



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

**" DISEÑO DE PROTOCOLO PARA EL APROVECHAMIENTO DE
EXOESQUELETOS DE CRUSTÁCEOS CON POTENCIAL
AGRÍCOLA "**

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentado por:

André Ricardo Dos Santos Ruperti

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

AGRADECIMIENTOS

Primero, doy gracias a mi Universidad y Facultad, por hacerme sentir como en casa durante todos estos años. A mi estimada tutora, Dra. María Isabel Jiménez y su equipo AGROLAB, por la confianza y el apoyo académico que me brindaron para realizar este trabajo. A Don Enrique de Puerto Hondo, por facilitar las muestras para este estudio, y finalmente, a todos los educadores que conocí durante toda mi formación pre-profesional.

DEDICATORIA

A mi madre y hermana, mi familia, en donde puedo ver reflejado un amor divino; a mis amigos, y a la misma vida, que todavía me permite admirar la creación del todo.

EVALUADORES DEL PROYECTO

Diego Arturo Gallardo Polit
Coordinador Materia Integradora

María Isabel Jiménez Feijó
Tutor Materia Integradora

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en la presente propuesta de la materia integradora corresponde exclusivamente a:

ANDRÉ RICARDO DOS SANTOS RUPERTI

Y el patrimonio intelectual del mismo a la Facultad Ciencias de la Vida (FCV) de la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”.

André Ricardo Dos Santos Rupertí

RESUMEN

La industria de crustáceos en el Ecuador, se proyecta internacionalmente como uno de los sectores con mayor demanda de productos. Esta proyección, en caso de no ser aprovechada estratégicamente, resultaría en el incremento de los desechos sólidos generados a partir de estas actividades, ocasionando a largo plazo un problema de contaminación para el ambiente. Este estudio presenta la elaboración e implementación de un protocolo semiartesanal, para la obtención de subproductos a partir del aprovechamiento de los exoesqueletos de tres especies de crustáceos de interés comercial para el Ecuador (*Ucides occidentalis*, *Callinectes arcuatus*, *Litopenaeus vannamei*), y a su vez, la evaluación del potencial de inhibición de los subproductos obtenidos mediante tratamiento de efectividad sobre un agente patógeno (*Mycosphaerella fijiensis*), presente en la producción de banano. Con los resultados de este trabajo, se pudo evidenciar la viabilidad de extracción de subproductos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes causales de interés agrícola, presentando diferencias en los resultados en relación con las especies analizadas y el tipo de tratamiento inicial de los exoesqueletos (crudo y cocido), siendo el producto obtenido a partir de exoesqueletos cocidos de cangrejo rojo (*U. occidentalis*), el que presentó mejores porcentajes de inhibición (94%), sobre el desarrollo del agente causal en estudio.

Palabras Claves:

Biopolímeros, Bioproductos, Desacetilación, Quitosano, Sigatoka negra.

SUMMARY

*The crustacean industry in Ecuador is internationally projected as one of the sectors with the greatest demand for products. This projection, if not used strategically, would result in the increase of solid waste generated from these activities, causing a long-term problem of contamination to the environment. This study presents the elaboration and implementation of a semiartesanal protocol, to obtain by-products from the exploitation of the exoskeletons of three species of crustaceans of commercial interest for Ecuador (*Ucides occidentalis*, *Callinectes arcuatus*, *Litopenaeus vannamei*), and in turn, the evaluation of the inhibition potential of the by-products obtained by treatment of effectiveness on a pathogenic agent (*Mycosphaerella fijiensis*), present in banana production. With the results of this work, it was possible to demonstrate the feasibility of extracting by-products with the capacity to inhibit the growth of causal agents of agricultural interest, presenting differences in the results in relation to the species analyzed and the type of initial treatment of the exoskeletons (raw and cooked), being the product obtained from cooked exoskeletons of red crab (*U. occidentalis*), the one that presented better percentages of inhibition (94%), on the development of the causal agent under study.*

KeyWords:

Biopolymers, Bioproducts, Deacetylation, Chitosan, Black Sigatoka.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
SUMMARY	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	2
1.2 OBJETIVOS.....	3
1.2.1 <i>Objetivo General</i>	3
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	3
1.3 MARCO TEÓRICO	4
1.3.1 <i>Polímeros y Biopolímeros</i>	4
1.3.2 <i>Polisacáridos como Biopolímeros</i>	4
1.3.3 <i>Aprovechamiento de exoesqueletos de Crustáceos</i>	6
1.3.4 <i>Desechos de Crustáceos y su impacto en el ambiente.</i>	7
CAPITULO 2	9
2. METODOLOGÍA DEL DISEÑO.....	9
2.1 <i>Esquema de trabajo</i>	9
2.2 <i>Fase de diseño y selección de protocolos</i>	9
2.3 <i>Obtención de los subproductos</i>	11
2.3.1 <i>Pre-tratamiento de exoesqueletos</i>	11
2.3.2 <i>Aislamiento y degradación química</i>	11
2.3.3 <i>Degradación final de los subproductos</i>	12
2.4 <i>Pruebas de inhibición</i>	13
CAPITULO 3	14

3. RESULTADOS	14
3.1 Esquema final del protocolo.....	14
3.2 Pre-tratamiento del material.....	15
3.3 Implementación del protocolo y obtención de subproductos	15
3.4 Pruebas de inhibición.....	17
CAPITULO 4	18
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	18
4.1 Conclusiones	18
4.2 Recomendaciones	19
BIBLIOGRAFÍA	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación de la estructura química de la quitina y quitosano.....	5
Figura 2.1. Esquema de trabajo.	9
Figura 2.2. Exoesqueletos de crustáceos utilizados en el trabajo. De izquierda a derecha: cangrejo, jaiba, camarón.	11
Figura 2.3. De izquierda a derecha: Aislamiento del producto aplicando agitación en zaranda, lavado y filtrado de muestra, aspecto del producto posterior a la primera degradación.....	12
Figura 2.4. Aspecto del producto después de la degradación final.	13
Figura 2.5. Tratamiento sobre <i>Mycosphaerella fijiensis</i> . De izquierda a derecha: Solución CH ₃ COOH +Producto; Inoculación en placas con medio PDA; Placas inoculadas previo a proceso de incubación.....	13
Figura 3.1. Diseño final para la obtención de polisacáridos de cadena corta para su aplicación en pruebas de efectividad	14
Figura 3.2. Rendimiento final de los exoesqueletos o polvo utilizado como materia prima.	15
Figura 3.3. Valores de rendimiento en porcentajes de los subproductos obtenidos luego de la primera degradación química.	16
Figura 3.4. Valores de humedad en porcentajes de los subproductos obtenidos luego de la primera degradación química.	16
Figura 3.5. Curvas de inhibición de los seis subproductos evaluados sobre <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Procesos y parámetros seleccionados para la obtención de bioproductos polisacáridos.....	10
--	----

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial en el Ecuador desde los 90s fue determinado e impulsado económicamente por la exportación de productos, así como también de materia prima, contando con un fuerte dinamismo sobre el sector pesquero y acuícola con pesquerías importantes, como la del camarón, y el atún para ese entonces, que hasta el día de hoy, continúan ofreciendo productos de alta calidad en el mercado internacional (UNIDO, 2003). Luego de casi 20 años con esta misma práctica, la preocupación por la baja competitividad internacional que surge para los siguientes años, obliga un cambio en la estrategia productiva del país, y crea una nueva perspectiva económica bajo el marco del actual modelo de matriz productiva, con el que ha tenido un desarrollo productivo estable en los últimos años, logrando expandirse al ritmo de América latina y el Caribe (Villena, 2015). Siguiendo esta tendencia, el país ha podido consolidar nuevos sectores importantes para el país, privilegiando la producción diversificada, ecoeficiente y con mayor valor agregado, así como los servicios basados en la economía del conocimiento y la biodiversidad (SENPLADES, 2012).

