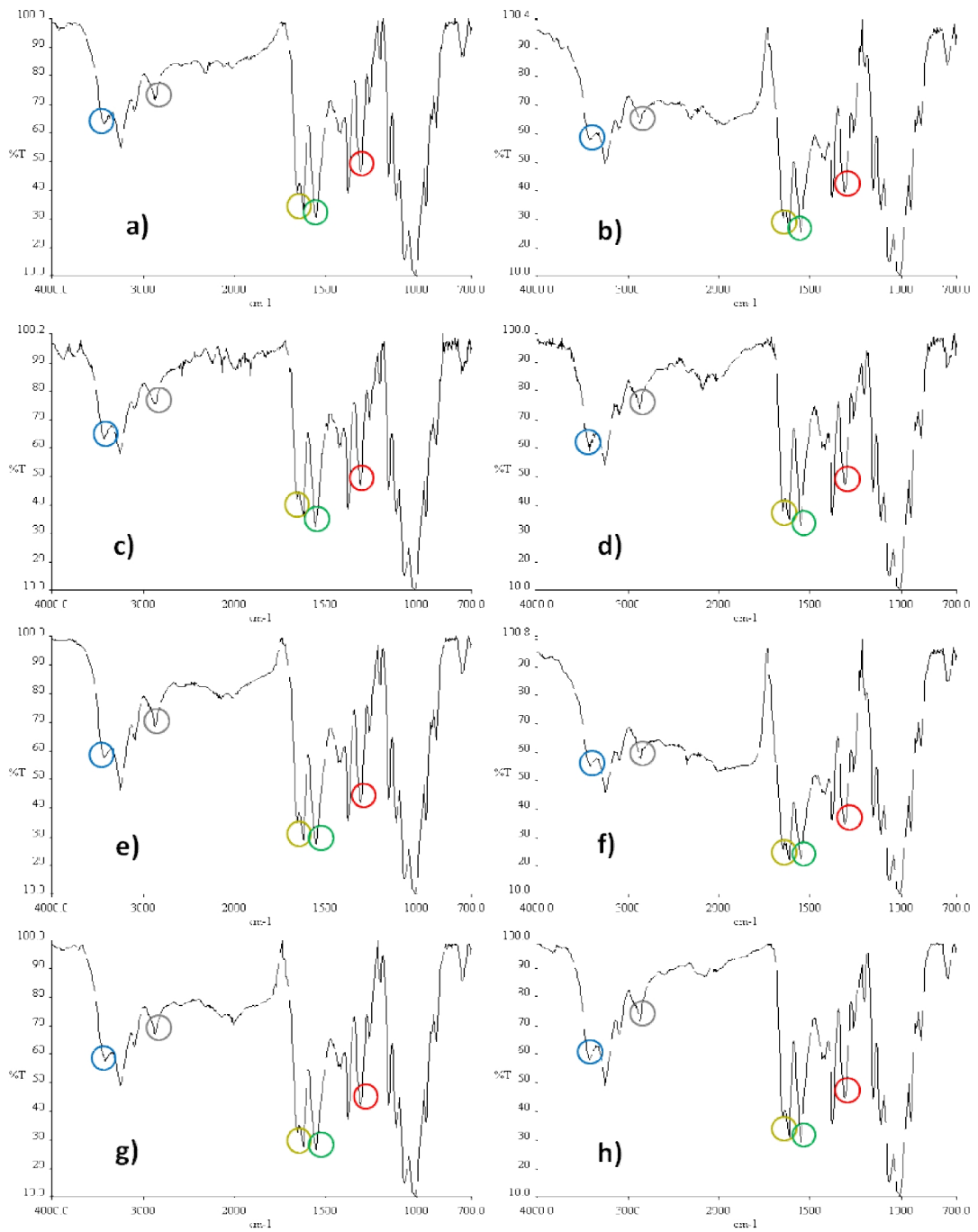
Se realizó una comparación visual de los espectros infrarrojos de quitina obtenidos con un espectro de quitina reportado (Gráfica 15) por Brugnerotto *et al.* (2001) en donde se pueden observar los picos característicos de la quitina, en especial los que aparecen en las regiones próximas a los 1320 cm^{-1} y 3450 cm^{-1} , ya que las áreas presentes sobre éstos picos se emplean determinar el grado de acetilación de la quitina.



Gráfica 14. Espectro infrarrojo de quitina del lote nueve, se destacan los picos que representan a los grupos funcionales característicos de la quitina.



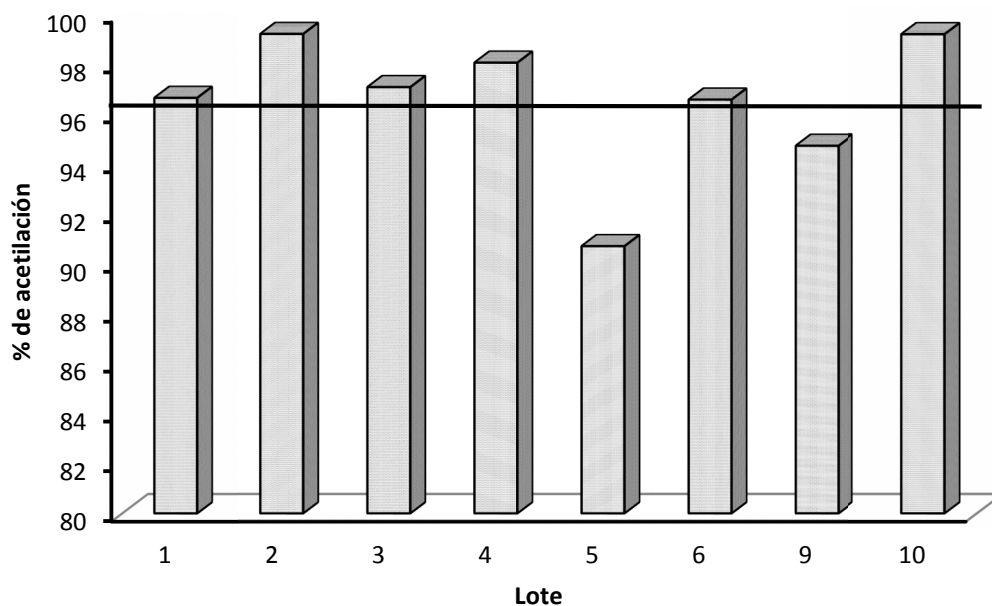
Gráfica 15. Espectro infrarrojo de quitina, se muestran los picos principales de la reportados en la literatura, mediante las áreas presentes sobre los picos b1 y b6 (en círculos) es posible determinar el grado de acetilación de la quitina (A_{1320}/A_{3450}); tomado de Brugnerotto *et al.* (2001).



