

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

**EXTRACCIÓN DE QUITINA CALCÁREA EMPLEANDO AGUA  
BAJO CONDICIONES SUBCRÍTICAS A PARTIR DE  
CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

**I.B.I. Angélica Espíndola Cortés**

Directora

**Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto**

Asesores

**Dra. Rosario Moreno Tovar**

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología

**Dr. Miquel Gimeno Seco**

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

México, CDMX., Febrero 2017

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con el financiamiento de la Secretaría de Economía y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto FINNOVA/CONACYT (No. 224962).



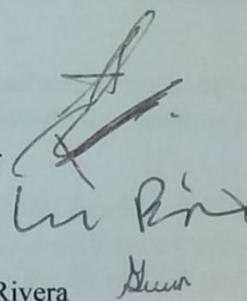
**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE Dr. Miquel Gimeno Seco

PRIMER VOCAL Dra. Rosario Moreno Tovar

SEGUNDO VOCAL Dr. Lauro Bucio Galindo

SECRETARIO M. en C. Raquel Gallardo Rivera



## AGRADECIMIENTOS

Dra. Keiko Shirai Matsumoto, Profesora-investigadora del Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos de la UAM-I, directora de tesis, por los conocimientos adquiridos durante la realización de la maestría y por aceptarme en su grupo de investigación.

Dr. Miquel Gimeno Seco, Profesor-investigador del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM, asesor de tesis, por el apoyo brindado en el uso del reactor de alta presión y las áreas del laboratorio L-314.

Dra. Rosario Moreno Tovar, asesora de tesis, por su apoyo en la propuesta de técnicas de caracterización estructural, los conocimientos brindados, sus acertados consejos y críticas orientadas hacia la mejora de este trabajo y de mi crecimiento profesional, y por su extraordinaria paciencia.

Dr. Lauro Bucio Galindo, Investigador del Laboratorio de Cristalofísica y Materiales Naturales del Instituto de Física de la UNAM por el apoyo brindado en el uso de software, cálculos, estándares y caracterización estructural por Difracción de Rayos X, por su buena disposición y los conocimientos brindados.

M. en C. Raquel Gallardo Rivera por formar parte del jurado, por el apoyo brindado en el uso del equipo IRTF-RTA y procesamiento de espectros.

Dr. José Luis Ruvalcaba Sil, Investigador del Instituto de Física de la UNAM por el apoyo brindado en el uso del sistema SANDRA (Sistema de Análisis No Destructivo por Rayos X), software, estándares y en la realización de cálculos de Fluorescencia de Rayos X.

Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa, Técnico Académico del Instituto de Física de la UNAM por el apoyo brindado en la obtención de las micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido en el Laboratorio Central de Microscopía.

Maestra en Física Mayra Dafne Manrique Ortega, estudiante de doctorado en el Instituto de Física de la UNAM por el apoyo brindado en el análisis de las muestras por Fluorescencia de Rayos X con el sistema SANDRA.

M. en C. Manuel Aguilar Franco, Técnico Académico del Instituto de Física de la UNAM por el apoyo brindado en el uso de software identificación de fases cristalinas y búsqueda de fichas cristalográficas en bases de datos especializadas por Difracción de Rayos X.

A los integrantes y exintegrantes del laboratorio S-157 y PP10: Ivana, Zaizy, Marco, Angie, Ana Belén, Alejandra, Rut, Iris, Carmen, Mariana, Jesús y Andrés.

A mis compañeros de maestría, estimados nómadas: Paulina, María Fernanda, Luisa, Kenia, Eduardo, Gerardo y Christian.

Por supuesto, a todos los ciudadanos mexicanos que con el pago de sus impuestos han invertido en mi educación.

## **DEDICATORIAS**

A ti mamá, Genoveva Cortés Hernández

A ti papá, Ángel Espíndola Carmona

A ustedes hermanas Mónica y Guadalupe

Que han sido, son y serán mi orgullo y fuente de admiración.

¡Muchas gracias por su apoyo incondicional, LOS AMO!

A ustedes amigos que han dejado huella en mi: Reyna, Anatolio, Nahúm, Abril, Marlen, Dulce, Belegui, Liliana, Tomás y Fernanda.

¡Gracias por los momentos inolvidables que hemos compartido!

A las personas que he tenido la fortuna de conocer en Zacatlán (de las manzanas), Puebla, mi “pueblo entre las nubes” y las personas que conocí en la CDMX.

## RESUMEN

Los tratamientos con agua bajo condiciones subcríticas permiten recuperar productos de valor agregado en tiempos cortos y menor impacto ambiental. En este trabajo se estudió la extracción de  $\alpha$ -quitina con agua bajo condiciones subcríticas a partir de cefalotórax de camarón. El método de Taguchi se empleó como diseño experimental para estudiar con un número reducido de experimentos los factores: relación muestra de cefalotórax/agua destilada (CW/ $d$ H<sub>2</sub>O), tiempo y temperatura del tratamiento, con una matriz ortogonal L<sub>9</sub> (3<sup>3</sup>). Las variables de respuesta consideradas fueron rendimiento de proteína soluble, determinación de pH y análisis elemental. El rendimiento de proteína soluble se cuantificó por el método de Lowry-Peterson. El análisis elemental se realizó por Fluorescencia de Rayos X (FRX). La caracterización estructural y morfología de las muestras se realizaron por Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA), Difracción de rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Barrido acoplada a un sistema de Microanálisis por Dispersión de Energía de Rayos X (SEM-EDS). El contenido de proteína residual en la fracción sólida se realizó por análisis químico proximal.

De acuerdo con el diseño experimental de Taguchi el mayor rendimiento de proteína soluble se obtuvo con la relación 0.09 CW/ $d$ H<sub>2</sub>O durante 5 min a 260 °C, que fue de 140.73 mg de proteína/g de CW. Los elementos identificados en todas las muestras fueron Ca, P, S, K, Cl y Al % g/kg como macroelementos y Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br y Sr  $\mu$ g/g, como microelementos. No se encontraron diferencias significativas en la composición elemental y valor de pH por la prueba de comparación de medias múltiples Tukey-Kramer.

Las fases cristalinas identificadas por DRX  $\alpha$ -quitina, calcita, hidroxiapatita y trazas de cuarzo. La presencia de estas fases se corroboró por IRTF-RTA, SEM-EDS. El mayor % wt (82.2) de  $\alpha$ -quitina se obtuvo con la relación 0.17 CW/ $d$ H<sub>2</sub>O durante 30 min de tratamiento a 260 °C. De acuerdo con los resultados obtenidos el tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas resultó efectivo para remover proteína, pero no se observaron cambios significativos en la remoción de minerales.

## ABSTRACT

Treatment with water under subcritical conditions allows the recovery of added-value products in short times and low environmental impact. At this work was studied the extraction of  $\alpha$ -chitin with water under subcritical conditions from shrimp cephalothorax. The taguchi method was used as an experimental design to study with a reduced number of experiments, the factors sample of cephalothorax/distilled water ratio (CW/ $d$ H<sub>2</sub>O), the time and the treatment temperature with an orthogonal matrix L<sub>9</sub> (3<sup>3</sup>). The response variables considered were soluble protein yield, pH determination and elemental analysis. The soluble protein yield was quantified through the method Lowry-Peterson. Elemental analysis was carried out with X-ray Fluorescence spectroscopy (XRF). The structural and morphology characterizations of the samples were made by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy absorption (ATR-FTIR), Powder X-ray Diffraction (PXRD) and Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy scattering X-ray system (SEM-EDS). Protein residual content in the solid fraction was determined by proximal chemical analysis.

According to the experimental design of Taguchi, the highest performance of soluble protein yield was found for the ratio 0.09 CW/ $d$ H<sub>2</sub>O, for 5 min of treatment at 260 °C, was of 140.73 mg of protein/g of CW. The elements identified in all samples were Ca, P, S, K, Cl and Al% g/kg as macromoelements and Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br and Sr  $\mu$ g/g as microelements. No significant differences were found in the elemental composition and pH value by the Tukey-Kramer multiple mean comparison test.

The crystalline phases identified by XRD were  $\alpha$ -chitin, calcite, hydroxyapatite and traces of quartz. The presence of these phases was corroborated by ATR-FTIR and SEM-EDS. The highest content of  $\alpha$ -chitin (82.2 wt%) was obtained for the ratio 0.17 CW/ $d$ H<sub>2</sub>O and 30 min of treatment at 260 °C. According to the results obtained the treatment with water under subcritical conditions proved effective to remove protein, but no significant changes were observed in the removal of minerals.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>TRABAJOS PRESENTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Propiedades estructurales de la quitina .....	15
2.2. Métodos de extracción de $\alpha$ -quitina .....	18
2.3. Agua bajo condiciones subcríticas .....	18
2.4. Método de Taguchi.....	20
JUSTIFICACIÓN .....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS .....	23
Objetivo general .....	23
Objetivos particulares.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1. Metodología experimental.....	24
3.1.1. Preparación de muestra .....	24
3.1.2. Reactor para tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas .....	24
3.1.3. Diseño experimental de Taguchi.....	25
3.1.4. Procedimiento experimental para los tratamientos.....	26
3.2. Análisis Diseño de Taguchi.....	27
3.2.1. Determinación de proteína soluble.....	27
3.2.2. Determinación de pH .....	28
3.2.3. Fluorescencia de Rayos X (FRX).....	28
3.3. Caracterización estructural de fracciones sólidas obtenidas .....	29
3.3.1. Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA).....	29
3.3.2. Difracción de Rayos X (DRX) .....	29
3.3.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) con Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) acoplada.....	31
3.4. Análisis químico proximal .....	31
4. RESULTADOS Y DICUSIÓN.....	32

4.2.	Análisis Diseño de Taguchi.....	32
4.2.1.	Determinación de proteína soluble.....	32
4.2.2.	Determinación de pH .....	35
4.2.3.	Análisis elemental por Fluorescencia de Rayos X (FRX).....	37
4.3.	Caracterización estructural de fracciones sólidas obtenidas .....	46
4.3.1.	Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA).....	46
4.3.2.	Difracción de Rayos X de polvos (DRX).....	48
4.3.3.	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) con Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X por de Energía (EDS) acoplada .....	55
4.4.	Análisis químico proximal .....	64
5.	CONCLUSIONES .....	65
6.	PERSPECTIVAS .....	66
7.	TRABAJOS PRESENTADOS .....	67
8.	REFERENCIAS .....	68
	ANEXO 1. FUNDAMENTOS TEORICOS DE TECNICAS EXPERIMENTALES .....	75
	A1.1. Determinación de Proteína soluble por el método de Lowry-Peterson .....	75
	A1.2. Cuantificación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl.....	76
	ANEXO 2. TECNICAS DE ANÁLISIS.....	78
	A2.1. Determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson (1977) .....	78
	A2.2. Análisis proximal .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Arreglo ortogonal $L_9 (3)^3$ del diseño de Taguchi con los factores y niveles empleados en la experimentación y la presión que registró cada experimento.....	26
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento de proteína soluble obtenido para cada tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Valores de $S/N$ por nivel de factor a calculados partir de $S/N$ .....	33
<b>Tabla 4.</b> Valor de $S/N$ .....	33
<b>Tabla 5.</b> pH obtenidos para cada tratamiento de CW en agua bajo condiciones subcríticas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer. ....	35
<b>Tabla 6.</b> Análisis elemental por Fluorescencia de Rayos X para las muestras CW y los tratamientos en Macromoelementos (% g/kg) y Microelementos ( $\mu\text{g/g}$ ), así como la relación Ca/P, $(\text{Ca/P})_{\text{prom}} = 2.84$ . ....	39
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de Ca presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de P presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer. ....	42
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de K presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer. ....	43
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de S presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer. ....	45
<b>Tabla 11.</b> Bandas características identificadas en los espectros de IR de las fracciones sólidas obtenidas con los tratamientos.....	48
<b>Tabla 12.</b> Datos cristalográficos y resultados de la cuantificación de las fases cristalinas identificadas. La relación Ca/P de la última columna, se determinó a partir de las proporciones en peso de calcita e hidroxapatita listadas en la tabla.....	51
<b>Tabla 13.</b> Composición elemental de la muestra C2 en diferentes zonas.....	57
<b>Tabla 14.</b> Composición elemental de las estructuras observadas en las micrografías de la muestra 6R2-t3-T1.....	62
<b>Tabla 15.</b> Composición elemental de las estructuras observadas en las micrografías de la muestra 4R2-t1-T2.....	63
<b>Tabla 16.</b> Reactivos necesarios en cada proceso para la determinación de proteína total por el método de Kjeldahl.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> a) Cadena de quitina y la dirección de crecimiento. b) Arreglo de las cadenas en los tres polimorfos (Roberts, 1992). .....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema de la estructura jerárquica del exoesqueleto de crustáceos marinos. (Qu, Verma, Alucozai, & Tomar, 2015).....	17
<b>Figura 3.</b> Diagrama de fases del agua (Anónimo, 2012).....	19
<b>Figura 4.</b> Autoionización del agua.....	19
<b>Figura 5.</b> Componentes del reactor utilizado para la experimentación: a) reactor armado y sus partes; b) sistema de control; c) celda de reacción; d) chaqueta de cerámica. ....	25
<b>Figura 6.</b> Gráficas de S/N para los factores considerando el rendimiento de proteína soluble.....	34
<b>Figura 7.</b> Hidrólisis del enlace peptídico. ....	35
<b>Figura 8.</b> Gráficas de S/N para los factores considerando la variable pH. ....	36
<b>Figura 9.</b> Espectro de Fluorescencia de Rayos X característico que presentaron todas las muestras. ....	37
<b>Figura 10.</b> Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de Ca en los tratamientos .....	41
<b>Figura 11.</b> Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de P en los tratamientos .....	42
<b>Figura 12.</b> Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de K en los tratamientos. ....	44
<b>Figura 13.</b> Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de S en los tratamientos. ....	45
<b>Figura 14.</b> Espectros de IR obtenidos del testigo C2 y de las muestras tratadas, de CaCO <sub>3</sub> puro, hidroxiapatita y $\alpha$ -quitina obtenida por el método biológico (Cira et al., 2002).....	47
<b>Figura 15.</b> Patrones de difracción de rayos X ajustados por el método Rietveld. Los patrones de difracción C1, C2 y C3 corresponden a las muestras control y el panel de nueve a los tratamientos. La línea continua en negro corresponde al difractograma obtenido y la línea verde que la traslapa corresponde al ajuste calculado a partir de las fases identificadas. La línea en gris de la parte inferior indica qué tan bueno fue el ajuste. En rojo se observa el fondo o línea base que se ajustó. A continuación de esta última, las barras de color indican las reflexiones correspondientes a cada fase cristalina, en orden descendente: azul para $\alpha$ -quitina, naranja para calcita, negro para hidroxiapatita y rojo para cuarzo. ....	50
<b>Figura 16.</b> Esquema del arreglo de las cadenas de $\alpha$ -quitina y el diámetro (D) de nanofibrilla que producen (izquierda). Esquema de cadenas de $\alpha$ -quitina desordenadas (derecha). ....	54
<b>Figura 17.</b> Micrografía de una colonia de bacterias a 3,500X (izquierda) y 10,000X (derecha) aumentos sobre la superficie del testigo C2. ....	55
<b>Figura 18.</b> Microanálisis por EDS del testigo C2 (izquierda) y micrografía a 9,000X aumentos de un aglomerado de minerales (derecha). ....	56

<b>Figura 19.</b> Microanálisis por EDS del testigo C2 (izquierda) y micrografía a 7,500X aumentos de estructuras con morfología de agujas (derecha). .....	56
<b>Figura 20.</b> Microanálisis por EDS del testigo C2 (izquierda) y micrografías a 1,700X aumentos y 10,000X aumentos de morfologías tipo esferulita (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco.....	57
<b>Figura 21.</b> Micrografías de la muestra 4R2-t1-T2: las nanofibrillas de $\alpha$ -quitina y los minerales en estado amorfo se indican con flechas hacia arriba y hacia abajo respectivamente. a) Predominan las nanofibrillas de $\alpha$ -quitina sobre la superficie. b) Se observan minerales con morfología semicristalina del orden de $\mu\text{m}$ . .....	58
<b>Figura 22.</b> Estructura jerárquica del exoesqueleto de langosta <i>Homarus americanus</i> (Raabe et al., 2007). .....	59
<b>Figura 23.</b> Micrografías del tratamiento 9R2-t3-T2. a) Estructuras tipo poro sobre la superficie a 14,000X aumentos. b) Estructura observada a 55,000X aumentos. ....	59
<b>Figura 24.</b> Micrografías del tratamiento 6R2-t3-T1 donde se observan montículos de mineral a diferentes aumentos: a) 180X, b) 1,200X, c) 7,500X y d) 8,500X. Las nanofibrillas de $\alpha$ -quitina y los minerales en estado amorfo se indican con flechas hacia arriba y hacia abajo respectivamente.....	60
<b>Figura 25.</b> Microanálisis por EDS de la muestra 6R2-t3-T1 (izquierda) y micrografía 5,000X aumentos de un montículo de minerales cristalinos (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco. ....	61
<b>Figura 26.</b> Microanálisis por EDS de la muestra 6R2-t3-T1 (izquierda) y micrografía a 22,000X aumentos de un cristalito octaedral (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco. ....	61
<b>Figura 27.</b> Microanálisis por EDS de la muestra 4R2-t1-T2 (izquierda) y micrografía a 15,000X aumentos de un cristalito (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco.....	62
<b>Figura 28.</b> Microanálisis por EDS de la muestra 4R2-t1-T2 (izquierda) y micrografías a 15,000X y 85,000X aumentos de una estructura con morfología de hojuela. El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada con un punto blanco. ....	63
<b>Figura 29.</b> Micrografías de diferentes estructuras cristalinas sobre la superficie de las muestras. Tratamiento 6R2-t3-T1 a) y b) a 23,000X aumentos. Tratamiento 4R2-t1-T2 c) a 3,000X aumentos y d) a 14,000X aumentos.....	64
<b>Figura 30.</b> Etapas del desarrollo de color por el método de Lowry-Peterson. a) Reacción de la proteína con el $\text{Cu}^{2+}$ en medio alcalino. b) Reducción del reactivo fosfomolibdotúngstico con el complejo $\text{Cu}^{2+}$ - N (Anaya Leyva Y. I., Santana García G. L., Hinojosa García K., Sandoval Esquivel J. A., 2011).....	76
<b>Figura 31.</b> Curva estándar, ecuación de ajuste lineal y factor $r^2$ obtenidos para la determinación de proteína soluble por el método de Lowry-Perterson.....	79

## 1. INTRODUCCIÓN

La  $\alpha$ -quitina es un copolímero formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas por enlace  $\beta$ -(1-4) (Kurita, 2006). Debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas; que es biocompatible, biodegradable, biosorbente, se ha estudiado en tratamiento de aguas residuales, industria papelera, en sistemas de suministro de fármacos, ingeniería textil, biotecnología, agricultura, entre otras (Gortari & Hours, 2013; Gyung-Hyun, Ro-Dong, & Woo-Jin, 2010; Kurita, 2006).

En este trabajo se estudio la extracción de  $\alpha$ -quitina apartir de cefalotórax de camarón por un método fisicoquímico. El método consiste en emplear agua bajo condiciones subcríticas, temperatura entre 230 y 280 °C, y una presión entre 2.7 y 20 MPa (Garrote, Domínguez, & Parajó, 1999). La ventaja de este método es que solo se usa agua destilada y energía para elevar la temperatura, no se generan residuos de ácido y bases fuertes como en el método químico y los tiempos del tratamiento no son largos como en el método biológico. Para optimizar el número de experimentos se empleó el método de Taguchi con una matriz ortogonal  $L_9$  ( $3^3$ ) para estudiar los factores: relación muestra de cefalotórax/agua destilada (CW/ $dH_2O$ ), tiempo y temperatura del tratamiento. Las variables de respuesta consideradas fueron rendimiento de proteína soluble, determinación de pH y análisis elemental. De acuerdo con el diseño experimental de Taguchi el mayor rendimiento de proteína soluble se obtuvo con la relación 0.09 CW/ $dH_2O$  durante 5 min a 260 °C, que fue de 140.73 mg de proteína/g de CW. La desproteinización de los desechos de crustáceos es un tema importante en la extracción de  $\alpha$ -quitina, debido a sus aplicaciones biomédicas y en alimentos.

Para determinar la composición elemental de las muestras y sus tratamiento se empleó la técnica de Fluorescencia de Rayos X (FRX), con esta técnica se identificaron y cuantificaron los elementos como Ca, P, S, K, Cl y Al % (g/kg) como macromoelementos y Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br y Sr  $\mu$ g/g, como microelementos o elementos trazas, su presencia se atribuye a las funciones elementales de los crustáceos, a los alimentos ingeridos y a la capacidad que tienen para absorber minerales del agua circundante (Tacon, 1989). Las fases cristalinas identificadas por Difracción de Rayos X (DRX):  $\alpha$ -quitina, calcita, hidroxiapatita y trazas de cuarzo. La identificación de calcita e hidroxiapatita en este trabajo es de gran importancia, debido a sus aplicaciones, biomédicas y en alimentos. El mayor % wt de  $\alpha$ -quitina (82.2) se

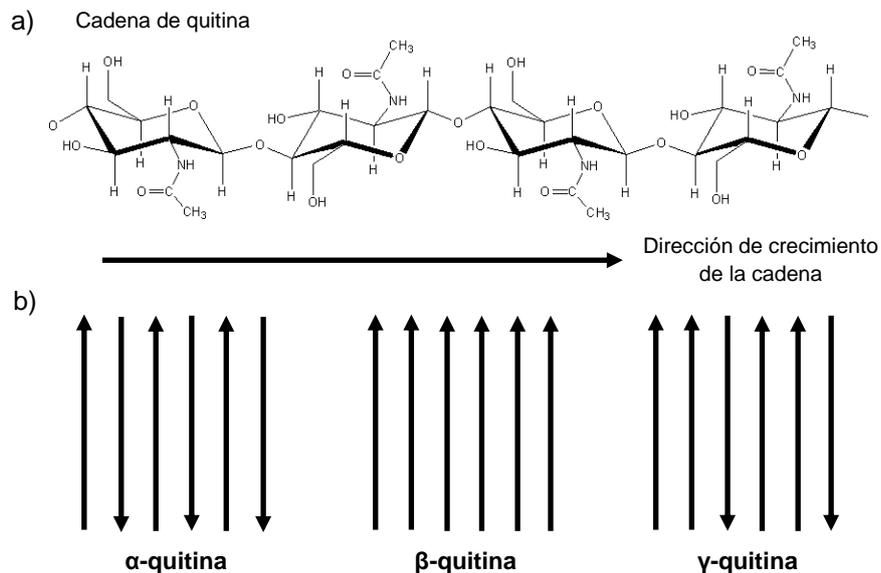
obtuvo con la relación 0.17 CW/dH<sub>2</sub>O durante 30 min de tratamiento a 260 °C. De acuerdo con los resultados obtenidos el tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas resultó efectivo para remover proteína, pero no se observaron cambios significativos en la remoción de minerales.

En el capítulo 2 se describen los fundamentos teóricos del presente trabajo. En capítulo 3 se describe la metodología experimental empleada en los tratamientos, el modelo del diseño experimental de Taguchi y las técnicas de caracterización. En el capítulo 4 se presentan los resultados del método del Taguchi para los variables rendimiento de proteína, pH y análisis elemental. Los resultados de la caracterización estructural y morfología de las muestras por Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA), Difracción de Rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Barrido acoplada a un sistema de Microanálisis por Dispersión de Energía de Rayos X (SEM-EDS). Finalmente, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Propiedades estructurales de la quitina

La quitina es un biopolímero formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlace  $\beta$ -(1,4), mismo que dicta la dirección en la que se agregan más unidades (crecimiento de la cadena) (**Figura 1a**). Las cadenas de este biopolímero se arreglan en un espacio tridimensional a largo alcance, es decir, presenta semi-cristalinidad (Bässler, 1984); que puede adoptar diferentes formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -quitina. (Rudall, 1963). La  $\alpha$ -quitina es el polimorfo más abundante en crustáceos, las cadenas se arreglan antiparalelamente, a la dirección de crecimiento (se alterna entre una y otra, **Figura 1b**) (Raabe et al., 2006). La  $\alpha$ -quitina se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos (cangrejos, camarones, gambas, krill y langostas) (Roberts, 1992) y se encuentra unida a proteínas y minerales (Gortari & Hours, 2013; Hou et al., 2016; Kurita, 2006) para brindar soporte y resistencia al caparazón. La  $\beta$ -quitina y  $\gamma$ -quitina se encuentran en menor proporción, en el primer caso las cadenas se arreglan de forma paralela y en el segundo caso se alternan dos cadenas en una dirección con otra en dirección contraria (**Figura 1b**), ambos polimorfos se encuentran en estructuras que requieren flexibilidad y tenacidad (Roberts, 1992).