Dentro de la oferta exportable no petrolera del país, la acuicultura para el año 2015, ocupó el segundo lugar con una participación del 18.23% (PROECUADOR, 2015). La producción de este sector tiene como producto principal al camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), que es cultivado extensivamente en piscinas camaroneras, y que envuelve un amplio número de participantes, con actividades interconectadas (UNIDO, 2003). Otras especies de crustáceos que son explotadas para consumo humano, en Ecuador, son el cangrejo rojo de manglar o guariche (*Ucides occidentalis*), y la Jaiba (*Callinectes* sp.). Considerando los aspectos biológicos-pesqueros y socioeconómicos de estos especímenes, la primera especie posee mayor valor comercial, y como recurso, se encuentra regulado por la Ley de Pesca y Desarrollo Pesquero (MAGAP, 2014); mientras que la comercialización de la segunda especie, no se encuentra regulada, y es alta, cuando los periodos de veda para el cangrejo rojo entran en vigencia (FDSS, 1988).

La presente demanda de productos derivados de la pesca por parte de los países europeos, ha generado iniciativas sobre la promoción de estudios de factibilidad para la generación de nuevas industrias, con el objetivo de tecnificar los procesos y otorgar valor agregado a estos recursos (Alvarado & Bonete, 2013; Avilés & Mendoza, 2009; Cabrera, Noblecilla, & Tumbaco, 2011; Herrera Ximénez & Molina Bravo, 2010). En lo que respecta a las actividades en las industrias procesadoras de estos invertebrados, existe mucha información sobre la promoción de diferentes subproductos, generados a partir de la transformación de los residuos que estas generan (Kaplan, 1998).

Entre la amplia gama de subproductos que se han podido extraer de los desechos de crustáceos encontramos algunos como quitina, quitosano, carotenoides, entre otros; que a nivel local, han proporcionado estudios para obtener principalmente el segundo de estos biopolímeros, y con éste, producir películas biodegradables, material de recubrimiento y en la formulación como emulsionante (De Dios Alvarado et al., 2007; Luna, 2012; Santacruz, Rivadeneira, & Castro, 2015; SORO, 2007). A partir de los resultados que obtuvieron tales investigaciones y dado que en la práctica el manejo de residuos es un tema de alta preocupación de todas las administraciones municipales, surge la decisión de continuar abordando técnicamente el tema de aprovechamiento de los desechos, haciendo uso de los desperdicios de los crustáceos explotados comercialmente por la industria de alimentos en Ecuador, con el objetivo de impulsar una economía circular, ampliar el estudio de otras posibles aplicaciones de los subproductos obtenidos, y contribuir con alternativas para mitigar la contaminación que pueda generar la expansión industrial del sector acuícola.

1.1 Descripción del problema

Las actividades de las industrias que realizan el procesamiento de crustáceos, y otras incluidas, como el sector alimentario, que ofrecen para la gastronomía local productos como cangrejos, jaibas y langostas, llegan a generar una gran cantidad de desechos de exoesqueletos. Actualmente el sector camaronero ecuatoriano ha experimentado una gran bonanza a consecuencia del declive en producción del continente asiático, que se ha visto afectada por el virus EMS (*Early Mortality*

Syndrome), sin lograr su recuperación total, y por el cual, ha podido ganar competitividad sobre países extranjeros (NAVAS, 2016). Simultáneamente, la demanda internacional que tiene el Ecuador por los productos derivados de crustáceos aparte del camarón, como cangrejo y jaiba, es creciente, por lo que la constitución de posibles empresas que se proyectan a escala industrial, para agregar valor a estos recursos y contribuir con la cadena productiva, es una estrategia cada vez más factible, lo que significaría un grave problema ambiental en caso de no tener un manejo adecuado de estos desechos. Por otro lado, se ha podido notar que en cuanto a la inversión sobre temas de investigación para la conservación del medio ambiente, continúan muchas veces sin mostrar preferencia pasando a un segundo plano, lo que dificulta la realización y desarrollo de proyectos en el tema de aprovechamiento de los residuos (Sáez, Urdaneta, & Joheni, 2014).

Actualmente en otros países, son consideradas diversas alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de los desechos sólidos derivados de los procesamientos industriales de mariscos, y la conversión de estos residuos en subproductos de gran utilidad. La competencia internacional a este nivel, representa un gran reto, por lo que el Ecuador como país, necesita optar por invertir capital en investigar a fondo los usos potenciales que estos residuos puedan tener, y así plantear estrategias en el manejo de problemas específicos de ciertos sectores generando un mayor valor a partir de un producto eficiente.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar un protocolo semiartesanal para el aprovechamiento de exoesqueletos y obtención de subproductos como alternativa para el manejo de problemas sanitarios agrícolas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analizar información existente que permita el planteamiento de un protocolo para la obtención de subproductos a partir de desechos de crustáceos.
- Implementar el protocolo propuesto utilizando como materia prima

exoesqueletos de cangrejo, jaiba y camarón.

- Realizar pruebas de inhibición sobre un agente causal de problemas agrícolas.

1.3 MARCO TEÓRICO

1.3.1 Polímeros y Biopolímeros

La síntesis de polímeros en el siglo XX se ha considerado como uno de los grandes avances para la vida cotidiana, siendo el plástico, como embalaje, el producto con mayor volumen de consumo elaborado a partir de polímeros sintéticos, como el polietileno y polipropileno (Valero-Valdivieso, Ortegón, & Uscategui, 2013). El mercado ecuatoriano de plásticos tiene un valor de \$1.200 M, del cual, el 75% es producido en el país por empresas segmentadas en diversos sectores (MIP, 2015). Cada vez es más notorio que los polímeros sintéticos a pesar de poseer cómodos beneficios también acarrear un problema de contaminación, y esa realidad, ha impulsado el desarrollo de investigación con el objetivo de encontrar alternativas para la sustitución de dichos productos. Una de las líneas de investigación relacionado con este objetivo es el estudio de los biopolímeros, que a diferencia de los polímeros sintéticos, son generados a partir de polímeros naturales sintetizados por los seres vivos, mediante procesos biológicos (Lara, 2016). Entre los biopolímeros naturales más conocidos por sus funciones estructurales tenemos a los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, poli-terpenos y poli-hidroxialcanoatos.

1.3.2 Polisacáridos como Biopolímeros

El consumo de biopolímeros para el 2001 estuvo estimado en 68 millones de kg y su desarrollo es visto como una oportunidad para que los químicos que son tomados de la naturaleza sean devueltos a esta sin perturbación de algún ecosistema (Gross & Kalra, 2002). Los polisacáridos como biopolímeros han sido estudiados en los últimos años con detenimiento debido a las funciones estructurales y propiedades que pueden obtener. Entre los más investigados podemos mencionar a la celulosa, almidón, quitina, quitosano, siendo la quitina el compuesto que mayormente ha llamado la atención, y es considerado como el segundo biopolímero más abundante en biomasa después de la celulosa en la naturaleza, con cerca de 6,9% en peso de nitrógeno en su estructura, puede ser

sintetizada por insectos y crustáceos para la formación de sus estructuras rígidas o exoesqueletos, y por algunos hongos filamentosos, donde también puede ser hallada como componente estructural de sus paredes celulares (Kaplan, 1998). En cuanto a su estructura química, se lo designa como un polisacárido que posee un alto peso molecular y está constituido por unidades N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -D (1,4), muy insoluble en agua, y con baja reactividad (Mármol, Páez, Rincón, Araujo, & Aiello, 2011). Según (Khor & Wan, 2014), la nomenclatura ideal de la quitina como biomolécula es β -(1-4)-2-acetilamina-2-desoxi-D-glucopiranososa, y realmente existe como un copolímero con grupos acetilamina y amino en su estructura, en donde, el número de grupos acetilamina (comúnmente 70-90%) que sustituyen el C-2 del anillo cíclico de glucosa, es el que determinaría su naturaleza, sin embargo, cuando en su cadena predomina un mayor porcentaje de grupos amino (>50%), el biopolímero es denominado como quitosano, que se considera como la forma desacetilada de la quitina obtenida mediante un proceso de degradación bajo condiciones alcalinas. En vista de esto, la fuente más importante de este biopolímero, es la quitina, con una estimación de al menos 150×10^3 toneladas producidas comercialmente y extraídas a partir de los desechos sólidos que son generados en el procesamiento de enlatados alimenticios que utilizan crustáceos como materia prima (Zargar, Asghari, & Dashti, 2015).

