

BIOCONVERSIÓN DE DESECHOS DE CRUSTÁCEOS MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA Y MALOLÁCTICA PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO

BIOCONVERSION OF CRUSTACEAN WASTES BY LACTIC
AND MALOLACTIC FERMENTATION TO OBTAIN CHITOSAN

Christian Rosero^{1*}, Fernando Novillo², Ana Calderón¹
& María Gabriela Salazar¹

Recibido: 1 de mayo 2023 / Aceptado: 20 de diciembre 2023
DOI: 10.26807/ia.v12i1.269

Palabras clave: *Farfantepenaeus brevisrostris*, fermentación láctica, fermentación maloláctica, quitina, quitosano, *Ucides occidentalis*

Keywords: Chitin, Chitosan, *Farfantepenaeus brevisrostris*, lactic fermentation, malolactic fermentation, *Ucides occidentalis*

RESUMEN

La quitina es un polímero natural que está presente en los exoesqueletos de los crustáceos, arácnidos y muchos insectos. En esta investigación se extrajo la qui-

1 Universidad Central del Ecuador, Centro de Química, Quito, Ecuador (*correspondencia: cjrosero@uce.edu.ec, amcalderon@uce.edu.ec, mgsalazar@uce.edu.ec)

2 Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador (fnovillo@uce.edu.ec)

tina mediante bioconversión de desechos de camarón (*Farfantepenaeus brevisrostris*) y cangrejo (*Ucides occidentalis*) por fermentación láctica y fermentación maloláctica para posteriormente obtener quitosano. Para llevar a cabo las fermentaciones se diseñó un biorreactor anaerobio, en el cual se mantuvo los sustratos durante dos y tres semanas. En este proceso se genera ácido láctico que es el responsable de la desmineralización de los desechos de los crustáceos. Posteriormente, se realizó una hidrólisis básica con NaOH al 5 % para la desproteinización de los exoesqueletos y un blanqueado con una solución de NaClO al 1 %. Para el proceso de desacetilación de quitina a quitosano se utilizó como fuente alternativa de energía un microondas acoplado a un equipo de reflujo que se trabajó a una potencia de 700 W. Los rendimientos obtenidos de quitina y quitosano estuvieron entre 28 y 33 %, respectivamente, y los grados de desacetilación de quitosano entre 68 y 77 %, el quitosano obtenido fue caracterizado mediante espectroscopia infrarroja, viscosimetría, microscopia óptica y titulación potenciométrica. Esta investigación abre nuevas alternativas de obtención de quitosano mediante métodos mixtos químico-biológicos, que permiten dar un valor agregado a desechos de crustáceos y a sustratos como el suero lácteo y zumos de frutas.

ABSTRACT

Chitin is a natural polymer that is present in the exoskeletons of crustaceans, arachnids, and insects. In this research, chitin was extracted by bioconversion of shrimp (*Farfantepenaeus brevisrostris*) and crab (*Ucides occidentalis*) waste by lactic fermentation and malolactic fermentation to subsequently obtain chitosan. To carry out the fermentations, an anaerobic bioreactor was designed, in which the substrates were kept for 2 and 3 weeks. In this process, lactic acid is generated, which is responsible for the demineralization of the crustacean waste. Subsequently, basic hydrolysis was carried out with 5% NaOH for deproteinization of the exoskeletons and bleaching with a 1% NaClO solution. For the process of deacetylation of chitin to chitosan, a microwave coupled to a reflux unit was used as an alternative source of energy at a power of 700 W. The obtained yields of chitin and chitosan were between 28 and 33% respec-

tively and the degrees of chitosan deacetylation between 68 and 77%, the obtained chitosan was characterized by infrared spectroscopy, viscosimetry, optical microscopy and potentiometric titration. Finally, this research opens new alternatives for obtaining chitosan by means of mixed chemical-biological methods that allow giving added value to crustacean wastes and substrates such as whey and fruit juices.

INTRODUCCIÓN

Existen varios métodos de extracción de quitina a partir de distintas fuentes como los crustáceos, entre ellos se puede nombrar a la fermentación láctica, los métodos químicos y los métodos biológicos, o la combinación de estos.

La quitina puede ser extraída a partir de desechos de crustáceos, principalmente de cangrejos, langostas y mejillones mediante un proceso exclusivamente químico (Escobar, Ossa, y Quintana, 2013).

Mediante métodos biológicos Pacheco (2005) realizó la extracción de quitina de desechos de camarón utilizando la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Las condiciones óptimas para llevar a cabo esta bioconversión fueron 20 % de glucosa, 20 % de inoculación y 6 días de fermentación. Bajo

estas condiciones se obtuvo un 82 % de desmineralización, un 92 % de desproteínización y el rendimiento de extracción de quitina fue del 47 %.