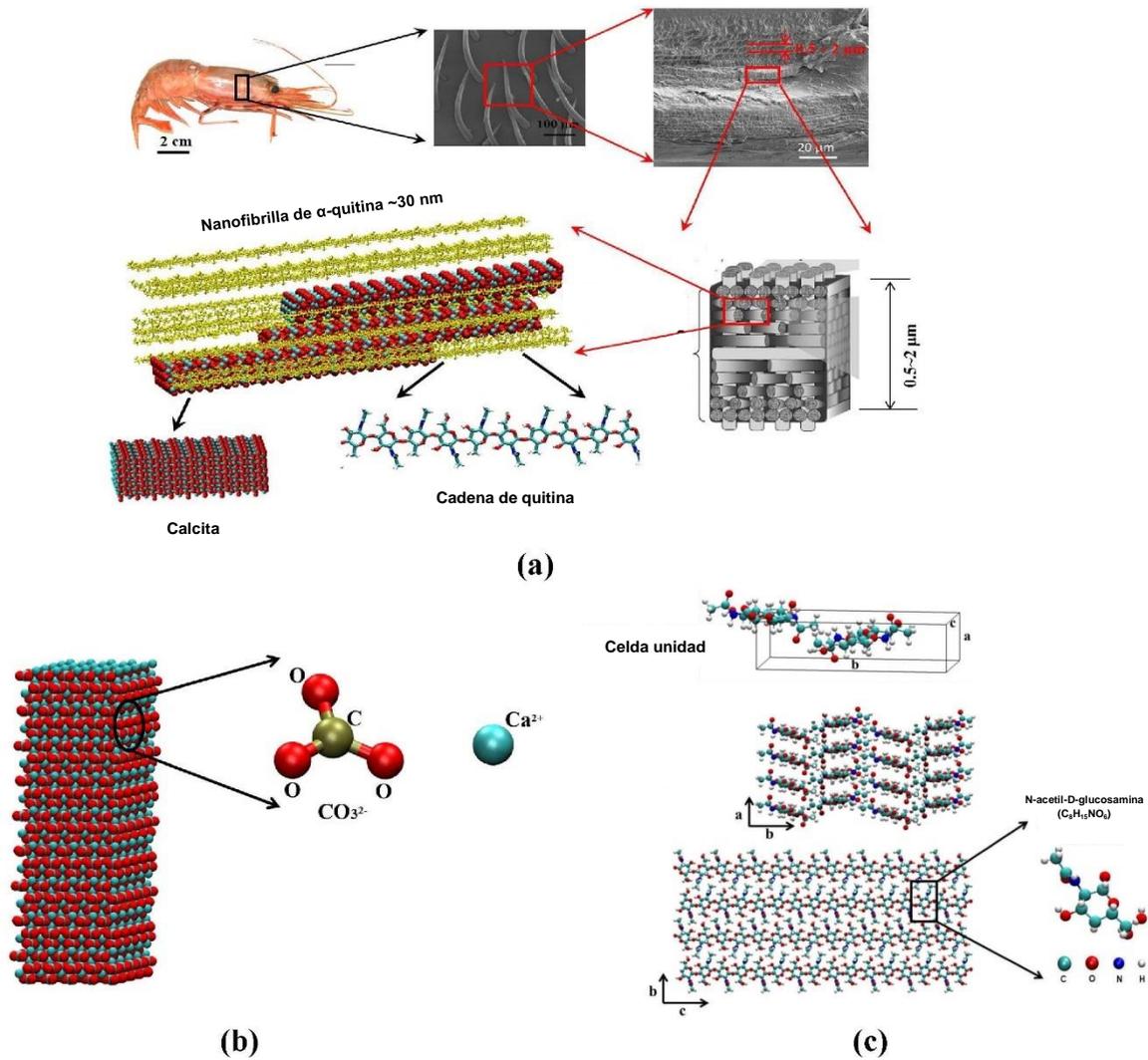


**Figura 1.** a) Cadena de quitina y la dirección de crecimiento. b) Arreglo de las cadenas en los tres polimorfos (Roberts, 1992).

La parte mineral de los exoesqueletos, está constituida principalmente por carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) amorfo y cristalino (Kurita, 2006; Mikkelsen, Engelsen, Hansen, Larsen, & Skibsted, 1997; Roberts, 1992). El  $\text{CaCO}_3$  presenta tres polimorfos: aragonita, vaterita y calcita (Zhang, Xie, Xu, Pan, & Tang, 2012). Los dos primeros polimorfos y el  $\text{CaCO}_3$  en estado amorfo son formas inestables, reaccionan fácilmente en medio acuoso para convertirse en calcita, el polimorfo más estable (Zhang et al., 2012). El  $\text{CaCO}_3$  se almacena en los crustáceos en estado amorfo (Zhang et al., 2012), en especial durante el proceso de muda cuando se necesita endurecer el exoesqueleto (Luquet & Marin, 2004). La presencia de Mg ayuda a estabilizar el  $\text{CaCO}_3$  en estado amorfo y evita que se transforme en calcita cuando no es necesario (Zhang et al., 2012). Se ha descrito la presencia de fosfato de calcio amorfo ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y calcita con Mg que sustituye al átomo de Ca (Boßelmann, Romano, Fabritius, Raabe, & Epple, 2007; Raabe et al., 2006).

La  $\alpha$ -quitina y la calcita forman estructuras tridimensionales altamente organizadas en el exoesqueleto de crustáceos marinos como se muestra en la **Figura 2a**. Las cadenas de  $\alpha$ -quitina se arreglan en un espacio tridimensional, eje *a*, *b* y *c*: las cadenas crecen a lo largo del eje *c* antiparalelamente (**Figura 2c**); una cadena está junto a otra a lo largo del eje *b* (**Figura 2c**); y una cadena se encuentra atrás de otra a lo largo del eje *a* (**Figura 2c**). Las cadenas se mantienen unidas por fuertes puentes de hidrógeno. El arreglo tridimensional de la estructura de la  $\alpha$ -quitina un paralelepípedo llamada celda unidad que cristaliza en un sistema ortorrómbico, grupo espacial  $P2_12_12_1$  (Minke & Blackwell, 1978; Raabe et al., 2006) (**Figura 2c**). Los parámetros red de la celda  $a = 4.74 \text{ \AA}$ ,  $b = 18.86 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.32 \text{ \AA}$ , y los ángulos formados  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  (Minke & Blackwell, 1978; Raabe et al., 2006),

Por otro parte, la calcita presente en los crustáceos, cristaliza en el sistema trigonal, grupo espacial  $R3c$ , los parámetros de red de la celda unidad son  $a = b = 4.989 \text{ \AA}$ ,  $c = 17.062 \text{ \AA}$  y los ángulos  $\alpha = \beta = 90^\circ$  y  $\gamma = 120^\circ$ .



**Figura 2.** Esquema de la estructura jerárquica del exoesqueleto de crustáceos marinos. (Qu, Verma, Alucozai, & Tomar, 2015).

La  $\alpha$ -quitina forma nanofibrillas de aproximadamente 3 nm de diámetro y 300 nm de largo que se integran por 18-25 cadenas de quitina (Atkins, 1985; Raabe et al., 2006) (**Figura 2a**). Las proteínas y el CaCO<sub>3</sub> se unen a las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina para formar fibras de quitina-proteína-mineral con diámetros de 50 a 300 nm (Romano, Fabritius, & Raabe, 2007). En el esquema de la **Figura 2a** solo se representa el arreglo estructural de la  $\alpha$ -quitina y la calcita debido a que el arreglo con las proteínas es complejo. Las fibras se apilan formando planos que rotan 180° como se muestra en la **Figura 2a** (Raabe et al., 2006; Raabe, Al-Sawalmih, Yi, & Fabritius, 2007; Romano et al., 2007).

## 2.2. Métodos de extracción de $\alpha$ -quitina

Para extraer la  $\alpha$ -quitina es necesario remover proteínas y minerales, los métodos que se han descrito en la literatura; el químico, biológico, combinaciones de ambos y enzimático. En el método biológico se emplea la fermentación con microorganismos del género *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Serratia*, entre otros (Hou et al., 2016). En el método químico se utilizan soluciones concentradas de álcali y ácido (principalmente NaOH y HCl a 1 M y 0.2-2 M respectivamente) que a menudo requieren calentamiento (desde temperatura ambiente a 100 °C) (Percot, Viton, & Domard, 2003; Roberts, 1992) para desproteínizar y desmineralizar. La desventaja de este método es que el uso de ácidos y bases fuertes daña la estructura de la  $\alpha$ -quitina y se modifican las propiedades fisicoquímicas de la  $\alpha$ -quitina (peso molecular, viscosidad y grado de acetilación) y las aguas residuales generadas pueden ocasionar problemas ambientales (Mahmoud et al., 2007; Percot et al., 2003). El método biológico, se considera amable con el medio ambiente, debido a que se puede recuperar proteínas, aminoácidos y pigmentos, además de  $\alpha$ -quitina (Gyung-Hyun et al., 2010), y no se generan aguas residuales ácidas o de álcali como el método químico. La desventaja de este método es el tiempo de fermentación de 3 a 5 días, lo que puede impedir la adaptación a escala industrial. El método enzimático requiere el uso de proteasas, purificadas o extractos crudos, como alcalasa, pepsina, papaína, pancreatina y tripsina. El empleo de proteasas purificadas elevaría el costo del tratamiento (Younes & Rinaudo, 2015). Además, se ha descrito que la remoción de proteína por este método es inferior en comparación con el químico, con el 5-10 % de proteína residual asociada a la quitina aislada (Younes & Rinaudo, 2015).

## 2.3. Agua bajo condiciones subcríticas

En el presente trabajo se empleó agua en condiciones subcríticas como tratamiento para la extracción de  $\alpha$ -quitina. El diagrama de fases del agua de la **Figura 2** permite entender el concepto de agua en condiciones subcríticas. El agua alcanza el punto crítico cuando se encuentra a 374 ° C y 22.1 MPa de presión, en este punto se puede diferenciar la región subcrítica y la región supercrítica, la primera ocurre cuando el agua se encuentra en condiciones cercanas a este pero inferiores, y la segunda cuando se encuentra en condiciones superiores al punto crítico (Brunner, 2009).

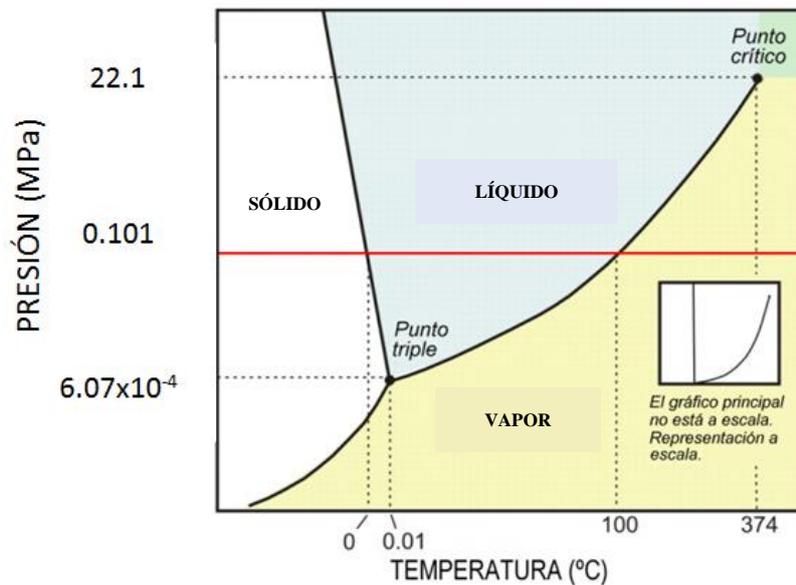


Figura 3. Diagrama de fases del agua (Anónimo, 2012).

Cuando el agua se encuentra en condiciones subcríticas se favorece la formación de iones hidronio ( $H_3O^+$ ) (Figura 4), esto se debe a que el producto ion del agua ( $K_w$ ) aumenta al incrementar la temperatura entre 150 y 250 °C (Ruiz, Rodríguez-Jasso, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2013). A temperatura ambiente el valor de  $K_w$  es  $1 \times 10^{-14}$  y alcanza su máximo valor a los 250 °C con  $1 \times 10^{-11}$  aproximadamente (Brunner, 2009). El agua en condiciones subcríticas se caracteriza por actuar como reactivo y medio de reacción, por lo que, permite la extracción de sustancias no polares (es capaz de disolverlas) (Brunner, 2009; Ruiz et al., 2013).

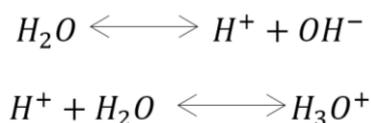


Figura 4. Autoionización del agua.

El tratamiento con agua en condiciones subcríticas requiere de reactores que soporten altas presiones y temperaturas. En los trabajos descritos en la literatura, los autores concuerdan en que la temperatura, el tiempo de tratamiento, tamaño de partícula, cantidad de agua y configuración de reactor, afectan, y puede causar reacciones de hidrólisis, despolimerización, deshidratación, descarboxilación, alteración o degradación de componentes y mayor disponibilidad de productos. (Brunner, 2009); (Iryani et al., 2014; Lavoie, Capek-Menard, Gauvin, & Chornet, 2010).

Este método se empezó a estudiar en los años setenta para eliminar residuos tóxicos, peligrosos o de difícil disposición. Posteriormente se enfocó para la extracción de compuestos de valor agregado a partir de biomasa vegetal, principalmente para recuperar azúcares, almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos como bagazo de caña, olotes y madera (Vallejos, Felissia, Kruyeniski, & Area, 2015; Yang, Yuan, Li, & Sun, 2015). En cuanto a biomasa animal hay reportes de tratamientos realizados en vísceras de pescado (Kang, Daimon, Noda, Hu, & Fujie, 2001; Yoshida, Terashima, & Takahashi, 1999) y exoesqueletos de camarón (Quitain, Sato, Daimon, & Fujie, 2001) de los que se ha recuperado proteínas principalmente, ácidos orgánicos y ácidos grasos, o bien como un pretratamiento de alteración morfológica para tratamientos posteriores con enzimas (Osada et al., 2012). Es común encontrar en la literatura al tratamiento con agua en condiciones subcríticas como proceso de autohidrólisis, agua caliente comprimida (HCW, por sus siglas en inglés), hidrotermólisis, agua caliente líquida (LHW, por sus siglas en inglés), procesamiento acuoso, presión de cocción en agua y tratamiento hidrotérmico. (Brunner, 2009; Ruiz et al., 2013).

#### **2.4. Método de Taguchi**

El método de Taguchi fue desarrollado por el Dr. Genichi Taguchi en 1940 con el objetivo de mejorar la calidad de productos manufacturados, posteriormente fue introducido en Estado Unidos en 1980. Desde entonces este método se ha aplicado en la industria para optimizar procesos y hacerlos robustos (insensibles ante variaciones de factores externos).

El empleo de este método como diseño experimental, además de la optimización, tiene la ventaja de estudiar dos o más factores con varios niveles mediante arreglos ortogonales (matriz), que reducen el número de experimentos a realizar respecto de otros diseños estadísticos. Los arreglos ortogonales tienen una nomenclatura como la siguiente:  $L_9(3^3)$ , inicia con la letra "L" (Latin squares), un subíndice que indica el número de experimentos a realizar (9 para este caso), y entre paréntesis se especifica el total de combinaciones posibles entre los niveles y factores de estudio, con el número de niveles como base (3 para este ejemplo) y el número de factores como exponente (3 para este ejemplo). Para comprender el ahorro en la cantidad de experimentos respecto de otros diseños, considérese el siguiente ejemplo: el estudio de tres factores con tres niveles se puede llevar a cabo con un diseño

factorial  $3^3$  o con el método de Taguchi mediante un arreglo  $L_9(3)^3$ . En el primer caso se tendrían que realizar 27 experimentos (sin considerar repeticiones), con el segundo se tendrían que realizar 9 experimentos. El número de experimentos a realizar es importante debido al tiempo, materiales y reactivos que deben invertirse. La desventaja principal del método de Taguchi es que solo considera los efectos principales de los factores, es decir, no permite estudiar las posibles interacciones entre estos, situación contraria en un diseño factorial donde además de los efectos principales, se pueden encontrar todas las posibles interacciones entre ellos. En el ámbito científico, el método de Taguchi ha sido aplicado en investigaciones con arreglos  $L_{18}(2^4)$ ,  $L_{18}(3^5)$ ,  $L_{18}(2^1 \times 3^7)$  y  $L_{18}(3^8)$  dependiendo de las necesidades de cada investigación (Rao, Kumar, Prakasham, & Hobbs, 2008).

La variable respuesta se interpreta con un indicador llamado S/N (en inglés Signal/Noise) que se calcula con la siguiente ecuación:

$$S/N = -10 \log(MSD) \quad (1)$$

La Distancia Estadística Multivariada (MSD) es una medida de la dispersión de los datos, para calcularla se debe definir cuál es el comportamiento óptimo de la variable respuesta, es decir, “qué es mejor”:

- Que la variable respuesta adopte el menor valor posible, diseño Tipo S:

$$MSD = \frac{Y_1^2 + Y_2^2 + \dots + Y_n^2}{n} \quad (2)$$

- Que la variable respuesta adopte el mayor valor posible, diseño Tipo B:

$$MSD = \frac{\frac{1}{Y_1^2} + \frac{1}{Y_2^2} + \dots + \frac{1}{Y_n^2}}{n} \quad (3)$$

- Que la variable respuesta se aproxime a un valor establecido (nominal), diseño Tipo N:

$$MSD = \frac{(Y_1 - Y_0)^2 + (Y_2 - Y_0)^2 + \dots + (Y_n - Y_0)^2}{n} \quad (4)$$

Con  $Y_n$  = Valor de la variable respuesta para la n-ésima repetición del experimento.

$Y_0$  = Valor que se desea aproximar

$n$  = Número de repeticiones de cada experimento

Los valores de S/N para cada experimento se agrupan y promedian para construir gráficas como se muestra en el apartado 4.2.1 determinación de proteína soluble.

## JUSTIFICACIÓN

Los desperdicios de camarón pueden ser aprovechados para la recuperación de productos de valor agregado ( $\alpha$ -quitina, pigmentos, proteínas y minerales), evitando así problemas ambientales debido a su rápida putrefacción (descomposición de materia orgánica). Cuando esta última ocurre en grandes volúmenes puede alterar los ecosistemas. En condiciones normales estos reciclan la materia orgánica, pero cuando la reciben en cantidades anormales (eutrofización), proliferan organismos descomponedores, saprofitos (hongos y bacterias) que aumentan el consumo de oxígeno; esto en sistemas lacustres, es particularmente grave, ya que no se oxigenan fácilmente. Los compuestos azufrados y  $\text{CO}_2$ , liberados por estos microorganismos cambian las condiciones fisicoquímicas del agua ocasionando mortandad en los ecosistemas. Por otro lado, la descomposición de materia orgánica sin presencia de oxígeno, produce metano ( $\text{CH}_4$ ), un gas de efecto invernadero que también contribuye al calentamiento global.

La  $\alpha$ -quitina es el producto de mayor valor, su extracción se ha descrito por métodos químicos, químicos/mecánicos, biológicos y químicos-biológicos. El principal inconveniente de estos métodos es la generación de efluentes con álcali y ácido, y/o con un alto contenido de materia orgánica, además de tiempos largos de reacción. El método fisicoquímico que se propone en este trabajo tiene como ventaja: tiempos cortos de tratamiento (5 a 30 min), emplea agua destilada como medio de reacción, y permite recuperar  $\alpha$ -quitina, proteína y minerales. Aunque se requiere de energía para alcanzar las temperaturas entre 230 y 280 °C.

Por otro lado, la recuperación de minerales como  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  es un tema importante debido a sus aplicaciones biomédicas y en alimentos. El fosfato de calcio cristalino, forma parte de las biocerámicas, un material biocompatible, que puede ser una alternativa de prótesis para diversas aplicaciones.

## **HIPÓTESIS**

Se obtendrá  $\alpha$ -quitina como resultado de someter cefalotórax de camarón a un tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas. La  $\alpha$ -quitina obtenida deberá contener una menor cantidad de proteínas y minerales.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Obtener  $\alpha$ -quitina con agua bajo condiciones subcríticas a partir de cefalotórax de camarón.

### **Objetivos particulares**

- Estudiar los factores: relación muestra de cefalotórax/agua destilada ( $CW/dH_2O$ ), tiempo y temperatura del tratamiento empleando el método de Taguchi y las variables de respuesta, rendimiento de proteína soluble, determinación de pH y análisis elemental.
- Determinar el valor de pH y cuantificar el rendimiento de proteína soluble por el método de Lowy-Peterson de la fracción líquida.
- Caracterizar la fracción sólida mediante las siguientes técnicas espectroscópicas:
  - Fluorescencia de Rayos X (FRX).
  - Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA).
  - Difracción de Rayos X (DRX).
  - Microscopia Electrónica de Barrido acoplada a un sistema de Microanálisis por Dispersión de Energía de Rayos X (MEB-EDS).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Metodología experimental

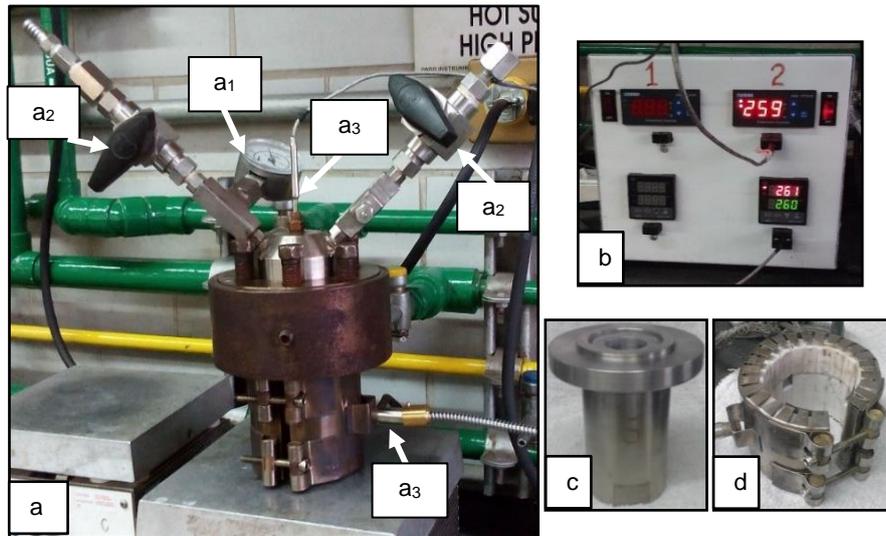
##### 3.1.1. Preparación de muestra

Se utilizó cefalotórax de camarón proveniente del mercado local “La Nueva Viga” como materia prima para realizar los tratamientos con agua bajo condiciones subcríticas. Este subproducto consistió en mezclas de especies de *Litopenaeus* que fueron molidos en un molino para carnes (Tor Rey M-32-3 HP) a un tamaño de partícula de 0.31 cm. El material obtenido se secó en charolas cubiertas con papel aluminio a 50 °C durante 3 h en una estufa. Posteriormente el secado prosiguió a temperatura ambiente por 3 días y después a 30 °C durante 24 h en una estufa.

La muestra de cefalotórax de camarón (CW) acondicionada como se describió anteriormente fue analizada por métodos estándar de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990 por sus siglas en inglés). La composición porcentual en base seca fue de  $51.45 \pm 0.17$  de proteína y  $25.05 \pm 0.08$  de cenizas.

##### 3.1.2. Reactor para tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas

El reactor de alta presión empleado es de un volumen interno de 40 mL y fabricado de acero inoxidable 316 (**Figura 5a**). Está equipado con un manómetro (Swagelok, USA) (**Figura 5a1**), dos válvulas de alta presión (Swagelok, USA) (**Figura 5a2**), una chaqueta cerámica externa de calentamiento (**Figura 5d**) y dos termopares independientes (**Figura 5a3**). Un termopar mide la temperatura dentro del reactor y el otro en la chaqueta cerámica, ambos se monitorean por un sistema de control y ajuste de temperaturas (**Figura 5b**).



**Figura 5.** Componentes del reactor utilizado para la experimentación: a) reactor armado y sus partes; b) sistema de control; c) celda de reacción; d) chaqueta de cerámica.