Gráfica 16. Espectros infrarrojos de las quitinas obtenidas, a) lote uno, b) lote dos, c) lote tres, d) lote cuatro, e) lote cinco, f) lote seis, g) lote nueve y h) lote diez; los círculos destacan los picos más importantes, de izquierda a derecha: Amida A; Amida B; Amida I; Amida II, y Amida III.

En la Gráfica 16 se muestran los espectros infrarrojos de las quitinas obtenidas, se encerraron en círculos los picos más importantes, lo que confirma que el material obtenido es quitina.

Pacheco (2010) reporta la obtención de quitinas con tratamientos enzimáticos, con grados de acetilación de entre 95 y 96% a partir de cefalotórax de camarón, mientras que Hernández-Núñez *et al.* (2008) reportan haber obtenido quitinas mediante tratamientos químicos a partir de cutícula de camarón con un grado de acetilación de hasta el 88%. Por su parte el grado de acetilación de las quitinas obtenidas es en promedio 96.51% en donde las quitinas de los lotes dos, diez y cuatro, presentaron grados de acetilación de 99.20, 99.17 y 98.05% respectivamente.



Gráfica 17. Comparación de los porcentajes de acetilación de las quitinas obtenidas.

En la Gráfica 17 se comparan los grados de acetilación de las quitinas, se observa que la quitina del lote cinco presenta un 90.70% de acetilación, esto debido probablemente a los tratamientos aplicados hasta su obtención y a que probablemente redujeron la cantidad de grupos acetilo presentes en la quitina.

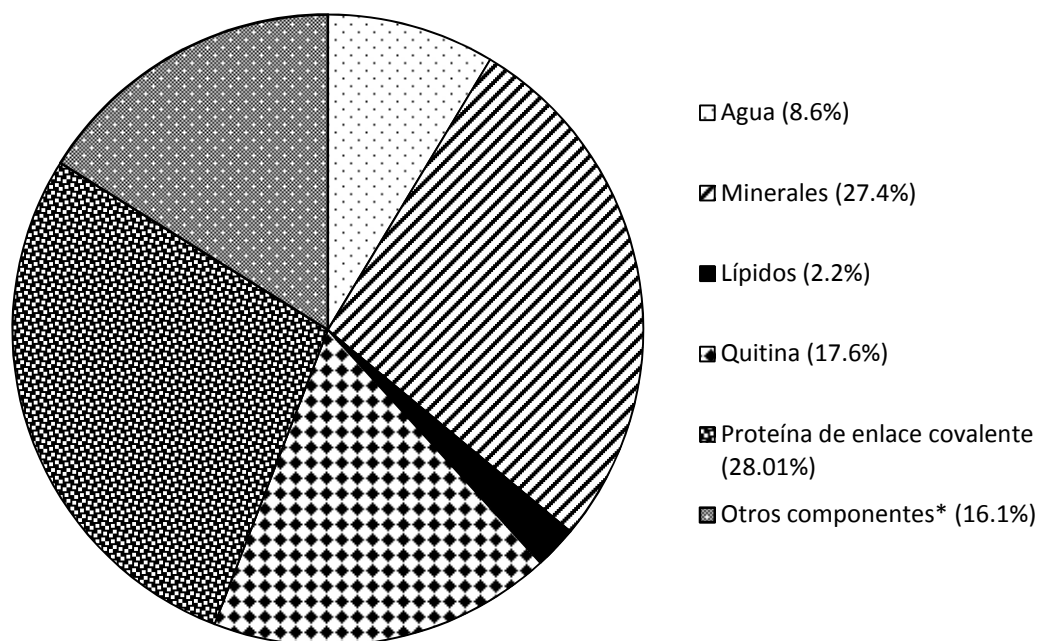
7.6 Caracterización básica final del material

Posterior a cada tratamiento se determinó el porcentaje de humedad y cenizas de cada harina tratada o en su caso la quitina. En el Cuadro 15 se muestran los porcentajes promedio de humedad y cenizas en cada etapa consecutiva por la que pasó la harina de cutícula de camarón, así como el porcentaje cuantificado de lípidos de la materia prima.

Cuadro 15. Caracterización básica de la harina de cutícula de camarón en cada una de las etapas de tratamiento hasta la obtención de quitina (los porcentajes de cenizas y lípidos son en base seca).

Material	Humedad (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)
Inicial	8.60	30.04	2.43
Despigmentado	6.60	29.88	ND
Desmineralizado	4.04	1.15	ND
Quitina	3.34	1.62	ND

En la Gráfica 18 se presenta el porcentaje de cada componente de la materia prima, estos porcentajes son en base húmeda, calculados a partir del promedio de masa inicial de la harina de cutícula de camarón que fue de 10.8596 g (9.9232 g base seca).



Gráfica 18. Porcentajes de los componentes de la harina de cutícula de camarón (en base húmeda).

Es importante destacar que la proteína de enlace covalente (28.01%) es la proteína que se remueve en la etapa de desproteínización; mientras que el 16.1% se refiere a los siguientes componentes: proteínas hidrosolubles, proteínas ligadas por puente de hidrogeno, proteínas ligadas electrostáticamente, además de una pequeña fracción de quitina y lípidos que no se identificaron debido a que los tratamientos son inespecíficos y en cada etapa se remueven componentes diferentes a los que se desea remover o aislar.