Concretamente, en Nicaragua, Marcia et al. (2011) estudió a fondo el método mediante fermentación láctica haciendo uso de suero de leche y sacarosa, como sustrato y fuente de carbono. El proceso de fermentación se llevó a cabo en un reactor vertical de vidrio Pyrex de 4 L por un período de 2 y 3 semanas a temperatura ambiente. Los resultados mostraron que, aunque hubo una buena desproteínización y desmineralización, todavía el producto contenía restos de proteínas y pigmentos. Por ello, se aplicó un procedimiento químico con hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio, para remover completamente las proteínas de la estructura del ca-

parazón. La comparación de los espectros FT-IR de la quitina producida con una muestra de quitina comercial, mostró un porcentaje de correlación del 93-95 %, lo que indica que la quitina obtenida, utilizando el método combinado, tiene un alto grado de pureza (Marcia.E, 2011).

El cultivo de camarón ha permitido una gran entrada de divisas a países costeros, en donde las exportaciones de camarones alcanzaron los 38 millones de dólares en el año 2006 , lo que ha incrementado el interés de otros gobiernos por incorporar la camaricultura como una estrategia de desarrollo (Zubiria y Jimenez, 2014). Sin embargo, los residuos generados por esta industria amenazan fuertemente su productividad, debido a que en el mundo se arroja toneladas de desechos al mar sin ningún tipo de control, generando un desequilibrio ecológico.

Es muy conocido que el Ecuador es un gran exportador de crustáceos y pesca en general, así como también un gran consumidor de camarón y cangrejo rojo. Esta actividad pesquera, tanto industrial como artesanal, no tiene un manejo adecuado de los

desechos sólidos producidos que son descargados en zonas aledañas de las industrias y en rellenos presentes en las ciudades, los cuales en grandes cantidades son un potencial contaminante.

Estos residuos son ricos en quitina, un biopolímero de gran interés tecnológico y científico, que puede ser aprovechado para obtener quitosano que posee propiedades fisicoquímicas excepcionales que permiten su aplicación tanto en el área médica, ambiental y de biomateriales (Maldonado, 2018).

La extracción química de la quitina involucra una serie de pasos como son la desmineralización, la desproteínización, la despigmentación, etcétera, en donde se utilizan grandes cantidades de ácidos y bases fuertes como el HCl y el NaOH, lo que genera contaminación ambiental por los desechos químicos producidos.

Por tal motivo, surge la necesidad de optimizar la obtención de quitosano utilizando otro tipo de ácidos producidos naturalmente en fermentaciones bacterianas como es la fermentación láctica y maloláctica, uti-

lizando suero de leche, así como también de la aplicación de técnicas químicas asistidas por microondas.

La radiación por microondas tiene la propiedad de transferir energía directamente a los reactantes, provocando el súper calentamiento instantáneo que promueve las transformaciones químicas en menor tiempo (Lorentzen, 1996). Para este estudio se utilizó microondas en la desacetilación de quitina a quitosano.

El suero de la leche es un gran contaminante de las aguas superficiales,

debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO), por lo tanto, puede ser utilizado como sustrato en las reacciones de fermentación láctica para la obtención de ácido láctico el cual es el responsable de la desmineralización de los exoesqueletos de los crustáceos. En otro procedimiento, se realizó una fermentación maloláctica a partir del zumo de la manzana. La fermentación maloláctica consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico por medio de bacterias que, de forma natural, se encuentran en la fruta (Comenge, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Material

Material de vidrio, termómetro, recipientes plásticos, papel filtro, magnetos, espátulas, mortero.

Reactivos

Exoesqueletos de cangrejo (*Ucides occidentalis*) y camarón (*Farfantepenaeus brevisrostris*), suero de leche, jugo concentrado de manzana, azúcar, levadura marca LEVAPAN.

Equipos

Biorreactor anaeróbico diseño Pyrex, equipo de reflujo, plancha de agitación Thys 83278, balanza Analítica Scientech SA 210, tamices Prufsiebring TGL, filtración a presión reducida, molino Corona, licuadora Oster 34S, potenciómetro OAKLON 1100, plancha de calentamiento CIMAREC S1313, microondas Sharp R-202E, viscosímetro, microscopio Óptico AmScope MU1400, espectro FTI Perkin Elmer RX1.

Métodos

Extracción de quitina

Lavado y secado: Se realizó un lavado exhaustivo de los desechos tanto de camarón como de cangrejo, se secó la muestra a temperatura ambiente por 48 horas y se redujo el tamaño de partícula con una licuadora.