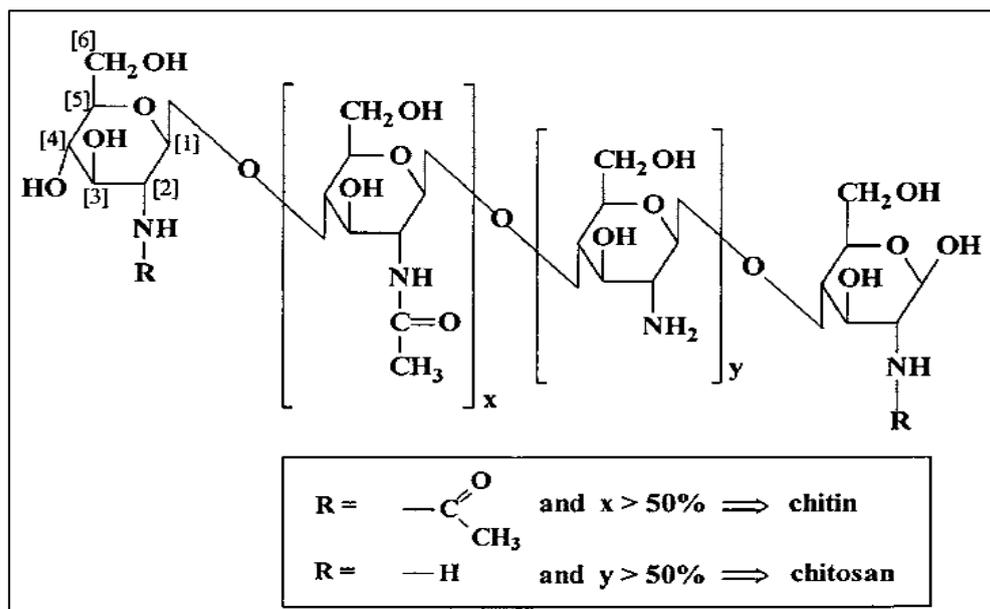


Figura 1.1. Representación de la estructura química de la quitina y quitosano.

Tomado de (Khor & Wan, 2014).

1.3.3 Aprovechamiento de exoesqueletos de Crustáceos

La obtención de subproductos, a partir de exoesqueletos, puede generalizarse como un proceso para la extracción de quitosano principalmente, envuelto principalmente por tres procesos, el primero con el que se remueven las proteínas del desecho orgánico, el segundo donde se desmineraliza el material o se retira el Carbonato de Calcio, y el tercero, denominado desacetilación parcial del quitosano, en donde se degrada una estructura con mayor número de grupos acetilamina, hasta tener con más grupos amino utilizando soluciones acidas y bases fuertes para su polimerización. Según (Zargar et al., 2015) esto ocurriría de la siguiente manera, iniciando con la materia prima, luego haciendo la reducción del material, dos procesos de separación de proteínas, una desmineralización, lavados para neutralizar pH, la decoloración del remanente, obtención de quitina, desacetilación, y quitosano al final. En cuanto a propiedades, cuando se habla del alcance en capacidad de la quitina y el quitosano, se acostumbra poner mayor interés a las propiedades del segundo copolímero, entre las que incluyen algunas como: alto contenido de nitrógeno, capacidad formadora de puentes de hidrogeno, capacidad como quelante, absorbente, floculante, y anticoagulante.

Para la actualidad, estos subproductos, y muchos otros derivados de este compuesto, con modificaciones químicas, están siendo estudiados con mucha atención debido a las propiedades de afinidad química que han podido presentar en distintos proyectos de aplicación (Zargar et al., 2015). Con respecto a la agricultura, para el cual se encuentra enfocado el proyecto, el uso de quitina y quitosano tiene cuatro principales líneas de investigación: (a) protección en plantas contra plagas y enfermedades en periodo pre y post cosecha, (b) mejorando la acción de microorganismos antagonistas y el control biológico, (c) asistir al beneficio de las relaciones simbióticas planta-microorganismo y (d) al desarrollo y regulación del crecimiento en plantas. Siguiendo estas líneas, algunos estudios sugieren que la adición de quitina al suelo sea de total importancia como control biológico favoreciendo el aumento de una flora microbiana con capacidad para atacar las paredes de hifas quitinosas de hongos patógenos o las conchas quitinosas de los huevos de nematodos, y así, aumentar la eficiencia en el crecimiento de la planta (Graham W., 1990).

A su vez, el quitosano puede ser sintetizado y aplicado en el recubrimiento de frutas y vegetales teniendo ventajas positivas en el almacenamiento a largo plazo de los alimentos. Esta biopelícula proporciona un tipo de paquete activo que permite la liberación gradual de conservantes inhibiendo así el crecimiento de hongos y manteniendo la apariencia externa de la fruta por un tiempo más largo (Galed, Fernández-Valle, Martínez, & Heras, 2004).

Según (Hirano & Nagao, 1989) en un estudio comparando la relación del grado de polimerización del quitosano (alto peso molecular, bajo peso molecular y oligosacáridos) y el grado de inhibición, se pudo confirmar la acción antimicrobiana en 14 especies de hongos, y una mejor actividad inhibitoria cuando en el tratamiento se utiliza productos de bajo peso molecular y oligosacáridos. Esto hace que el mecanismo de inhibición que el quitosano desencadena sea muy diferente al que poseen algunos fungicidas actualmente utilizados. Esto hace que la naturaleza policatiónica del oligoquitosano sea la forma más utilizada al momento de evaluarlo como producto antifúngico en cultivos (Xu, Zhao, Han, & Du, 2007).

1.3.4 Desechos de Crustáceos y su impacto en el ambiente.

La industria donde son procesadas especies bioacuáticas generan un gran volumen de desechos, que pueden ser divididos en sólidos, en donde encontramos el caparazón, cabezas, vísceras, colas y fragmentos de carne sin remover; o líquidos, denominado agua de blanqueo (Sila et al., 2014). Los componentes orgánicos de los desechos tienen una elevada demanda biológica de oxígeno (DBO₅); y puede generar problemas ecológicos si no cuenta con un buen manejo, por lo que se sugiere la instalación de procesamientos para la recuperación de productos secundarios (Sastoque Cala, 2005). La quitina es uno de estos productos, cada año se estima que una cantidad global de 10¹¹ toneladas de quitina son generadas naturalmente a partir de la degradación natural de sus exoesqueletos. Esto puede ser tanto positivo como negativo para el suelo, donde estos residuos finalmente se depositan, ya que dependiendo principalmente de la concentración de quitina que contenga el sustrato se puede lograr el buen crecimiento de una planta (Shaukat, Abid, Akbar, & Campus, 2013).

