

## CAPITULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados para esta investigación se describen a continuación:

El exoesqueleto del camarón *P. vannamei* fue proporcionado por la Compañía DUNCI S.A., ubicada en la provincia del Guayas, Km. 10.5 vía a Daule, Urbanización Inmacosa, Calle Eucaliptos.

El hidróxido de sodio (NaOH) de marca Mallinckrodt Baker S.A. fue adquirido por medio de la distribuidora INTERLAB Cía. Ltda.

El ácido clorhídrico (HCl) corresponde igualmente a la casa comercial Mallinckrodt Baker S.A., comprado en la distribuidora INTERLAB Cía. Ltda.

El aceite de girasol fue comprado en un supermercado local.

Agua destilada fue utilizada para todas las preparaciones.

Con respecto a los equipos utilizados se utilizó lo siguiente:

Para secar el producto final se utilizó una estufa Memmert del laboratorio de Microbiología.

Luego del secado final, se procedió a triturar el quitosano en un molino manual marca Corona, utilizado en la Planta Piloto de PROTAL – ESPOL.

Para realizar la emulsión del ácido clorhídrico con el aceite se utilizó una licuadora casera marca Osterizer “Super Deluxe”.

Las distintas pruebas para obtención de quitosano y estabilidad de emulsión fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Química de la FIMCP – ESPOL.

## **2.1. Métodos de obtención de quitosano**

### **2.1.1. Método Hindú**

La extracción de quitosano a partir del exoesqueleto del camarón para este primer método es una adaptación de la Central Institute of Fisheries Technology (CIFT) de la India.

Aquí se procede primero a lavar la materia prima para remover impurezas. Se escurre y la muestra deseada pasa a un proceso

de extracción por media hora en NaOH al 0.5% a ebullición.  
(Gráf. 1).



Gráfica 1. Extracción con hidróxido de sodio 0.5%.

Luego se filtra y se desecha el álcali. A continuación se hierven los caparzones con NaOH al 3% por un tiempo de 90 minutos. Con estos pasos se elimina la mayor cantidad de proteínas. Seguido se procede a un lavado de los caparzones y por medio de HCl 1.25N por una hora a temperatura ambiente, aproximadamente 28°C, se realiza una desmineralización.  
(Gráf. 2).



Gráfica 2. Extracción con ácido clorhídrico 1.25 N.

A pesar de que la técnica establece que hasta este punto se ha obtenido quitosano, de acuerdo con la CIFT, el mayor porcentaje de producción de quitosano fue de 8.63% cuando la muestra fue tratada con NaOH al 50% durante una hora a 100°C, previo un lavado para remover todo el ácido. (Gráf. 3).

Finalmente se realizó un secado en estufa a 60°C con un tiempo de 2.5 horas.



Gráfica 3. Extracción con hidróxido de sodio 50%.

### 2.1.2. Método Propuesto

El segundo método corresponde a una recopilación de diferentes métodos de obtención de la quitina. Se realizó una evaluación de los mismos para determinar el método que mejor se adapta a las condiciones de trabajo en el laboratorio. Primero se lava los caparazones para eliminar impurezas y se pesa la cantidad deseada.

La primera parte del experimento corresponde a la adición de HCl 2N en relación sólido:líquido de 1:10 a temperatura ambiente por dos horas. Esto genera desprendimiento de volúmenes de CO<sub>2</sub>. (Gráf. 4).



Gráfica 4. Extracción con ácido clorhídrico 2 N.

Luego se procede a lavar con abundante agua y se realiza una desproteinización mediante una inmersión de los caparzones en NaOH al 2% bajo una relación 1:5, igualmente sólido:líquido, entre 30 y 60 minutos con agitación a una temperatura entre 70 y 80°C. (Gráf. 5).



Gráfica 5. Extracción con hidróxido de sodio 2%.

Esta técnica fue desarrollada por García y sus colaboradores en 1996, en La Habana para la obtención de quitina. Es importante destacar que entre cada etapa del proceso fue necesario hacer un lavado para remover las sustancias, tanto el ácido como el álcali.

La obtención del quitosano es un solo paso que consiste en la inmersión de los caparazones en NaOH al 50% por 60 minutos a 80 – 90°C. El secado final fue a 100°C por un tiempo de 2 horas.

### **2.1.3. Método Universidad Técnica de Ambato**

El tercer método corresponde al más complejo de todos que fue elaborado por Juan de Dios Alvarado de la Universidad Técnica de Ambato, como parte de un proyecto para películas biodegradables.