7.6.1 Contenido de humedad

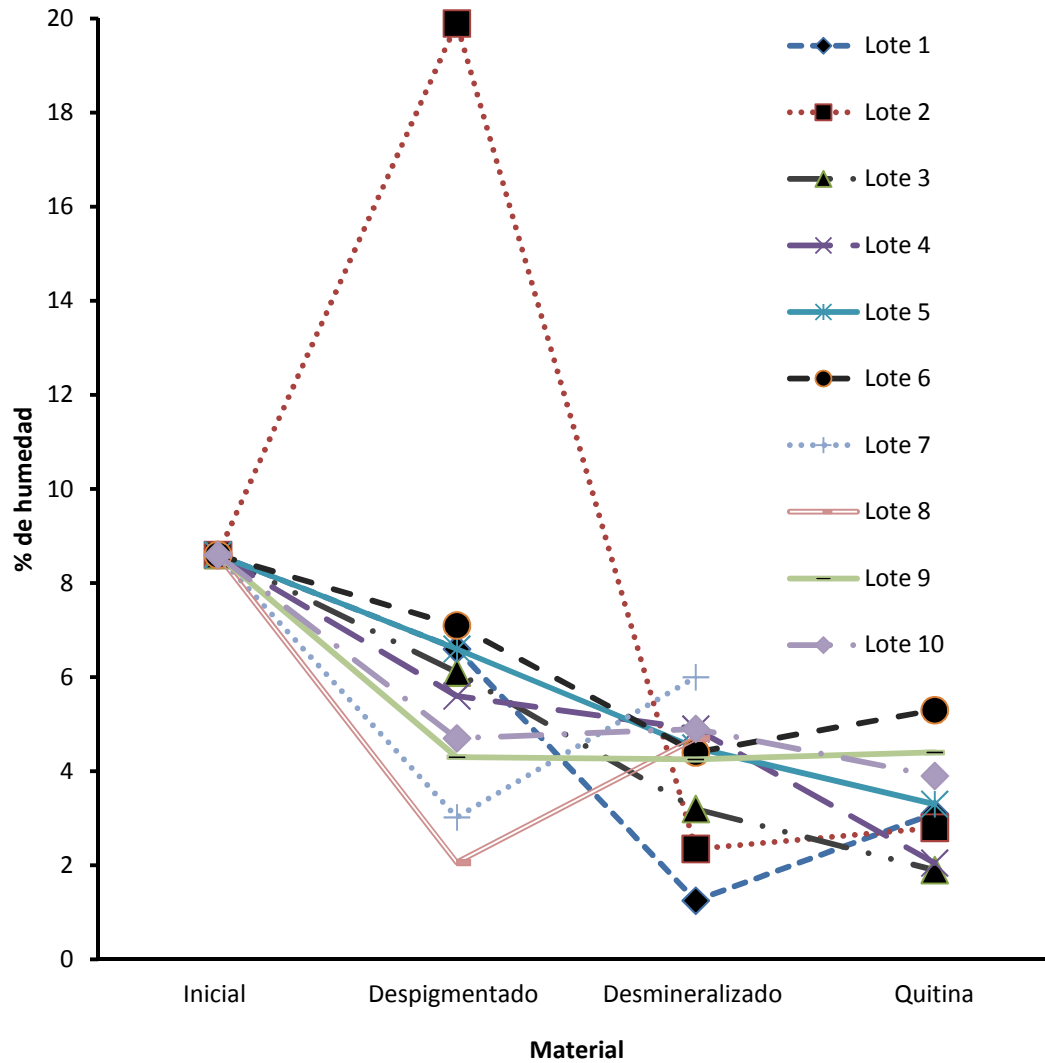
El contenido de humedad en cada etapa varió en función del tiempo que se dejó secar el material después del tratamiento al que se sometió, en el Cuadro 16 se presentan los resultados de contenido de humedad de cada lote en las diferentes etapas de la

metodología desde la materia prima hasta la obtención de quitina. La Gráfica 19 representa el perfil de humedad de cada lote a lo largo de la metodología. Cabe recordar que para determinar el contenido de humedad se sometieron muestras de harina de 0.1 g a temperatura de 100°C durante 4 h.

Cuadro 16. Porcentajes de contenido de humedad en las muestras, desde el material inicial hasta la quitina.

Lote	Inicial (%)	Despigmentado (%)	Desmineralizado (%)	Quitina (%)
1	8.60	6.60	1.25	3.10
2	8.60	19.90	2.35	2.80
3	8.60	6.10	3.20	1.90
4	8.60	5.60	4.90	2.05
5	8.60	6.60	4.50	3.30
6	8.60	7.10	4.40	5.30
7	8.60	3.02	6.00	ND
8	8.60	2.06	4.70	ND
9	8.60	4.30	4.25	4.40
10	8.60	4.70	4.90	3.90

La harina despigmentada del lote dos presentó 19.9% de humedad, un valor alto en comparación a los demás lotes, lo cual probablemente se debió a la aglomeración o dispersión del material sólido, esto influye en la cantidad de agua que es retenida en la harina después del secado.



Gráfica 19. Perfil de humedad de la cutícula de camarón a lo largo de la metodología.

7.6.2 Contenido de minerales

El contenido de minerales de las harinas/quitinas de cada lote disminuyó o aumentó en función del tratamiento aplicado (despigmentación, desmineralización, desproteización). En el Cuadro 17 se presenta el contenido de minerales en porcentaje, éste se expresa como carbonato de calcio o calcita (CaCO_3) ya que es el compuesto de

calcio más abundante en la cutícula de camarón, sin embargo al someter las muestras a 800°C durante 4 h (para determinar el contenido de minerales) el carbonato pasa a una forma más estable que es el óxido de calcio (CaO). Para expresarlo como carbonato de calcio es necesario hacer una serie de cálculos que involucran el peso molecular del carbonato de calcio y del óxido de calcio, así como el factor gravimétrico del calcio en ambos compuestos (ver anexo F, página 99). Como se mencionó previamente la materia prima presentó 30.04% de cenizas, un valor cercano al 26% que reporta Sachindra (2003) en su investigación. Las harinas despigmentadas presentaron en promedio 29.88% de minerales, una diferencia de 0.16% con respecto al contenido cenizas del material inicial, lo que indica que al remover los lípidos también se remueven minerales.