Con respecto a la producción comercial de quitina, rentable en algunos países, utiliza como materia prima todo de exoesqueletos de crustáceos desechado por la industria, y para obtenerlo, el material es tratado con ácidos e hidróxidos, que al ser a gran escala podría considerarse como un proceso con posibles impactos ambientales. Actualmente, hay mucho interés entre la comunidad científica de reemplazar este procedimiento por uno con degradación biológica utilizando microorganismos quitinolíticos, capaces de degradar de igual manera este compuesto, mitigando el impacto que los residuos de los procedimientos químicos puedan tener sobre el ambiente (Sastoque Cala, 2005).

CAPITULO 2

2. METODOLOGÍA DEL DISEÑO

2.1 Esquema de trabajo

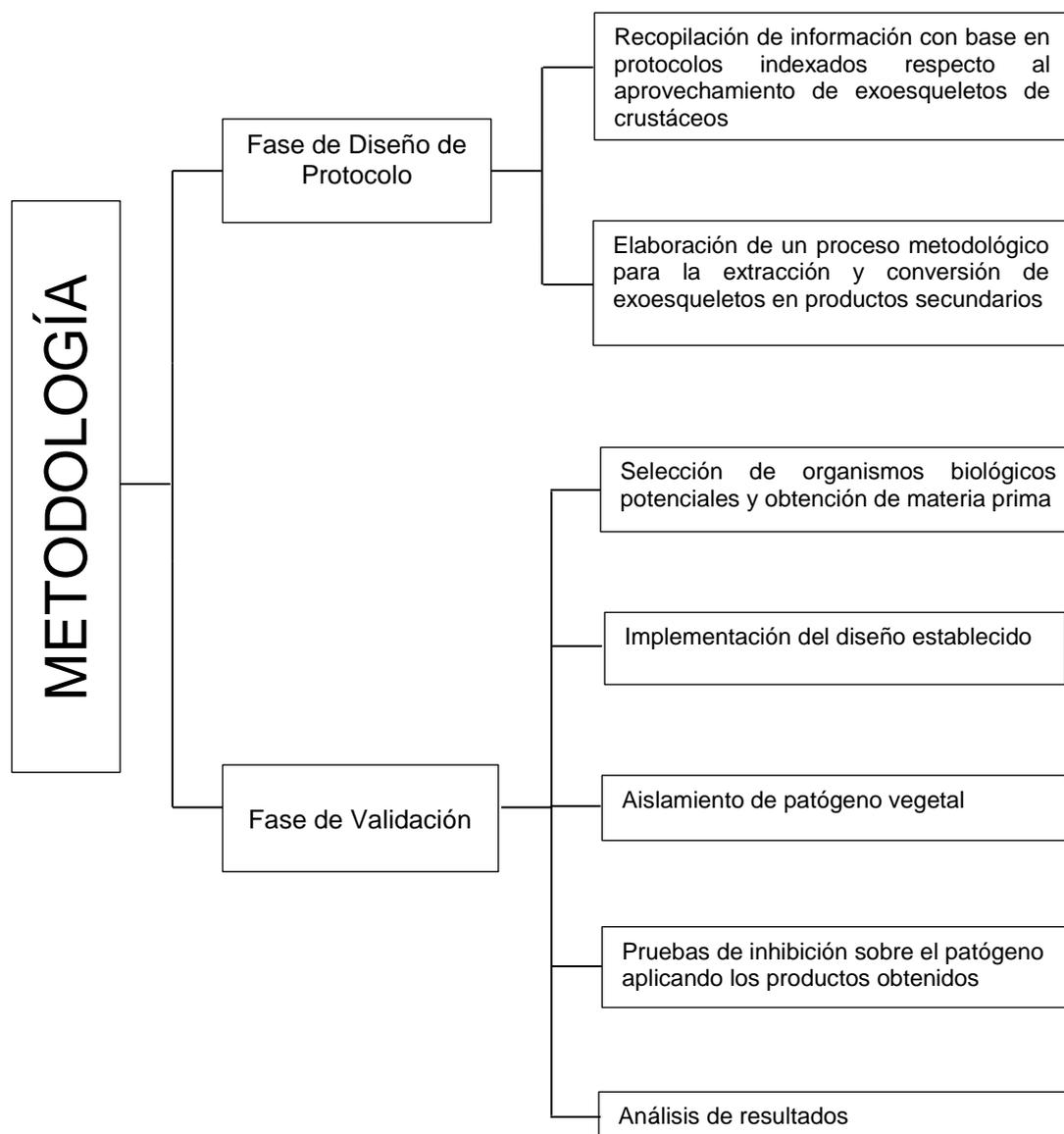


Figura 2.1. Esquema de trabajo.
Elaboración: André Dos Santos 2018.

2.2 Fase de diseño y selección de protocolos

Esta fase consistió en la recopilación de información validada en publicaciones indexadas, preferiblemente que hayan usado como materia prima exoesqueletos de las especies utilizadas en nuestro trabajo. Con esta información, fue posible comparar y establecer un protocolo a pequeña escala, tomando datos

primordiales como rendimiento, número de etapas del proceso, y parámetros físicos-químicos que puedan ser replicados (Tabla 2.1).

Además, debido a los distintos procedimientos que existen y que son ejecutados, según la aplicación que se desea desarrollar con el producto, se tomaron en cuenta metodologías que puedan ajustar finalmente los parámetros físico-químicos idóneos para la aplicación y evaluación del producto como antimicrobiano (Gerasimenko, Avdienko, Bannikova, Zueva, & Varlamov, 2004; Liu, Guan, Yang, Li, & Yao, 2000). Las alternativas escogidas para este trabajo, fueron ejecutadas sin la aplicación de altas temperaturas para evitar una desnaturalización del producto de interés previa a su degradación, y usando una variante de degradación mediante el uso de microondas.

Tabla 2.1. Procesos y parámetros seleccionados para la obtención de bioproductos polisacáridos.

Proceso	Descripción de parámetros	Referencia
Pretratamiento	Obtención de materia prima	(Andrade, Ladchumanananda sivam, Rocha, Belarmino, & Galvão, 2012)
Desproteínización	Remoción de proteínas con NaOH al 4% por 24 horas	(Majekodunmi, 2016)
Desmineralización	Remoción de minerales con HCl al 4% por 12 h	(Premasudha, Vanathi, & Abirami, 2017)
Degradación química	Tratamiento en NaOH al 40% sometido a microondas (200W) por 22 min	(Mahdy Samar, El-Kalyoubi, Khalaf, & Abd El-Razik, 2013)
Degradación Final	Tratamiento en 0.1M de CH ₃ COOH sometido a microondas (100W) por 40 min	(Wasikiewicz & Yeates, 2013)

2.3 Obtención de los subproductos

2.3.1 Pre-tratamiento de exoesqueletos

Antes de iniciar el proceso de degradación química es importante realizar el pre-tratamiento del material. Para esta etapa, los organismos son lavados y manipulados hasta extraer su exoesqueleto, intentando remover la mayor cantidad del tejido animal adherido. Una vez recolectado este material, se realiza la cocción de una porción de los caparazones a 100 °C por 10 min, que luego es pesado en una balanza analítica, y secado en estufa eléctrica, a 40°C por 48 horas. Finalmente, el material seco, es molido usando un molino eléctrico (Hamilton-Beach modelo 80335R) hasta obtener un polvo homogéneo de exoesqueletos (15-20um), el cual es almacenado en un lugar libre de humedad hasta que se realice la obtención del bioproducto.



Figura 2.2. Exoesqueletos de crustáceos utilizados en el trabajo. De izquierda a derecha: cangrejo, jaiba, camarón.
Elaboración: André Dos Santos, 2018.

