

APORTES AL CONOCIMIENTO EN LA OBTENCIÓN DE QUITINA, CON DIÓXIDO DE CARBONO Y UNA CATIONITA, A PARTIR DE EXOESQUELETO DE LANGOSTA (*PANULIRUS ARGUS*)

AUTORES PRINCIPALES: Dr.C. Miguel Ángel Ramírez Arrebató¹; Dr.Cs. Carlos Andrés Peniche Covas²; Dr.C. Patricia González Hernández²; MSc. Margaret Suarez Muñoz³ Dr.C Luis Máximo Alfonso Hernández[†]; Dr.Cs. Juan Reinerio Fagundo Castillo²; MSc. Clara Melián Rodríguez³; MSc. Aida Tania Rodríguez Pedroso¹

UNIDADES EJECUTORAS PRINCIPALES: ¹Unidad Científico Tecnológica de Base “Los Palacios”, (UCTB Los Palacios), perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba; ²Facultad de Química de la Universidad de La Habana, Cuba; ³Facultad de Ciencias y Tecnologías Nucleares, INSTEC, Cuba
[†]Jubilado del MES, fallecido en 2012

OTROS AUTORES: Irminia del Jesús Herrera Martínez

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES: Laboratorio Central de Criminalística

COLABORADORES:

Dra. C. Liliam Becheram Maron (IMRE, Universidad de La Habana, Cuba)
Dra. C. Patricia Bernabé Galloway (IMRE, Universidad de La Habana, Cuba)
Dra.C. Nuiris Acosta (Universidad Complutense de Madrid, España)
Dra.C. Anayanci Osorio (Universidad de Friburg, Alemania)
Ing. Gabriel Palacios (Combinado Pesquero La Coloma)
Ing. Maypú Suárez (Combinado Pesquero La Coloma)
Ing. Midalis Rodríguez (Combinado Pesquero La Coloma)
Dr.C. Juan Andrés Alfonso Sosa (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas)
Dra.C. Yaneth Vázquez (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas)
Dr.C. José Azócar (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas)
Dra.C. Hazel Peniche Agüero (Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana)
Dra.C. Silvia Bautista Baños (Centro de Producto Bióticos, México)
Dra.C. Maribel Plasencia Jatomea (Universidad de Sonora, México)
Dra.C. Inés María Reynaldo Escobar (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba)
Dra.C. Miriam de la Caridad Núñez Vázquez (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)
Dr.C. Pedro Hernández (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)
Dr.C. Alexander Miranda Caballero (UCTB, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)
Dra.C. Alejandro Falcón Rodríguez (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)
Dra.C. María Caridad Nápoles (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)
Dr.C. Walfredo Torres de la Noval (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)
Dr. C Juan José Reyes Pérez (Universidad de Cotopaxi, Ecuador)
MSc. Rogelio Morejón Rivera (UCTB Los palacios)

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Dr.C. Miguel Ángel Ramírez Arrebato

Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios". Km 1 ½ Carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, CP. 22 900. Teléf. (53) 48 54 7120.

e-mail: miguelar@inca.edu.cu

RESUMEN

En el mundo y en Cuba se ha trabajado extensamente en la obtención y caracterización de quitina a partir de subproductos pesqueros (Brine y Austin, 1981; Henríquez y Nieto, 1980; Peniche, 2006), con resultados incluso que ha sido premiado por la Academia de Ciencias (Peniche, 2006). Sin embargo, las numerosas, novedosas y cada vez más crecientes aplicaciones que se han desarrollado y se desarrollan para este polímero y sus derivados en la actualidad, en campos como la nanotecnología, ciencia de los materiales, biotecnología, alimentos o la salud, entre otros obligan a la búsqueda y validación de nuevos métodos de obtención, con similar eficiencia a los métodos convencionales, pero en condiciones suaves de reacción que permiten preservar en la quitina y sus derivados propiedades útiles para sus nuevas aplicaciones. En el presente trabajo se realizó la caracterización del exoesqueleto de langosta espinosa (*Panulirus argus*) en términos de su composición química, con la novedad de una determinación por fluorescencia de rayos X de 16 elementos presentes en este material y el informe de la presencia de elementos trazas, no reportados anteriormente para estos materiales.