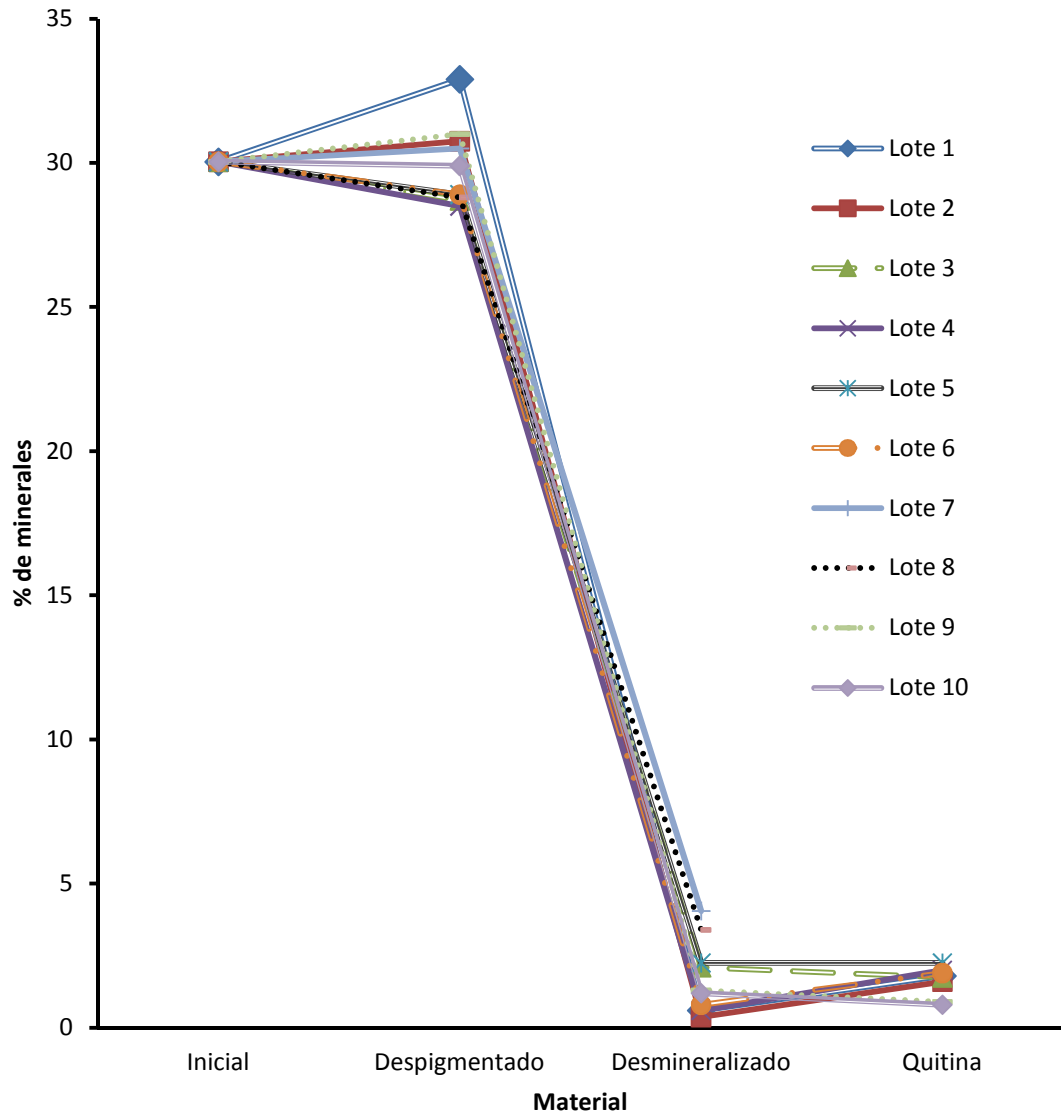
Cuadro 17. Porcentajes de contenido de minerales (en base seca) en las muestras, desde el material inicial hasta la obtención de quitina.

Lote	Inicial (%)	Despigmentado (%)	Desmineralizado (%)	Quitina (%)
1	30.04	32.90	0.60	1.80
2	30.04	30.75	0.37	1.60
3	30.04	28.70	2.10	1.75
4	30.04	28.50	0.60	2.00
5	30.04	28.90	2.25	2.25
6	30.04	28.90	0.80	1.90
7	30.04	30.50	4.05	ND
8	30.04	28.80	3.40	ND
9	30.04	31.00	1.30	0.90
10	30.04	29.90	1.20	0.80

El contenido de metales presente en las quitinas fue 1.62% en promedio, 29.1% más con respecto al promedio de la etapa anterior. Se observa que el contenido de minerales de la quitina aumenta en comparación con la harina desmineralizada, ya que al remover las

proteínas en la etapa de desproteínización los minerales pasan a representar un porcentaje más alto con respecto a la masa del material (quitina).

De acuerdo a los resultados, y como se observa en la Gráfica 20 las harinas desmineralizadas reducen dramáticamente su contenido de cenizas, ésta diferencia es de 96.1%, lo que confirma la efectividad del tratamiento (ver resultados de desmineralización).



Gráfica 20. Perfil de contenido de minerales de la cutícula de camarón desde la materia prima hasta la obtención de quitina.

8. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos, con los experimentos y las condiciones aquí empleadas, se puede concluir lo siguiente:

1. Se confirma la hipótesis planteada: las metodologías empleadas permiten la obtención de productos de alto valor agregado con características óptimas, en especial proteína y quitina, estos biomateriales pueden ser aprovechados en diversas áreas relacionadas a la industria y la investigación, siguiendo los fundamentos de la química verde.
2. Iniciar el proceso con la etapa de recuperación de lípidos/pigmentos permite optimizar la extracción y grado de pureza de las demás fracciones de alto valor agregado en las etapas subsecuentes.
3. El método de sal de fenol, utilizado inicialmente para determinar el contenido de nitrógeno en sistemas acuosos, dio buenos resultados en la determinación de concentración de proteína en licores de desproteínización.
4. Se logró la recuperación de proteína, sin embargo, no se alcanzaron los porcentajes deseados, ya que en promedio los métodos *RP2*, *RP3* y *RP5* sólo permitieron una recuperación de 32.2, 17.3 y 13.7% respectivamente, con respecto a la proteína de enlace covalente. Cabe destacar que al poner en práctica métodos diferentes, y en base a lo observado, se sabe que es posible aumentar la eficiencia de recuperación de proteína en futuras investigaciones.
5. El análisis de proteína mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) confirma que la materia sólida recuperada a partir de la precipitación ácida en los licores de desproteínización es proteína de buena calidad, lo que indica que las

metodologías aplicadas para su recuperación son adecuadas, pero no las más efectivas, por lo tanto se recomienda en trabajos futuros el uso de técnicas diferentes como la electroforesis o el uso de membranas de diálisis para el aislamiento de proteína.