2.3.2 Aislamiento y degradación química

En esta parte se procede a validar el protocolo, para lo cual, fueron utilizados 30, 60, y 50 gramos de la materia prima obtenido de los exoesqueletos de cangrejo, jaiba y camarón, respectivamente. Inicialmente el proceso de obtención comienza con una desproteización del material, donde el polvo de exoesqueletos de las muestras es tratado o remojado en una solución 2.5 N de Hidróxido de Sodio (NaOH), durante 24 horas. Seguido de esto, se realizó una desmineralización, que consistió en el remojo del residuo, de la fase previa, en una solución al 4% de ácido clorhídrico (HCL) por 12 horas. En este punto, encontrando aislada la quitina, se procede a degradar su estructura a quitosano, mediante una desacetilación por radiación, en microondas (Indurama MWI-28BL-1000W), sometiendo la muestra de quitina en una solución de NaOH al 40% a una potencia de 200W durante 22 min. Para cada tratamiento de este

procedimiento se utilizó una relación en proporción de 1:4 (p/v), y además, finalizada cada etapa, las muestras son filtradas en papel filtro (8-10 μm) de café, y lavadas con agua destilada hasta neutralizar su pH, parámetro indicado usando titulación mediante tiras indicadoras (pH-Fix 0-14 Macherey-Nagel). El producto luego de recuperado, es pesado y secado en estufa eléctrica a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 12 horas, con lo que fue posible calcular su rendimiento.



Figura 2.3. De izquierda a derecha: Aislamiento del producto aplicando agitación en zaranda, lavado y filtrado de muestra, aspecto del producto posterior a la primera degradación.

Elaboración: André Dos Santos, 2018.

2.3.3 Degradación final de los subproductos

Esta etapa del protocolo, consistió en degradar la cadena larga del polisacárido a un número finito de monómeros, denominados oligómeros, aplicando nuevamente el método de radiación por microondas (Wasikiewicz & Yeates, 2013). Con este método, fueron preparados oligómeros con un peso molecular menor a 30 KDa, para lo cual, se prepararon disoluciones de 1 g de quitosano en 50 ml de ácido acético (CH_3COOH) al 1%, que posteriormente fueron sometidas a radiación de 100 W de potencia por 40 min. Luego de terminado el tratamiento en el microondas, la fracción de la muestra, que no se precipita, es recuperada para ser centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Una vez centrifugado, el sobrenadante es descartado, y la muestra es lavada con agua destilada hasta recuperar un producto con un pH igual a 6, que finalmente es secado a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.



Figura 2.4. Aspecto del producto después de la degradación final.
Elaboración: André Dos Santos,

2.4 Pruebas de inhibición

Los subproductos de bajo peso molecular obtenidos de la degradación final fueron evaluados mediante pruebas de inhibición sobre colonias de *Mycosphaerella fijiensis* aisladas de una hacienda convencional. Para esto, se prepararon inicialmente soluciones stock al 5% (w/v) con los seis subproductos para un volumen final de 10 ml, utilizando como solvente ácido acético al 0,1% (v/v). El medio de cultivo utilizado en el ensayo fue PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma-Aldrich) con el cual se prepararon cajas petri (30ml) por triplicado, junto con sus respectivos controles (Control total-CT; Control ácido acético-CTA), para luego ser inoculadas con las soluciones preparadas inicialmente, estableciendo para el ensayo seis dosis (0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 1,25%), las cuales finalmente fueron enfrentadas con 3 ul del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, a una concentración de $1,4 \times 10^5$ UFC en 4 puntos de la caja debidamente referenciados. Terminado el ensayo, las placas fueron incubadas a 26.4 °C durante 6 días, tomando medidas macrométricas de crecimiento de las colonias cada 3 días.



Figura 2.5. Tratamiento sobre *Mycosphaerella fijiensis*. De izquierda a derecha: Solución CH₃COOH +Producto; Inoculación en placas con medio PDA; Placas inoculadas previo a proceso de incubación.
Elaboración: André Dos Santos, 2018.

CAPITULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Esquema final del protocolo

Por medio de la información obtenida en la fase de diseño, se estableció un protocolo a pequeña escala de obtención de polisacáridos, conformado por cinco etapas, que se encuentran relacionadas con los procesos de pre-tratamiento del material para la obtención de materia prima, un proceso de aislamiento para la remoción de los elementos que también componen la estructura del exoesqueleto (proteínas y minerales), y posteriormente dos procesos de degradación química que permite la obtención de los productos de interés. El esquema del protocolo final para este trabajo, se presenta a continuación:

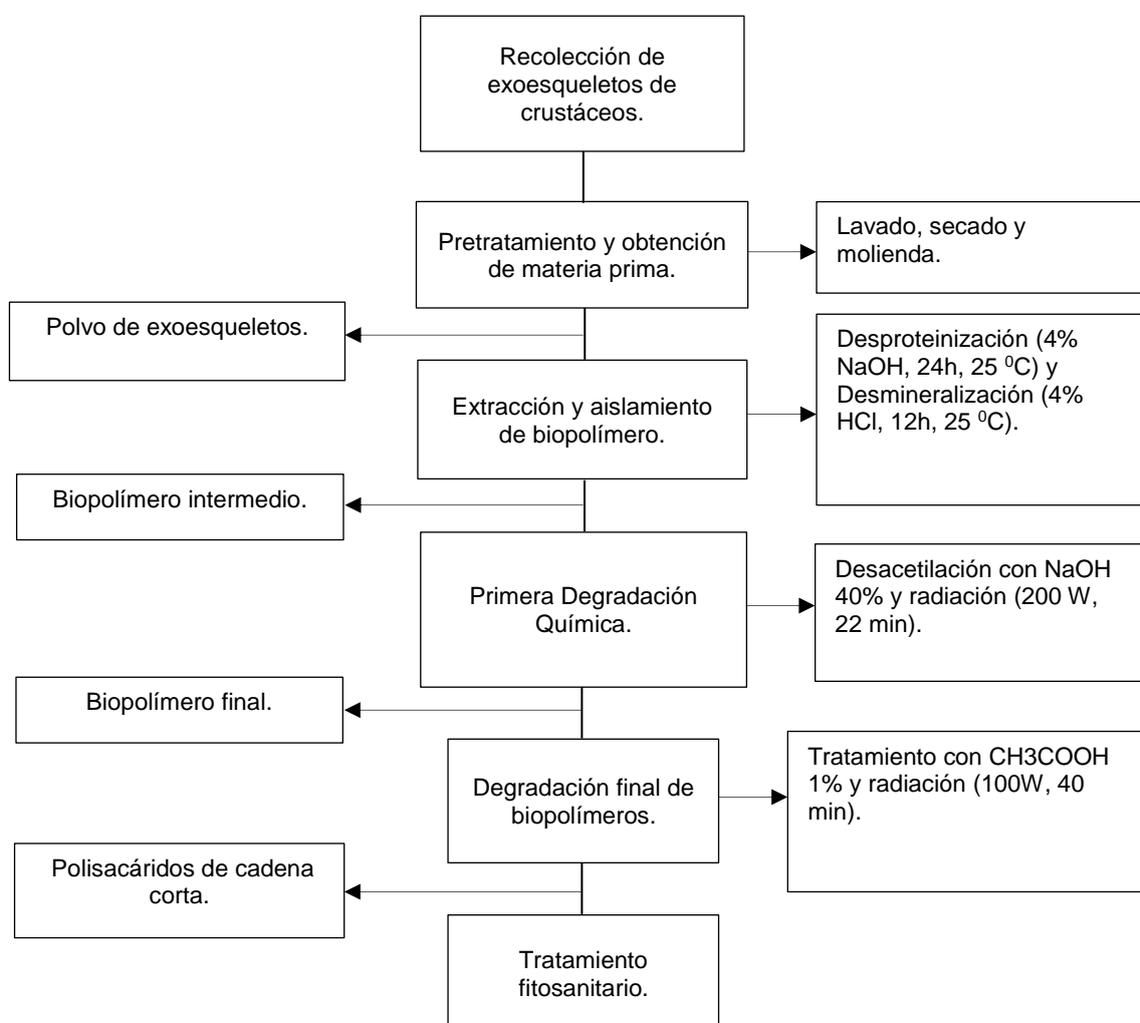


Figura 3.1. Diseño final para la obtención de polisacáridos de cadena corta para su aplicación en pruebas de efectividad
Elaboración: André Dos Santos, 2018.