Posteriormente se desarrolló un proceso de desmineralización del exoesqueleto desproteínizado, con el empleo de dióxido de carbono (CO₂) para la obtención de quitina. Mediante un diseño experimental se determinó la influencia de los principales factores en la disminución de los contenidos de cenizas y las mejores condiciones de reacción para obtener quitina por este método. Se realizó un estudio de la cinética del proceso de desmineralización y se demostró la necesidad del empleo de una resina intercambiadora de cationes para incrementar la eficiencia del proceso. Se obtuvieron las ecuaciones de velocidad de los procesos de desmineralización del exoesqueleto desproteínizado con CO₂, en ausencia y presencia de intercambiador catiónico y se determinaron las variables cinéticas. Se obtuvieron las quitinas por tratamientos con HCl y EDTA y se realizó un estudio comparativo de los materiales obtenidos por las tres vías mediante técnicas de difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja y análisis térmico.

La desmineralización con CO₂ con la presencia de cationita permitió el desarrollo de un nuevo procedimiento de obtención de quitina con un contenido de cenizas similar a los métodos industriales, pero en condiciones más suaves de reacción, produciendo menos modificaciones a la quitina nativa, reflejado en el mayor grado de acetilación de la quitina obtenida con CO₂, mayor estabilidad térmica y cristalinidad. Por este resultado fue concedida una patente de invención.

El procedimiento propuesto convierte al exoesqueleto de langosta, un abundante producto de desecho de la industria pesquera, altamente contaminante del medio ambiente, en un material útil como la quitina, con características fisicoquímicas más deseables y muchas aplicaciones en distintas ramas de la actividad humana, además que puede ser un rubro de exportación. Sin embargo, a diferencia de los métodos actualmente establecidos, en el propuesto en este trabajo se obtiene bicarbonato de

sodio en el proceso, mucho más amigable para el tratamiento de residuales, que además es un producto que Cuba **importa** y es la fuente de carbono fundamental para la obtención de macroalgas como las *Spirulinas* que tienen un alto valor agregado. Al utilizar dióxido de carbono como reaccionante se puede conectar a procesos altamente emisores de este gas de efecto invernadero, con la posible contribución a la reducción del cambio climático. También se obtiene una apreciable cantidad de proteínas de buena calidad que puede ser utilizada en la alimentación humana o animal.

El procedimiento además pudiera adaptarse al tratamiento de otros desechos de invertebrados como ostiones, cangrejos o jaibas, entre otros, cuya acumulación constituyen un problema ambiental en varias regiones del país.

Estos resultados constituyen **APORTES CIENTÍFICOS** al conocimiento, además de que son **NOVEDOSOS**. Ellos están **ACREDITADOS** en la concesión de una patente de obtención por la OCPI en 2014, dos artículos publicados en una revista especializada internacional de impacto (*Journal of Renewable Materials*, 2015 y 2017), uno en la revista CENIC de Ciencias Químicas en 2010, uno en el Boletín de Ciencias del MES. Los resultados se presentaron en 10 eventos nacionales e internacionales. Adicionalmente merecieron varios premios dentro de ellos dos Premio CITMA provincial 2008 y 2010, Primer lugar Ponencia Oral Profesional en el Congreso de Ciencias Alimentarias CICAB`2016 en México, premio Destacado en el FÓRUM Municipal 2012. El **APORTE SOCIAL** se evidencia en la formación de profesionales, se defendió una Tesis de Doctorado en Ciencias Química que fue propuesta a ser presentada como Premio Academia de Ciencias y mejor tesis defendida en el año 2016 en el Tribunal de Ciencias Químicas. Se anexan avales de especialistas extranjeros de la Universidad de Sonora de México, así como del combinado pesquero La Coloma y directivos del Ministerio de la Industria Alimentaria.

COMUNICACIÓN CORTA

INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, solo superada por la celulosa. Se le encuentra formando parte de distintas estructuras en organismos invertebrados tales como: crustáceos, insectos, arácnidos, moluscos hongos entre otros¹.

Este polímero está compuesto por aminoazúcares unidos entre sí, por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ formando una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, algunas de las cuales se encuentran desacetiladas. La quitina presenta numerosas aplicaciones en disímiles ramas, tales como la medicina, agricultura y la industria².