6. La precipitación salina de la proteína es una técnica que permite recuperar más proteína, sin embargo se debe tomar en cuenta que la proteína que se recupera aumenta su contenido de minerales debido a las sales empleadas para la precipitación, esto afecta la pureza de la proteína recuperada y por ende limita algunas de sus aplicaciones.
7. La metodología aplicada para la recuperación de los principales componentes de la cutícula de camarón permitió una recuperación de quitina con un rendimiento del 90.68% en promedio, ésta quitina resultó ser de buena calidad (96.51% de acetilación) y de alto grado de pureza (1.62% de minerales).
8. El uso de un ácido orgánico para la remoción de minerales (con una remoción efectiva del 96.1%) demostró que es posible diseñar una metodología amigable con el medio ambiente, que no requiere de condiciones complejas y que es de bajo costo en comparación con otros métodos de desmineralización reportados en la literatura.
9. El aislamiento del pigmento astaxantina es un proceso complejo, ya que requiere de condiciones específicas para llevarse a cabo, y al observar que la concentración es muy baja, es discutible su recuperación.
10. La remoción de lípidos al aplicar calor da buenos resultados, sin embargo, las altas temperaturas junto con la mezcla de solventes tienden a degradar los

pigmentos (en este caso la astaxantina), por lo tanto, si se desea recuperar los pigmentos es recomendable su extracción a temperatura ambiente.

9. PERSPECTIVAS

La proteína aislada mediante la metodología mencionada en este trabajo de investigación puede ser aplicada en la investigación y en el sector industrial.

Como lo mencionan Juárez *et al.* (2010) la proteína proveniente de residuos de camarón puede ser empleada como una fuente de nitrógeno para el cultivo de *Lactobacillus plantarum*, una diferencia notable con respecto a la proteína obtenida en ese trabajo es la presencia de la astaxantina, éste pigmento antioxidante puede llegar a afectar el desarrollo de las bacterias que necesitan del oxígeno en su ruta metabólica. La proteína aislada con la metodología propuesta carece de astaxantina, en investigaciones futuras puede ser probada su efectividad como fuente de nitrógeno en diversos medios de cultivo para una gran variedad de microorganismos.

Otras aplicaciones para la proteína se relacionan con su contenido de aminoácidos, pudiendo ser utilizada como complemento alimenticio para el ser humano o ser suministrada a animales como parte de la dieta. Además, como en el caso de la caseína, la proteína aislada a partir de los desechos de cutícula de camarón puede ser utilizada para la fabricación de bioplásticos, cosméticos, pinturas o para la creación de materiales funcionalizados de celulosa o quitina, como papel y biopelículas.

10. LITERATURA CITADA

- Armenta, R. E., Guerrero-Legarreta, I. & Huerta, S. (2002). Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1(1-2), 49-55. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62010207>
- Badui, S. (1990). *Química de los alimentos*. México D. F.: Editorial Alhambra Mexicana.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9(15), 1551-1558.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J. & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580. doi: 10.1016/S0032-3861(00)00713-8
- Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O. N., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N. P. & Sánchez-Machado, D. I. (2008). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112(3), 671-675. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.029
- Capelli, B. & Cysewski, G. (2007). *Astaxanthin, Natural astaxanthin: king of the carotenoids*. Hawái: Cyanotech Corporation. Recuperado de <http://www.naturalnews.com/files/astaxanthin.pdf>

- Chen, X., Li, C., Ji, X., Zhong, Z. & Li, P. (2008). Recovery of protein from discharged wastewater during the production of chitin. *Bioresource Technology*, 99(3), 570-574. doi: 10.1016/j.biortech.2006.12.029
- Cifuentes, J. L., Torres-García, M. P. & Frías, M. (1997). *El océano y sus recursos XI, acuicultura*. Recuperado de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Cifuentes1997.pdf>
- Cira, L. A., Huerta, S. & Shirai, K. (2002). Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1(1-2), 45-48.
- Dayal, J. S., Ali, S. A. & Sarada, C. (2005). Amino-acid and biochemical composition of whole body and molt of the Indian white shrimp. *Indian Journal of Fisheries*, 52(3), 351-356.
- Dennison, C. (2002). *A guide to protein isolation*. Nueva York: Kluwer Academic Publishers.
- Eckfeldt, J. H., Kershaw, M. J. & Dahl, I. I. (1984). Direct analysis of urinary protein with biuret reagent, with use of urine ultrafiltrate blanking: comparison with a manual biuret method involving trichloroacetic acid precipitation. *Clinical Chemistry*, 30(3), 443-446.
- Ehrlich, H., Koutsoukos, P. G., Demadis, K. D. & Pokrovsky, O. S. (2009). Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks; part II, decalcification. *Micron*, 40(2), 169-193. doi: 10.1016/j.micron.2008.06.004

- Espinosa, G. (1997). *Obtención de pigmentos carotenoides de cabeza de camarón fresco y fermentado*. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana). Recuperado de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/asm/presentatesis.php?recno=21084&docs=UAM21084.PDF>
- Gagné, N. (1993). *Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid*. (Tesis de maestría, Universidad McGill). Recuperado de <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk2/ftp04/MQ37310.pdf>
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751-766. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/177/2/751.full.pdf+html>
- Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. & Eaton, A. D. (1992). *Standard methods: for the examination of water and waste water*. Baltimore: American Public Health Association.
- Hach Company (1999). *Digesdahl® digestion apparatus, instrument manual*. Recuperado de <http://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639982427>
- Held, P. (2003). *Quantitation of peptides and amino acids with a Synergy HT using UV fluorescence*. Recuperado de http://www.biotek.com/resources/docs/Synergy_HT_Quantitation_of_Peptides_and_Amino_Acids.pdf

Hernández-Núñez, C. M., Varo-Argüello, W. E., Leyva-Reyes, N., Ramírez-Barragán, C. A., Delgado-Fornué, E. & Andrade-Ortega, J. A. (2008). *Utilización de residuos de cáscara de camarón para la obtención de quitina blanqueada: propuesta de una metodología a base de tratamientos alcalino-ácido y ozono*. Zapopan: XIX Semana Nacional de la Investigación Científica (CUCBA).

Herrera-Andrade, M. H., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Núñez-Gastélum, J. A. & Moreno-Ramos, O. H. (2010). *Efecto de ácidos y álcalis en la concentración de astaxantina proveniente de residuos de camarón fermentado*. Acapulco: XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Recuperado de http://biomedbiotec.encb.ipn.mx/congreso2010/Extensos/Tec_ambiental/BTN415HHE20091231.pdf

Herrera-Andrade, M. H., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Núñez-Gastélum, J. A. & Moreno-Ramos, O. H. (2011). Extracción de la astaxantina y su estabilidad. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 7(1), 21-27.