### 3.1.3. Diseño experimental de Taguchi

El método de Taguchi se empleó para optimizar los factores de variación y estudiar su influencia sobre las variables de respuesta. El diseño experimental empleado fue un arreglo ortogonal  $L_9$  ( $3^3$ ) y los factores de variación considerados: tiempo de tratamiento (t) con los niveles 5, 15 y 30 min, temperatura del tratamiento (T) con los niveles 230, 260 y 280 °C y la relación de CW/aH<sub>2</sub>O (g/g), donde: CW (desperdicio de camarón) y aH<sub>2</sub>O (agua destilada) con los niveles 0.05, 0.09 y 0.17. Las variables de respuesta consideradas fueron rendimiento de proteína soluble, pH y análisis elemental. En la **Tabla 1** se muestran los factores de variación y los niveles a lo largo de matriz  $L_9$ , también la presión que registró cada tratamiento. La nomenclatura de los tratamientos inicia con un número del 1-9 para facilitar su identificación seguido de la combinación de niveles. Cada tratamiento se realizó por duplicado. El análisis estadístico se realizó con un indicador llamado relación Señal/Ruido (S/N, por sus siglas en inglés) (Genichi T 2000).

**Tabla 1.** Arreglo ortogonal  $L_9 (3)^3$  del diseño de Taguchi con los factores y niveles empleados en la experimentación y la presión que registró cada experimento.

Factor	Relación (g CW / g dH <sub>2</sub> O)	Tiempo (min)	Temperatura (°C) *	
Nivel 1	0.05	5	230	
Nivel 2	0.09	15	260	
Nivel 3	0.17	30	280	
Tratamiento	Diseño			Presión (MPa)
1R1-t1-T1	1	1	1	2.78 ± 0.09
2R1-t2-T2	1	2	2	10.21 ± 3.59
3R1-t3-T3	1	3	3	20.18 ± 2.78
4R2-t1-T2	2	1	2	5.36 ± 0.64
5R2-t2-T3	2	2	3	8.94 ± 0.60
6R2-t3-T1	2	3	1	3.94 ± 0.95
7R3-t1-T3	3	1	3	10.39 ± 1.98
8R3-t2-T1	3	2	1	3.96 ± 0.66
9R3-t3-T2	3	3	2	5.00 ± 1.66
*Desviación estándar de ± 4 °C para cada nivel.				

### 3.1.4. Procedimiento experimental para los tratamientos

Los tratamientos con agua bajo condiciones subcríticas descritos en la **Tabla 1** se realizaron bajo la siguiente metodología experimental: en la celda de reacción (**Figura 5c**) se introdujo un agitador magnético en forma de cruz, y la muestra con la relación CW/dH<sub>2</sub>O correspondiente a cada nivel del factor relación. El reactor fue cargado a su máxima capacidad y se mantuvo con agitación magnética en una parrilla (Thermolyne 1000). Posteriormente, el reactor se armó y las válvulas fueron cerradas. La chaqueta de cerámica se calentó previamente antes de colocarla en el reactor a la temperatura requerida del cada tratamiento. Una vez que en el interior de la celda de reacción se había alcanzado la temperatura requerida, se registró la presión durante el tiempo de tratamiento correspondiente. Para detener la reacción una vez transcurrido el tiempo de reacción requerido, el reactor armado se llevó a baño de hielo frappe dentro de un cuarto frío (5 °C). Una vez que el reactor se encontró bajo condiciones de presión y temperatura ambiente se procedió a desarmarlo. El producto del tratamiento se filtró con papel filtro tamaño 40 µm, la fracción líquida se conservó en un tubo falcon de 50 ml, y en otro tubo se guardó la

fracción sólida retenida, ambos tubos se almacenaron a -20 °C (congelador Revco) hasta su posterior análisis.

La fracción líquida de cada tratamiento se descongeló a temperatura ambiente, después fue centrifugada a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C (Thermo Scientific Sorvall Legend XTR). El sobrenadante obtenido se filtró con papel filtro 40 µm y para cada tratamiento: se guardó una porción como referencia en un ultracongelador a -20°C (modelo -86 °C 120 V 60 Hz Thermo Scientific™ Forma™ serie 900), mientras que la otra porción se utilizó para realizar las determinaciones correspondientes (se guardó a -4°C cuando no era utilizada). La fracción sólida de cada tratamiento fue secada en una estufa a 40 °C durante 24 h, y luego se molió (Micro molino Bel-Art H3725-20000; hoja y cámara de molienda de acero inoxidable: 120 VAC, 60 Hz.) durante 3 min aproximadamente.

## **3.2. Análisis Diseño de Taguchi**

### **3.2.1. Determinación de proteína soluble**

La cantidad de proteína soluble se determinó en el sobrenadante de las muestras testigos ( $P_0$ ) y las tratadas con agua bajo condiciones subcríticas ( $P_f$ ) siguiendo la técnica descrita por Lowry-Peterson, 1977; para ello se preparó una curva estándar con seroalbúmina bovina. La curva estándar presentó una respuesta lineal que se ajustó a un factor  $r^2 = 0.9925$  entre 50 y 700 µg de proteína soluble/mL de sobrenadante. Todas las mediciones de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro Genesys 6 (Thermo Spectronic).

Las muestras testigos ( $P_0$ ) se prepararon con la muestra (CW) y agua destilada ( $dH_2O$ ) para las relaciones propuestas, pero no fueron sometidas a tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas (**C1**, **C2** y **C3**). Para cada nivel del factor relación (**Tabla 1**) se adicionó CW/ $dH_2O$  en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual se selló con parafilm y se mantuvo con agitación magnética durante 30 min (Thermo Scientific modelo SP131015Q, nivel 5), posteriormente se filtró para separar la fracción líquida y la fracción sólida.

Para calcular el rendimiento de proteína soluble ( $Y$ ) por tratamiento, se empleó la ecuación (1), cuidando que nivel del factor Relación fuera el mismo que el tratamiento en cuestión.

$$Y_k = P_{fk} - P_0 \quad (5)$$

Donde:

$Y_{ki}$  = Rendimiento de proteína en el  $k$ -ésimo experimento con el  $i$ -ésimo nivel del factor relación.

$P_0$  = Cantidad de proteína soluble inicial presente en el sobrenadante del testigo en el  $i$ -ésimo nivel del factor relación.

$P_{fk}$  = Cantidad de proteína soluble final presente en el sobrenadante del  $k$ -ésimo tratamiento en el  $i$ -ésimo nivel del factor relación.

$i$  = Valores de 1, 2 o 3 según el nivel de la Relación considerada

$k$  = Valores de 1, 2... hasta 9 según el experimento.

### 3.2.2. Determinación de pH

Las medidas se realizaron con un potenciómetro HANNA pH 210 previamente calibrado con un buffer a pH 4 y pH 7.

### 3.2.3. Fluorescencia de Rayos X (FRX)

El análisis elemental determinado por Fluorescencia de Rayos X se utilizó como variable de respuesta para identificar y cuantificar los elementos químicos presentes en la muestra antes y después de los tratamientos, estas se analizaron por duplicado. El sistema de FRX empleado es un equipo para análisis *in situ* SANDRA (Sistema de Análisis No Destructivo por Rayos X) (Ruvalcaba Sil, Ramírez Miranda, Aguilar Melo, & Picazo, 2010), que detecta elementos a partir del número atómico 13. El equipo cuenta con un detector de Si a 45° de la dirección de excitación de los rayos X. Los tubos de rayos X disponibles tienen un ánodo de Mo, Rh y ánodos con ventana de Be y filtro de N. También cuenta con dos láseres que se centran manualmente utilizando una cámara junto con el dispositivo, esto con el fin de establecer la región de análisis. La potencia máxima de los tubos de rayos X es 75 W (50 kv, 1.5 mA). Las condiciones utilizadas para el análisis fueron 0.125 mA, 35 kV en un área activa de 0.03 cm<sup>2</sup> a 2 cm de distancia, los datos se colectaron del canal 20 al 270 y el tiempo de adquisición de los espectros fue 120 s. Los datos obtenidos se procesaron con el software

DppMCA (Redus, Huber y Sperry, 2009) visualización y control para procesadores de señales Amptek. El tratamiento de los datos se realizó con el software PyMCA (Solé et al., 2007). Los cálculos de análisis cuantitativo se realizaron con el software AXL y se usaron estándares como materiales de referencia, Referencia de Materiales Estándar (SRM por sus siglas en inglés) del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST por sus siglas en inglés): NIST SRM 1573A.

### **3.3. Caracterización estructural de fracciones sólidas obtenidas**

#### **3.3.1. Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA)**

La espectroscopia FT-IR se utilizó para determinar los grupos funcionales presentes en las muestras de la fracción sólida. Los espectros se obtuvieron por ATR (Reflectancia Total Atenuada) en un espectrómetro FTIR (Perkin Elmer modelo Spectrum 100, UK) en la región de 4000 a 550  $\text{cm}^{-1}$  con 32 escaneos por muestra. Todas las muestras fueron previamente pulverizadas hasta obtener un tamaño de partícula de 140  $\mu\text{m}$ . Los espectros obtenidos se compararon con el espectro de  $\text{CaCO}_3$  puro (Laboratorio Laitz S.A. de C.V.), de hidroxiapatita (Sigma-Aldrich) y una  $\alpha$ -quitina obtenida por un método biológico descrito por Cira et al., 2002.

#### **3.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)**

Las muestras se analizaron en difractor Rigaku Ultima V, operado a 40 KV y 30 mA, con radiación  $\text{CuK}\alpha$   $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ . Los datos fueron colectados de 5 a 80° en escala  $2\theta$  con detector de estado sólido D/teX-ULTRA a una velocidad de 10 °/min. La identificación de fases se realizó considerando los resultados del análisis químico EDS, consultado la base de datos del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD, 2007 por sus siglas en inglés). Para el análisis cuantitativo de fases los datos de las fases cristalinas identificadas, se obtuvieron de la base de datos Estructuras Cristalinas Inorgánicas (ICSD, 2013 por sus siglas en inglés), de la Base de Datos Estructural de Cambridge (CSD, 2015 por sus siglas en inglés) y de la Base de Datos de la Estructura Cristalina del Mineralogista Americano (AMCSD por sus siglas en inglés). Las fases cristalinas identificadas fueron  $\alpha$ -quitina (CSD-

SUSGIW04) (Sikorski et al., 2009), calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) (ICSD - 16710), hidroxiapatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (ICSD-22059) (Kay et al., 1964) y cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) (ICSD-27826).

Los parámetros de celda, la simetría del cristal y las coordenadas atómicas se introdujeron en el programa de Rietveld GSAS II (Toby & Von Dreele, 2013). Los parámetros refinados fueron: factor de escala, parámetros de forma del pico, parámetros de orientación preferencial y parámetros de red al final del refinamiento. Los parámetros de forma el pico instrumentales se mantuvieron constantes y se determinaron a través del análisis de una muestra estándar de hexaboruro de lactano,  $\text{LaB}_6$  (NIST SRM 660). Lo anterior permitió modelar la forma del pico refinando únicamente parámetros microestructurales. Las coordenadas atómicas se mantuvieron fijas durante el refinamiento. El fondo fue modelado utilizando un conjunto de puntos seleccionados a los cuales se ajustó una función polinómica Chebyshev con 12 términos y parámetros de refinamiento. La microestructura de  $\alpha$ -quitina se modeló considerando una simetría uniaxial para el tamaño de dominio cristalino, de esta manera, dos parámetros son refinables: tamaño ecuatorial D y tamaño axial L. El tamaño axial es el tamaño del dominio cristalino a lo largo del eje C, la dirección de la fibra, que es la dirección de la cadena polimérica de la  $\alpha$ -quitina, este parámetro no se refinó ya que su tamaño es del orden de  $\mu\text{m}$  y no contribuyen al ensanchamiento de las reflexiones; sólo se refinó el tamaño ecuatorial D.

El sistema cristalino en el que se arreglan las fibras de  $\alpha$ -quitina es ortorrómbico con un grupo espacial  $\text{P}2_12_12_1$ . Estructuralmente las cadenas de  $\alpha$ -quitina están alineadas en forma corrugada y antiparalela sobre el plano bc. Con la posición antiparalela se establecen puentes de hidrógeno y por consiguiente se tiene una estructura más estable (ref). La hidroxiapatita cristaliza en un sistema hexagonal con simetría descrita por el grupo espacial  $\text{P}6_3/\text{m}$ , también se modeló la microestructura con una componente axial L (con dirección del eje c hexagonal) y una ecuatorial D para el tamaño de dominio cristalino. Para la calcita y el cuarzo (en su caso) no se consideraron efectos de tamaño de cristal para describir la anchura de las reflexiones.

### **3.3.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) con Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) acoplada**

Las imágenes obtenidas por MEB, se observaron en un microscopio JEOL JSM-7800F equipado con un sistema de microanálisis por dispersión de energía de rayos-X característicos (EDS), con un voltaje entre 3 y 5 kV para MEB; y entre 12 y 20 Kv para EDS. Las muestras con forma de hojuelas con tamaño fino menor a 177  $\mu\text{m}$ , se fijaron en una cinta de carbono adherida a un porta muestras de aluminio. Posteriormente se recubrieron con una capa fina de oro para evitar que la muestra se cargara.

### **3.4. Análisis químico proximal**

El porcentaje de humedad, cenizas y cuantificación de nitrógeno total se realizó de acuerdo con el método de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990 por sus siglas en inglés) número 954.01.

Para la determinación de nitrógeno total las muestras fueron digeridas en tubos de digestión tipo Kjeldahl de 300 ml, empleando una unidad de digestión Büchi B-426 que fue conectada a un lavador de gases Büchi B-412 para atrapar los vapores de trióxido de azufre ( $\text{SO}_3$ ). La destilación de las muestras digeridas se realizó en una unidad Büchi B-323.

## 4. RESULTADOS Y DICUSIÓN

### 4.2. Análisis Diseño de Taguchi

#### 4.2.1. Determinación de proteína soluble

Los resultados de la cuantificación de proteína soluble presente en las fracciones líquidas obtenidas de los tratamientos se presentan en la **Tabla 2**. Los valores negativos corresponden a la pérdida de proteína, es decir, la cantidad de proteína soluble presente en los tratamientos fue inferior a la que había en el testigo **C1**.

**Tabla 2.** Rendimiento de proteína soluble obtenido para cada tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer.

Tratamiento	Rendimiento (mg proteína soluble / g de CW)		
	Datos		Media y desviación estándar
1R1-t1-T1	94.91	53.24	74.07 ± 29.46 <sup>bc</sup>
2R1-t2-T2	-70.22	-30.09	-50.15 ± 28.37 <sup>e</sup>
3R1-t3-T3	-3.86	-3.86	-3.86 ± 0.0 <sup>de</sup>
4R2-t1-T2	153.49	127.98	140.73 ± 18.04 <sup>a</sup>
5R2-t2-T3	89.71	96.51	93.11 ± 4.81 <sup>ab</sup>
6R2-t3-T1	98.21	113.52	105.87 ± 10.82 <sup>ab</sup>
7R3-t1-T3	16.10	17.52	16.81 ± 1.00 <sup>cd</sup>
8R3-t2-T1	11.84	0.47	6.16 ± 8.04 <sup>de</sup>
9R3-t3-T2	72.44	71.02	71.73 ± 1.00 <sup>bc</sup>

Las dos columnas de datos de la **Tabla 2** se emplearon para calcular los valores de S/N para cada tratamiento, se utilizaron las ecuaciones 1 y 3 del apartado 2.4 de antecedentes. Estos valores se agruparon y promediaron por cada nivel de factor (**Tabla 3**), se obtuvieron 3 valores de  $\overline{S/N}$  con los que se construyó una gráfica por factor (**Figura 6**). Cada gráfica permite interpretar el efecto que tuvo el factor sobre la variable respuesta.

**Tabla 3.** Valores de  $\overline{S/N}$  por nivel de factor a calculados partir de S/N.

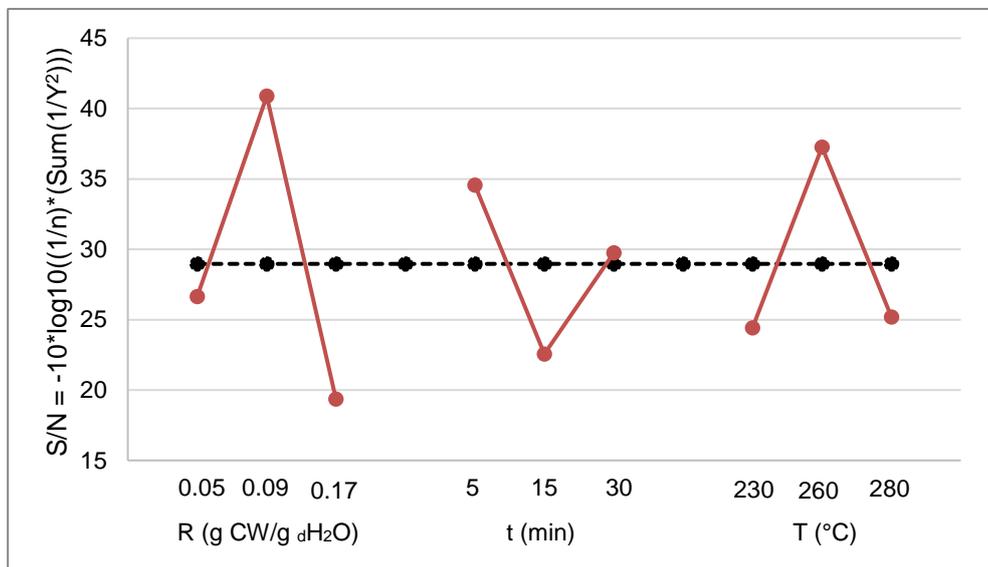
Valores de S/N			Valores de $\overline{S/N}$			
Tratamiento	Datos	S/N				
1R1-t1-T1	94.91	36.35	<b>Factor relación</b>			
	53.24		Nivel	1	2	3
2R1-t2-T2	-70.22	31.85		36.35	42.86	24.49
	-30.09		S/N	31.85	39.36	-3.49
3R1-t3-T3	-3.86	11.73		11.73	40.43	37.11
	-3.86		$\overline{S/N}$	<b>26.64</b>	<b>40.88</b>	<b>19.37</b>
4R2-t1-T2	153.49	42.86	<b>Factor tiempo</b>			
	127.98		Nivel	1	2	3
5R2-t2-T3	89.71	39.36		36.35	31.85	11.73
	96.51		S/N	42.86	39.36	40.43
6R2-t3-T1	98.21	40.43		24.49	-3.49	37.11
	113.52		$\overline{S/N}$	<b>34.56</b>	<b>22.57</b>	<b>29.76</b>
7R3-t1-T3	16.1	24.49	<b>Factor temperatura</b>			
	17.52		Nivel	1	2	3
8R3-t2-T1	11.84	-3.49		36.35	31.85	11.73
	0.47		S/N	40.43	42.86	39.36
9R3-t3-T2	72.44	37.11		-3.49	37.11	24.49
	71.02		$\overline{S/N}$	<b>24.43</b>	<b>37.27</b>	<b>25.19</b>

La línea base ( $\overline{\overline{S/N}}$ ) que corta cada gráfica se obtuvo como la media de los 9 valores (3 por cada factor) de  $\overline{S/N}$  calculados antes (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Valor de  $\overline{\overline{S/N}}$ .

Factor	Nivel	$\overline{S/N}$
Relación	0.05	26.64
	0.09	40.88
	0.17	19.37
Tiempo	5	34.56
	15	22.57
	30	29.76
Temperatura	230	24.43
	260	37.27
	280	25.19
	$\overline{\overline{S/N}}$	<b>28.96</b>

Los niveles ubicados por encima esta línea  $\overline{\overline{S/N}}$  son aquellos que influyen sobre la variable respuesta rendimiento de proteína soluble maximizándola, por el contrario con los niveles ubicados por debajo de la línea, la variable se minimiza.



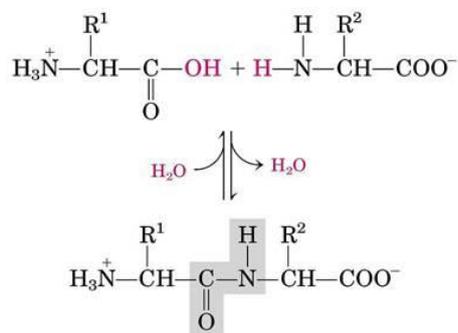
**Figura 6.** Gráficas de S/N para los factores considerando el rendimiento de proteína soluble.

En la **Figura 6** se observa que el máximo rendimiento de proteína soluble se optimiza con los niveles R2, t1 y T2 que en combinación corresponden al tratamiento **4R2-t1-T2** (**Tabla 1**). En cambio, con los niveles R3, t2 y T1 se obtuvieron rendimientos cercanos a cero.

Los datos de la **Tabla 2** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple, ( $p \leq 0.05$ ). Se encontró que con el tratamiento **4R2-t1-T2** se obtiene un rendimiento máximo de proteína de  $140.73 \pm 18.03$  mg / g de CW. Quitain et al., en 2001, reportan un rendimiento máximo de 70 mg de aminoácidos / g de cáscara de camarón seca, empleando una relación de 1:125 (g cáscara de camarón / g agua desionizada) a 250 °C, 60 min de tratamiento y con una presión de 4 MPa (corresponde a la presión de vapor saturado del agua a esa temperatura).

La liberación de proteína y posiblemente de minerales de la fracción sólida hacia la fracción líquida, se debe al efecto del agua bajo condiciones subcríticas. Yoshida, Terashima, y Takahashi, 1999 y Kang et al., 2001), describieron que el agua bajo condiciones subcríticas alcanza su máximo producto ion Kw  $1 \times 10^{-11}$  entre 250 y 268 °C entre 4 y 9 MPa aproximadamente, en todo caso Kw depende de la temperatura. Considerando lo descrito por los autores, se puede decir, que las proteínas presentes en la fracción sólida se hidrolizan

cuando alcanza su máximo Kw, los péptidos y posiblemente aminoácidos pasan a la fracción líquida como compuestos solubles cuantificables (**Figura 7**).



**Figura 7.** Hidrólisis del enlace peptídico.

Los datos de la **Tabla 2** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple ( $p \leq 0.05$ ) y se encontró que los factores tiempo y temperatura no fueron significativos sobre el rendimiento de proteína soluble. El factor relación sí fue significativo, de hecho, con el nivel **R2** se obtuvo la mayor media  $113.23 \pm 24.04$  mg / g de CW, es decir, las medias mayores de rendimiento de proteína soluble en la fracción líquida se obtuvieron en los tratamientos con el nivel **R2**.

#### 4.2.2. Determinación de pH

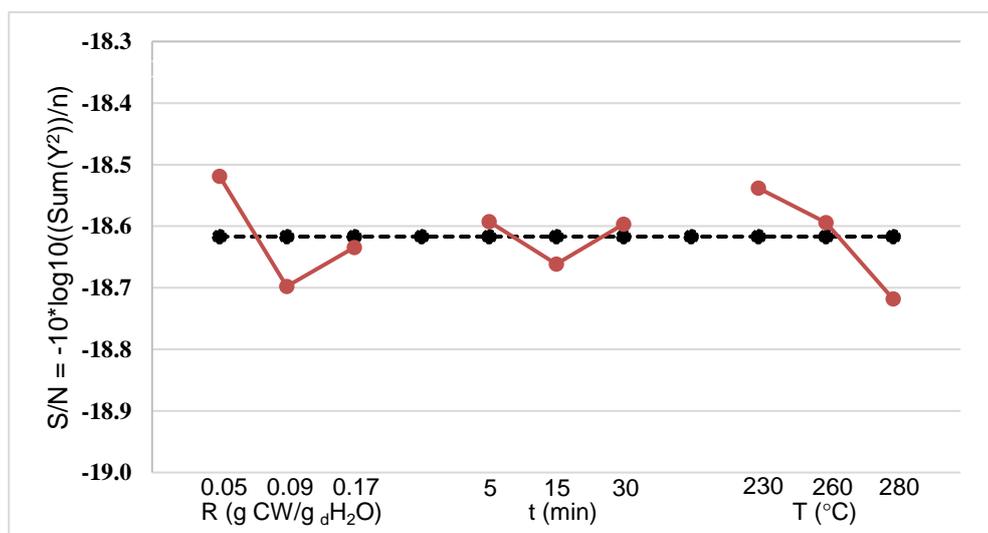
En la **Tabla 5** se presentan los valores de pH obtenidos para cada tratamiento. Las determinaciones se realizaron por duplicado y se observa que la variable pH toma valores dentro de un intervalo reducido de 8.26 a 8.91.