Comercialmente la quitina se obtiene principalmente de subproductos pesqueros, en especial del exoesqueleto de cangrejo camarón y langosta. La industria pesquera cubana, sólo de langosta captura al año alrededor de 6500 t, lo cual genera grandes cantidades de desechos altamente contaminantes en sus plantas procesadoras, que sin embargo, constituyen un subproducto rico en proteína, quitina y CaCO_3 que puede ser valorizado si se aplica un método adecuado de extracción de estos componentes³. La mayoría de los métodos de obtención convencionales generalmente involucran tratamientos químicos drásticos con el propósito de aislar la quitina: básicos para separar la proteína y ácidos para separar los minerales que pueden afectar su estructura y adicionalmente generan desechos corrosivos difíciles de manipular.⁴

Varios métodos alternativos se han propuesto para evitar la degradación de la quitina, donde

se incluye el tratamiento con ácidos orgánicos, el método complejométrico (tratamiento con EDTA,), el tratamiento con enzimas o con líquidos iónicos, entre otros, pero hasta ahora con menor eficiencia que el tratamiento con HCl.⁵

Algunos autores⁶ han propuesto, la utilización del CO₂ para la obtención de disoluciones concentradas de bicarbonato de sodio a partir de roca caliza. Este proceso pudiera aplicarse con éxito en la obtención de quitina a partir de exoesqueleto de crustáceos.

Teniendo en cuenta lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron hacer una caracterización más exhaustiva de la composición elemental del exoesqueleto de langosta espinosa, evaluar el método de obtención de quitina con CO₂ en ausencia y presencia de cationita, además de comparar la quitina obtenida con las preparadas por el método complejométrico y con HCl.

MATERIALES Y MÉTODOS

La reacción de desmineralización se efectuó en un reactor de teflón de 3½ L. Los exosqueletos desproteinizados reaccionaron hasta 3 horas con la disolución acuosa saturada en CO₂ en ausencia o en presencia de la cationita Dowex 50X8 Na⁺. La quitina resultante se identificó como Q-CO₂. Durante toda la reacción se evaluó la concentración en disolución de los iones Ca²⁺, Mg²⁺, HCO₃⁻ y Na⁺.

La cinética de la reacción se estudió según metodología una previamente establecida⁷. Se obtuvieron las ecuaciones de velocidad, el orden de reacción y la constante de velocidad para las reacciones de desmineralización con CO₂ del exoesqueleto desproteinizado, en ausencia y en presencia de la cationita.

Se obtuvieron también muestras de quitina extraídas con EDTA y HCl y se caracterizaron junto con la Q-CO₂ por distintas técnicas de análisis.

RESULTADOS

Análisis elemental del exoesqueleto de langosta

Los análisis realizados constituyen el primer reporte que se conozca en la literatura científica de una determinación elemental exhaustiva del exoesqueleto de langosta espinosa, con más de 16 elementos. Los iones metálicos se encontraron a muy baja concentración en este biomaterial, por debajo de 0,020%. Adicionalmente, no fueron detectados los elementos tóxicos plomo (Pb), cadmio (Cd), arsénico (As) y mercurio (Hg) a pesar de la sensibilidad de la técnica empleada. Este resultado constituye un indicador de la baja contaminación del medio donde se desarrollan estos animales que se consideran organismo bioindicadores de la contaminación ambiental, y además demuestra analíticamente la ausencia de estos elementos tóxicos en las muestras colectadas. Sin embargo, por la alta sensibilidad de esta técnica se detectó la presencia de dos elementos Hf y Rh que anteriormente no había sido reportada para este material, resultado que fue publicado⁸.

Reacción de desmineralización de los exoesqueletos de langosta desproteinizados con disoluciones de CO₂.

Las disoluciones saturadas de dióxido de carbono en agua son ácidas, y llegan a alcanzar valores de pH de 4,5, condiciones de reacción mucho menos drásticas que en la descarbonatación con HCl, donde se alcanzan valores de pH ≤ 2, que propician modificaciones de la quitina. En estas condiciones se puede disolver el carbonato de calcio presente en los exoesqueletos. Esta disolución del carbonato de calcio provoca el incremento del pH y las concentraciones de iones Ca²⁺ y HCO₃⁻. La reacción transcurre muy rápidamente en los primeros minutos, con la caída brusca del contenido de cenizas en los exoesqueletos desproteinizados, lo que verifica el proceso de disolución de los minerales presentes. Sin embargo, la reacción, comienza a tornarse cada vez más lenta en el tiempo, hasta que alrededor de la hora se establece un equilibrio. El establecimiento de este

equilibrio impide una desmineralización cuantitativa del exoesqueleto para la obtención de quitina. De esta forma, si se usa solo CO_2 no se logra una eliminación cuantitativa del mineral presente en este material, resultado que fue publicado⁹.