Desmineralizado: Se diseñó un biorreactor para desmineralizar la materia prima. Este biorreactor consiste en un Erlenmeyer de 1 L, al cual se le colocó un tapón de caucho N.º 9 monohoradado con un tubo de desprendimiento. Se adaptó una manguera a este tubo y se la sumergió en un Erlenmeyer con una solución saturada de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, para cuantificar el CO_2 generado.

En cada biorreactor se colocó 30 g de exoesqueleto de crustáceo molido, 300 ml de suero de leche o zumo de manzana según el tipo de fermentación y 5 g de sacarosa. En la fermentación maloláctica se agregó además una solución al 10 % de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, preparada a partir de levadura fresca marca LEVAPAN, con el fin de pro-

mover inicialmente una fermentación alcohólica.

Desproteinado: Al residuo del desmineralizado se lo sometió a reflujo con agitación magnética y una temperatura aproximada de 100 °C con 100 mL de NaOH al 5 % durante 3 horas.

Blanqueo: Al sólido que se obtuvo en el paso anterior se le adicionó 20 mL de solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,1 %.

Mediciones de variables de seguimiento (pH, CO_2 y Ca^{2+})

Se midió el pH del suero de leche y del jugo concentrado de manzana con un potenciómetro OAKLON 1100. Además, se cuantificó el Ca^{2+} en un espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER ANALYST 100.

Obtención de quitosano

En un balón de fondo redondo de 50 ml se adicionó 1,5 g de quitina extraída y 20 mL de una solución de NaOH al 50 %. La mezcla se calentó hasta ebullición en un montaje adap-

tado para reflujó en periodos de 1 minuto hasta completar 10 minutos utilizando un microondas a una potencia de 700 W.

Caracterización quitosano obtenido

Porcentaje de desacetilación: Se usó el método de áreas bajo la curva mediante espectroscopia IR (Baxter, Di-

llon y Taylor, 1992) y mediante titulación potenciométrica con la ayuda de un potenciómetro OAKLON 1100. Además, se caracterizó el quitosano por análisis de sus espectros IR, microscopía óptica usando un microscopio AmScope MU1400 acoplado a una cámara fotográfica y, mediante viscosidad, se determinó su peso molecular medio.

RESULTADOS

A lo largo de este apartado se usarán abreviaturas para los distintos tratamientos experimentales propuestos

Tabla 1. Codificación de variables

Factor	Nivel A	Nivel B
Materia prima	A (<i>Farfantepenaeus brevis</i>) Camarón	B (<i>Ucides occidentalis</i>) Cangrejo
Fermentación	FL (láctica)	FM (maloláctica)
Tiempo	3 (semanas)	2 (semanas)

Variación de pH en la fermentación láctica

La fermentación láctica (FL) se lleva a cabo por acción de las bacterias del género *Lactobacillus* presentes en el suero de leche, las cuales, al interactuar con la fuente de energía proveniente de los azúcares, generan una disminución gradual del pH al producir el ácido láctico.

Tabla 2. Medias de los resultados de pH inicial y final de la fermentación láctica de desechos de crustáceos

Materia Prima	Tiempo de fermentación semanas	pH inicial	pH final
Camarón	2	5,79±0,16	3,13±0,24
Camarón	3	5,79±0,16	2,93±0,10
Cangrejo	2	5,89±0,18	2,96±0,13
Cangrejo	3	5,89±0,18	2,85±0,01

Variación de pH en la fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica (FM) ocurre en dos pasos; el primero, una fermentación alcohólica en donde levaduras descomponen los azúcares a etanol; y, la segunda, donde las

bacterias lácticas, como *Oenococcus oeni*, proliferan a un pH menor a 3,1 y pueden realizar una FM, produciendo ácido láctico y por lo tanto la reducción del pH (García, 2008). Las medias de la variación de pH se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Medias de los resultados de pH inicial y final de la fermentación maloláctica de desechos de crustáceos

Materia Prima	Tiempo de fermentación semanas	pH inicial	pH final
Camarón	2	5,16±0,28	3,70±0,01
Camarón	3	5,16±0,28	3,58±0,03
Cangrejo	2	5,12±0,12	3,66±0,16
Cangrejo	3	5,12±0,12	3,53±0,18

Variación de CO₂ en los procesos de fermentación

Se obtuvo valores similares entre 1087-1095 de CO₂ en ppm para todos los tratamientos.

La similitud entre los valores de CO₂ en ppm en cada uno de los tratamientos se debe a que el Ca(OH)₂ limitó la cantidad de CaCO₃ como precipitador, es decir, una vez que se consumió todo el Ca(OH)₂ ya no fue posible la reacción con CO₂, y por lo tanto no se conoce con certeza la

cantidad total de CO₂ producido en los procesos de fermentación láctica.