**Tabla 5.** pH obtenidos para cada tratamiento de CW en agua bajo condiciones subcríticas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer.

Tratamiento	pH	
	Datos	Media y desviación estándar
<b>1R1-t1-T1</b>	8.66 8.26	$8.46 \pm 0.28$ <sup>ab</sup>
<b>2R1-t2-T2</b>	8.37 8.26	$8.32 \pm 0.08$ <sup>b</sup>
<b>3R1-t3-T3</b>	8.54 8.5	$8.52 \pm 0.03$ <sup>ab</sup>
<b>4R2-t1-T2</b>	8.58 8.56	$8.57 \pm 0.01$ <sup>ab</sup>
<b>5R2-t2-T3</b>	8.91 8.87	$8.89 \pm 0.03$ <sup>a</sup>
<b>6R2-t3-T1</b>	8.47 8.27	$8.37 \pm 0.14$ <sup>b</sup>
<b>7R3-t1-T3</b>	8.50 8.46	$8.48 \pm 0.03$ <sup>ab</sup>
<b>8R3-t2-T1</b>	8.42 8.62	$8.52 \pm 0.14$ <sup>ab</sup>
<b>9R3-t3-T2</b>	8.53 8.74	$8.64 \pm 0.15$ <sup>ab</sup>

Con los datos de la **Tabla 5** se obtuvieron las gráficas de cada factor y la línea base ( $\overline{\overline{S/N}}$ ) como se describió para la determinación de proteína soluble, pero se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 del apartado 2.4 de antecedentes. En este caso se interpreta que los niveles ubicados por encima de esta línea  $\overline{\overline{S/N}}$  influyen positivamente sobre la variable respuesta pH minimizándola, mientras que aquellos ubicados por debajo la maximizan.

Debido a la pequeña variación en el valor del pH, el intervalo de valores que puede tomar S/N también es reducido (-18.72 y -18.52).



**Figura 8.** Gráficas de S/N para los factores considerando la variable pH.

En la **Figura 8**, se observa que el valor mínimo de pH se optimiza con los niveles R1, t1 y T1, que en combinación corresponde al tratamiento **1R1-t1-T1** (**Tabla 1**). En cambio, con los niveles R2, t2 y T3 se obtuvieron los valores más altos que corresponden al tratamiento **5R2-t2-T3** (**Tabla 1**).

Los datos de la **Tabla 5** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple, ( $p \leq 0.05$ ). Se encontró que el tratamiento con la media más baja de pH fue el **1R1-t1-T1** ( $8.31 \pm 0.077$ ), mientras que con el tratamiento **5R2-t2-T3** se obtuvo la media más alta ( $8.89 \pm 0.028$ ).

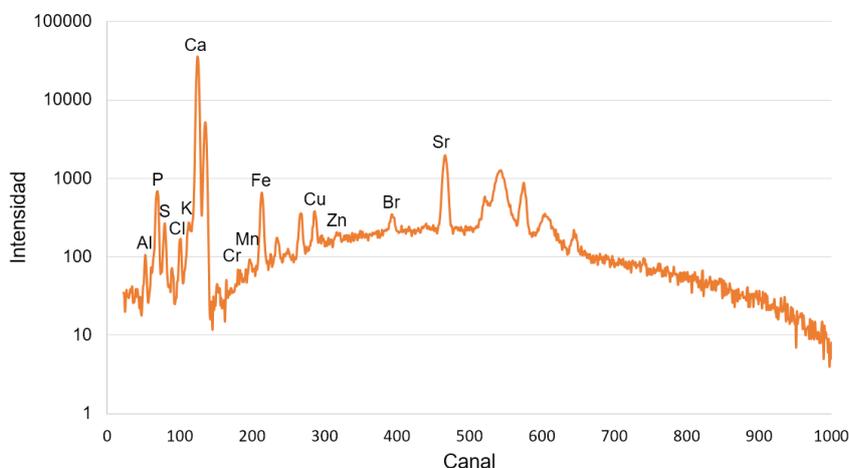
De acuerdo con la hipótesis planteada para esta variable se esperaban cambios de mayor significancia en el pH, debido a la posible liberación del grupo acetamido de la  $\alpha$ -quitina en forma de ácido acético, sin embargo, los valores de pH obtenidos cambian dentro de un

intervalo reducido. Esto puede atribuirse a que las proteínas liberadas de la fracción sólida hacia la fracción líquida propiciaron un efecto de amortiguamiento en el pH.

Los datos de la **Tabla 5** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple ( $p \leq 0.05$ ) y se encontró que los factores relación, tiempo y temperatura no fueron significativos sobre el pH.

#### 4.2.3. Análisis elemental por Fluorescencia de Rayos X (FRX)

La técnica de FRX permite identificar y cuantificar elementos de manera simultánea en una misma muestra sin afectarla (Klockenkämper y Von Bohlen, 1996); (Stephens y Calder, 2004); (Szoboszlai et al., 2009). Se ha descrito su aplicación para estudiar la acumulación de elementos en muestras biológicas (Szoboszlai et al., 2009) principalmente en especímenes vegetales (Stephens y Calder, 2004); (Marguá et al., 2009), animales (Stump et al., 1979) (Bohuss et al., 2001), y en tejidos y fluidos humanos (Börjesson y Mattsson, 2007). En la **Figura 9** se muestra el espectro de Fluorescencia de Rayos X que presentaron las muestras, mismo en el que se indican los elementos identificados.



**Figura 9.** Espectro de Fluorescencia de Rayos X característico que presentaron todas las muestras.

En la **Tabla 6** se presentan los resultados del análisis elemental por FRX de la fracción sólida de los testigos **C1**, **C2**, **C3** y los tratamientos. Los elementos identificados en todas las muestras fueron Ca, P, S, K, Cl y Al % (g/kg) en mayor cantidad macroelementos y Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br y Sr  $\mu\text{g/g}$ , en menor cantidad microelementos, clasificados de acuerdo su concentración. Los datos de **Tabla 6** fueron analizados mediante comparación de medias múltiples por prueba de Tukey-Kramer, se consideró un valor  $p \leq 0.05$ . Después del análisis

no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ni en los testigos **C1**, **C2** y **C3**. La presencia de los minerales identificados y cuantificados, se explica principalmente por su requerimiento para las funciones elementales de los crustáceos, a los alimentos ingeridos y a la capacidad que tienen para absorber minerales del agua circundante (Tacon, 1989). Se ha descrito en la literatura la presencia de Ca, P, Na, y Zn en el cefalotórax de algunas especies de camarón, y K y Mg en altas concentraciones (Ibrahim et al., 1999; Ravichandran et al., 2009). Weaver J.C. et al., (2012) sugieren que el calcio que es almacenado por el crustáceo, probablemente es utilizado en la calcificación de su exoesqueleto, mientras que el P parece necesario para la síntesis de quitina. La concentración de Ca y P aumenta cuando un crustáceo se encuentra en periodo de pre-muda

**Tabla 6.** Análisis elemental por Fluorescencia de Rayos X para las muestras CW y los tratamientos en Macromoelementos (% g/kg) y Microelementos (µg/g), así como la relación Ca/P,  $(Ca/P)_{prom} = 2.84$ .

Tratamiento	Macroelementos (% g/Kg de muestra)						Ca/P	Microelementos (µg/g muestra)							
	Ca	P	S	K	Cl	Al		Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Sr
C1	9.040 ± 0.719	3.460 ± 0.332	0.362 ± 0.049	0.174 ± 0.013	0.385 ± 0.093	0.088 ± 0.020	2.61	22.083 ± 31.230	58.224 ± 31.416	343.669 ± 258.463	49.081 ± 31.330	43.206 ± 0.783	53.843 ± 17.084	362.612 ± 21.130	1714.111 ± 313.119
C2	7.821 ± 1.286	2.834 ± 0.408	0.436 ± 0.087	0.201 ± 0.008	0.864 ± 0.272	0.077 ± 0.018	2.76	20.319 ± 9.007	30.605 ± 15.798	162.355 ± 46.287	67.451 ± 53.768	56.860 ± 4.587	75.847 ± 18.542	256.839 ± 50.806	1412.406 ± 464.925
C3	8.598 ± 0.760	2.631 ± 0.497	0.494 ± 0.040	0.241 ± 0.008	1.220 ± 0.057	0.073 ± 0.004	3.27	0.000	0	90.231 ± 2.012	7.536 ± 10.657	16.576 ± 23.442	82.588 ± 10.138	305.605 ± 42.362	1744.149 ± 153.802
1R1-t1-T1	9.640 ± 2.220	3.083 ± 2.964	0.313 ± 0.078	0.103 ± 0.024	0.154 ± 0.018	0.077 ± 0.017	3.13	46.755 ± 41.084	45.675 ± 8.470	142.355 ± 65.556	103.383 ± 91.581	67.946 ± 13.304	93.500 ± 22.502	52.355 ± 7.746	948.093 ± 810.688
2R1-t2-T2	9.657 ± 0.015	3.746 ± 0.469	0.279 ± 0.004	0.112 ± 0.012	0.161 ± 0.052	0.067 ± 0.004	2.58	35.350 ± 15.124	45.688 ± 1.056	225.555 ± 41.596	54.947 ± 39.747	68.967 ± 30.114	106.807 ± 29.905	46.877 ± 12.174	1644.303 ± 311.895
3R1-t3-T3	10.972 ± 0.527	4.832 ± 0.359	0.337 ± 0.008	0.140 ± 0.015	0.283 ± 0.062	0.097 ± 0.010	2.27	50.600 ± 16.071	57.848 ± 6.351	366.210 ± 52.154	45.847 ± 13.798	56.694 ± 19.751	85.208 ± 4.107	53.430 ± 9.814	1913.916 ± 45.992
4R2-t1-T2	7.268 ± 0.541	2.089 ± 0.484	0.413 ± 0.023	0.187 ± 0.006	0.837 ± 0.042	0.059 ± 0.008	3.48	24.690 ± 7.856	53.109 ± 5.619	109.668 ± 7.519	30.155 ± 6.979	140.848 ± 7.015	95.322 ± 1.118	91.956 ± 5.739	1345.581 ± 27.361
5R2-t2-T3	7.664 ± 0.036	2.552 ± 0.368	0.405 ± 0.009	0.172 ± 0.015	0.657 ± 0.127	0.071 ± 0.009	3.00	26.897 ± 12.384	40.556 ± 4.573	190.561 ± 31.453	59.809 ± 36.804	387.574 ± 23.103	122.391 ± 11.528	94.059 ± 1.650	1363.676 ± 390.650
6R2-t3-T1	7.583 ± 1.218	1.965 ± 0.149	0.374 ± 0.002	0.141 ± 0.010	0.465 ± 0.030	0.065 ± 0.000	3.86	27.059 ± 13.123	35.701 ± 6.504	133.941 ± 42.066	77.153 ± 62.259	84.043 ± 24.396	135.131 ± 49.415	70.073 ± 12.496	949.406 ± 267.292
7R3-t1-T3	8.797 ± 0.109	3.985 ± 0.469	0.490 ± 0.047	0.192 ± 0.008	0.685 ± 0.081	0.075 ± 0.007	2.21	37.276 ± 14.294	46.649 ± 2.728	224.870 ± 11.973	73.855 ± 49.270	126.194 ± 18.810	117.364 ± 4.436	105.989 ± 4.769	1493.887 ± 514.227
8R3-t2-T1	9.048 ± 1.277	3.174 ± 0.803	0.403 ± 0.009	0.201 ± 0.011	0.695 ± 0.022	0.074 ± 0.011	2.85	8.439 ± 11.934	38.125 ± 6.532	105.554 ± 28.928	24.111 ± 7.317	82.916 ± 18.361	140.715 ± 41.882	114.219 ± 6.265	1556.989 ± 232.688
9R3-t3-T2	7.133 ± 0.864	3.461 ± 0.344	0.514 ± 0.056	0.273 ± 0.053	1.188 ± 0.235	0.062 ± 0.006	2.06	18.598 ± 1.295	43.554 ± 0.436	139.290 ± 10.971	36.900 ± 4.804	106.833 ± 12.924	145.573 ± 25.160	176.952 ± 39.589	1885.681 ± 189.115

El método de Taguchi se aplicó en este análisis con el fin de estudiar la presencia de los macroelementos Ca, P, S y K, que se cuantificaron en mayor concentración en las fracciones sólidas.

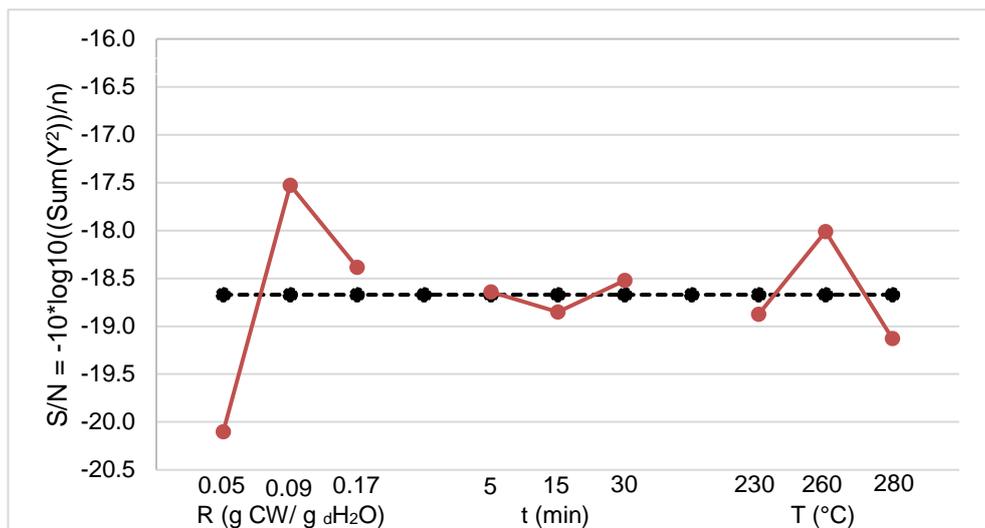
#### 4.2.3.1. Cuantificación de calcio

El calcio es un componente esencial del exoesqueleto de crustáceos y en conjunto con los fosfolípidos, juega un papel fundamental en la regulación de la permeabilidad de las membranas celulares y como consecuencia sobre la capacidad de nutrientes por célula (Kurita, 2006; Tacon, 1989). En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de Ca presente en las fracciones sólidas en mg de elemento por kg de la matriz (esta se consideró como  $\alpha$ -quitina).

**Tabla 7.** Porcentaje de Ca presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer.

Tratamiento	% Ca (mg/Kg)		
	Datos		Media y desviación estándar
<b>1R1-t1-T1</b>	11.210	8.070	9.64 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>
<b>2R1-t2-T2</b>	9.647	9.668	9.66 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
<b>3R1-t3-T3</b>	11.345	10.599	10.97 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
<b>4R2-t1-T2</b>	7.650	6.885	7.27 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>
<b>5R2-t2-T3</b>	7.638	7.689	7.66 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
<b>6R2-t3-T1</b>	6.721	8.444	7.58 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>
<b>7R3-t1-T3</b>	8.874	8.720	8.80 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
<b>8R3-t2-T1</b>	8.145	9.951	9.05 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>
<b>9R3-t3-T2</b>	6.523	7.744	7.13 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>

Con los datos de la **Tabla 7**, se obtuvieron las gráficas de cada factor y la línea base ( $\overline{S/N}$ ), se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 del apartado 2.4 de antecedentes. Los niveles ubicados por encima esta línea  $\overline{S/N}$  influyen positivamente sobre la variable respuesta porcentaje de calcio minimizándola, mientras que aquellos ubicados por debajo la maximizan.



**Figura 10.** Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de Ca en los tratamientos

En la **Figura 10** se observa que el porcentaje de Ca se minimiza con los niveles R2, t3 y T2, mientras que con R1, t2 y T3 se obtuvieron los valores más altos.

Los datos de la **Tabla 7** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple, se consideró un valor  $p \leq 0.05$ . Entre los tratamientos no se encontró diferencia significativa. Los factores tiempo y temperatura no fueron significativos sobre el contenido de Ca. El factor relación sí fue significativo, con los niveles **0.09** y **0.05** se registraron las medias más bajas ( $0.75 \pm 0.62$  y  $8.3 \pm 1.15$  % Ca respectivamente), es decir, para la variable porcentaje de Ca los valores menores se obtuvieron en los tratamientos con los niveles **R2** y **R3**.

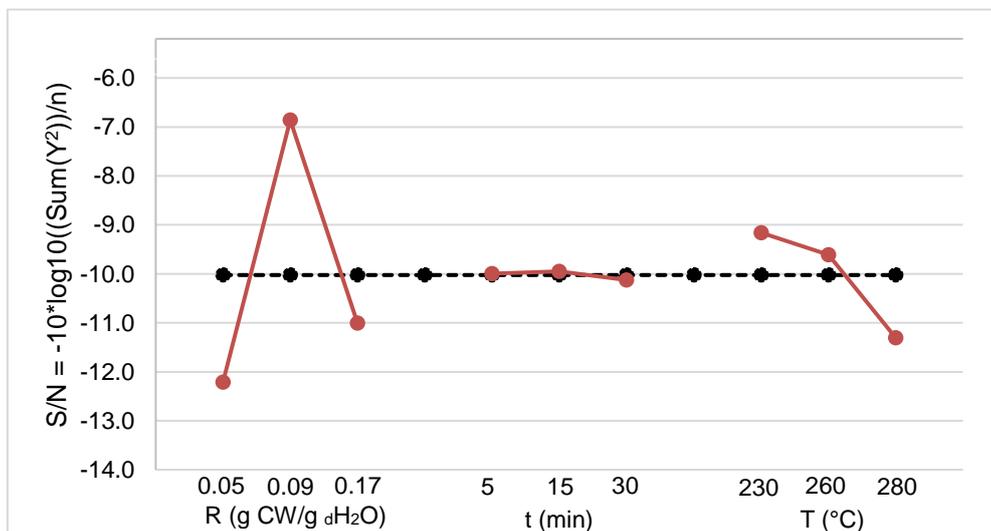
#### 4.2.3.2. *Cuantificación de fósforo*

El P es un componente esencial en el exoesqueleto de crustáceos, igual que el Ca, juega un papel central en el metabolismo celular y energético (Tacon, 1989). El P se encuentra en forma de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en moléculas como fosfolípidos, ácidos nucleicos (ADN), fosfoproteínas, ésteres de fosfato altamente energéticos (ATP), hexosa fosfato, fosfato de creatina y varias enzimas claves (Tacon, 1989). En la **Tabla 8** se muestran los datos obtenidos del porcentaje de P presente en las fracciones sólidas en mg de elemento por Kg de la matriz (esta se consideró como  $\alpha$ -quitina).

**Tabla 8.** Porcentaje de P presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer.

Tratamiento	% P (mg/Kg)		
	Datos		Media y desviación estándar
1R1-t1-T1	5.179	0.987	3.08 ± 2.96 <sup>a</sup>
2R1-t2-T2	4.077	3.414	3.75 ± 0.47 <sup>a</sup>
3R1-t3-T3	5.086	4.578	4.83 ± 0.36 <sup>a</sup>
4R2-t1-T2	1.746	2.431	2.09 ± 0.48 <sup>b</sup>
5R2-t2-T3	2.292	2.812	2.55 ± 0.37 <sup>b</sup>
6R2-t3-T1	1.859	2.070	1.96 ± 0.15 <sup>b</sup>
7R3-t1-T3	3.654	4.316	3.98 ± 0.47 <sup>ab</sup>
8R3-t2-T1	2.607	3.742	3.17 ± 0.80 <sup>ab</sup>
9R3-t3-T2	3.218	3.704	3.46 ± 0.34 <sup>ab</sup>

Con los datos de la **Tabla 8**, se obtuvieron las gráficas de cada factor y la línea base ( $\overline{S/N}$ ), se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 del apartado 2.4 de antecedentes. Como en el caso de la variable pH, se debe interpretar que los niveles ubicados por encima esta línea  $\overline{S/N}$  influyen positivamente sobre la variable respuesta porcentaje de P minimizándola, mientras que aquellos ubicados por debajo la maximizan.



**Figura 11.** Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de P en los tratamientos

En la **Figura 11** se observa que el porcentaje de P se minimiza con los niveles R2 y T1, el nivel “tiempo” prácticamente no presenta efecto sobre esta variable ya que su gráfica traslapa a la línea  $\overline{S/N} = -10.02$ . Con los niveles R1 y T3 se observan porcentajes altos de este elemento.

Los datos de la **Tabla 8** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple, se consideró un valor  $p \leq 0.05$ . Entre los tratamientos no se encontró diferencia significativa. Mediante la misma prueba se encontró que los factores tiempo y temperatura no fueron significativos sobre el contenido de P. El factor relación sí fue significativo, con el nivel **R2** se obtuvo la menor media ( $2.2 \pm 0.39$  %P) respecto de los otros niveles, es decir, que las medias menores del porcentaje de P se obtuvieron en los tratamientos con el nivel **R2**.

#### 4.2.3.3. *Cuantificación de potasio*

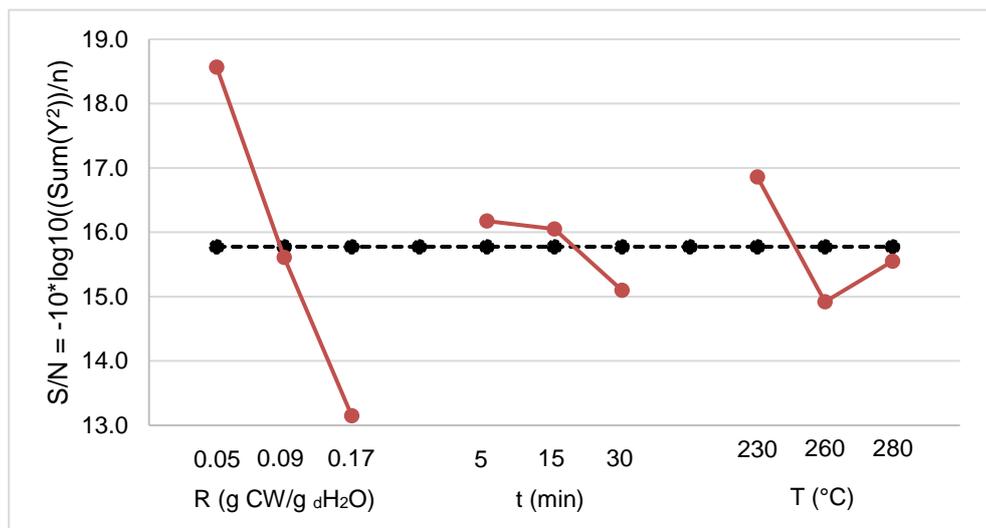
El K forma parte de las funciones biológicas de los crustáceos. Es el principal catión de los fluidos intracelulares para regular la presión osmótica intracelular y el balance ácido-base. Además se requiere para la síntesis de glicógeno y proteínas, así como en el desdoblamiento metabólico de la glucosa (Tacon, 1989).

En la **Tabla 9** se muestran los datos obtenidos del porcentaje de K presente en las fracciones sólidas. El cálculo se obtuvo como mg de elemento presente por Kg de la matriz (esta se consideró como  $\alpha$ -quitina).

**Tabla 9.** Porcentaje de K presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer.

Tratamiento	% K (mg/Kg)		
	Datos		Media y desviación estándar
<b>1R1-t1-T1</b>	0.120	0.086	$0.103 \pm 0.024$ <sup>d</sup>
<b>2R1-t2-T2</b>	0.121	0.103	$0.112 \pm 0.012$ <sup>cd</sup>
<b>3R1-t3-T3</b>	0.150	0.129	$0.140 \pm 0.015$ <sup>bcd</sup>
<b>4R2-t1-T2</b>	0.191	0.182	$0.187 \pm 0.006$ <sup>abcd</sup>
<b>5R2-t2-T3</b>	0.183	0.162	$0.172 \pm 0.015$ <sup>bcd</sup>
<b>6R2-t3-T1</b>	0.134	0.148	$0.141 \pm 0.010$ <sup>bcd</sup>
<b>7R3-t1-T3</b>	0.186	0.198	$0.192 \pm 0.008$ <sup>abc</sup>
<b>8R3-t2-T1</b>	0.194	0.209	$0.201 \pm 0.011$ <sup>ab</sup>
<b>9R3-t3-T2</b>	0.235	0.310	$0.273 \pm 0.053$ <sup>a</sup>

Con los datos de la **Tabla 9**, se obtuvieron las gráficas de cada factor y la línea base ( $\overline{S/N}$ ), se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 del apartado 2.4. de antecedentes. Los niveles ubicados por encima esta línea  $\overline{S/N}$  influyen positivamente sobre la variable respuesta porcentaje de K minimizándola, mientras que aquellos ubicados por debajo la maximizan.