3.2 Pre-tratamiento del material

Los organismos recolectados en este trabajo correspondieron a los especímenes de cangrejo rojo (*Ucides occidentalis*), jaiba verde (*Callinectes arcuatus*), y camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), adquiridos por compra directa (\$1 x cangrejo y \$3,50 x libra de camarón). El peso medio de los especímenes de crustáceos utilizados, presentaron valores de 200, 320, y 16 gramos para cangrejo, jaiba y camarón, respectivamente. De acuerdo a estos valores, el cálculo del peso solo de la fracción de los exoesqueletos corresponde a los valores 36,5% para cangrejo rojo, 24% para jaiba verde y 33,3% para camarón. A partir de las 3 especies trabajadas, fueron obtenidas 6 tipos muestras que de acuerdo al tratamiento de cocción se clasificaron en cangrejo cocido (CANCO), cangrejo crudo (CANCRU), jaiba cocida (JAICO), jaiba cruda (JAICRU), camarón cocido (CAMCO), camarón crudo (CAMCRU). Una vez procesada la muestra en la fase de pretratamiento del material, las cantidades de materia prima correspondientes al polvo de exoesqueletos fueron de 86,4 g (CANCO), 94,8 g (CANCRU), 177,5 g (JAICO), 209,9 g (JAICRU), 64,9 g (CAMCO), y 65,5 g (CAMCRU), lo cual por especie representa los valores de rendimiento del 59% para cangrejo rojo, 66% para jaiba y 50% para camarón.

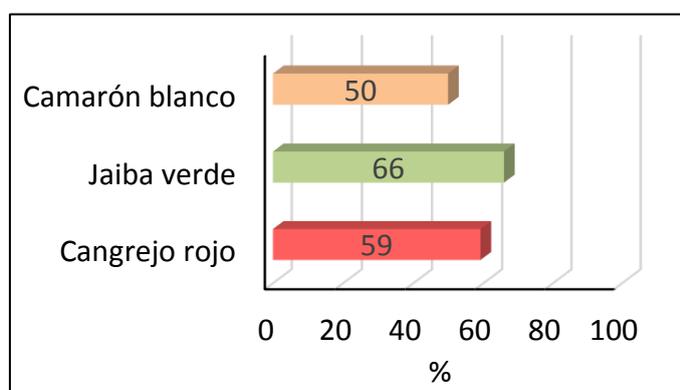


Figura 3.2. Rendimiento final de los exoesqueletos o polvo utilizado como materia prima.
Elaboración: André Dos Santos, 2018.

3.3 Implementación del protocolo y obtención de subproductos

Sin mayores restricciones, la implementación del protocolo hasta la obtención de los 6 tipos de subproductos se realizó en un tiempo total de 5 días. EL pH final de producto luego de su degradación final estuvo en un rango de 6-7, mientras que los valores de rendimiento que se obtuvieron con los pesos secos finales

(Figura 9), resultantes del procedimiento que tuvo luego de finalizada la primera degradación química fueron de 58,7%, 76,7% y 47,4% para los subproductos de la especie *Ucides occidentalis*, *Callinectes arcuatus*, y *Litopenaeus vannamei*.

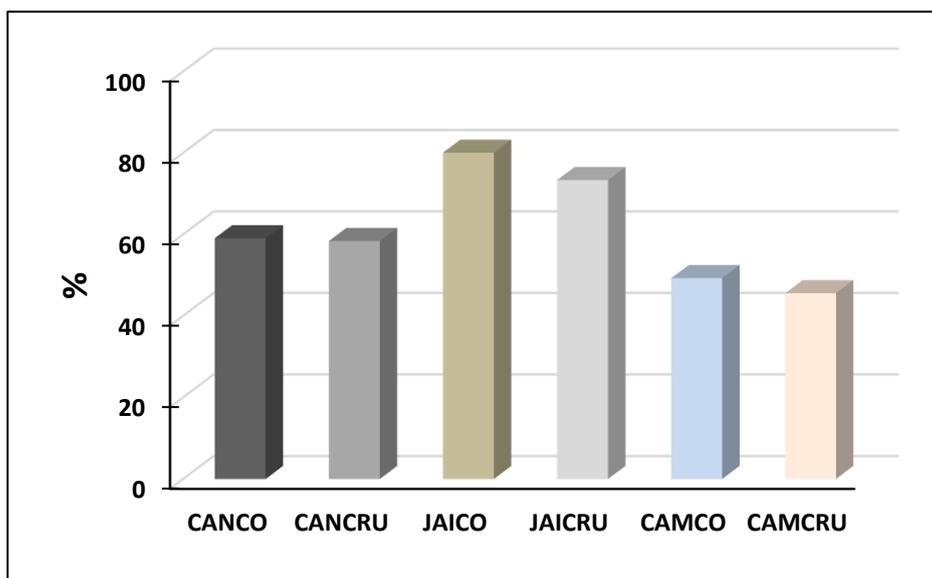


Figura 3.3. Valores de rendimiento en porcentajes de los subproductos obtenidos luego de la primera degradación química. Elaboración: André Dos Santos, 2018.

Con respecto a los valores de humedad calculados de las muestras de los subproductos posterior a su secado (Figura 10), las muestras de cangrejo *U. occidentalis* en promedio obtuvieron 40,47%, y las de *C. arcuatus* y *L. vannamei* 26,82%, y 40,42% respectivamente.

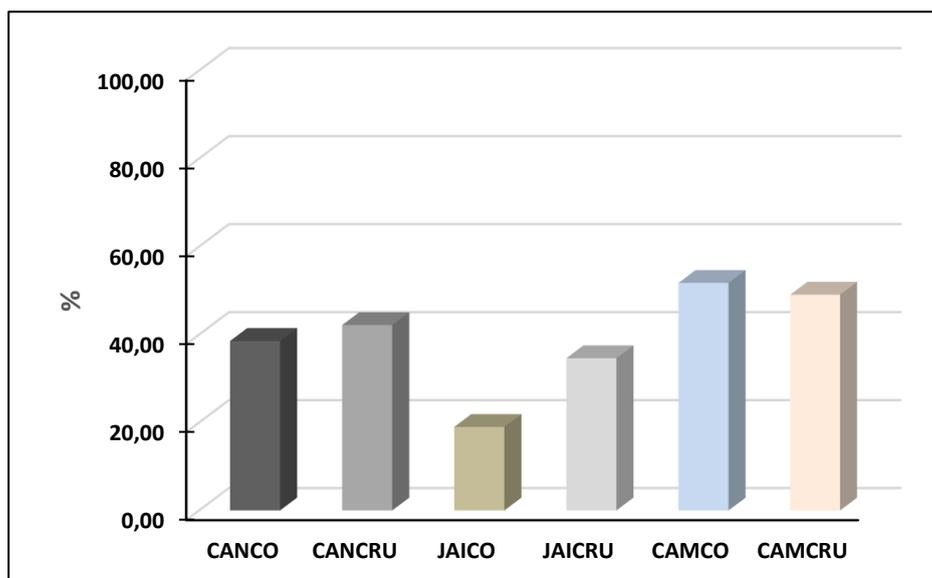


Figura 3.4. Valores de humedad en porcentajes de los subproductos obtenidos luego de la primera degradación química.