Variación de Ca²⁺ en los procesos de fermentación

Se determinó la concentración de calcio en los líquidos resultantes del proceso de desmineralizado previo tratamiento mediante absorción atómica, para lo cual con ayuda de la respectiva curva de calibración se calcularon las concentraciones de calcio que se describen en la Tabla 4 (Seijas, 1992).

Tabla 4. Medidas de absorbancia y cantidad de Ca²⁺ calculado

Materia Prima	Tipo fermentación	Tiempo fermentación semanas	Ca²⁺ (ppm)
Cangrejo	FL	3	3685
Cangrejo	FM	3	3287
Camarón	FL	3	4923
Camarón	FM	3	4742

Rendimiento de quitosano

Se calculó un rendimiento global de quitosano obtenido teniendo en cuenta la materia prima con la que se inició el proceso (Tabla 5).

Tabla 5. Medias de los resultados de rendimiento de quitosano final para los distintos tratamientos

Tratamiento	Promedio
BFL2	28,68 ±0,12
BFL3	29,09 ±0,90
BFM2	27,98 ±1,13
BFM3	29,24 ±1,95
AFL2	30,73 ±0,13
AFL3	32,98 ±0,10
AFM2	32,79 ±0,82
AFM3	30,75 ±0,43

Caracterización de quitosano por IR

Para realizar el análisis del espectro IR del quitosano se escogió las muestras más representativas para cada materia prima (AFL3, AFM3, BFL3, BFM3) de exoesqueletos de cangrejo y camarón teniendo en cuenta el rendimiento obtenido en cada uno de los tratamientos.

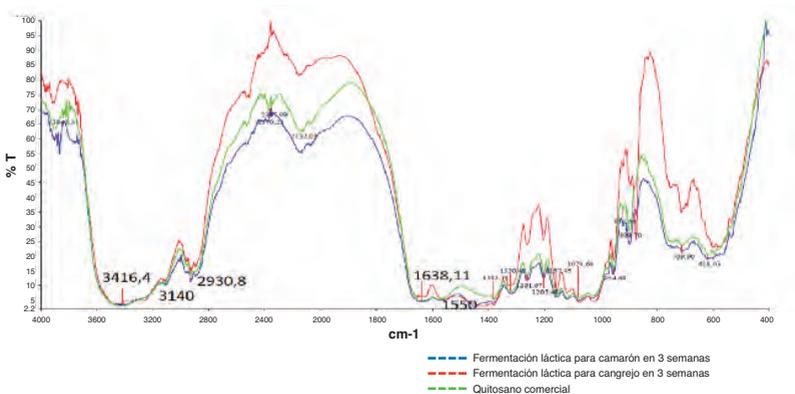


Figura 2. Espectro IR de quitosano. Fermentación láctica

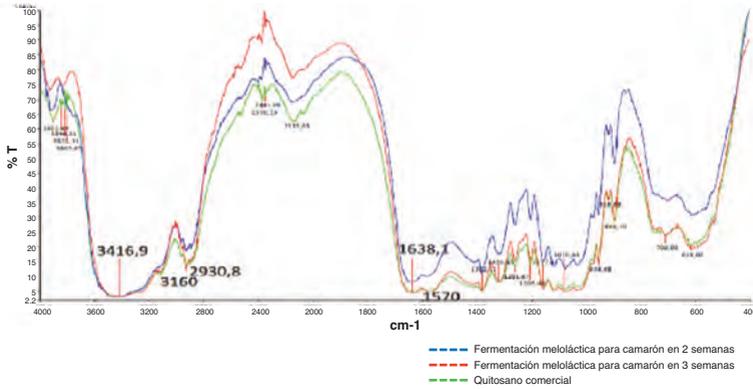


Figura 3. Espectro IR de quitosano. Fermentación meloláctica

Determinación del grado de desacetilación por espectroscopia IR

Para el proceso de desacetilación de quitina a quitosano se utilizó un microondas acoplado a un equipo de reflujo como fuente alternativa de energía. Se ha demostrado que el calentamiento por microondas es más rápido y en algunas ocasiones más eficaz que los métodos convencionales para varias reacciones químicas como lo es la desacetilación de la quitina para producir quitosano (Liu, Yepeing y Yue E, 2004).

Cisneros et al. (2016), utilizó un microondas SAMSUNG a una potencia de 1400 W en tiempos de 4,7 y 10 minutos obteniendo porcentajes de

desacetilación (% DA) máximos de 87 %. En la presente investigación se ocupó un microondas a una potencia de 700 W obteniendo % DA máximo de 77,43 que corresponde a quitosano obtenido de desechos de camarón mediante FL en un tiempo de 3 semanas.