Hoffman, K., Daum, G., Koster, M., Kulicke, W. M., Meyer-Rammes, H., Bisping, B. & Meinhardt, F. (2010). Genetic improvement of *Bacillus licheniformis* strains for efficient deproteinization of shrimp shells and production of high-molecular-mass chitin and chitosan. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 8211-8221. doi: 10.1128/AEM.01404-10

Jabs, A. (2005). *Determination of secondary structure in proteins by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)*. Recuperado de http://jenalib.fli-leibniz.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html.

- Jover, A. & García, M. J. (2004). *Manual del auxiliar de farmacia, módulo II*. Sevilla: Editorial Mad.
- Juárez, A., Ruíz, S., Dávila, K., Anzaldo, J., Ramírez, C., Andrade, J. & González, Y. (2010). Aprovechamiento de la proteína cruda del proceso de obtención de quitina/quitosana a partir de cáscara de camarón como fuente de nitrógeno en el cultivo de la bacteria *Lactobacillus plantarum*. Zapopan: XXI Semana de la Investigación Científica (CUCBA).
- Kamata, T., Simpson, K. L., Collins, J. G. & Collins, J. H. (1976). *Utilization of the recovered shrimp protein as a pigment source for salmonids*. Texas: 1st Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference. Recuperado de http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNAAC702.pdf
- Kandra, P.; Mohan, M. & Jyothi, H. (2012). Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 17-29. doi: 10.1007/s00253-011-3651-2
- Keller, R. P. & Neville, M. C. (1986). Determination of total protein in human milk: comparison of methods. *Clinical Chemistry*, 32(1), 120-123.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*. 1(2):15-21.

- Lee, S. H., Roh, S. K., Park, K. H. & Yoon, K. R. (1999). Effective extraction of astaxanthin pigment from shrimp using proteolytic enzymes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(3), 199-204.
- Leyva-Reyes, N. (2008). *Remoción de nitrógeno amoniacal en sistemas acuosos con bagazo de caña: un enfoque acuícola*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
- Lim, S. T., Lee, J. H., Shin, D. H. & Lim, H. S. (1999). Comparison of protein extraction solutions for rice starch isolation and effects of residual protein content on starch pasting properties. *Starch*, 51(4), 120-125. doi: 10.1002/(SICI)1521-379X(199904)51:4<120::AID-STAR120>3.0.CO;2-A
- Liu, Z., Liu, C., Hou, Y., Chen, S., Xiao, D., Zhang, J. & Chen, F. (2013). Isolation and characterization of a marine microalga for biofuel production with astaxanthin as a co-product. *Energies*, 6(6), 2759-2772. doi: 10.3390/en6062759
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I. & Nasri, M. (2010^b). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357. doi: 10.1007/s12010-009-8846-y

- Manni, L., Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Agrebi, R., Haddar, A., Sellami-Kamoun, A. & Nasri, M. (2010^a). An oxidant-and solvent- stable protease produced by *Bacillus cereus* SV1: application in the deproteinization of shrimp wastes and as a laundry detergent additive. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(8), 2308-2321. doi: 10.1007/s12010-009-8703-z
- Medina, M. (2008). Espectroscopia de emisión: fluorescencia. Universidad de Zaragoza. Recuperado de <http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/Emi.pdf>.
- Nigam, A. & Ayyagari, A. (2007). *Lab manual in biochemistry, immunology, and biotechnology*. Nueva Delhi: Tata McGraw-Hill.
- Owusu-Apenten, R. K. (2002). *Food Protein Analysis: Quantitative effects on processing*. Pennsylvania: Marcel Dekker. Recuperado de <http://www.crcnetbase.com/isbn/978-0-8247-0684-5>
- Pacheco, N. (2010). *Extracción biotecnológica de quitina parar la producción de quitosanos: caracterización y aplicación*. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana). Recuperado de <http://148.206.53.231/UAMI14607.pdf>
- Palpandi, C., Shanmugam, V. & Shanmugam, A. (2009). Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(5), 198-205.

- Pastor, A. (Ed.). (2004). *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*.
Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Pervaiz, M. (2012). *Protein recovery from secondary paper sludge and its potential use as wood adhesive*. (Tesis de doctorado, Universidad de Toronto). Recuperado de https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/34844/1/Pervaiz_Muhammad_201211_PhD_thesis.pdf
- Piqué, T. M. & Vázquez, A. (2012). Uso de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y Cemento, Investigación y Desarrollo*, 3(2), 62-71.
- Praus, P. (2002). Determination of nitrogen in water technology. *GeoScience Engineering*, 48(2), 35-42. Recuperado de <http://gse.vsb.cz/2002/XLVIII-2002-2-35-42.pdf>
- Quitain, A. T., Sato, N., Daimon, H. & Fujie, K. (2001). Production of valuable materials by hydrothermal treatment of shrimp shells. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40(25), 5885-5888. doi: 10.1021/ie010439f
- Ramírez-Cruz, M. A., García-Gómez, R. S., Flores-Argüello, I., Gálvez-Mariscal, A. & Durán-de-Bazúa, C. (2003). Empleo de una enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* para la obtención de carotenoproteínas a partir de cefalotórax de camarón. *Tecnología, Ciencia y Educación del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos*, 18(1), 32-39.