**Figura 12.** Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de K en los tratamientos.

En la **Figura 12** se observa que el porcentaje de K se minimiza con los niveles R1, t1 y T1, mientras que con los niveles R3, t3 y T2 se obtuvieron los valores más altos, en la **Tabla 1** corresponden a los tratamientos **1R1-t1-T1** y **9R3-t3-T2** respectivamente.

Los datos de la **Tabla 9** también fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple, se consideró un valor  $p \leq 0.05$ . Se encontró que para la variable porcentaje de K, la menor media se obtuvo con el tratamiento **1R1-t1-T1** ( $0.10 \pm 0.024$  %K) y mayor media con el tratamiento **9R3-t3-T2** ( $0.27 \pm 0.053$  %K). Mediante la misma prueba estadística se encontró que los factores tiempo y temperatura no fueron significativos sobre el contenido de K. El factor relación sí fue significativo, con los niveles **R1** y **R3** se registraron las medias más bajas de porcentaje de K, con  $0.11 \pm 0.021$  %K y  $0.16 \pm 0.02$  %K respectivamente, es decir, para la variable porcentaje de K los valores menores se obtuvieron en los tratamientos con los niveles **R1** y **R3**.

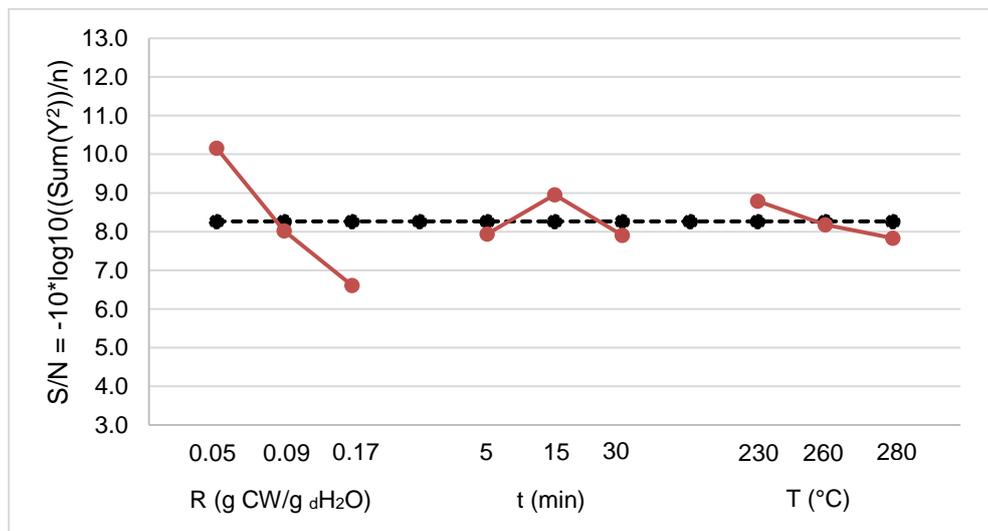
#### 4.2.3.4. *Cuantificación de azufre*

Los datos obtenidos del porcentaje de S presente en las fracciones sólidas se muestran en la **Tabla 10**. El cálculo se obtuvo en mg de elemento presente por Kg de la matriz (esta se consideró como  $\alpha$ -quitina).

**Tabla 10.** Porcentaje de S presente en las fracciones sólidas. Las letras en superíndice indican grupos con diferencia significativa mediante la prueba de Tukey-Kramer.

Tratamiento	% S (mg/Kg)		
	Datos		Media y desviación estándar
<b>1R1-t1-T1</b>	0.369	0.258	0.313 ± 0.078 <sup>b</sup>
<b>2R1-t2-T2</b>	0.276	0.281	0.279 ± 0.004 <sup>b</sup>
<b>3R1-t3-T3</b>	0.331	0.343	0.337 ± 0.008 <sup>b</sup>
<b>4R2-t1-T2</b>	0.397	0.429	0.413 ± 0.023 <sup>ab</sup>
<b>5R2-t2-T3</b>	0.411	0.398	0.405 ± 0.009 <sup>ab</sup>
<b>6R2-t3-T1</b>	0.373	0.376	0.374 ± 0.002 <sup>ab</sup>
<b>7R3-t1-T3</b>	0.457	0.523	0.490 ± 0.047 <sup>a</sup>
<b>8R3-t2-T1</b>	0.397	0.409	0.403 ± 0.009 <sup>ab</sup>
<b>9R3-t3-T2</b>	0.474	0.554	0.514 ± 0.056 <sup>a</sup>

Con los datos de la **Tabla 10**, se obtuvieron las gráficas de cada factor y la línea base ( $\overline{S/N}$ ), se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 de apartado 2.4 de antecedentes. Los niveles ubicados por encima esta línea  $\overline{S/N}$  influyen positivamente sobre la variable respuesta porcentaje de S minimizándola, mientras que aquellos ubicados por debajo la maximizan.



**Figura 13.** Gráficas de S/N para los factores considerando el contenido de S en los tratamientos.

En la **Figura 13** se observa que el porcentaje de S se minimiza con los niveles R1, t2 y T1, mientras que con los niveles R3, t3 y T3 se obtuvieron los valores más altos.

Los datos de la **Tabla 10** fueron analizados mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple ( $p \leq 0.05$ ). Se encontró que los tratamientos con las medias más bajas para el porcentaje de S son **2R1-t2-T2** ( $0.27 \pm 0.003$  %S), **1R1-t1-T1** ( $0.31 \pm$

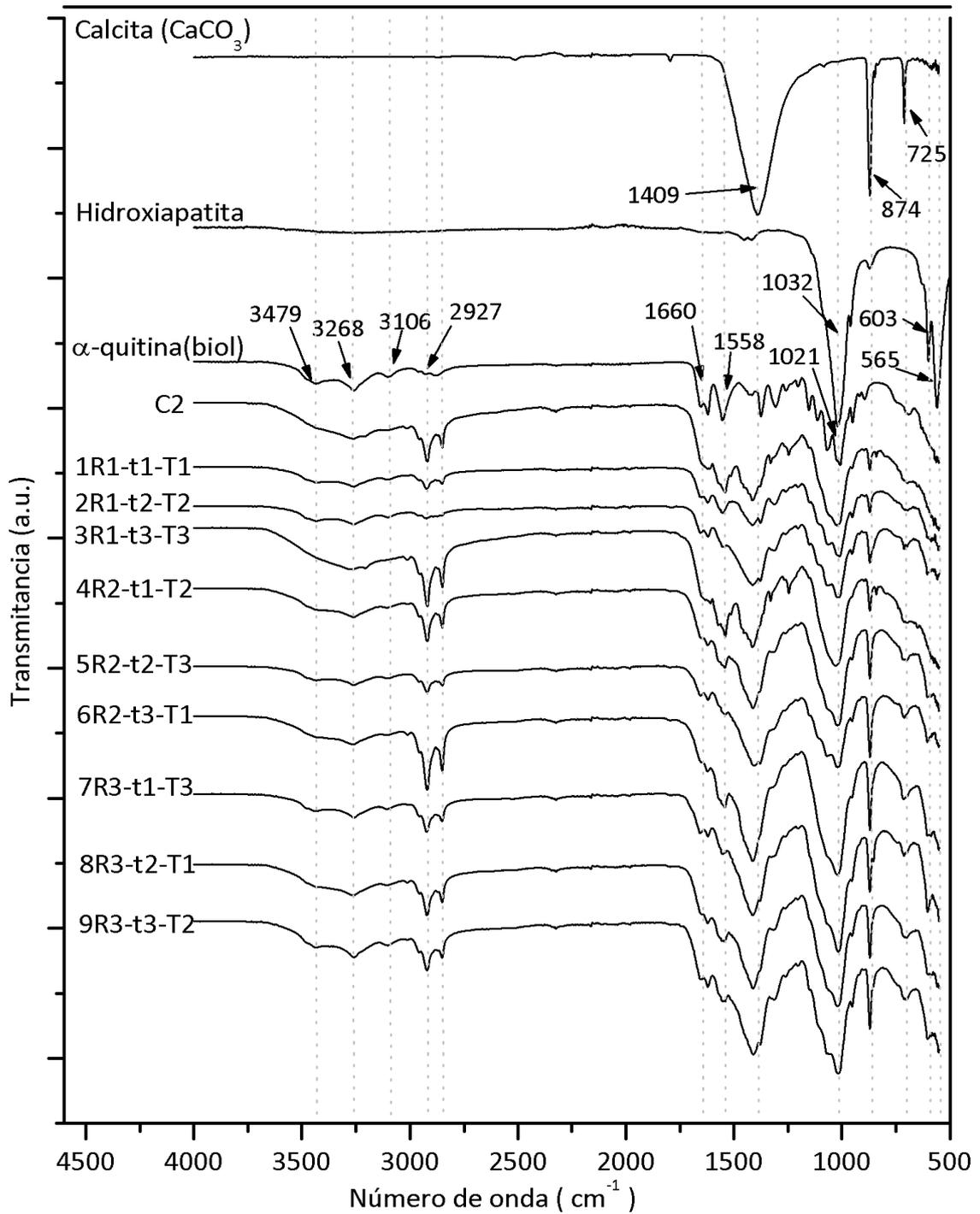
0.078 %S) y **3R1-t3-T3** ( $0.33 \pm 0.008$  %S); mientras que las medias más altas se obtuvieron con los tratamientos **9R3-t3-T2** ( $0.51 \pm 0.056$  %S) y **7R3-t1-T3** ( $0.49 \pm 0.046$  %S). Mediante la misma prueba estadística se encontró que los factores tiempo y temperatura no fueron significativos sobre el contenido de S. El factor relación sí fue significativo, con el nivel **R1** se registró la menor media ( $0.3 \pm 0.044$  % S) respecto de los otros niveles, es decir, para la variable porcentaje de S los valores menores se obtuvieron con el nivel **R1**.

De acuerdo con los resultados se encontró que los factores tiempo y temperatura no fueron significativos sobre la composición elemental de los tratamientos mediante la prueba de Tukey-Kramer por comparación de medias múltiple, (valor  $p \leq 0.05$ ). El factor relación fue significativo sobre la composición elemental de los tratamientos. Se obtuvo la menor cantidad de Ca con los niveles **R2** y **R3**, para el P con el nivel **R2**, para el K con los niveles **R1** y **R3**, y para el S con el nivel **R1**.

### **4.3. Caracterización estructural de fracciones sólidas obtenidas**

#### **4.3.1. Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA)**

En la **Figura 14** se muestran los espectros de IR obtenidos de las muestras de los tratamientos. Las bandas identificadas para todos los tratamientos se reportan en la **Tabla 11**, así como la literatura consultada. El espectro del testigo **C1** corresponde al control, muestra sin tratamiento (los espectros de **C1** y **C3** no presentaron diferencia respecto de este). Las bandas características de  $\alpha$ -quitina se compararon con las de una muestra de quitina obtenida por el método biológico (Cira et al., 2002), las bandas de grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  se compararon con una muestra de  $\text{CaCO}_3$  puro (Laboratorio Laitz S.A. de C.V.) y las bandas características de la hidroxiapatita se compraron con una muestra de hidroxiapatita (Sigma-Aldrich).



**Figura 14.** Espectros de IR obtenidos del testigo C2 y de las muestras tratadas, de CaCO<sub>3</sub> puro, hidroxiapatita y α-quitina obtenida por el método biológico (Cira et al., 2002).

**Tabla 11.-** Bandas características identificadas en los espectros de IR de las fracciones sólidas obtenidas con los tratamientos.

Frecuencia vibracional (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Referencia
3479	v <sub>as</sub> del OH	(Pavia, Lampman y Kriz, 1979)
3268	v <sub>as</sub> del NH	(Cárdenas, Cabrera, Taboada, & Miranda, 2004), (Seoudi y Nada 2007)
3106	v <sub>s</sub> del NH	
2927, 2850	v <sub>s</sub> del C-H	(Pavia, Lampman y Kriz, 1979)
1660 (doblete 1657, 1620)	v <sub>s</sub> del C=O (Amida I)	
1558	N-H (Amida II)	
1409	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	(Miller & Wilkins, 1952)
1032, 962	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	(Cárdenas et al., 2004)
1021	C-O	
874,725	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	

\* v<sub>as</sub> = Estiramiento asimétrico; v<sub>s</sub> = Estiramiento simétrico (tensión).

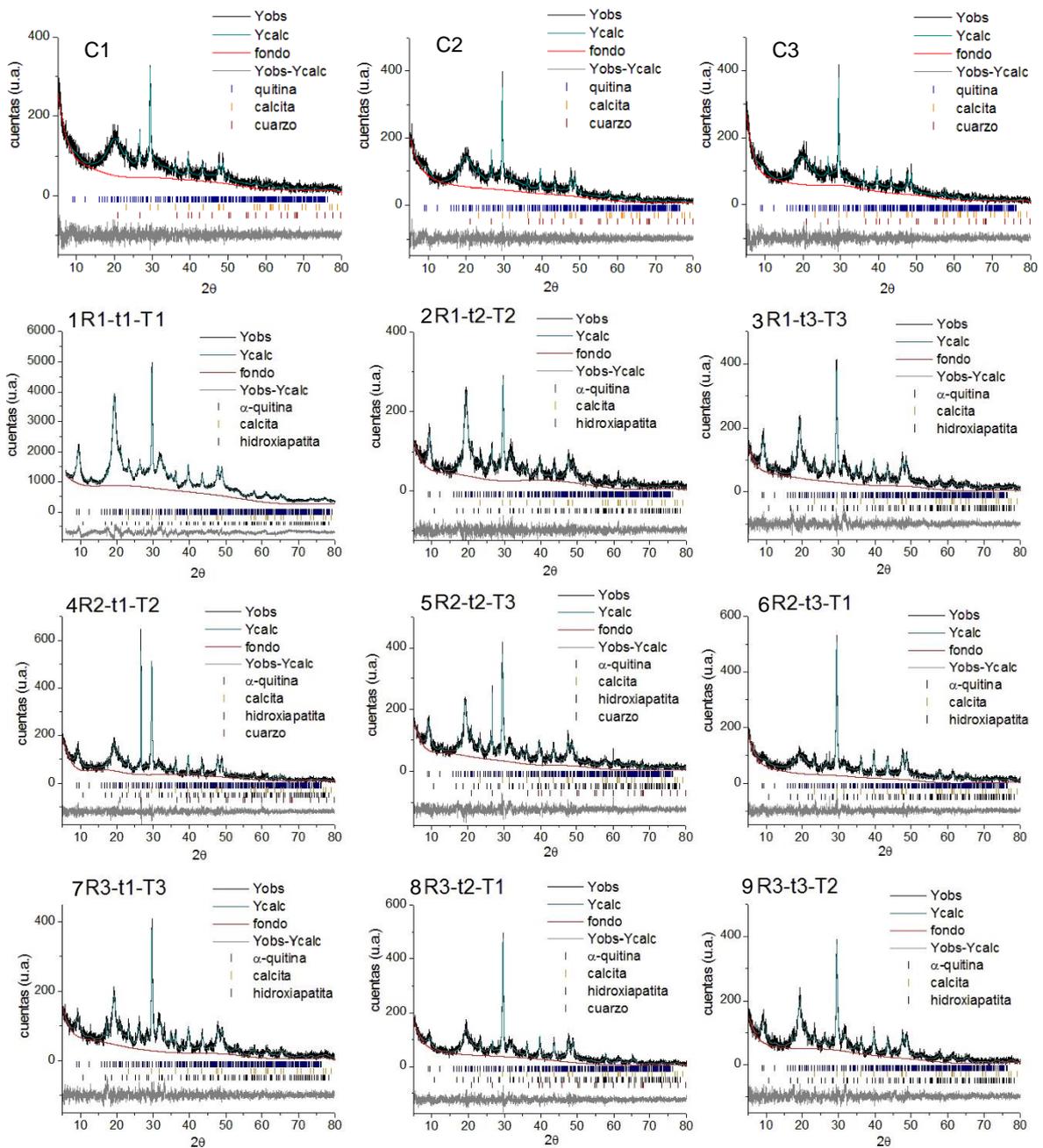
Las bandas en 3479 a 1558 cm<sup>-1</sup> y en 1021 cm<sup>-1</sup> corresponden a la  $\alpha$ -quitina, (Cárdenas et al., 2004; Jang, Kong, Jeong, Lee, & Nah, 2004; Seoudi & Nada, 2007). Estas bandas se observaron en todos los tratamientos. Las bandas de  $\alpha$ -quitina se observaron en todos los tratamientos, a excepción del testigo **C2** en la que aparece una banda en 1660 cm<sup>-1</sup>. Esta banda se atribuye a la presencia de proteínas, se ha descrito que estas afectan la intensidad y posición del doblete de la amida I (Barth, 2007; Duarte, Ferreira, Marvão, & Rocha, 2002).

Las bandas en 1032 y 962 cm<sup>-1</sup> corresponden al grupo fosfato PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, mientras que las bandas en 1409, 874 y 725 cm<sup>-1</sup> son características del grupo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (corresponden al mineral más abundante en el exoesqueleto de crustáceos, CaCO<sub>3</sub>) (Mikkelsen et al., 1997; Rahman & Halfar, 2014). En todos los tratamientos se observaron las bandas características de ambos grupos, esto corroboró la presencia de hidroxiapatita y CaCO<sub>3</sub>, minerales identificados también por DRX y MEB-EDS.

#### 4.3.2. Difracción de Rayos X de polvos (DRX)

En la **Figura 15** se muestran los patrones de difracción de rayos X ajustados por el método Rietveld. Los patrones de difracción **C1**, **C2** y **C3** corresponden a las muestras control que no fueron sometidas a los tratamientos con agua en estado subcrítico. En la **Tabla 12** se presentan los datos cristalográficos de las fases identificadas ( $\alpha$ -quitina, calcita, hidroxiapatita y cuarzo) y su cuantificación (en % wt); el diámetro del tamaño de dominio cristalino ecuatorial D (nm) (para  $\alpha$ -quitina e hidroxiapatita) y axial L (nm) para

hidroxiapatita; así como el factor de discrepancia  $R_F$  cuya definición se indica en el pie de figura y es un indicador útil del refinamiento. La altura y ancho de los picos que produce un compuesto en DRX aporta información de su cristalinidad. Entre más altos y delgados sean los picos, más cristalino será el compuesto. Por ejemplo, los picos de la calcita son notoriamente más altos y delgados que los obtenidos para la  $\alpha$ -quitina (**Figura 15**). Además, la altura de los picos es directamente proporcional al porcentaje en peso de la fase cristalina.



**Figura 15.** Patrones de difracción de rayos X ajustados por el método Rietveld. Los patrones de difracción C1, C2 y C3 corresponden a las muestras control y el panel de nueve a los tratamientos. La línea continua en negro corresponde al difractograma obtenido y la línea verde que la traslapa corresponde al ajuste calculado a partir de las fases identificadas. La línea en gris de la parte inferior indica qué tan bueno fue el ajuste. En rojo se observa el fondo o línea base que se ajustó. A continuación de esta última, las barras de color indican las reflexiones correspondientes a cada fase cristalina, en orden descendente: azul para  $\alpha$ -quitina, naranja para calcita, negro para hidroxiapatita y rojo para cuarzo.

**Tabla 12.** Datos cristalográficos y resultados de la cuantificación de las fases cristalinas identificadas. La relación Ca/P de la última columna, se determinó a partir de las proporciones en peso de calcita e hidroxiapatita listadas en la tabla.

Nombre Fórmula peso fórmula (g/mol) Grupo espacial Sistema cristalino Z parámetros reticulares (Å) Referencia	Fases identificadas											
	Quitina (C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> N) <sub>n</sub> 812.78 P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (19) Ortorrómbico 1 a = 4.750 b = 18.890 c = 10.333 Sikorski et al. (2009)			Calcita CaCO <sub>3</sub> 100.088 R-3c (167) Trigonal 6 a = 4.989 c = 17.062 ICSD-16710			Hidroxiapatita Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH 502.32 P6 <sub>3</sub> /m (176) Hexagonal 2 a = 9.432 c = 6.881 ICSD-22059, Kay et al. (1964)			Cuarzo SiO <sub>2</sub> 60.084 P3 <sub>2</sub> 21 (154) trigonal 3 a = 4.91 c = 5.40 ICSD-27826		
Muestra	% wt	D (nm)*	R <sub>F</sub> **	% wt	R <sub>F</sub> *	% wt	D (nm)*	L (nm)*	R <sub>F</sub> **	% wt	R <sub>F</sub> **	Ca/P
C1	95.4	1.7	0.08	4.3	0.08	N.D.				0.3	0.11	
C2	96.7	2.5	0.09	3.1	0.07	N.D.				0.2	0.11	
C3	95.9	2.7	0.09	3.8	0.08	N.D.				0.2	0.16	
		<b>2.3</b> (promedio)		<b>3.7</b> (promedio)								
1R1-t1-T1	72.0	7.0	0.03	10.0	0.04	18.0	3.3	6.3	0.03	N.D.		2.60
2R1-t2-T2	78.8	7.7	0.05	12.3	0.06	8.9	4.1	8.9	0.07	N.D.		3.98
3R1-t3-T3	68.6	7.9	0.04	16.9	0.03	14.5	2.4	1.0	0.04	N.D.		3.62
4R2-t1-T2	76.7	5.5	0.08	16.3	0.06	6.7	3.1	11.6	0.09	0.3	0.12	5.74
5R2-t2-T3	64.0	7.7	0.04	19.0	0.04	15.6	1.5	11.8	0.05	1.5	0.08	3.71
6R2-t3-T1	52.2	2.3	0.04	22.1	0.03	25.7	1.2	1.0	0.04	N.D.		3.11
7R3-t1-T3	76.0	6.7	0.05	16.1	0.04	8.0	2.4	15.8	0.06	N.D.		5.04
8R3-t2-T1	67.9	4.9	0.06	20.6	0.05	11.2	1.8	13.7	0.07	0.4	0.10	4.75
9R3-t3-T2	82.2	6.6	0.09	14.4	0.06	3.4	14.1	1.0	0.11	N.D.		8.76
		<b>6.3</b> (promedio)				<b>3.8</b> (promedio)	<b>7.9</b> (promedio)					<b>4.59</b> (promedio)

\* En el modelo monoaxial usado para el tamaño de cristalito con el eje a lo largo de la dirección [001] (eje c), D y L son los tamaños en dirección ecuatorial y dominio axial respectivamente.

\*\* El valor de discrepancia de Rietveld se obtuvo mediante  $R_F = (\sum_{hkl} |F_{obs,hkl} - F_{calc,hkl}|) / (\sum_{hkl} |F_{obs,hkl}|)$  donde  $F_{obs,hkl}$  y  $F_{calc,hkl}$  son las amplitudes del factor estructura observados y calculados para la fase cristalina específica. Es ideal que el valor de  $R_F$  sea menor a 0.1.

N. D. = No detectable.

La  $\alpha$ -quitina y los polimorfos de  $\text{CaCO}_3$ , calcita, aragonita y  $\text{CaCO}_3$  amorfo, son las estructuras más estudiadas el exoesqueleto de camarón como *Pandalus borealis* (Mikkelsen et al., 1997) y *Penaeus aztecus* (Heredia et al., 2007). Se ha descrito la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en fase amorfa o cristalina en el exoesqueleto de crustáceos dependiendo de factores ambientales y el proceso de biomineralización que está estrechamente ligada al ciclo de muda de estos organismos (Luquet G. & Marin F. 2004; Neues et al., 2011). De acuerdo con la hipótesis planteada, se esperaba que la fase cristalina de  $\alpha$ -quitina predominaría respecto de la calcita en los difractogramas de los tratamientos debido a la remoción de proteínas y minerales ( $\text{CaCO}_3$ ). Sin embargo, la altura de los picos de calcita aumentó respecto de los testigos y se identificó la fase cristalina de hidroxiapatita.