Para el cálculo del grado de desacetilación se aplicó el método propuesto por Baxter et al. (1992), el cual se basa en elegir la banda en 1655 cm⁻¹ (C=O) característica de la amida I y como referencia la banda a 3450 cm⁻¹ (O-H).

$$\%A = 115 * \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \quad \text{Ec. 1}$$

$$\%DA = 100 - \%A \quad \text{Ec. 2}$$

De esta manera se obtiene los valores de % DA para quitosano de las muestras resultantes de todos los tratamientos y que se indican sus medias en la Tabla 6.

Tabla 6. Medias de los resultados de % DA de quitosano para los distintos tratamientos

Tratamiento	Promedio
BFL2	73,40±1,39
BFL3	68,71±1,23
BFM2	65,45±1,52
BFM3	69,58±3,25
AFL2	73,77±0,39
AFL3	77,43±0,58
AFM2	72,55±1,23
AFM3	75,02±1,73

Determinación del peso molecular del quitosano mediante viscosimetría

Para la determinación del peso molecular se utilizó un viscosímetro de Ostwald, por lo que fue necesario calcular sus constantes cinéticas. Por lo tanto, se determinaron las densidades de los dos líquidos, del agua y del ácido acético 10 % y de igual manera se utilizó sus viscosidades a la temperatura de 25 °C, al final se calculó las viscosidades reducidas,

viscosidades intrínsecas para finalmente determinar el peso molecular medio de las 3 muestras que tuvieron el mayor grado de desacetilación mediante la ecuación de Mark-Houwink.

Tabla 7. Pesos moleculares medios viscosimétrico

Solución de Qs	[η], cm ³ /g	PM, g/mol
BFL2	306,17	4,18×10 ⁵
AFL3	260,73	3,73×10 ⁵
AFM3	320,57	4,39×10 ⁵

Microscopia óptica de quitosano

Se analizaron las muestras más representativas de quitosano en un microscopio óptico con aumento de 4x y 40x, para lo cual se colocó una mínima cantidad de muestra directamente en el portaobjetos.

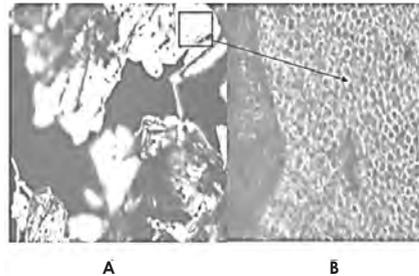


Figura 4. Quitosano de camarón por fermentación láctica en 2 semanas
A, observado a 4x; B, observado a 40x

DISCUSIÓN

En esta investigación el objetivo principal fue la bioconversión de exoesqueletos del cangrejo (*Ucides occidentalis*) y camarón (*Farfantepenaeus brevisrostris*), para facilitar la extracción de quitina y posteriormente obtener quitosano mediante una hidrólisis básica vía microondas. En el exoesqueleto de los crustáceos, además de la quitina, están presentes proteínas, minerales de calcio y pigmentos (Gerente y Lee, 2017); por esta razón, es necesario separar dichos compuestos mediante métodos químicos, enzimáticos, biológicos o métodos mixtos.

Para llevar a cabo la bioconversión biológica se aplicó por separado una fermentación láctica y maloláctica. Estas fermentaciones tienen en común la generación de ácido láctico, el cual es responsable de la desmineralización de los exoesqueletos de los crustáceos. Posteriormente, para extraer la quitina se realizó el desproteinado mediante una hidrólisis con una solución de NaOH al 5 %. Finalmente, para obtener quitosano, la quitina extraída se trató con una solución de NaOH al 50 % y reflujo durante 10

minutos calentado en un microondas adaptado para este propósito.

Variación de pH en la fermentación láctica

En la Tabla 2 se detalla las medias de los pH determinados durante el proceso de la fermentación láctica (FL). Se observa de una manera general que a las dos semanas hay una disminución importante del valor de pH de 5,79 a 3,13 para los desechos de camarón y de 5,89 a 2,85 para los desechos de cangrejo. A partir de la segunda a la tercera semana la variación de pH es muy pequeña de 3,13 a 2,93 y de 2,96 a 2,85 respectivamente. Esto significa que probablemente después de la tercera semana no se observaría una reducción considerable del pH. Estos valores del cambio del pH en el biorreactor están en concordancia con los reportados por Marcia (2011), donde el pH inicial fue de 5,97 y el pH final fue 3,7 y 3,3 a las 2 y 3 semanas, respectivamente.

Esta disminución de pH se asocia a la producción de ácido láctico a partir de la actividad metabólica de las bac-

terias del género *Lactobacillus* que descomponen las fuentes de carbono, en este caso el azúcar añadido al sistema de reacción y la lactosa presente en el suero de leche.