- Ruttanapornvareesakul, Y., Ikeda, M., Hara, K., Osako, K., Kongpun, O. & Nozaki, Y. (2005). Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. *Fisheries Science*, 71(1), 220-228. doi: 10.1111/j.1444-2906.2005.00951.x
- Sachindra, N. M. (2003). *Studies on some crustaceans of tropical waters with special reference to pigments*. (Tesis de doctorado, Universidad de Mysore). Recuperado de http://ir.cftri.com/150/1/1868_Sachindra.pdf
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N. & Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 167-172. doi: 10.1002/jsfa.1977
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N. & Mahendrakar, N. S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26(10), 1092-1098. doi: 10.1016/j.wasman.2005.07.002
- Santos, M. J., Rivera, G. & Cardos, A. (2003). *Efecto de aditivos y de la relación enzima-sustrato, en la hidrólisis de la proteína de camarón, con alcalasa*. Puerto Vallarta: X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_I/CARTEL/CI-6.pdf
- Se-Kwon, K. (Ed.). (2011). *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives, biological activities and applications*. Boca Ratón: CRC Press, Taylor & Francis Group.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera “SIAP” (2012). *México: sexto productor mundial de camarón*. Recuperado de http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=378:mexico-sexto-productor-mundial-de-camaron&catid=6:boletines&Itemid=569
- Shimadzu. (2013). *Protein secondary structural analysis by FTIR*. Recuperado de <http://www.shimadzu.com/an/industry/pharmaceuticallifescience/proteome020505.htm>
- Vahur, S. (2012). *IR spectrum of casein (powder)*. Recuperado de http://tera.chem.ut.ee/IR_spectra/index.php?option=com_content&view=article&id=105&Itemid=73.
- Villegas, W. A., Acereto, P. O. & Vargas, M. E. (2006). *Análisis ultravioleta-visible, la teoría y la práctica en el ejercicio profesional*. Yucatán: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Yarbeh, A. (1991). *Optimization studies on chitin extraction from crustacean solid wastes*. (Tesis de maestría, Universidad McGill). Recuperado de http://digitool.library.mcgill.ca/webclient/DeliveryManager?pid=61169&custom_att_2=direct
- Zhao, J., Huang, G. R., Zhang, M. N., Chen, W. W. & Jiang, J. X. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing byproduct hydrolysate. *American Journal of Food Technology*. 6(10):904-913. doi: 10.3923/ajft.2011.904.913

Anexo A

Material y equipo de laboratorio

Se utilizaron los siguientes materiales básicos de laboratorio: vasos de precipitados; matraces balón, aforados, Erlenmeyer y Kitasato; tubos de ensaye; pipetas aforadas y volumétricas; micropipetas marca Biohit®; cajas de Petri, espátulas, soportes universales, sistemas de enfriamiento, frascos con tapa, papel filtro Whatman®; filtros gooch y buchner; embudos, cronómetros marca Thomas Scientific®, tiras reactivas para medir pH marca Macherey-Nagel®, y bolsas de tela para filtrar.

Se hizo uso de los siguiente equipos: estufas de secado a 45 y 100°C marca Felisa®, estufa de vacío marca Heraeus®; balanza analítica marca Thomas Scientific®, refrigerador (a 4°C) marca Torrey®, agitador vórtex marca Corning®, centrífuga marca Thermo®, agitador magnético múltiple marca Thomas Scientific®, agitador mecánico con propela marca Heidolph®, baño maría marca Precision®, molino Wiley® marca Thomas Scientific®, equipo soxhlet marca Pyrex®, rotavapor marca Brinkman®, espectrofotómetro USB4000® marca Ocean Optics®, espectrofluorómetro USB2000® Ocean Optics®, espectrómetro infrarrojo Spectrum GX marca Perkin Elmer®, potenciómetros marca Denver Instrument® y Sper Scientific®, equipo de digestión Digesdahl marca Hach®.

Reactivos

Todos los reactivos químicos empleados fueron de grado reactivo, se trabajó con: ácido acético glacial marca Merck®, hidróxido de sodio marca Golden Bell®, n-hexano, isopropanol (alcohol isopropílico), agua desionizada, peróxido de hidrógeno, cloruro de

sodio, tartrato de sodio y potasio, sulfato cúprico marca J. T. Baker ®, caseína (N-Z-Amine A) marca Sigma®, ninhidrina marca Hycel®, etanol absoluto marca Golden Bell®, acetato de sodio marca J. T. Baker®, L-ácido aspártico marca Sigma®, cloruro de amonio marca Golden Bell®, ácido sulfúrico marca J. T. Baker®, alcohol polivinílico marca Aldrich®, reactivo de Nessler marca Golden Bell®, sulfato manganeso marca Golden Bell®, hipoclorito de sodio al 5% marca comercial Cloralex®, ácido clorhídrico marca J. T. Baker®, fenol marca Jalmek®, y éter etílico marca Analytyka®.

Anexo B

En éste anexo se muestran los datos mediante los cuales se obtuvo la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de remoción de metales con ácido acético (Cuadro 18) en la etapa de desmineralización.

Cuadro 18. Datos para el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de remoción de minerales.

Lote	% de remoción	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$
1	98.2	2.10125	4.415251563
2	98.8	2.70125	7.296751563
3	92.7	-3.39875	11.55150156
4	97.9	1.80125	3.244501563
5	92.2	-3.89875	15.20025156
6	97.2	1.10125	1.212751563
9	95.8	-0.29875	0.089251562
10	95.99	-0.10875	0.011826563
			$\bar{X} = 5.377760937$

$$\bar{X} = 96.09875\%$$

$$\sigma^2 = 5.37776094$$

$$\sigma = 2.31899999$$

$$C. V. = 2.413142717\%$$

Anexo C

Cálculo de la concentración de proteína a partir del método de sal de fenol, cada muestra proveniente de la primera etapa de desproteínización se diluyó para que su concentración de proteína quedara dentro de la curva. Se tomó un volumen específico para cada muestra y se aforó a 25 mL con agua desionizada, una vez obtenidas las absorbancias, después de construir la gráfica y de obtener las concentraciones de proteína en la curva (Cuadros 8 y 9), se multiplican los promedios de proteína (g/mL) por 25; a continuación el valor obtenido se divide entre la cantidad en mililitros que se tomó del licor de desproteínización para hacer la dilución, y finalmente se multiplica por el volumen inicial de licor obtenido; de esta manera se estiman los gramos de proteína removidos en cada etapa de desproteínización, así como la proteína remanente después del cambio de pH (Cuadro 19).

Cuadro 19. Datos de los cálculos realizados para obtener la concentración de proteína disuelta en los licores de desproteínización.

Muestra	Proteína (g/mL) ^a	Proteína (g/25 mL) ^b	Licor tomado (mL) ^c	Proteína en licor (g/mL) ^d	Licor obtenido (mL) ^e	Proteína en licor (g) ^f
9-I-pHb	0.0034328	0.08582045	2.30	0.037313239	65.0	2.425360543
9-I-pHa	0.0023970	0.05992510	2.70	0.022194481	65.0	1.442641296
9-II-pHb	0.0043516	NN	1.00	0.004351600	145.0	0.630980840
9-II-pHa	0.0038688	NN	1.00	0.003868800	142.0	0.549369174
10-I-pHb	0.0036581	0.091453075	3.06	0.029886626	85.0	2.540363194
10-I-pHa	0.0030554	0.076384000	3.60	0.021217778	87.0	1.845946667
10-II-pHb	0.0035967	NN	1.00	0.003596700	135.0	0.485551260
10-II-pHa	0.0025287	NN	1.00	0.002528700	148.0	0.374243900

a. Promedio de concentración de proteína calculada a partir del método de sal de fenol. **b.** Concentración de proteína en el matraz de dilución. **c.** Volumen de licor tomado para hacer la dilución. **d.** Concentración de proteína por cada mililitro de licor. **e.** Volumen de licor recuperado después de las desproteínizaciones. **f.** Concentración de proteína disuelta en los licores obtenidos. NN = no necesario.