Los resultados de la **Tabla 12** muestran que el porcentaje de fase cristalina de calcita en los tratamientos es mayor que en los testigos. Con los tratamientos **6R2-t3-T1** y **1R1-t1-T1** se obtuvieron el mayor y menor porcentaje de calcita con 22.1 y 10 %wt respectivamente, mientras que en los testigos el porcentaje tuvo una media de 3.7 %wt. El aumento de la fase cristalina de calcita se atribuye al efecto de la presión y temperatura de los tratamientos, es decir, se obtuvo calcita a partir del  $\text{CaCO}_3$  amorfo debido a las condiciones ensayadas. Se ha descrito que el  $\text{CaCO}_3$  amorfo es inestable y, por lo tanto, altamente reactivo; en crustáceos (Becker, Ziegler, & Epple, 2005) y moluscos (Fratzl, Fischer, Svoboda, & Aizenberg, 2010) esto permite que el  $\text{CaCO}_3$  amorfo se transforme en calcita y aragonita para brindar dureza en ciertas estructuras. La presencia de la calcita se corroboró por IRTF-RTA y MEB-EDS. Mediante IRTF-RTA se identificaron bandas características del grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  (**Figura 14** y **Tabla 11**). Mediante MEB se observaron diferentes morfologías de estructuras cristalinas en los tratamientos (**Figura 24-29**), y el análisis de EDS reveló que están compuestas principalmente por C, O y Ca (**Tabla 14 y 15**); mientras que en las micrografías del testigo (**C2, Figura 18-20**) se observaron morfologías de minerales en estado amorfo compuestas principalmente por C, O y Ca, pero que contienen otros elementos en porcentajes menores (**Tabla 13**).

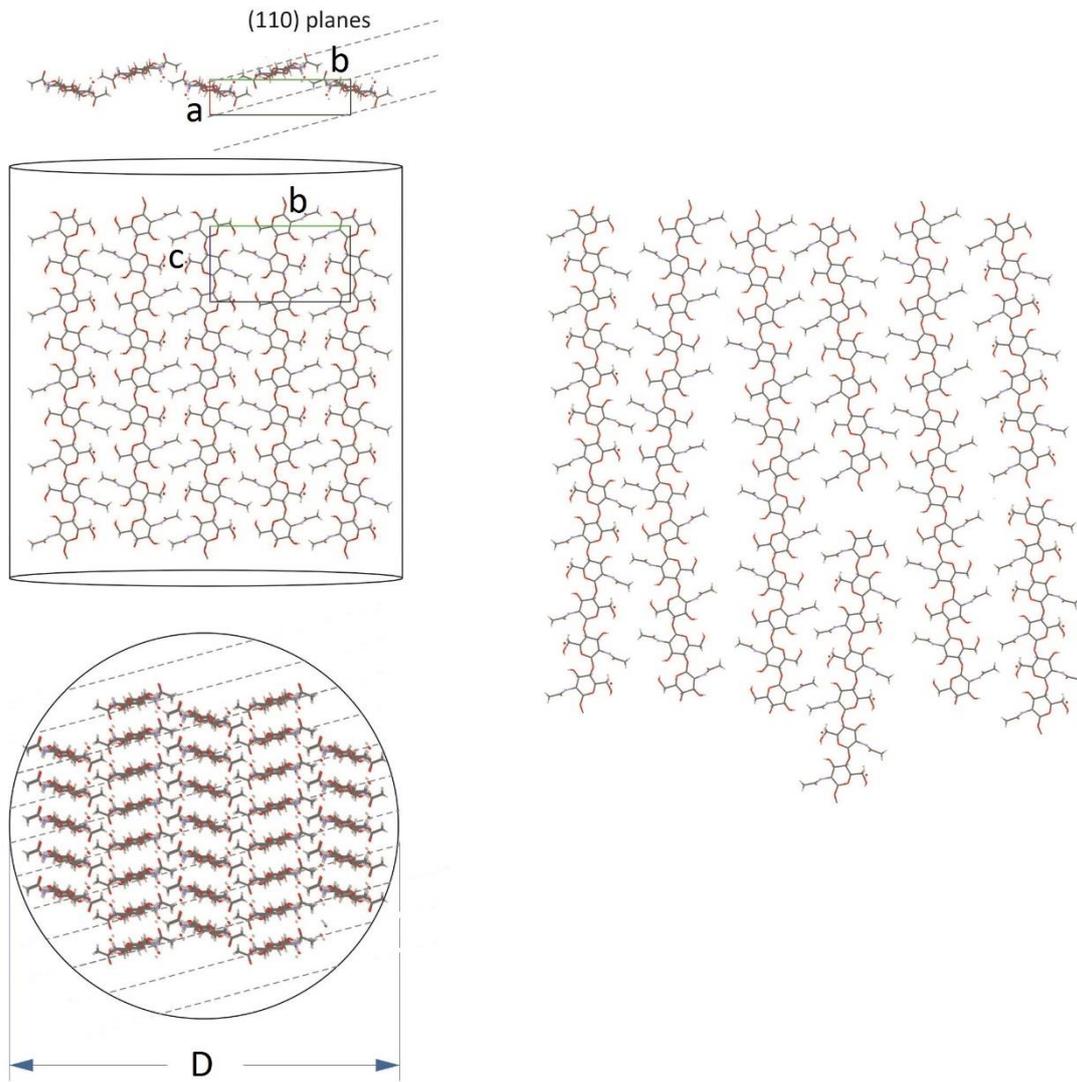
La fase cristalina de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) se identificó en los testigos **C1** y **C3**, y en los tratamientos **4R2-t1-T2**, **5R2-t2-T3** y **8R3-t2-T1**, fue incluida en el refinamiento (**Figura 15** y **Tabla 12**) debido a los picos intensos que produce. La intensidad integrada de la reflexión más intensa de esta fase, es directamente proporcional % wt de la fase y en todas las muestras es

menor al 1.5 % wt en comparación con la fase de quitina, calcita e hidroxiapatita. En todas las muestras, la presencia de SiO<sub>2</sub> se atribuye a la ingesta de alimentos de los crustáceos principalmente algas (Neues et al., 2011; Spinde et al., 2011). El Si también fue identificado y cuantificado por análisis de EDS en el testigo **C2 (Figura 19 y Tabla 13)**.

La fase cristalina de hidroxiapatita se identificó en los difractogramas de todos los tratamientos, pero no en los testigos (**Figura 15**). Con el tratamiento **1R1-t1-T1** se obtuvo el porcentaje menor de hidroxiapatita (3.4%) (**Tabla 12**), y con el resto de tratamientos se obtuvieron valores superiores al 6%. El porcentaje mayor se obtuvo con el tratamiento **6R2-t3-T1** (25.7%) (**Tabla 12**), mismo que registró el mayor porcentaje de fase cristalina de calcita. En la literatura se ha descrito la presencia de este mineral en estructuras especializadas tipo martillo del camarón *Odontodactylus scyllarus* (Weaver et al., 2012), pero no en camarones de consumo; y varios autores han estudiado el método hidrotermal para sintetizar hidroxiapatita a partir de fuentes marinas ricas en aragonita (polimorfo del CaCO<sub>3</sub>) a las que se añade una fuente de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> externa (entre 120 a 200 °C) (Jinawath, Polchai, & Yoshimura, 2002; Yoshimura et al., 2004). En los tratamientos llevados a cabo la fuente de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> presente al inicio en las muestras: mediante FRX se cuantificó el P como uno de los elementos presentes en mayor cantidad (**Tabla 6**) y mediante espectroscopia IRTF-RTA se identificaron las bandas características de este grupo funcional (**Figura 14 y Tabla 11**). Se ha descrito la presencia de fosfato de calcio amorfo (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) en crustáceos (Becker et al., 2005; Boßelmann et al., 2007); por lo tanto, es factible que la hidroxiapatita se formará *in situ* a partir de este precursor de fosfato. Además, mediante MEB se observaron estructuras con morfología de hojuela (**Figura 28**) que están compuestas principalmente por C, O, P y Ca (**Tabla 15**), que pueden ser de hidroxiapatita. Sin embargo, los nanocristales de hidroxiapatita obtenidos son apenas del tamaño de la celda unidad. La hidroxiapatita tiene propiedades bioactivas y de biocompatibilidad, mismas que permiten su aplicación en el campo biomédico para la regeneración de hueso, Hou et al., en 2016 presentaron un artículo de revisión donde resumen dichas propiedades y aplicaciones.

En cuanto a la fase cristalina de  $\alpha$ -quitina (**Tabla 12**), se observa que el diámetro de las nanofibrillas en todos los tratamientos (promedio de 6.3 nm) es mayor que en los testigos (promedio de 2.3 nm). Como se describió en el capítulo de antecedentes, las cadenas de  $\alpha$ -quitina se acomodan formando nanofibrillas con 3 nm de diámetro (Atkins, 1985; Raabe

et al., 2007) que están rodeadas por proteínas y minerales (**Figura 22**). El incremento en el diámetro de las nanofibrillas se atribuye al rearrreglo de las cadenas de  $\alpha$ -quitina debido a la remoción de proteína en los tratamientos ensayados. En la **Figura 16** se observa un esquema del diámetro de una nanofibrilla de  $\alpha$ -quitina cuando las cadenas se encuentran ordenadas y cuando están desordenadas.



**Figura 16.** Esquema del arreglo de las cadenas de  $\alpha$ -quitina y el diámetro (D) de nanofibrilla que producen (izquierda). Esquema de cadenas de  $\alpha$ -quitina desordenadas (derecha).

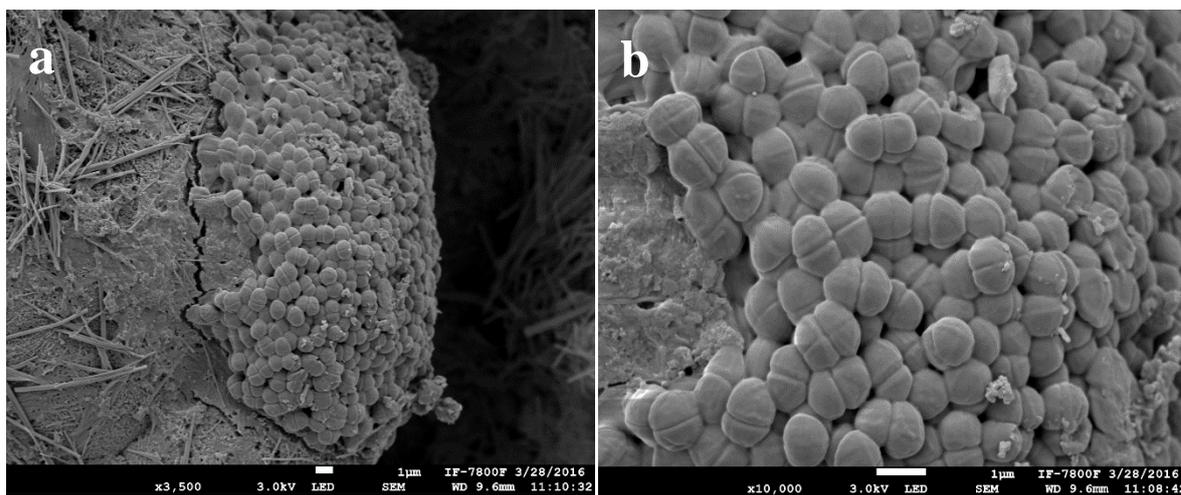
El cálculo del porcentaje en peso de las fases cristalinas (**Tabla 12**) considera las fases identificadas. En los testigos el porcentaje se calculó considerando las fases de  $\alpha$ -quitina, calcita y trazas de cuarzo; mientras que en los tratamientos se consideró también la fase de hidroxiapatita y el porcentaje de calcita aumento considerablemente como se mencionó

anteriormente. Debido a lo anterior el porcentaje de fase cristalina de  $\alpha$ -quitina en los testigos aparenta ser mayor que en los tratamientos. El tratamiento que registró el mayor porcentaje de fase cristalina de  $\alpha$ -quitina fue el **9R3-t3-T2** con el 82.2 %wt. Se esperaba que los resultados de rendimiento de proteína soluble y la cuantificación de fase cristalina de  $\alpha$ -quitina tuvieran relación, es decir, que con el tratamiento que presentó mayor remoción de proteínas también se hubiera registrado el mayor porcentaje de fase cristalina de  $\alpha$ -quitina. Para ello se necesitan realizar técnicas para caracterizar las proteínas recuperadas.

#### 4.3.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) con Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X por de Energía (EDS) acoplada

Se analizó por MEB-EDS: la muestra control **C2 (Figura 17-20)** y las muestras tratadas **4R2-t1-T2 (Figura 21, 27, 28 y 29c,d)** que obtuvo el mayor rendimiento de proteína soluble en la fracción líquida, la muestra **6R2-t3-T1 (Figura 24-26 y 29a,b)** que registró el mayor porcentaje de fases cristalinas calcita e hidroxapatita por DRX y la muestra **9R2-t3-T2 (Figura 23)** que obtuvo el mayor porcentaje en peso de  $\alpha$ -quitina

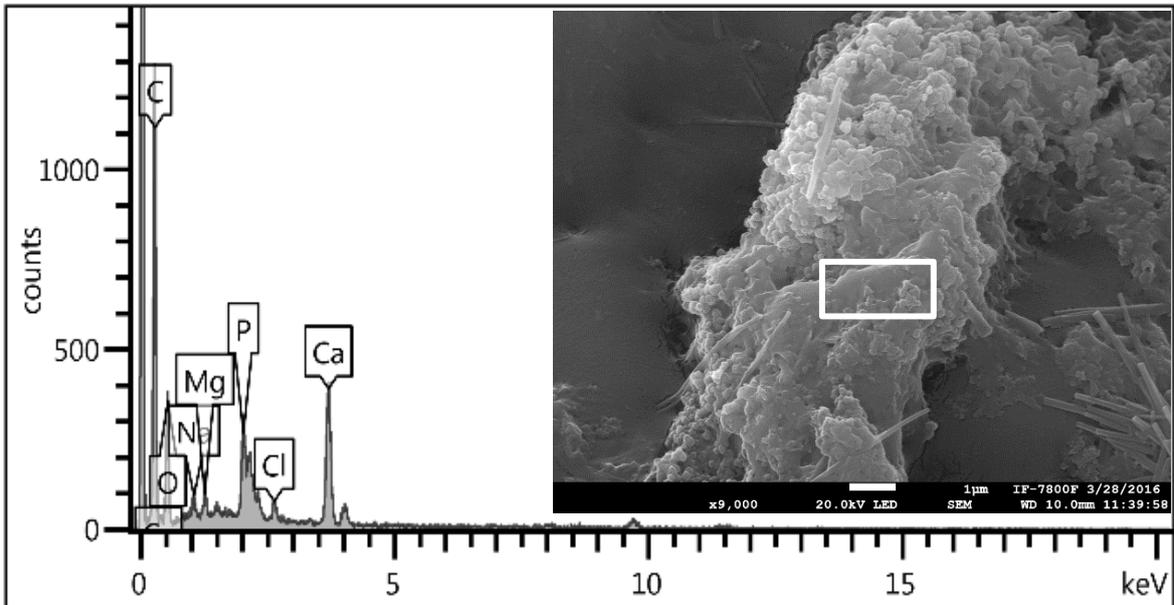
En las micrografías del testigo **C2 (Figura 17)** a x3,500 y x10,000 aumentos se observa una colonia de bacterias sobre la superficie. Es posible identificarlas debido a la morfología que presentan, sin embargo, esta información no es suficiente para determinar la especie.



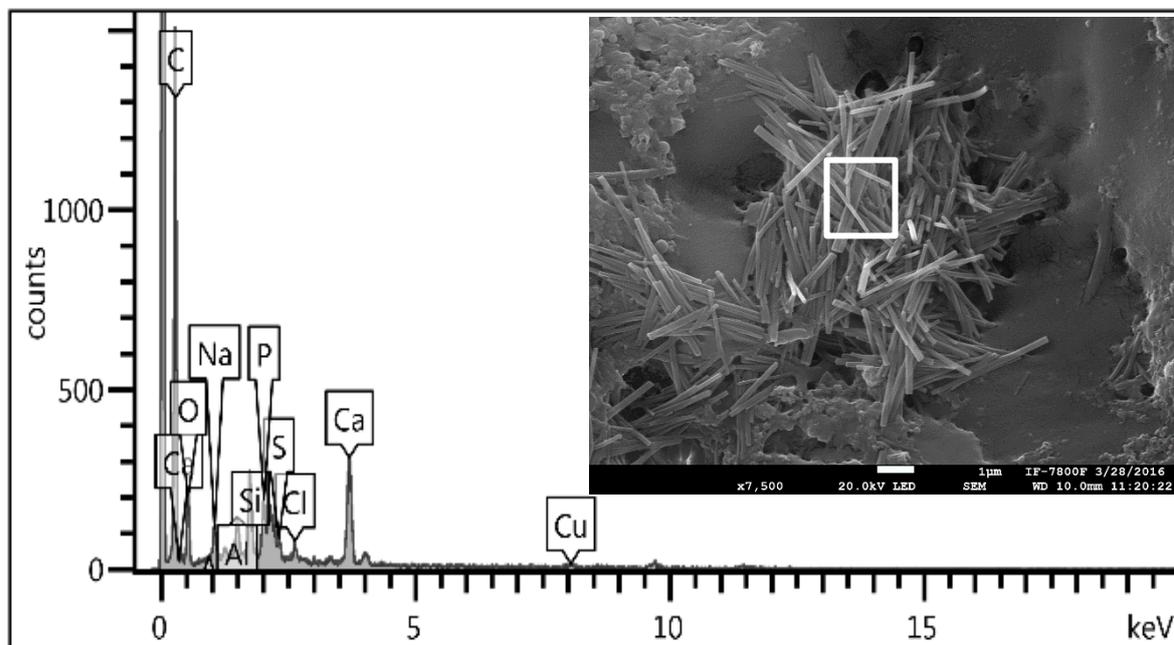
**Figura 17.** Micrografía de una colonia de bacterias a 3,500X (izquierda) y 10,000X (derecha) aumentos sobre la superficie del testigo C2.

En las micrografías de las **Figura 18-20** se observan diferentes estructuras, que por análisis de EDS (**Tabla 13**) están compuestos por C, O y Ca principalmente y P, Na, Mg, Cu, Cl, Si, Al y S estos menores al 2%.

En la **Figura 18** se observa un aglomerado con minerales en estado amorfo, mientras que en la **Figura 19** se observa una morfología tipo aguja y el análisis por EDS indica que está compuesto por C, O y Ca principalmente; en la literatura se han descrito como aragonita, uno de los polimorfos del  $\text{CaCO}_3$  encontrado en crustáceos (Hou et al., 2016).

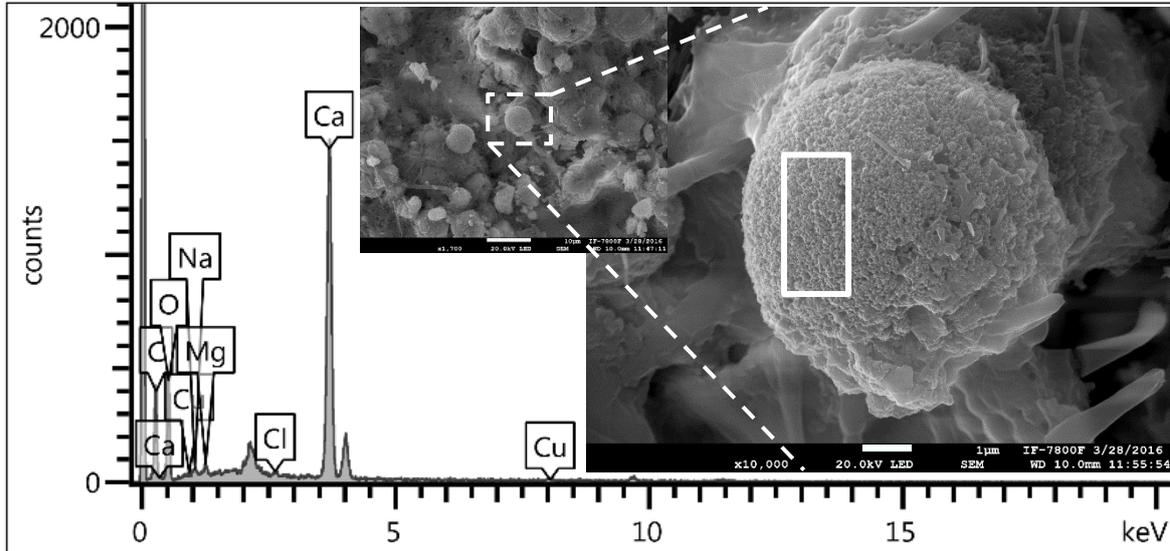


**Figura 18.** Microanálisis por EDS del testigo C2 (izquierda) y micrografía a 9,000X aumentos de un aglomerado de minerales (derecha).



**Figura 19.** Microanálisis por EDS del testigo C2 (izquierda) y micrografía a 7,500X aumentos de estructuras con morfología de agujas (derecha).

El análisis de EDS sobre la esferulita observada a 10,000X aumentos reveló que su composición también consiste en C, O y Ca principalmente (**Tabla 13**). También se cuantificaron otros elementos como el Mg, Cu, Na y Cl en cantidad menor al 1 %. El Ca se encontró en mayor proporción respecto de las estructuras descritas anteriormente.

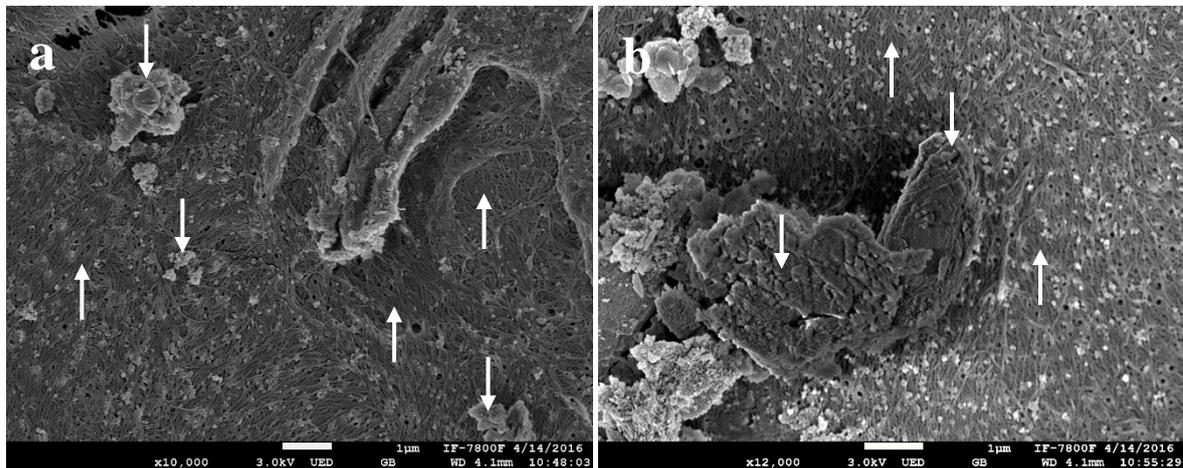


**Figura 20.** Microanálisis por EDS del testigo C2 (izquierda) y micrografías a 1,700X aumentos y 10,000X aumentos de morfologías tipo esferulita (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco.

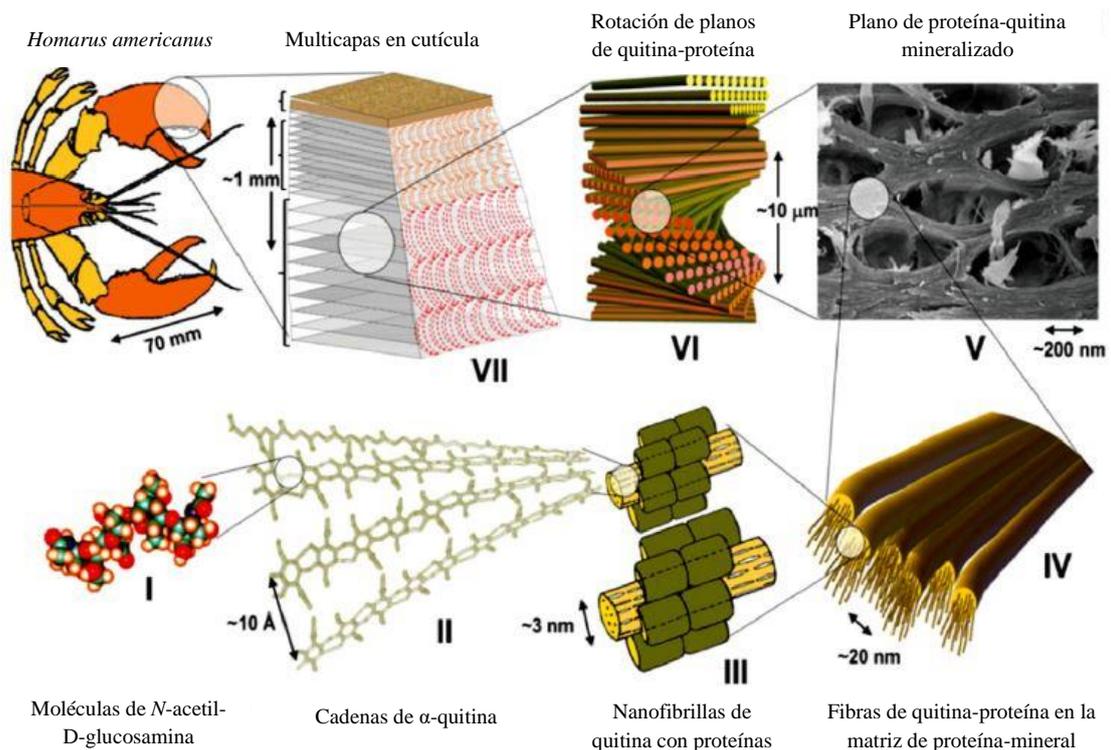
**Tabla 13.** Composición elemental de la muestra C2 en diferentes zonas.