Estas bacterias lácticas pertenecen a los microorganismos anaeróbicos facultativos, es decir, que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Sin embargo, la fermentación tiene lugar en un medio anaeróbico, por lo que se tomó las debidas precauciones para que no ingrese aire al biorreactor (Ramirez, Rosas, Velásquez, Ulloa y Arce, 2011).

Además, esta condición de acidez alta (pH bajo) evita el crecimiento de microorganismos no deseados como *Pseudomonas*, *Moraxella* entre otros, que pueden conducir a la putrefacción de los desechos de crustáceos (Shirai, Guerrero, Huerta, Saucedo, y Castillo, 2000).

Variación de pH en la fermentación maloláctica

En la Tabla 2 se detalla las medias de los pH determinados durante el proceso de la FM. Se observa de una manera general, que al igual que en la fermentación láctica, a las dos semanas hay una disminución considerable del valor de pH de 5,16 a 3,70 para los desechos de camarón y de 5,12 a 3,66 para los desechos de cangrejo, a partir de la segunda a la tercera semana la variación de pH es menor de 3,70 a 3,58 y de 3,66 a 3,53, respectivamente. Al comparar el pH final de la FL con el de la FM podemos observar que en la FM no se alcanzó los mismos niveles de acidez (pH bajo), asociado a que la producción de ácido láctico en este tipo de fermentación necesita de más tiempo, como se puede observar en un proceso de fermentación maloláctica en vinos (Figura 5) en los primeros días se da una fermentación alcohólica.

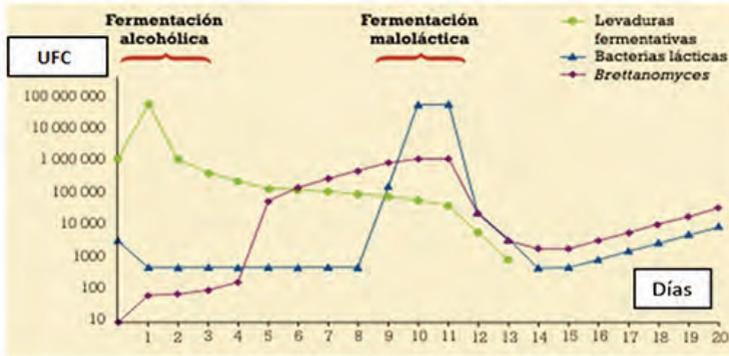


Figura 5. Crecimiento microbiano en un proceso de fermentación para vinificación

(Lopéz, 2010)

En la FM la disminución de pH por producción de ácido láctico ocurre en dos pasos, inicialmente la fermentación alcohólica y posteriormente una fermentación maloláctica, en donde el ácido málico del zumo de manzana se transforma en ácido láctico y CO_2 por acción de las bacterias lácticas *Oenococcus oeni* (Parés, 1995). Considerando que la FM requiere de estas dos etapas, y con el propósito de acelerar el proceso de fermentación alcohólica se agregó una solución al 10 % de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Variación de CO_2 en los procesos de fermentación

Se obtuvo valores similares entre 1087-1095 de CO_2 en ppm para todos los tratamientos.

La similitud entre los valores de CO_2 en ppm en cada uno de los tratamientos se debe a que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ limitó la cantidad de CaCO_3 como precipitado, es decir, una vez que se consumió todo el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ya no fue posible la reacción con CO_2 , y por lo tanto no se conoce con certeza la cantidad total de CO_2 producido en los procesos de fermentación láctica. Para esto se propone utilizar otro tipo de hidróxido con mayor solubilidad, como puede ser el $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

Variación de Ca^{2+} en los procesos de fermentación

Existen estudios similares basados en fermentaciones lácticas para la bioconversión de desechos de crustáceos. Marcia (2011), indica que tras el proceso de fermentación se obtuvo un licor que contenía entre 9 y 12 g/L de Ca^{2+} que al convertirlo en ppm se obtiene valores en concordancia a los obtenidos en esta investigación teniendo en cuenta que se ocupó menor cantidad de materia prima que la utilizada por Marcia (2011).

El ácido láctico que se produce durante el proceso de fermentación reacciona con los minerales del calcio que se encuentran en los desechos de crustáceos, de esta manera se da su separación en primera instancia de la quitina (Xu, Gallert y Winter, 2008).

Inicialmente un mol de glucosa produce dos moles de ácido láctico, estas dos moléculas de ácido láctico reaccionan con una molécula de carbonato de calcio y se produce el lactato de calcio.

El lactato de calcio se podría recuperar del sistema para ser usado co-

mo un ingrediente en la industria de alimentos, principalmente por sus propiedades como regulador de la acidez y para el tratamiento de harinas (Badui, 2013).