En resumen, para calcular la concentración de proteína, al tomar en cuenta las letras asignadas en la tabla anterior, se procede de la siguiente manera:

$$(a) * (25) = b$$

$$(b) / (c) = d$$

$$(d) * (e) = f$$

Nota: en el caso de las muestras de la segunda desproteinización no hubo necesidad de hacer una dilución porque su concentración de proteína estaba desde un principio en el rango que maneja la curva.

Anexo D

Cálculo de la concentración de proteína (determinada con el método de sal de fenol) en muestras a las cuales se les removió proteína mediante precipitación salina. Se tomaron alícuotas de 10 mL de licores de desproteínización a los cuales se precipitó la proteína con ácido acético. Para conocer la concentración de proteína de las alícuotas se procedió de la siguiente manera, la concentración de proteína calculada mediante el método de sal de fenol se multiplica por 25 mL, y posteriormente se divide entre el volumen tomado para preparar la dilución inicial. En el Cuadro 20 se muestran los resultados promediados de la concentración de proteína calculada.

Cuadro 20. Resultados de los cálculos realizados para obtener la concentración de proteína de los licores con pH ácido que se sometieron a precipitación salina.

Muestra	Proteína (g/mL) ^g	Proteína (g/25 mL) ^h	Volumen de licor tomado (mL) ⁱ	Proteína antes de precipitar (g/10 mL) ^j	Proteína después de precipitar (g/10 mL) ^k	Remoción de proteína (%) ^l
9-I-pHa	0.002888150	0.072203779	6.00	0.22194481	0.12033963	45.78
9-II-pHa	0.002655133	0.066378320	20.00	0.03868800	0.03318916	14.21

g. Promedio de concentración de proteína calculada a partir del método de sal de fenol. **h.** Concentración de proteína en el matraz de dilución. **i.** Cantidad de licor de desproteínización que se tomó para hacer la dilución. **j.** Concentración de proteína inicial en la alícuota de 10 ml. **k.** Concentración de proteína en la alícuota de 10 ml después de la precipitación salina. **l.** Porcentaje de remoción de proteína mediante la precipitación con NaCl.

Resumiendo, para calcular la concentración de proteína en la alícuota final, al tomar en cuenta las letras asignadas en la tabla 16, se procede así:

$$(g) * (25) = h$$

$$(h) / (i) = j$$

$$[(k - j) * 100] / k = l$$

Anexo E

En este anexo se muestran los datos mediante los cuales se obtuvo la desviación estándar y el coeficiente de variación a partir de los pesos de las quitinas obtenidas (Cuadro 21).

Cuadro 21. Datos para el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación de los pesos de las quitinas.

Lote	Quitina (g)	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
1	1.5646	-0.346375	0.119975641
2	1.7233	-0.187675	0.035221906
3	2.0167	0.105725	0.011177776
4	2.1705	0.259525	0.067353226
5	2.0208	0.109825	0.012061531
6	1.8877	-0.023275	0.000541726
9	1.9547	0.043725	0.001911876
10	1.9495	0.038525	0.001484176

$\bar{x} = 0.031215982$

$$\bar{x} = 1.910975 \text{ g}$$

$$\sigma^2 = 0.031215982$$

$$\sigma = 0.176680451$$

$$C. V. = 9.245565814\%$$

Anexo F

Método para calcular el porcentaje de cenizas, primero se deben conocer los siguientes datos:

Peso molecular (P.M.) de óxido de calcio (CaO): 56.0794 g/mol

Peso molecular de carbonato de calcio (CaCO₃): 100.08935 g/mol

Factor gravimétrico de calcio (Ca) en óxido de calcio: 0.7147 (71.47%)

Factor gravimétrico de calcio en carbonato de calcio: 0.4004 (40.04%)

Por ejemplo, si se pesó una muestra de cenizas generadas a 800°C durante 4 horas y el peso es de 0.0009 g, para calcular los gramos de calcio se hace lo siguiente: se multiplica el F.G. de Ca en CaO por el peso de las cenizas, en éste caso el resultado serian 0.0006 g de calcio. Si se multiplican éstos gramos por 100 y se dividen entre el F.G. de CaCO₃ (en porcentaje) se obtienen los gramos de carbonato de calcio presentes en la muestra antes de calcinar, esto es 0.0015 g. Para conocer el porcentaje que representan de la muestra, en el caso de haber sometido 0.1 g (base seca) a calcinación, se multiplican los gramos de CaCO₃ por 100, y se dividen entre los 0.1 g, lo que da como resultado 1.5% de cenizas en forma de CaCO₃.

DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA

Presidente del Comité de Titulación

Licenciatura en Biología

CUCBA

Presente.-

Por este conducto reciba un cordial saludo. Aprovechamos la presente, para solicitar a Usted lo siguiente:

En vista de que en fechas próximas el **C. JUAN CARLOS TAMAYO PARTIDA**, código **207395612**; pasante de la carrera de licenciado en Biología, defenderá su trabajo de tesis ["Recuperación de las fracciones de alto valor agregado a partir de desechos (cutícula) de camarón, con énfasis en la proteína"] para obtener el grado correspondiente, necesitamos realizar la impresión del trabajo en cuestión.

El documento de tesis contiene gráficas y diagramas que de imprimirse a un tamaño menor al carta, demeritaría la calidad y se perderían los detalles de los elementos mencionados; por esa razón *solicitamos a Usted nos permita realizar la impresión de la tesis en tamaño carta.*

En espera de una respuesta favorable a esta solicitud, quedamos de Usted a sus apreciables órdenes.

ATENTAMENTE

"Piensa y trabaja"

Zapopan, Jalisco, 9 de septiembre de 2013



M. en C. Jesús Angel Andrade Ortega
Director de tesis



Juan Carlos Tamayo Partida
Tesista

Vo. Bo.



Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha
Presidente del Comité de titulación
Licenciatura en Biología

COMITE DE
TITULACION