3.4 Pruebas de inhibición

Los resultados de la evaluación fitosanitaria aplicando los diferentes subproductos obtenidos sobre el crecimiento de las colonias de *Mycosphaerella fijiensis* presentaron altos porcentajes de inhibición que se ajustan a un modelo lineal positivo relacionado con el aumento de concentración del tratamiento, o dosis. Los valores de inhibición van desde porcentajes bajos del 22-23%, correspondiente a la primera dosis aplicada de 0,01%, hasta un 92-98% con respecto a la última dosis aplicada de 1,25%. Los subproductos que tuvieron porcentajes de inhibición por encima del 90% fueron, CANCO, JAICRU y CAMCRU, y de estos tres, el que mejor modelo de inhibición presentó fue CANCO correspondiente al subproducto obtenido a partir de los exoesqueletos de cangrejo cocidos ($R^2=0,6008$).

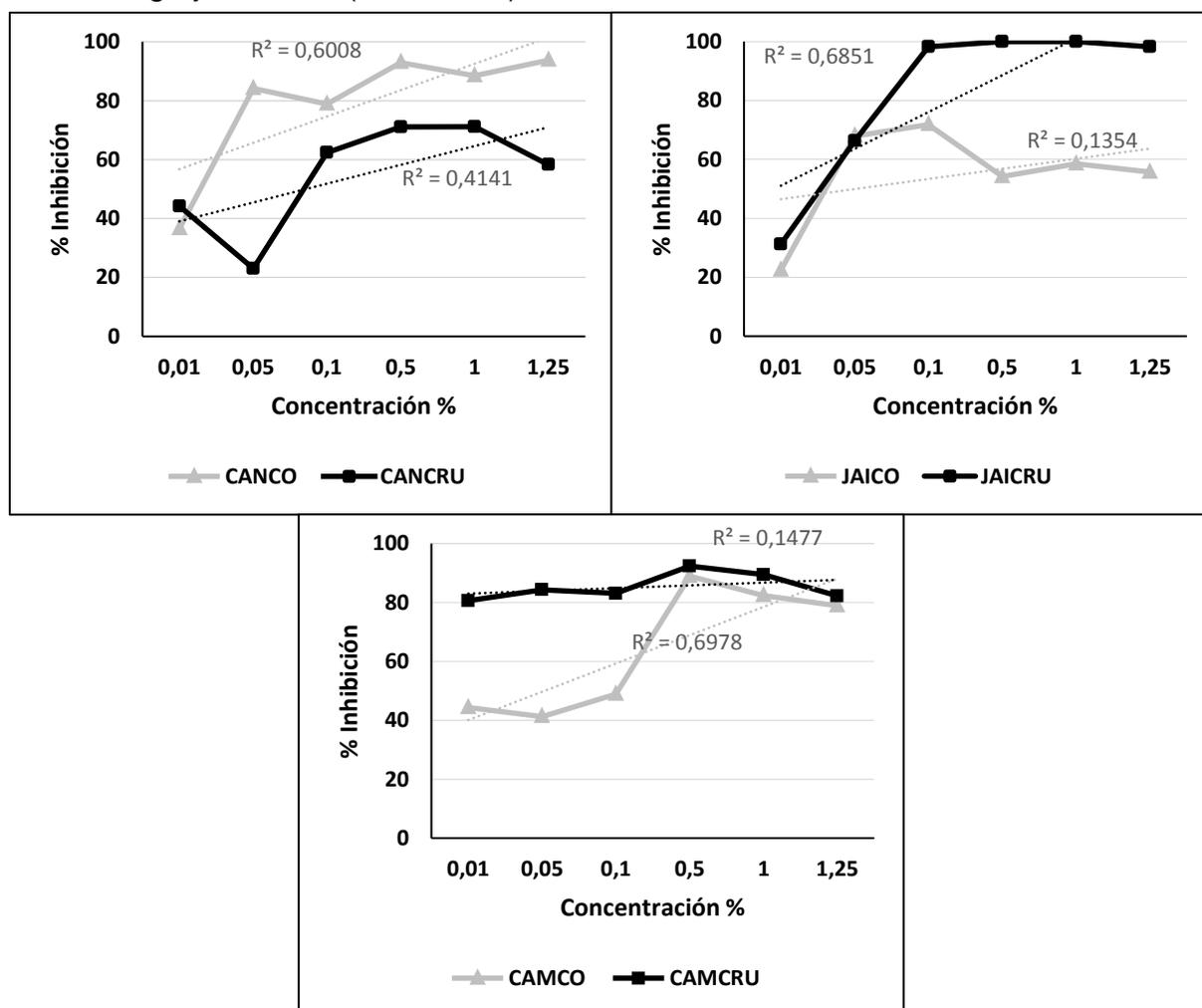


Figura 3.5. Curvas de inhibición de los seis subproductos evaluados sobre *Mycosphaerella fijiensis*.
Elaboración: André Dos Santos, 2018.

CAPITULO 4

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La importancia de este diseño radica en la obtención semiartesanal de bioproductos polisacáridos mediante el aprovechamiento del material desechado por la industria de crustáceos (caparazones o exoesqueletos), y la respuesta de inhibición sobre patógenos que afectan a cultivos agrícolas de importancia para el Ecuador como el caso de *Mycosphaerella fijiensis*, presente en la producción de banano.

4.1 Conclusiones

- Con relación al objetivo principal "Diseñar un protocolo para el aprovechamiento de exoesqueletos y obtención de polisacáridos como alternativa para el manejo de problemas sanitarios agrícolas" se concluye que con el diseño semiartesanal propuesto e implementado, utilizando exoesqueletos de cangrejo, jaiba y camarón, se pudieron obtener diferentes bioproductos polisacáridos.
- En cuanto a la propuesta de diseño, se evidencio la viabilidad de extracción de bioproductos utilizando un método de degradación química por radiación de microondas, sin mayores restricciones y adaptado de diferentes metodologías.
- El material de desecho o exoesqueletos de las diferentes especies de crustáceos de interés comercial en Ecuador, dieron resultados de rendimiento óptimos, tanto en el proceso de transformación de la materia prima (>50%), y después de la degradación química aplicada (45-80%).
- Según los resultados obtenidos de las pruebas de efectividad sobre el patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, los seis bioproductos mostraron potencial de inhibición, a partir de 0,5% la concentración. Se encontraron diferencias en los resultados en relación con las especies analizadas y el tipo de tratamiento inicial de los exoesqueletos (crudo y cocido). El producto obtenido a partir de exoesqueletos cocidos de cangrejo rojo (*U. occidentalis*), presento los mejores porcentajes de inhibición, con un 94% de inhibición sobre el desarrollo del agente causal en estudio.

4.2 Recomendaciones

La realización de este trabajo como proyecto integrador tuvo sus limitaciones en cuanto a materiales y reactivos, por lo cual, en futuros trabajos, para tener un total control sobre el proceso se recomienda que los equipos utilizados sean destinados únicamente para la extracción del subproducto de interés, que con seguridad ayudaría a obtener mejores resultados y que no ocurran interrupciones durante el proceso.

Debido a los valores positivos, en cuanto al control sobre el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*, se recomienda continuar el estudio del potencial de estos subproductos, utilizando este estudio como base, y proponiendo la estandarización del protocolo y la continuidad de pruebas *in vivo*.

Por otro lado, es importante integrar métodos cuantitativos para la caracterización química del producto.