El primer paso es un lavado minucioso de la materia prima.  
(Gráf. 6).



Gráfica 6. Materia prima, caparazones de camarón

Posteriormente se realiza un secado de los caparazones para facilitar la manipulación. Las condiciones de secado fueron por 5 horas a 90°C. Seguido de esto se procede a sumergir la muestra en NaOH al 0.5% por 30 minutos a una temperatura de 80°C. A continuación se realiza una segunda extracción con NaOH con una concentración diferente, al 3% a la misma temperatura pero con un tiempo de 10 minutos.

Se realiza un lavado minucioso hasta obtener un pH próximo a la neutralidad y luego a la extracción con HCl 2N en relación 1:3 a temperatura ambiente por una hora. Nuevamente se realiza un lavado y se procede a secar en estufa a 50°C por 6 horas.

Luego la quitina se somete a un proceso de desacetilación por medio de NaOH al 50% en una relación 1:7 a 100°C por una hora. (Gráf. 7).



Gráfica 7. Extracción con hidróxido de sodio 50%.

Se procede a un lavado y secado final por 6 horas a 50°C.

Para todos los métodos se adicionó la etapa de molienda del quitosano con el objetivo de disminuir el tamaño de las partículas para facilitar la emulsión.

Todos los métodos son aparentemente similares y siguen un procedimiento general, basándose en una secuencia de extracciones con álcalis y ácidos. Si bien es cierto el segundo método alterna el procedimiento lo relevante y mas importante es la adición de soluciones ácidas y alcalinas, ya que éstas actúan directamente sobre compuestos químicos. El uso de

hidróxido de sodio a bajas concentraciones hace que las proteínas que se encuentran en el caparazón de camarón se eliminen debido a una desnaturalización. El resultado de la desnaturalización de las proteínas es la pérdida de muchas propiedades biológicas de la misma, y esto se puede suscitar de diversas formas. Estas pueden ser por coagulación o agregación y por hidrólisis.

Por otro lado, el ácido clorhídrico genera una descalcificación debido a que el exoesqueleto presenta grandes cantidades de calcio en su estructura. Posee también otros minerales como el magnesio, pero este se encuentra en menor proporción que el calcio. Como el quitosano es un compuesto versátil, que puede ser utilizado según el grado de desacetilación, el hidróxido de sodio a una concentración alta (50%) produce la remoción del grupo acetilo de la estructura de la quitina.

Es muy importante tomar en cuenta los cambios que iba sufriendo la materia prima al pasar las diferentes etapas. En el método propuesto por la CIFT después que los caparazones se sumergieron en hidróxido de sodio a bajas concentraciones su textura seguía consistente. Posteriormente, se fue ablandando

a medida que la concentración aumentaba. Luego del ácido clorhídrico la textura era muy blanda y había perdido considerablemente su volumen. El color varió considerablemente desde su color original hasta un color melón con apariencia cristalina.

Los cambios suscitados en el método propuesto fueron que en la extracción ácida el color de los caparazones se intensificó a naranja por la liberación del compuesto carotenoide astaxantina. Con respecto a la textura se ablandó considerablemente en esta etapa.

Finalmente en el método de extracción de quitosano la textura cambió debido al secado inicial y se fue suavizando a medida que aumentaban las etapas del proceso. El color se comportó de manera similar al proceso número uno.

Un cambio muy especial se notó cuando los caparazones se sometían con NaOH al 50%. Durante este tratamiento, el color original de la muestra se transformó a un color rojizo muy intenso. Pero al finalizar y escurrir la solución, los caparazones retomaron un color melón cristalino al contacto con el agua para

su lavado y remoción de la solución alcalina. El colorante que se encuentra en el exoesqueleto y músculo del camarón es la astaxantina. Debido a las extracciones antes descritas y los sucesivos lavados a los que se sometió el exoesqueleto, este pigmento se va removiendo poco a poco hasta que finalmente se mantiene como color melón cristalino.

En el siguiente esquema se grafica en un diagrama de flujo los tres procesos que han sido utilizados para la obtención del quitosano.