Empleo de cationita en la reacción de desmineralización de exoesqueletos de langosta desproteinizados con disoluciones de CO_2

Para solventar la dificultad presentada por el establecimiento del equilibrio antes mencionado, se decidió introducir en el medio de reacción una resina catiónica, con el fin de intercambiar los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} de la disolución por iones Na^+ . De esta forma, se logra alcanzar un grado de completamiento superior de la reacción. Al emplear la cationita, luego de 2 horas de reacción el contenido de ceniza, se redujo a 1,3 %, lo cual se considera una desmineralización aceptable para la obtención de quitina.

Este proceso provoca la obtención de disoluciones concentradas de bicarbonato de sodio como subproducto principal, mucho más amigable para el tratamiento de residuales y fácil de manipular. Estos resultados fueron publicados⁹ y patentados recientemente¹⁰

Cinética de la reacción de desmineralización con CO_2 del exoesqueleto de langosta desproteinizado

En las condiciones empleadas en el presente trabajo la concentración de CO_2 se mantiene constante. Así, es de esperar que la reacción de disolución de los carbonatos del exoesqueleto siga una cinética de reacción heterogénea de primer orden, en la cual las concentraciones de los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y HCO_3^- , así como la conductividad eléctrica, por ser la resultante de la contribución de estos iones. Al aplicarse la metodología de Fagundo y cols (1995) como era de esperar, el aumento de la concentración de los iones Ca^{2+} , HCO_3^- y Mg^{2+} va aparejado a un incremento de la conductividad de la disolución. En el caso del ion Na^+ , los valores de concentración encontrados fueron muy pequeños y estuvieron dentro del error experimental de la determinación. Dada la bondad del ajuste, reflejada en los valores de R^2 cercanos a la unidad, se puede concluir que el sistema estudiado sigue un comportamiento cinético donde el orden de la reacción es $n = 1.14 \pm 0.02$ y la constante de velocidad de reacción es $k = (3,71 \pm 0.03) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1.14}$. Se debe destacar que el valor obtenido del coeficiente experimental n , no está entre 0 y 1 como encontraron⁷ para la disolución de roca caliza con CO_2 . En ese sentido, constituye un nuevo aporte de este trabajo la demostración que para la desmineralización del exoesqueleto de langosta con CO_2 el coeficiente experimental n toma valores mayores que 1. Estos resultados fueron publicados recientemente.¹¹

Efecto del empleo de la cationita sobre el comportamiento cinético de la reacción

Con la adición de un intercambiador catiónico, como la resina Dowex, 50X8 Na^+ para capturar los iones Ca^{2+} liberados a la disolución e intercambiarlos por iones Na^+ se consigue evitar el alcance del equilibrio y lograr así una mayor desmineralización del material quitinoso. En este caso son los iones HCO_3^- y Na^+ los responsables del aumento de la conductividad de la disolución, ya que la adición de la resina intercambiadora remueve los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} que se producen como resultado de la reacción con CO_2 . La curva del HCO_3^- y la conductividad eléctrica, aumentaron de forma exponencial hasta alcanzar el

equilibrio. El resultado final de este intercambio es que en la solución ahora se tendrá NaHCO_3 , en lugar de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ y como el primero presenta una constante de disolución (Kps) mucho menor que el segundo esto hace que la calcita continúe disolviéndose alcanzando niveles de desmineralización del exoesqueleto muy superiores a los obtenidos en ausencia de la cationita. Este hecho ha permitido proponer un método suave de obtención de quitina por desmineralización con CO_2 , que se le concedió patente de invención.¹⁰ El sistema estudiado en presencia de la resina intercambiadora sigue también un comportamiento cinético exponencial. El orden de la reacción es ahora $n = 1.24 \pm 0.02$ y la constante de velocidad es $k = (3,41 \pm 0.02) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.¹¹

Caracterización de quitinas obtenidas por diferentes métodos

La quitina Q- CO_2 , tuvo una composición química similar a las de las quitinas Q-HCl y Q-EDTA. Sin embargo, en el primer caso debe significarse el uso de ácido clorhídrico, el cual se ha señalado que puede afectar la estructura de la quitina para algunas aplicaciones, mientras que al emplear EDTA el tiempo de reacción necesario para lograr una desmineralización satisfactoria fue mucho mayor (12 horas) además se necesitó disminuir apreciablemente el tamaño de partícula y elevar el pH a 10.