Se deben ajustar medidas de seguridad cuando el proceso de obtención del producto se lo realiza mediante degradación química.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, M., & Bonete, R. (2013). *Estudio de factibilidad para la creación de una planta procesadora de cangrejo (*Ucides occidentalis*) y de jaiba azul (*Callinectes sapidus*) En la cooperativa 6 de Julio del cantón Naranjal. Universidad estatal de milagro. UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO. Retrieved from <http://repositorio.unemi.edu.ec/handle/123456789/779>*
- Andrade, S. M. B. de, Ladchumananandasivam, R., Rocha, B. G. da, Belarmino, D. D., & Galvão, A. O. (2012). The Use of Exoskeletons of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Crab (*Ucides cordatus*) for the Extraction of Chitosan and Production of Nanomembrane. *Materials Sciences and Applications*, 3(7), 495–508. <https://doi.org/10.4236/msa.2012.37070>
- Avilés, D. L., & Mendoza, C. Q. (2009). *Proyecto de exportación de jaiba*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Cabrera, C., Noblecilla, R., & Tumbaco, A. (2011). *Evaluación de factibilidad técnica financiera para la instalación de una planta procesadora de cangrejo*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/17199>
- De Dios Alvarado, J., Almeida, A., Arancibia, M., De Carvalho, R. A., Do Amaral Sobral, P. J., Habitante, A. M. Q. B., ... Sereno, A. (2007). Direct method of chitosan extraction from shrimp waste for production of biodegradable films. *Afinidad*, 64(531), 605–611. Retrieved from <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-42349094186&origin=inward&txGid=f6b56f83ce4d575b8bd65fc23ca0c239>
- Fishery Development Support Service. (1988). *Development of a swimming crab fishery in Ecuador* (No. 23). Kingston.
- Galed, G., Fernández-Valle, M. E., Martínez, A., & Heras, A. (2004). Application of MRI to monitor the process of ripening and decay in citrus treated with chitosan solutions. *Magnetic Resonance Imaging*, 22(1), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2003.05.006>

- Gerasimenko, D. V, Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O. Y., & Varlamov, V. P. (2004). Antibacterial Effects of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Chitosans on Different Microorganisms, *40*(3), 253–257.
- Graham W., G. (1990). The Ecology of Chitin Degradation. In *Advances in Microbial Ecology* (pp. 405–411). New York: Plenum Press.
[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60003-6)
- Gross, R. A., & Kalra, B. (2002). Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*, *297*(5582), 803–807. <https://doi.org/10.1126/science.297.5582.803>
- Herrera Ximénez, L., & Molina Bravo, E. (2010). Programa de Manejo de Recursos Costeros de Ecuador, PMRC., 30.
- Hirano, S., & Nagao, N. (1989). Effects of Chitosan, Pectic Acid, Lysozyme, and Chitinase on the Growth of Several Phytopathogens. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, *53*(11), 3065–3066.
 Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/els/contents110006324114.pdf?id=ART0008331431>
- Kaplan, D. L. (1998). *Biopolymers from Renewable Resources*. (S. M. Hudson & C. Smith, Eds.), *Polysaccharides: Chitin and Chitosan: Chemistry and Technology of Their Use As Structural Materials*. Medford: Springer.
<https://doi.org/10.10007/978-3-662-04068-3>
- Khor, E., & Wan, A. C. A. (2014). Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise: Second Edition. *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise: Second Edition*, 1–136.
<https://doi.org/10.1016/C2013-0-06951-4>
- Lara, M. (2016). *Obtención y caracterización de quitosano procedente del hongo Ganoderma australe para aplicación en biopolímeros*. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6850/1/T-UCE-0017-0010-2016.pdf>

- Liu, X., Guan, Y., Yang, D., Li, Z., & Yao, K. (2000). Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated, (March), 1324–1335.
- Luna, Y. (2012). Obtención De Quitosano a Partir De Quitina Para Su Empleo En Conservación De Frutillas Y Moras. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/427/1/T-UCE-0017-5.pdf>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca. (2014). Reforma del Acuerdo Ministerial 016 Veda del Cangrejo Rojo. Guayaquil. Retrieved from <http://www.acuaculturaypesca.gob.ec/wp-content/uploads/2014/01/Reforma-del-Acuerdo-Ministerial-016-Veda-del-Cangrejo-Rojo.pdf>
- Mahdy Samar, M., El-Kalyoubi, M., Khalaf, M., & Abd El-Razik, M. (2013). Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2013.01.006>
- Majekodunmi, S. (2016). Current Development of Extraction, Characterization and Evaluation of Properties of Chitosan and Its Use in Medicine and Pharmaceutical industry. *American Journal of Polymer Science*, 6(3), 86–91. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20160603.04>
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello, C. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer . A review of their applications. *Revista Tcnocientífica URU*, (August 2016), 53–58. <https://doi.org/2244-775X>
- Ministerio de Industrias y Productividad. (2015). Industria de transformación de plásticos en Ecuador. Retrieved from [http://servicios.industrias.gob.ec/siipro/downloads/temporales/21_1_Industria de transformacion de plasticos en Ecuador.compressed.pdf](http://servicios.industrias.gob.ec/siipro/downloads/temporales/21_1_Industria%20de%20transformacion%20de%20plasticos%20en%20Ecuador.compressed.pdf)
- NAVAS, M. (2016). *Crecimiento del sector camaronero con apertura de nuevos mercados, período 2008 - 2015*. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL. Retrieved

from [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/14063/1/CRECIMIENTO DEL SECTOR CAMARONERO CON APERTURA DE NUEVOS MERCADOS%2C PERIODO 2008 - 2015.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/14063/1/CRECIMIENTO%20DEL%20SECTOR%20CAMARONERO%20CON%20APERTURA%20DE%20NUEVOS%20MERCADOS%20PERIODO%202008%20-%202015.pdf)

Premasudha, P., Vanathi, P., & Abirami, M. (2017). Extraction and Characterization of Chitosan from Crustacean Waste: A Constructive Waste Management Approach. *International Journal of Science and Research*, 6(7), 1194–1198.

PROECUADOR. (2015). Boletín Mesual de Comercio Exterior. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. Retrieved from <http://www.mincit.gov.co/mincomercioexterior/>

Sáez, A., Urdaneta, G., & Joheni, A. (2014). Manejo de residuos sólidos en América Latina y el Caribe. *Omnia*, 20(3), 121–135. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/737/73737091009.pdf>

Santacruz, S., Rivadeneira, C., & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 49, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.019>

Sastoque Cala, E. L. (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador, 1–118.

Shaukat, S. S., Abid, M., Akbar, M., & Campus, G. (2013). Control of Some Important Soil-Borne Fungi By Chitin Associated With Chilli (*Capsicum Annuum L.*) in Lower Sindh , Pakistan, 32(3), 228–234.

Sila, L. A., Bermúdez, A., Almario, F., Mojica, P., Cuéllar, S., & Montoya, M. (2014). Subproductos del camarón (quitina, quitosán, harina y proteína de camarón). Retrieved from http://www.ibepi.org/wp-content/uploads/2014/12/boletin_productos_camaron_03oct.pdf

SORO, L. (2007). *Estudio de la obtención de quitosano a partir de caparazón de*

camarón (Penaeus Vannamei) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión aceite en agua. Escuela Superior Politécnica del litoral. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/94638/D-65367.pdf>

Valero-Valdivieso, M., Ortegón, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: Avances y perspectivas. *Bdigital*, 80(181), 171–180. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/20642/45329>

Villena, N. (2015). El Ecuador y el proceso de cambio de la matriz productiva: Consideraciones para el desarrollo y equilibrio de la balanza comercial. *Observatorio de La Economía Latinoamericana: Revista Eumednet*, 1–10. <https://doi.org/http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/2015/matriz-productiva.html>

Wasikiewicz, J. M., & Yeates, S. G. (2013). “Green” molecular weight degradation of chitosan using microwave irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, 98(4), 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.028>

Xu, J., Zhao, X., Han, X., & Du, Y. (2007). Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.013>

Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>