Rendimiento de quitosano

Como podemos observar en la Tabla 5 se obtuvo rendimientos similares a los rendimientos obtenidos de quitina. Se mantiene la tendencia a obtener mejores rendimientos a partir de exoesqueletos de camarón, En general se obtuvo rendimientos entre un 28 y 32 % y que están cercanos a los reportados en la literatura, por ejemplo, se han realizado algunos estudios de la obtención de quitosano a partir de métodos químicos, métodos biológicos y métodos de bioconversión mixta. Una investigación realizada en la Universidad Autónoma de Puebla se reporta un rendimiento de quitosano cercano al 50 % para desechos de camarón utilizando métodos químicos (Hernandez, Almanza y Florez, 2009). En estudios similares realizados mediante métodos microbiológicos se han obtenido rendimientos entre un 33 y 38 % para desechos de camarón (Khanafari y Marandi, 2013).

Caracterización de quitosano por IR

En las Figuras 2 y 3 se puede observar señales características entre $3400-3500\text{ cm}^{-1}$ que corresponden al alargamiento del enlace O-H de los grupos hidroxilos. Una característica importante en esta banda es la presencia de un hombro aproximadamente a 3200 cm^{-1} , debido a que existen solapamientos con otras señales características en esta zona, tal es el caso del alargamiento del enlace N-H proveniente de los grupos amino del quitosano. La señal entre $2900-3000\text{ cm}^{-1}$ se debe al alargamiento del enlace $C_{sp^3}-H$ de los grupos metilenos. Como la reacción de desacetilación no se da en la totalidad de la quitina aún existirán grupos amida en la estructura del biopolímero, es por esta razón que se observa entre $1600-1670\text{ cm}^{-1}$ la señal atribuida al enlace $C_{sp^2}=O$ del grupo amida (Amida I), la señal entre $1540-1590\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de flexión del grupo NH-R (Amida II). El resto de las bandas aparecen de forma similar tanto en la quitina como en el quitosano y representan su huella digital. Claramente se dio el proceso de desacetilación de la quitina a qui-

tosano, pero no en un 100 %, aún se observan señales correspondientes a los grupos amida, posiblemente por la presencia de minerales que interhirieron en el proceso de desacetilación.

Determinación del grado de desacetilación por espectroscopia IR

Los tratamientos en los que se obtuvo mayor grado de desacetilación fueron BFL2 y AFL3 73,40 y 77,43. En general se obtuvo mejores grados de desacetilación utilizando como materia prima el camarón, esto debido a que la quitina obtenida de exoesqueletos de camarón ya no presentaban gran cantidad de minerales por lo que fue más eficiente el proceso de desacetilación, a diferencia de la quitina obtenida a partir de exoesqueletos de cangrejo que pudo haber sido menos pura y esto interfirió en el proceso de desacetilación. Cabe recalcar que mediante titulación potenciométrica de una muestra representativa se obtuvo un grado de desacetilación de 69,13 %.

Determinación del peso molecular del quitosano mediante viscosimetría

En distintas investigaciones se reportan pesos moleculares (PM) de quitosano mayores a 1×10^5 g/mol. Específicamente De la Paz et al. (2013), reporta PM cercanos a $3,1 \times 10^5$ g/mol ocupando métodos convencionales de desacetilación. En un estudio donde se obtuvo quitosano a partir de la pluma del calamar, se reporta un PM cercano a 2×10^5 g/mol (Bermeo, 2015). En esta investigación se ocupó un microondas acoplado a un equipo de reflujos como una fuente alterna-

tiva de energía obteniendo un peso molecular medio entre 3×10^5 y 4×10^5 g/mol, confirmando la eficiencia energética de este método alternativo de desacetilación.

Microscopia óptica de quitosano

En la Figura 4, se puede observar una red polimérica entrecruzada tal y como lo reporta Ramírez et al. (2016), la cual es característica de la adsorción del quitosano debido a que forma hidrogeles y es en donde se retícula un monómero a un polímero ya formado, generando una red porosa de menor tamaño.

CONCLUSIÓN

Se obtuvo quitosano a partir de un proceso de bioconversión de desechos de crustáceos mediante fermentación láctica y maloláctica usando como fuente alternativa de calentamiento un microondas para el proceso de desacetilación, dicho quitosano se lo obtuvo con rendimientos entre un 27 % y 33 %. El mejor método para la obtención de quitosano resultó ser mediante una fermentación láctica de desechos de camarón, en un tiempo de fermentación de 3 semanas.

El análisis de las variables de seguimiento, variación de pH, cantidad de Ca^{2+} y CO_2 producido, muestran valores similares a los obtenidos en investigaciones de otros autores, por lo tanto, se pudo verificar que el proceso de fermentación y producción de ácido láctico bajo las condiciones propuestas en esta investigación se dio con éxito.