Elemento	Cantidad estimada en C2 (%wt)			Estándar
	Figura 18	Figura 19	Figura 20	
C	64.15± 0.87	73.37 ± 0.77	29.77 ± 0.93	C Vit
O	27.31 ±0.88	17.48± 0.77	44.06±0.96	SiO <sub>2</sub>
Na	0.74 ± 0.11	0.92 ± 0.10	0.61 ± 0.16	Albite
Al	-	0.74 ± 0.06	-	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Si	-	1.41 ± 0.07	-	SiO <sub>2</sub>
Mg	0.56 ± 0.08	-	0.55 ± 0.10	MgO
P	1.65 ± 0.11	1.11 ± 0.09	-	GaP
S	-	0.50 ± 0.07	-	FeS <sub>2</sub>
Cl	0.50 ± 0.06	0.37 ± 0.05	0.26 ± 0.06	NaCl
Ca	5.08 ± 0.15	3.62 ± 0.12	24.15±0.50	Wollastonite
Cu	-	0.49 ± 0.13	0.61 ± 0.19	Cu

Las micrografías de la (Figura 21) corresponden al tratamiento 4R2-t1-T2. En ambas micrografías se observan estructuras fibrilares sobre la superficie que corresponden a las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina (Figura 22 sección IV) que han sido descritas en estudios estructurales del exoesqueleto de langosta *Homarus americanus* (Raabe et al., 2007). Las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina también se observaron en las micrografías de los demás tratamientos analizados por MEB (Figura 23, 24d y Figura 23b). En el testigo C2 (Figura 18-20) además de morfologías minerales, la superficie se observan plana, es decir, no se observan las nanofibrillas, lo que evidencia la remoción de proteína en las muestras sometidas a los tratamientos. Sin embargo, aún se observan minerales en estado amorfo sobre la superficie. En la Figura 21 se observan aglomerados de minerales en estado amorfo y con morfología semicristalina del tamaño de  $\mu\text{m}$  (Figura 21b).

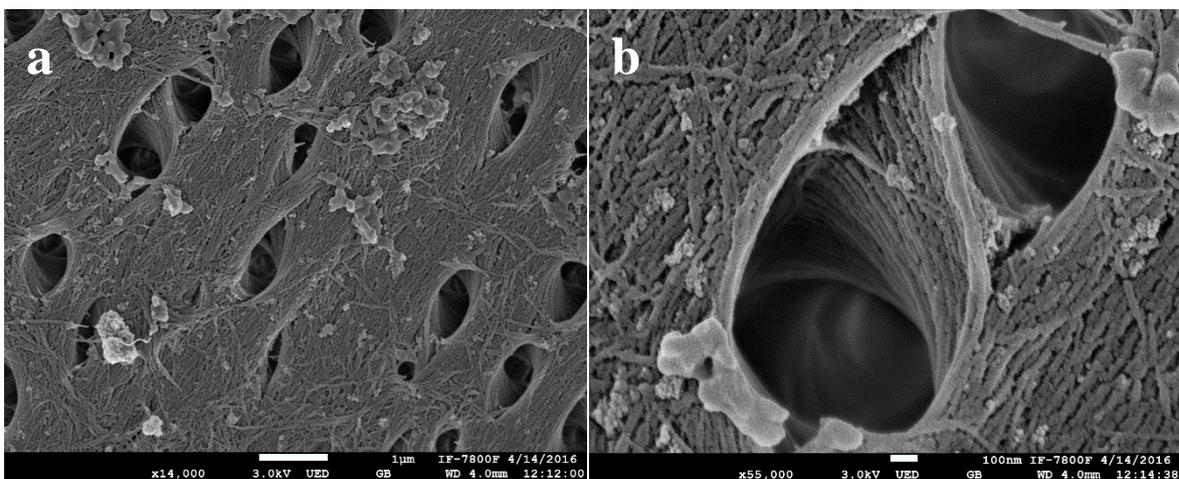


**Figura 21.** Micrografías de la muestra 4R2-t1-T2: las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina y los minerales en estado amorfo se indican con flechas hacia arriba y hacia abajo respectivamente. a) Predominan las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina sobre la superficie. b) Se observan minerales con morfología semicristalina del orden de  $\mu\text{m}$ .



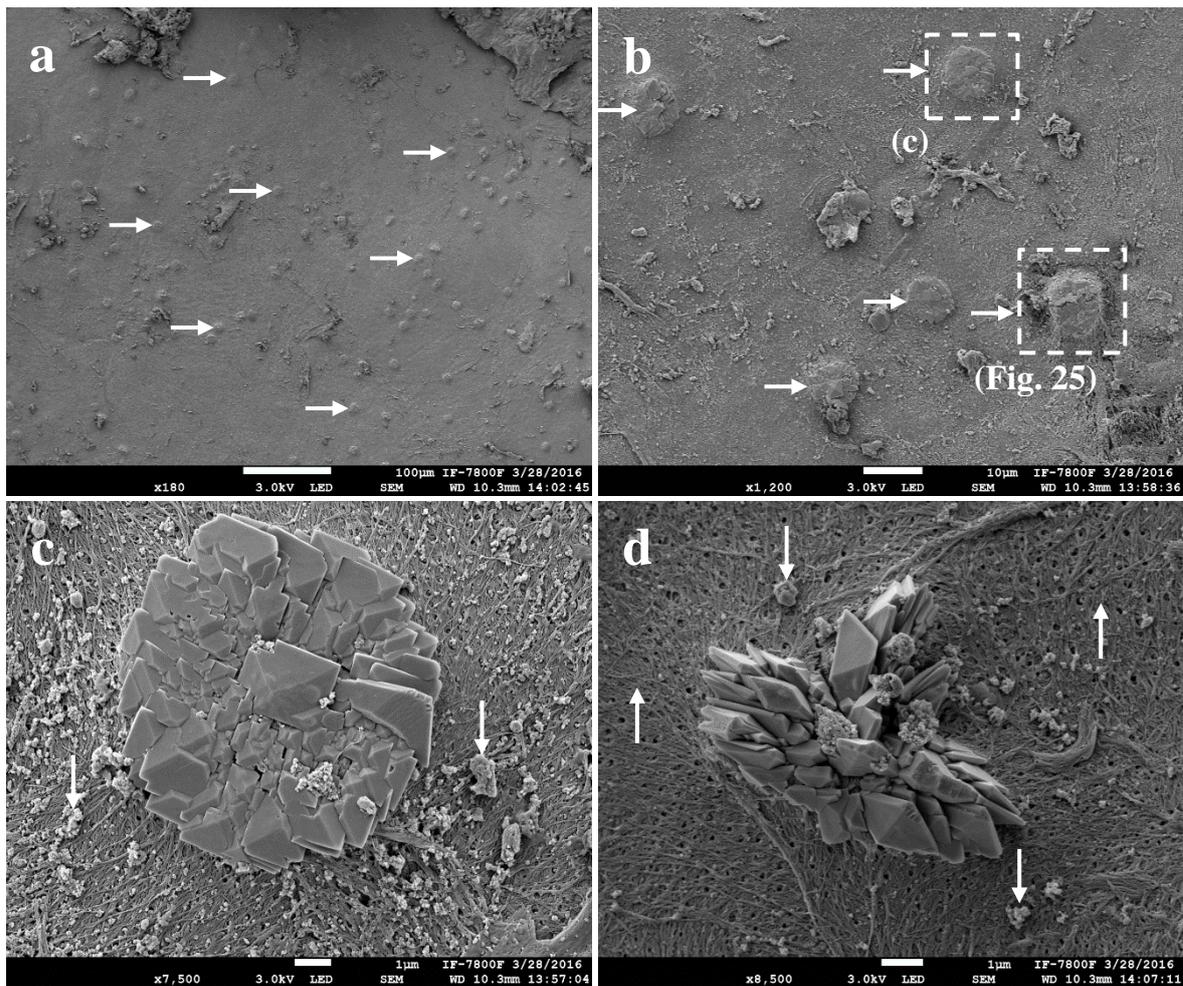
**Figura 22.** Estructura jerárquica del exoesqueleto de langosta *Homarus americanus* (Raabe et al., 2007).

Las micrografías de la **Figura 23** corresponden al tratamiento **9R3-t3-T2**. En estas se observan estructuras tipo poro formadas por las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina, mismas que fueron descritas por Raabe et al., en 2007 en el exoesqueleto de langosta **Figura 22 sección V**. En la micrografía de la **Figura 23b** se observa la rotación de  $180^\circ$  de los planos formados por fibras de quitina-proteína cuando se superpone un plano sobre otro; el esquema de la **Figura 12 sección VI** representa esta superposición de planos.



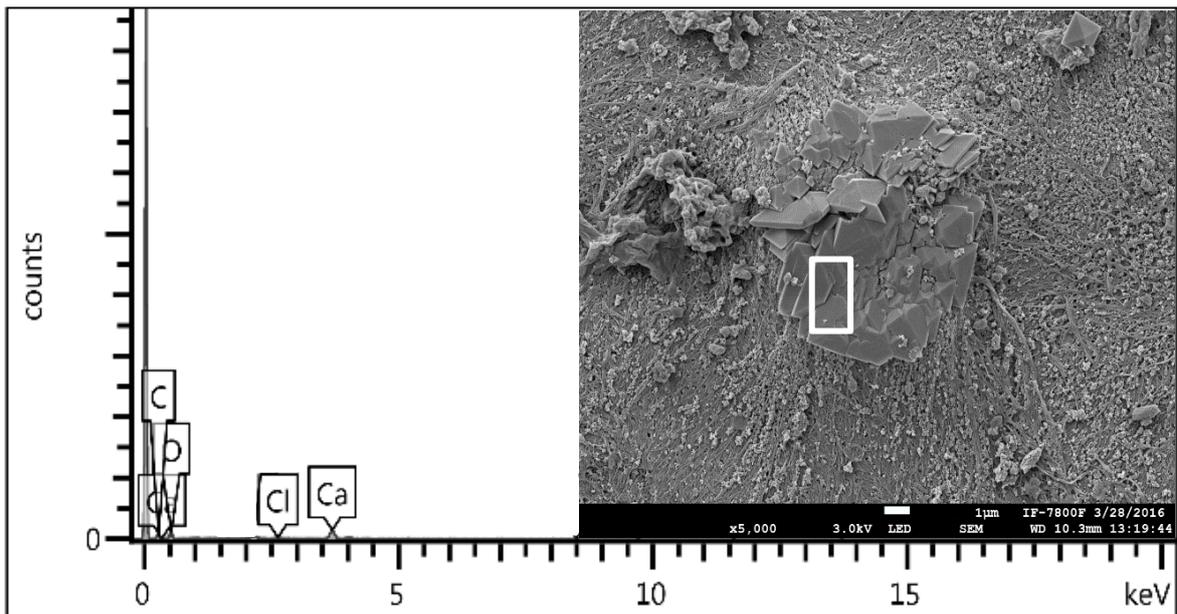
**Figura 23.** Micrografías del tratamiento 9R2-t3-T2. a) Estructuras tipo poro sobre la superficie a 14,000X aumentos. b) Estructura observada a 55,000X aumentos.

Las micrografías de la **Figura 24** corresponden al tratamiento **6R2-t3-T1**. En la micrografía de la **Figura 24a** se observaron varias estructuras cristalinas que forman montículos sobre la superficie a 180X aumentos. En la micrografía de la **Figura 24b** se observan 5 de estas estructuras a 1,200X aumentos (**Figura 24b**). En las micrografías de la **Figura 24c y 24d** se observan dos morfologías de los montículos cristalinos; en las que se observan nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina, y en la **Figura 24d** se observan las estructuras tipo poro descritas anteriormente.



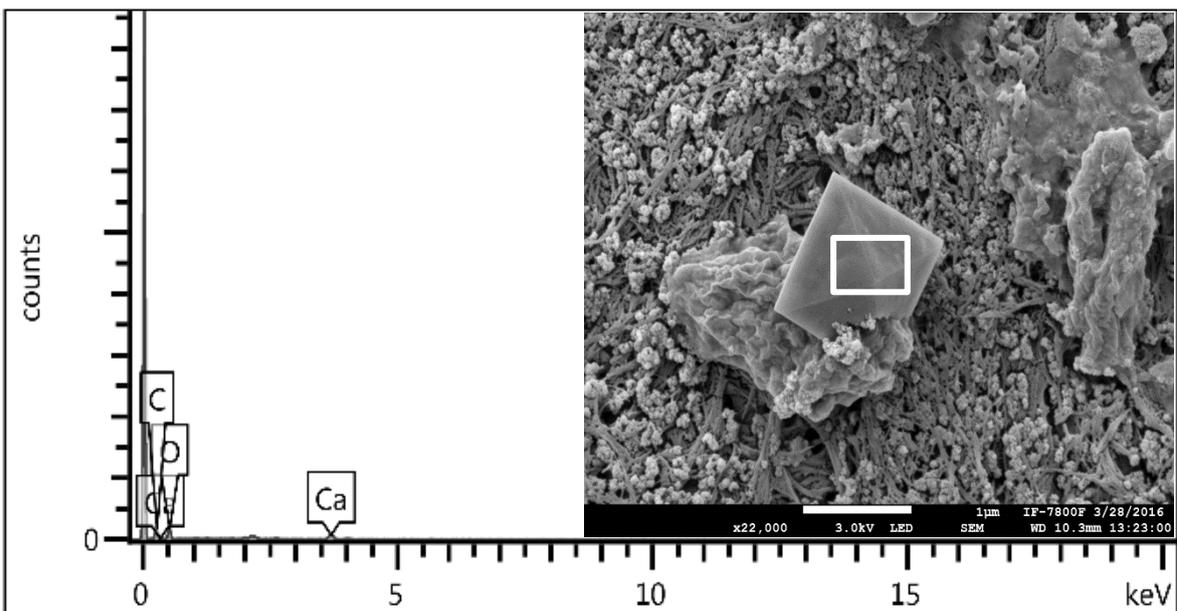
**Figura 24.** Micrografías del tratamiento 6R2-t3-T1 donde se observan montículos de mineral a diferentes aumentos: a) 180X, b) 1,200X, c) 7,500X y d) 8,500X. Las nanofibrillas de  $\alpha$ -quitina y los minerales en estado amorfo se indican con flechas hacia arriba y hacia abajo respectivamente

La micrografía de la **Figura 25** corresponde al tratamiento **6R2-t3-T1**. En esta se observa el montículo de cristales de la **Figura 24b** a 5,000X aumentos y de acuerdo al análisis de EDS (**Tabla 14**) está compuesto principalmente por C, O y Ca, también Cl en menos del 2%.



**Figura 25.** Microanálisis por EDS de la muestra 6R2-t3-T1 (izquierda) y micrografía 5,000X aumentos de un montículo de minerales cristalinos (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco.

La micrografía de la **Figura 26** corresponde al tratamiento **6R2-t3-T1**. En esta se observa un cristalito octaedral a x22000 aumentos que está compuesto por C, O y Ca (**Tabla 14**). Se observa que las estructuras cristalinas de las **Figuras 25 y 26** están compuestas por C, O y Ca (**Tabla 14**) a comparación de las estructuras observadas en el testigo **C2** (**Figura 18-20**) que también poseen P, Na, Mg, Cu, Cl, Si, Al y S en menos del 2 %wt (**Tabla 13**).

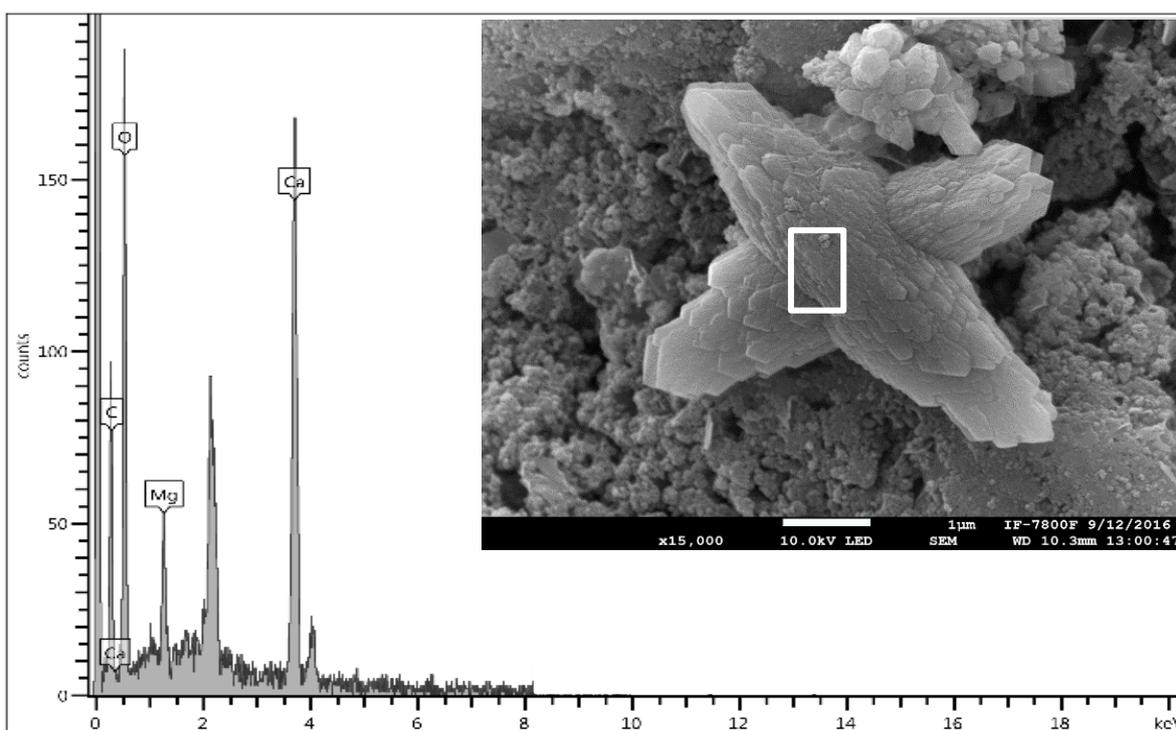


**Figura 26.** Microanálisis por EDS de la muestra 6R2-t3-T1 (izquierda) y micrografía a 22,000X aumentos de un cristalito octaedral (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco.

**Tabla 14.** Composición elemental de las estructuras observadas en las micrográficas de la muestra 6R2-t3-T1.

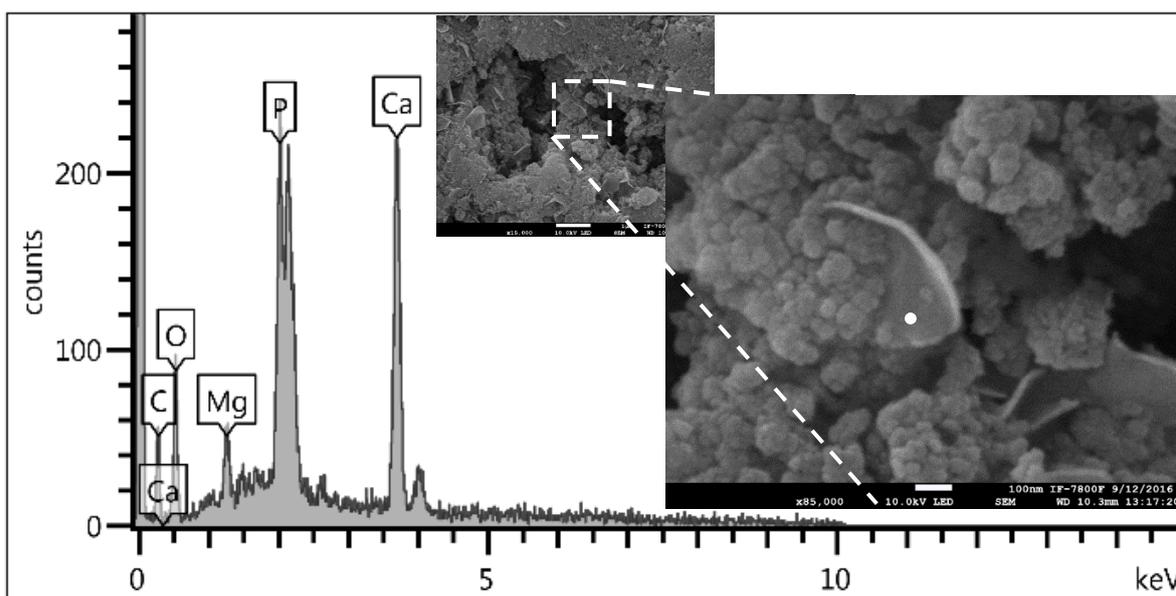
Elemento	Cantidad estimada (% wt)		Estándar
	Figura 25	Figura 26	
C	19.88 ± 1.85	36.42 ± 1.84	C Vit
O	45.52 ± 2.51	48.82 ± 2.08	SiO <sub>2</sub>
Cl	1.33 ± 0.34	-	NaCl
Ca	33.27 ± 1.74	14.76 ± 0.9	Wollastonite

La micrografía de la **Figura 27** corresponde a la muestra **4R2-t1-T2**. Se observa una estructura cristalina del orden de  $\mu\text{m}$  sobre la que realizó análisis de EDS. Se encontró que está compuesta principalmente por C, O y Ca, también contiene Mg en menos del 3 % wt (**Tabla 15**). En el resto de la superficie se observan minerales en estado amorfo.



**Figura 27.** Microanálisis por EDS de la muestra 4R2-t1-T2 (izquierda) y micrografía a 15,000X aumentos de un cristalito (derecha). El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada en recuadro blanco.

La micrografía de la **Figura 28** también corresponde al tratamiento **4R2-t1-T2**. En esta se observan varias estructuras con morfología de hojuelas. En análisis de EDS realizado sobre una de estas estructuras reveló que está compuesta principalmente por C, O, Ca y P, también contiene Mg alrededor del 2% wt (**Tabla 15**). De acuerdo con su composición y con los resultados de DRX (**Figura 15 y Tabla 12**) podrían ser de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ).

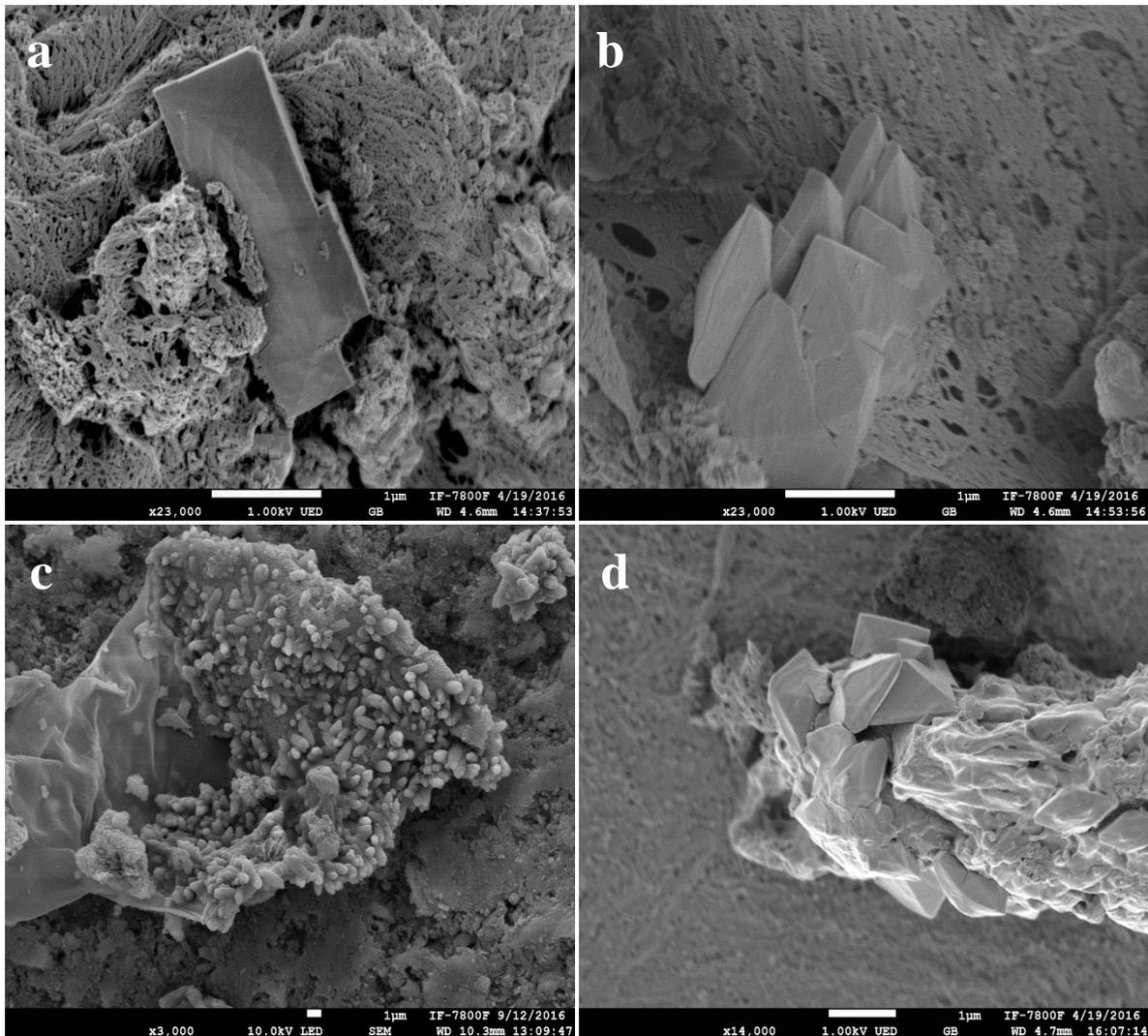


**Figura 28.** Microanálisis por EDS de la muestra 4R2-t1-T2 (izquierda) y micrografías a 15,000X y 85,000X aumentos de una estructura con morfología de hojuela. El microanálisis de EDS se realizó sobre la zona indicada con un punto blanco.