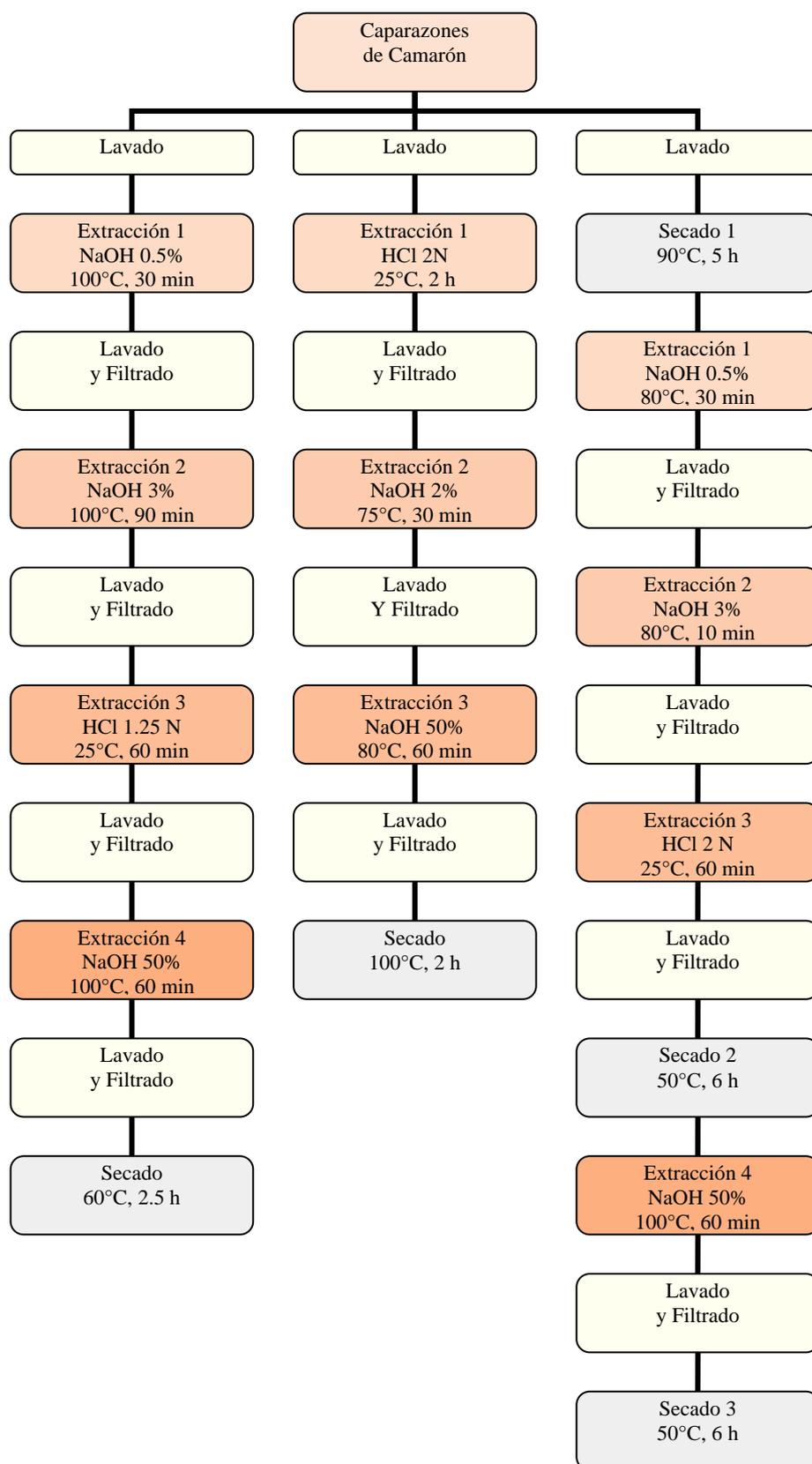


Figura 5. Diagrama de flujo de los tres procesos de obtención de quitosano  
Elaborado por: Luis Soro G.

## 2.2. Técnica de Preparación de Emulsiones

La preparación de las emulsiones consiste en mezclar una solución con 20% de aceite de girasol y 80% de ácido clorhídrico 0.1M con 0.2% de quitosano.

La metodología a seguir para formar la emulsión es la siguiente, para todas las muestras: se coloca la solución de ácido clorhídrico 0.1M, luego el quitosano y por último el aceite. Todas estas sustancias, en las proporciones antes descritas, se mezclan en una licuadora por 3 minutos en total, estableciendo pausas de 30 segundos cada minuto. Una vez realizada la emulsión se coloca en los tubos de ensayo para proceder a realizar el análisis y mediciones de los índices de cremado. Relación porcentual entre el volumen de las dos capas en separación versus el volumen total de la emulsión.