Se caracterizó el quitosano mediante espectroscopia infrarroja, obteniéndose resultados similares a los repor-

tados en la literatura. Además, mediante esta técnica se calculó el % DA de quitosano alcanzando valores entre 60-70 % y mediante titulación potenciométrica se obtuvo 69 %. El PM medio viscosimétrico del quitosano obtenido fue de $4,39 \times 10^5$ g/mol. Esto sugiere que el quitosano obteni-

do tiene un alto grado de desacetilación y un peso molecular medio adecuado lo que lo hace útil para diversas aplicaciones teniendo en cuenta propiedades beneficiosas como mayor solubilidad, propiedades reológicas y apropiada viscosidad.

LISTA DE REFERENCIAS

- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*. Pearson.
- Baxter, A., Dillon, M. y Taylor, K. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 14(3), 166–169. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(05\)80007-8](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(05)80007-8)
- Bermeo, A. (2015). *Determinación de pesos moleculares de biopolímeros*. Ambato.
- Cisneros Pérez, I., Curbelo, C., Vinicio Cobeña, M., & Molina, D. I. (2019). MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA DESACETILACIÓN DE LA QUITINA. *Universidad Ciencia Y Tecnología*, (2), 162-169. <https://uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/80>
- Comenge. (2015). Enología. Obtenido de <https://www.comenge.com/blog/enologia/fermentacion-malolactica.html>
- De la paz, N., Perez, D., Frenandez, M., Lopez, D. y Nogueira, A. (2013). Evaluación viscosimétrica de quitosano. *Revista iberoamericana de Polímero*, 14(2), 84-91. <https://www.observatorioplastico.com/ficheros/articulos/37786480826040539.pdf>
- Escobar, D., Ossa, C. y Quintana, M. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina de caparazones de crustaceos. *Scientia et Technica*, 18(1), 260-266. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84927487038>
- Garcia, J. (2008). *Maridaje, enología y cata de vinos*. IC Editorial.

- Gerente, C. y Lee, V. (2017). Application of Chitosan for the Removal of Metals. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 41-127. <https://doi.org/10.1080/10643380600729089>
- Hernandez, C., Almanza, A. y Florez, A. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-352120-09000300012&lng=es&tlng=es.
- Khanafari, A. y Marandi, R. (2013). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. 19-24.
- Khanafari, A., Marandi, R. y Sanatei, Sh. (2008). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 5(1). https://www.researchgate.net/publication/26507624_Recovery_of_chitin_and_chitosan_from_shrimp_waste_by_chemical_and_microbial_methods
- Liu, L., Yepeing, L. y Yue E, F. (2004). Rapid N-phthaloylation of chitosan by microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 97-100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.009>
- López, E. (2010). Brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodegas. ACE: Revista de enología, (78). https://www.acenologia.com/ciencia78_2.htm
- Lorentzen, E. (1996). Comparison of microwave and convencional leaching. *Analytical Chemistry*, 68(24), 4316-4320. <https://datapdf.com/comparison-of-microwave-assisted-and-conventional-leaching-u.html>
- Maldonado, E. L. (2018). Obtenido de CIDETEQ: <http://www.cideteq.mx/sabias-que-los-residuos-de-las-cascaras-de-camaron-se-pueden-utilizar-para-la-descontaminacion-de-agua/>
- Marcia, E., Malespín, J., Sánchez, M. y Benavente, M. (2011). Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Revista Científica*, 24(1), 33-42. <https://doi.org/10.5377/nexo.v24i1.592>
- Pacheco, N. (2005). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosano [Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://theses.hal.science/tel-00807945>

- Parés I Farrás, R. (1995). *Bioquímica de los microorganismos*. Edit. Reverté. España
- Ramirez, A., Benitez, J., Rojas, L., & Blanca, R. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*.
- Ramirez, Arnaldo, Benítez, José Luis, Rojas de Astudillo, Luisa y Rojas de Gáscue, Blanca. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108-130. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002&lng=es&tlng=es.
- Ramirez, J., Rosas, P., Velásquez, M., Ulloa, J. y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2(7), 2-16. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Seijas, V. (1992). Determinacion de selenio en suero por espectrofotometría de absorción atómica. [Tesis, Universidad Complutense de Madrid]. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/63582>
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G. y Castillo, A. (2000). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4-5), 446-452. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00338-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00338-0)
- Xu, Y., Gallert, C. y Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Environmental Biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology; Heidelberg*, 79(4), 687-97. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1471-9>
- Zubiria, J. y Jimenez, A. (2014). Análisis de los métodos de extracción de quitina de los residuos de camarón según parámetros económicos y ambientales. *Ciencia E Ingeniería*, 1(2), e010. <https://revistas.uniguajira.edu.co/rev/index.php/cei/article/view/e010>