Los espectros infrarrojos de las tres quitinas son muy parecidos, principalmente los de Q-HCl y Q- CO_2 . Sin embargo, en la relación de absorbancias se obtuvo que $A_{1320}/A_{1420} = 1,94$ para Q- CO_2 y 1,52 para Q-HCl. Esto indica que la muestra descarbonatada con CO_2 resultó menos desacetilada que la muestra descarbonatada con HCl.

Por su parte, de los difractogramas de rayos X se calcularon los índices de cristalinidad resultante de las quitinas y estos fueron 33% para Q-HCl, 49% Q-EDTA y 53% Q- CO_2 , lo cual demuestra que la quitina obtenida por este método resultó con mayor cristalinidad.

Adicionalmente, a partir de los resultados del análisis térmico se encontró las temperaturas de máxima velocidad de descomposición eran 364°C para Q-HCl y 390 °C para Q-EDTA y Q- CO_2 , lo que demuestra la mayor estabilidad térmica de éstas últimas respecto al tratamiento comercial con HCl. Este resultado fue publicado⁹ y constituyó parte de una Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas defendida exitosamente.¹²

En esencia, se informa por primera vez nuevos datos sobre la composición elemental del exoesqueleto de langosta que puede utilizarse en la práctica como un aval científico de la baja contaminación de la langosta de La Coloma. Se establece una metodología de obtención de quitina con similar contenido de cenizas que los métodos comerciales tradicionales y menores modificaciones con respecto a la quitina nativa, expresadas en mayor cristalinidad, mayor estabilidad térmica y menor desacetilación, lo cual se traduce en la posible obtención de derivados de quitina con características fisicoquímicas más deseables. Este método se recoge en una patente de invención.

CONCLUSIONES:

1. El análisis elemental del exoesqueleto de langosta no detectó metales tóxicos en su composición, es de interés científico que se encontraron trazas de hafnio y rodio que deben ser confirmada por otros análisis.
2. La cinética de desmineralización de los exoesqueletos desproteinizados con CO_2 obedece a un comportamiento de orden $n = 1,14 \pm 0,02$, con una constante de velocidad, $k = (3,71 \pm 0.03) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. En presencia de una resina intercambiadora catiónica estos fueron $n = 1,24 \pm 0,02$ y $k = (3,41 \pm 0.02) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectivamente.
3. La quitina obtenida mediante la desmineralización de exoesqueletos de langosta desproteinizados con CO_2 y una cationita presenta una composición semejante a las que se obtienen por los métodos tradicionales con EDTA y HCl, aunque con mayor grado de acetilación con respecto a la muestra obtenida por desmineralización con HCl.

REFERENCIAS

- ¹Cauchie M. *Hydrobiologia*. (2002) 470(1-3):63-95.
- ²Muzzarelli RAA y cols. (2012). *Carbohydrate Polymers*. 87(2):995-1012.
- ³Peniche C y Ramírez M. (2014). *Boletín Medio ambiente del MES*, noviembre 2014.
- ⁴H. K. No and P. Meyers (1997) In *Chitin Handbook*, ed. R. A. A. Muzarelli and M. G. Peter. European Chitin Society: Grottammare. p. 475-489.
- ⁵Pacheco N, y cols (2011) *Biomacromol*. 12(9):3285-90. DOI: 10.1021/bm200750
- ⁶Fagundo J y cols (2001) *Patente Cubana* No. 1098/2001.
- ⁷Fagundo JR, Valdés JJ, Rodríguez J. (1996). *Hidroquímica del Karst*. Granada: Ediciones Osuna, Universidad de Granada (España) p. 14-119
- ⁸Ramírez, M.y cols. (2010).*Revista CNIC de Ciencias Química*. 41(2): 94-99
- ⁹Ramírez-Arrebato M y cols. (2017) *J. Renew. Mater*. 5(1): 30-7.
- ¹⁰Ramírez-Arrebato y cols (2014). *Patente Cubana OCPI*. Certificado No. 24040, concedido por Resolución No. 1884/2014
- ¹¹Ramírez-Arrebato, M. y cols (2015). *Journal of Renew. Mater*, 3(1): 73-80
- ¹²Ramírez-Arrebato, M. (2016). *Tesis Doctoral*. DOI: 3968. Fondo bibliográfico Universidad de La Habana, La Habana, Cuba