Gráfica 8. Medición de índice de cremado

Una vez se han preparado las emulsiones de acuerdo a los tres tipos de quitosano extraídos, se analiza cuál quitosano es el que se comporta con mejores propiedades de emulsionante. Posteriormente se realizan nuevas emulsiones con variaciones en la concentración de quitosano, cambio en el pH del medio y por último, la adición de cloruro de sodio en el medio.

La primera consiste en una variación de la concentración de quitosano. La cantidad de quitosano tipo a ser utilizada es de 0.2%, 0.5%, 0.7% y 1% con respecto al total de la emulsión. Lo primero en agregarse a la licuadora fue la solución de 0.1M HCl, luego el quitosano y finalmente el aceite de girasol. Todo se homogeniza en la licuadora según el mismo mecanismo previamente descrito.

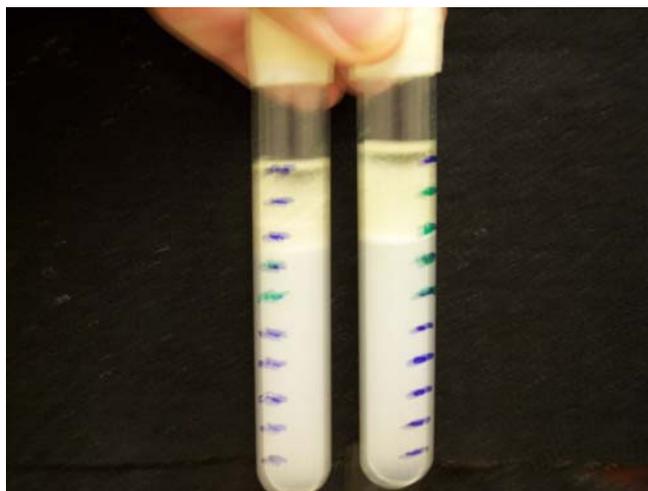
El segundo tipo corresponde a un área bastante importante en el campo de las emulsiones, pues es el efecto del pH. Para preparar la emulsión a diferentes valores de pH se adiciona ácidos y álcalis. En el rango de los ácidos se preparan soluciones de 0.1M y 0.01M de ácido clorhídrico. Mientras que para los valores alcalinos, se trabaja con 1% y 3% de bicarbonato de sodio. Se realiza también con agua destilada sin ninguna solución para medir el efecto en un pH neutro. El segundo componente a ser agregado es el quitosano a una

concentración del 0.2% y finalmente el aceite para proceder a hacer la emulsión.

La última característica que se analiza es la fuerza iónica en la emulsión. Para prepararla fue necesario variar la concentración de cloruro de sodio (0.3M NaCl y 0.7M NaCl) en el medio ácido en el cual se encontraba (0.01M de HCl). Una vez hecha las respectivas combinaciones, se adiciona el quitosano y el aceite de girasol en un 20% del total para finalmente colocar en la licuadora por 3 minutos.

### **2.3. Técnica de Estabilidad de la Emulsión**

La estabilidad de la emulsión se mide mediante el volumen de cremado de la solución mantenida al medio ambiente conforme aumenta el tiempo de exposición. Se mide la estabilidad por la velocidad con la cual las gotas de la fase dispersa se agrupan para formar una masa de líquido cada vez mayor que se separa por gravedad.



Gráfica 9. Medida de la estabilidad de la emulsión

Transcurridas 48 horas se determinó cual muestra fue la más estable. La muestra de quitosano que mejor funciona bajo estas características es analizada y determinada como el mejor emulsionante. Y se realiza tres pruebas de estabilidad adicionales con diferentes variantes: la concentración de quitosano en la emulsión; el pH del medio y la fuerza iónica en la estabilidad de la emulsión.

La concentración de quitosano fue cambiada y variada en el siguiente rango: 0.2, 0.5, 0.7 y 1% en la emulsión. Debido a que la concentración de quitosano es baja se puede mantener constante los porcentajes de aceite y solución de ácido clorhídrico.

Con respecto a la variación del pH de la solución, se trabajó con cinco valores de pH diferentes, de 4, 6, 7, 8 y 9.

Para las pruebas de estabilidad de la última variable, se utilizó diferentes rangos de cloruro de sodio. Las mezclas fueron realizadas de la siguiente manera: 0.01M HCl con 0.3M NaCl; y 0.01M HCl con 0.7M NaCl.