**Tabla 15.** Composición elemental de las estructuras observadas en las micrografías de la muestra 4R2-t1-T2.

Elemento	Cantidad estimada (%wt)		Estándar
	Figura 27	Figura 28	
<b>C</b>	14.80 ± 1.29	15.47 ± 1.59	C Vit
<b>O</b>	42.84 ± 1.398	21.78 ± 1.69	SiO <sub>2</sub>
<b>Mg</b>	2.44 ± 0.34	2.09 ± 0.31	MgO
<b>P</b>	-	13.54 ± 0.88	GaP
<b>Ca</b>	39.91 ± 1.62	47.13 ± 1.59	Wollastonite

En las micrografías de la **Figura 29** se observan estructuras cristalinas con diferentes morfologías sobre la superficie de las muestras **6R2-t3-T1** y **4R2-t1-T2**.



**Figura 29.** Micrografías de diferentes estructuras cristalinas sobre la superficie de las muestras. Tratamiento 6R2-t3-T1 a) y b) a 23,000X aumentos. Tratamiento 4R2-t1-T2 c) a 3,000X aumentos y d) a 14,000X aumentos.

#### 4.4. Análisis químico proximal

El contenido de humedad de la muestra de camarón fue del 73.21% y la composición porcentual en base seca (bs) es de  $51.45 \pm 0.17$  % de proteína y  $25.05 \pm 0.08$  % de ceniza. Para la muestra **4R2-t1-T2** el contenido de proteína es de  $2.03 \pm 0.28$  %; con  $36.81 \pm 0.80$  % de cenizas y  $96.06 \pm 0.54$  % desproteínización, que resultó el tratamiento más eficiente para la remoción de proteína.

## 5. CONCLUSIONES

Se obtuvo quitina calcárea a partir de cefalotórax de camarón con agua bajo condiciones subcríticas.

El diseño experimental de Taguchi permitió optimizar el número de experimentos con los niveles tiempo, temperatura y relación muestra de cefalotórax/agua destilada (CW/dH<sub>2</sub>O).

El mayor rendimiento de proteína soluble de acuerdo al modelo Taguchi fue de 140.73 mg de proteína/g de CW en el tratamiento de la relación 0.09 CW/dH<sub>2</sub>O durante 5 min de tratamiento a 260 °C.

No se encontraron diferencias significativas por la prueba de comparación de medias múltiples Tukey-Kramer en la composición elemental y valor de pH.

El mayor %wt (82.2) de  $\alpha$ -quitina se obtuvo con la relación 0.17 CW/dH<sub>2</sub>O durante 30 min de tratamiento a 230 °C.

Los tratamientos favorecen la cristalización de minerales y producen una mayor cristalización de las fibras de  $\alpha$ -quitina.

El tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas resultó efectivo para remover proteína, pero no se observaron cambios significativos en la remoción de minerales.

## 6. PERSPECTIVAS

- ✓ La  $\alpha$ -quitina calcárea obtenida con los tratamientos propuestos puede ser sometida a un segundo tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas para evaluar la posible remoción de minerales.
- ✓ En estudios futuros se podría evaluar la extracción de  $\alpha$ -quitina a partir de cefalotórax de camarón empleando agua bajo condiciones subcríticas ajustada a un pH inicial de 6 o 7.
- ✓ Acondicionar el reactor con un electrodo para poder monitorear el valor de pH cuando se lleva a cabo la reacción.
- ✓ El tratamiento con agua bajo condiciones subcríticas puede enfocarse para la obtención de calcita e hidroxiapatita considerando las condiciones ensayadas con el tratamiento 6R2-t3-T1.
- ✓ Caracterizar las proteínas obtenidas mediante Electroforesis de Laemmli.

## **7. TRABAJOS PRESENTADOS**

En modalidad de póster, presentación del trabajo “Diseño de Taguchi aplicado en la optimización para desproteínizar cefalotórax de camarón con agua en estado subcrítico para purificación de quitina” en el Cuarto Simposium: Perspectivas en Biotecnología, llevado a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX, el 18 de abril de 2016.

En modalidad de póster, presentación del trabajo “Tratamiento con agua con agua en estado subcrítico para la extracción de quitina calcárea a partir de desperdicios de camarón” en el “5<sup>th</sup> International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering”, llevado a cabo en Buenos Aires, Argentina del 25 al 29 de julio de 2016.

## 8. REFERENCIAS

- ANÁLISIS DE AGUA - MEDICIÓN DE NITRÓGENO TOTAL KJELDAHL EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA - (CANCELA A LA NMX-AA-026-SCFI-2001) [pdf] (2010). México. Recuperado a partir de <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-026-SCFI-2010.pdf>
- Anaya Leyva Y. I., Santana García G. L., Hinojosa García K., Sandoval Esquivel J. A., y O. D. N. (2011). Análisis químico: Método de Lowry [Ilustración]. Recuperado el 28 de agosto de 2016, a partir de <http://yunelijo-k.blogspot.mx/>
- Anónimo. (2012). Diagrama de fases del agua: Hielo, líquido, vapor y fluido supercrítico [Ilustración]. Recuperado el 26 de agosto de 2016, a partir de <http://notaculturaldeldia.blogspot.mx/2012/02/diagrama-de-fase-del-agua-hielo-agua.html>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis. (K. Helrich, Ed.) (1990). Washington D.C., USA. 70-76.
- Atkins, E. (1985). Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. *Journal of Biosciences*, 8(1), 375–387. JOUR. <http://doi.org/10.1007/BF02703990>
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Bässler, H. (1984). Charge transport in molecularly doped polymers. *Philosophical Magazine Part B*, 50(3), 347–362. JOUR. <http://doi.org/10.1080/13642818408238860>
- Becker, A., Ziegler, A., & Epple, M. (2005). The mineral phase in the cuticles of two species of Crustacea consists of magnesium calcite, amorphous calcium carbonate, and amorphous calcium phosphate. *Dalton Trans.*, (10), 1814–1820. article. <http://doi.org/10.1039/B412062K>
- Bohuss, I., Varga, A., Barkács, K., Oertel, N., & Zárny, G. (2001). MICROANALYTICAL DETERMINATION OF METALS IN SELECTED ORGANS OF ZEBRA MUSSELS BY TOTAL REFLECTION X-RAY FLUORESCENCE SPECTROMETRY. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 19(1), 177–182. JOUR. <http://doi.org/10.1081/TMA-100001472>
- Börjesson, J., & Mattsson, S. (2007). Medical applications of X-ray fluorescence for trace element research. *Powder Diffraction*, 22(2), 130–137. JOUR. <http://doi.org/10.1154/1.2737468>
- Boßelmann, F., Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., & Epple, M. (2007). The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. *Thermochimica Acta*, 463(1–2), 65–68. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2007.07.018>

- Brunner, G. (2009). Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 373–381. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2008.09.002>
- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., & Miranda, S. P. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and <sup>13</sup>C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1876–1885. article. <http://doi.org/10.1002/app.20647>
- Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359–1366. JOUR. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00008-0](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00008-0)
- CSD. (2015). The Cambridge Structural Database (CSD). C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot and S. C. Ward, *Acta Cryst.* (2016). B72, 171-179. <http://doi.org/10.1107/S2052520616003954>
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvão, M. R., & Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1–3), 1–8. [http://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00039-9](http://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00039-9)
- Fratzl, P., Fischer, F. D., Svoboda, J., & Aizenberg, J. (2010). A kinetic model of the transformation of a micropatterned amorphous precursor into a porous single crystal. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1001–1005. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.002>
- Garrote, G., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (1999). Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74(11), 1101–1109. article. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199911\)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199911)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M)
- Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 1–18. JOUR.
- Gyung-Hyun, J., Ro-Dong, P., & Woo-Jin, J. (2010). Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives. En S.-K. Kim (Ed.) (pp. 37–45). CRC Press.
- Heredia, A., Aguilar-Franco, M., Magaña, C., Flores, C., Piña, C., Velázquez, R., ... Basiuk, V. A. (2007). Structure and interactions of calcite spherulites with  $\alpha$ -chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1), 8–13. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2005.11.003>
- Hou, Y., Shavandi, A., Carne, A., Bekhit, A. A., Ng, T. B., Cheung, R. C. F., & Bekhit, A. E. A. (2016). Marine shells: Potential opportunities for extraction of functional and health-promoting materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(11–12), 1047–1116. article. <http://doi.org/10.1080/10643389.2016.1202669>
- Ibrahim, H. M., Salama, M. F., & El-Banna, H. a. (1999). Shrimp's waste: Chemical

- composition, nutritional value and utilization. *Food / Nahrung*, 43(6), 418–423. [http://doi.org/doi:10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19991201\)43:6<418::AID-FOOD418>3.0.CO;2-6](http://doi.org/doi:10.1002/(SICI)1521-3803(19991201)43:6<418::AID-FOOD418>3.0.CO;2-6)
- ICDD. (2007). Powder Diffraction File. International Centre for Diffraction Data (ICDD). Newtown Square, Pennsylvania, USA.
- ICSD. (2013). Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). Fachinformations Zentrum Karlsruhe, and the U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States.
- Iryani, D. A., Kumagai, S., Nonaka, M., Nagashima, Y., Sasaki, K., & Hirajima, T. (2014). The Hot Compressed Water Treatment of Solid Waste Material from the Sugar Industry for Valuable Chemical Production. *International Journal of Green Energy*, 11(6), 577–588. JOUR. <http://doi.org/10.1080/15435075.2013.777909>
- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H., & Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 42(14), 3423–3432. <http://doi.org/10.1002/pola.20176>
- Jinawath, S., Polchai, D., & Yoshimura, M. (2002). Low-temperature, hydrothermal transformation of aragonite to hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 22(1), 35–39. JOUR. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00110-8](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00110-8)
- Kang, K., Daimon, H., Noda, R., Hu, H., & Fujie, K. (2001). Optimization of Amino Acids Production from Waste Fish Entrails by Hydrolysis in Sub- and Supercritical Water. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 79(February), 65–70. <http://doi.org/10.1002/cjce.5450790110>
- Kay, M. I., Young, R. A., & Posner, A. S. (1964). Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature (London)*, 204, 1050–1052.
- Klockenkämper, R., & Von Bohlen, A. (1996). Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence: a Review. *X-Ray Spectrometry*, 25(4), 156–162. article. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4539\(199607\)25:4<156::AID-XRS154>3.0.CO;2-3](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4539(199607)25:4<156::AID-XRS154>3.0.CO;2-3)
- Kurita, K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203. article. <http://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>
- Lavoie, J.-M., Capek-Menard, E., Gauvin, H., & Chornet, E. (2010). Quality Pulp from Mixed Softwoods as an Added Value Coproduct of a Biorefinery. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(5), 2503–2509. JOUR. <http://doi.org/10.1021/ie901763h>
- Luquet, G., & Marin, F. (2004). Biomineralisations in crustaceans: storage strategies. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6–7), 515–534. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.crpv.2004.07.015>
- Mahmoud, N. S., Ghaly, A. E., & Arab, F. (2007). Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American*

*Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3(1), 1–9.

- Marguá, E., Queralt, I., & Hidalgo, M. (2009). Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(3), 362–372. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.11.011>
- Mikkelsen, A., Engelsen, S. B., Hansen, H. C. B., Larsen, O., & Skibsted, L. H. (1997). Calcium carbonate crystallization in the  $\alpha$ -chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage. *Journal of Crystal Growth*, 177(1), 125–134. article. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0248\(96\)00824-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0248(96)00824-X)
- Miller, F. A., & Wilkins, C. H. (1952). Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions. *Analytical Chemistry*, 24(8), 1253–1294. JOUR. <http://doi.org/10.1021/ac60068a007>
- Minke, R., & Blackwell, J. (1978). The structure of alpha-chitin. *Journal of molecular biology*, 120(2), 167–181. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90063-3](http://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90063-3)
- Neues, F., Hild, S., Eppele, M., Marti, O., & Ziegler, A. (2011). Amorphous and crystalline calcium carbonate distribution in the tergite cuticle of moulting Porcellio scaber (Isopoda, Crustacea). *Journal of Structural Biology*, 175(1), 10–20. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.019>
- Nollet L. M. L., T. F. (Ed.). (2015). Handbook of Food Analysis [ebook]. Recuperado el 26 de agosto de 2016, a partir de <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=KtAdCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=NOLLET,+Leo+M.+L.%3B+Handbook+of+food+analysis%3B+M.+Dekker,+New+York+1996.&ots=nZVDV28aPE&sig=PBD0zZgMRb5K9FoOOOfYifBG8Fs#v=onepage&q&f=>
- Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. L. F. and R. J. R. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275. Recuperado a partir de <http://www.jbc.org/content/193/1/265.citation.full.html#ref-list-1>
- Osada, M., Miura, C., Nakagawa, Y. S., Kaihara, M., Nikaido, M., & Totani, K. (2012). Effect of sub- and supercritical water pretreatment on enzymatic degradation of chitin. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 308–312. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.007>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., & Kriz, G. S. (1979). *Introducción a la espectroscopia: Guía para estudiantes de química orgánica*.
- Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules*, 4, 12–18.
- Peterson, G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 356(83), 246–256.
- Qu, T., Verma, D., Alucozai, M., & Tomar, V. (2015). Influence of interfacial interactions

- on deformation mechanism and interface viscosity in  $\alpha$ -chitin–calcite interfaces. *Acta Biomaterialia*, 25, 325–338. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.034>
- Quitain, A. T., Sato, N., Daimon, H., & Fujie, K. (2001). Production of Valuable Materials by Hydrothermal Treatment of Shrimp Shells. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(25), 5885–5888. <http://doi.org/10.1021/ie010439f>
- Raabe, D., Al-Sawalmih, A., Yi, S. B., & Fabritius, H. (2007). Preferred crystallographic texture of  $\alpha$ -chitin as a microscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Acta Biomaterialia*, 3(6), 882–895. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.006>
- Raabe, D., Romano, P., Sachs, C., Fabritius, H., Al-Sawalmih, A., Yi, S.-B., ... Hartwig, H. G. (2006). Microstructure and crystallographic texture of the chitin–protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Materials Science and Engineering: A*, 421(1–2), 143–153. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msea.2005.09.115>
- Rahman, M. A., & Halfar, J. (2014). First evidence of chitin in calcified coralline algae: new insights into the calcification process of *Clathromorphum compactum*. *Scientific reports*, 4, 6162. <http://doi.org/10.1038/srep06162>
- Rao, R. S., Kumar, C. G., Prakasham, R. S., & Hobbs, P. J. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnology Journal*, 3(4), 510–523. article. <http://doi.org/10.1002/biot.200700201>
- Redus, R. H., Huber, A. C., & Sperry, D. J. (2009). Dead Time Correction in the DP5 Digital Pulse Processor. *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Rec., Oct 2008*, (Ldl), 3416–3420.
- Roberts, G. A. F. (1992). Structure of Chitin and Chitosan. En *Chitin Chemistry* (pp. 1–53). book, Springer Customer Service Center GmbH. Recuperado a partir de <http://books.google.co.in/books?id=GU1PjwEACAAJ>
- Romano, P., Fabritius, H., & Raabe, D. (2007). The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material. *Acta Biomaterialia*, 3(3), 301–309. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2006.10.003>
- Rudall, K. M. (1963). The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. En J. E. T. J.W.L. Beament & V. B. Wigglesworth (Eds.) (Vol. 1, pp. 257–313). in collection, Academic Press. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60177-0](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60177-0)
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35–51. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>
- Ruvalcaba Sil, J. L., Ramírez Miranda, D., Aguilar Melo, V., & Picazo, F. (2010). SANDRA: a portable XRF system for the study of Mexican cultural heritage. *X-Ray Spectrometry*, 39(5), 338–345. article. <http://doi.org/10.1002/xrs.1257>

- Seoudi, R., & Nada, A. M. A. (2007). Molecular structure and dielectric properties studies of chitin and its treated by acid, base and hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*, 68(4), 728–733. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.009>
- Sikorski, P., Hori, R., & Wada, M. (2009). Revisist of alpha-chitin crystal structure using high resolution X-ray diffracttion data. *Biomacromolecules*, 10(5), 1100–1105.
- Solé, V. A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., & Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorecence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(1), 63–68. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2006.12.002>
- Spinde, K., Kammer, M., Freyer, K., Ehrlich, H., Vournakis, J., & Brunner, E. (2011). Biomimetic silicification of chitin from diatoms. *Chem. Mater.*, 23(11), 2973–2978.
- Stephens, W. E., & Calder, A. (2004). Analysis of non-organic elements in plant foliage using polarised X-ray fluorecence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 527(1), 89–96. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.015>
- Stump, I. G., Kearney, J., D’Auria, J. M., & Popham, J. D. (1979). Monitoring trace elements in the mussel, *Mytilus edulis* using X-ray energy spectroscopy. *Marine Pollution Bulletin*, 10(9), 270–274. article. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X\(79\)90485-5](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X(79)90485-5)
- Szoboszlai, N., Polgári, Z., Mihucz, V. G., & Záráy, G. (2009). Recent trends in total reflection X-ray fluorecence spectrometry for biological applications. *Analytica Chimica Acta*, 633(1), 1–18. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.009>
- Tacon, A. G. J. (1989). *The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - a training manual I. The essential nutrients*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Brazil.
- Toby, B. H., & Von Dreele, R. B. (2013). *{it GSAS-II}*: the genesis of a modern open-source all purpose crystallography software package. *Journal of Applied Crystallography*, 46(2), 544–549. article. <http://doi.org/10.1107/S0021889813003531>
- Vallejos, M. E., Felissia, F. E., Kruyeniski, J., & Area, M. C. (2015). Kinetic study of the extraction of hemicellulosic carbohydrates from sugarcane bagasse by hot water treatment. *Industrial Crops and Products*, 67, 1–6. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.058>
- Weaver, J. C., Milliron, G. W., Miserez, A., Evans-Lutterodt, K., Herrera, S., Gallana, I., ... Kisailus, D. (2012). The Stomatopod Dactyl Club: A Formidable Damage-Tolerant Biological Hammer. *Science*, 336(6086), 1275–1280. article. <http://doi.org/10.1126/science.1218764>
- Yang, S., Yuan, T.-Q., Li, M.-F., & Sun, R.-C. (2015). Hydrothermal degradation of lignin: Products analysis for phenol formaldehyde adhesive synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 54–62. article. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.048>

- Yoshida, H., Terashima, M., & Takahashi, Y. (1999). Production of organic acids and amino acids from fish meat by sub-critical water hydrolysis. *Biotechnology progress*, 15(6), 1090–4. <http://doi.org/10.1021/bp9900920>
- Yoshimura, M., Sujaridworakun, P., Koh, F., Fujiwara, T., Pongkao, D., & Ahniyaz, A. (2004). Hydrothermal conversion of calcite crystals to hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 24(4), 521–525. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2004.01.005>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. JOUR. <http://doi.org/10.3390/md13031133>
- Zhang, Z., Xie, Y., Xu, X., Pan, H., & Tang, R. (2012). Transformation of amorphous calcium carbonate into aragonite. *Journal of Crystal Growth*, 343(1), 62–67. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2012.01.025>

## **ANEXO 1. FUNDAMENTOS TEORICOS DE TECNICAS EXPERIMENTALES**

### **A1.1. Determinación de Proteína soluble por el método de Lowry-Peterson**

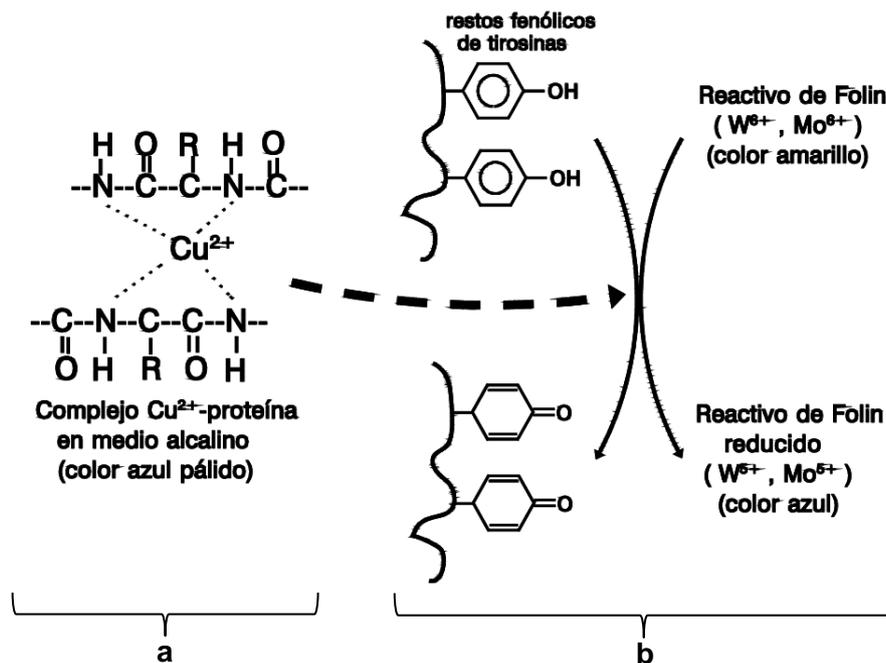
Es una técnica espectrofotométrica para determinación cuantitativa de proteína soluble en muestras. Se basa en el desarrollo de color que combina la reacción de Biuret con la adición del reactivo de Fenol Folin-Ciocalteau, ambas etapas se describen a continuación:

#### **a) Reacción de Biuret**

Experimentalmente ocurre cuando se agrega el reactivo A (descripción en el apartado A2.1). El NaOH presente en el reactivo provee un medio alcalino para que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  se unan al N del enlace peptídico. Se forma el complejo  $\text{Cu}^{2+}$  - N que produce un color azul claro (Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, 1951). Mientras que el SDS provoca la desnaturalización de proteínas en la muestra para exponer sus residuos aminoacídicos (**Figura 30a**).

#### **b) Reducción del reactivo fosfomolibdotúngstico por el complejo $\text{Cu}^{2+}$ - N**

Empieza cuando se agrega el reactivo B, que consiste en el reactivo de Fenol Folin-Ciocalteau, una mezcla de fenol y ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico. Los residuos de tirosina, triptófano y cisteína presentes en la mayoría de las proteínas reducen el reactivo. El complejo produce un color azul intenso ( Handbook of Food Analysis, 2015). Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  catalizan esta reacción (**Figura 30b**).



**Figura 30.** Etapas del desarrollo de color por el método de Lowry-Peterson. a) Reacción de la proteína con el  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino. b) Reducción del reactivo fosfomolibdotúngstico con el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -N (Anaya Leyva Y. I., Santana García G. L., Hinojosa García K., Sandoval Esquivel J. A., 2011).

## A1.2. Cuantificación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl

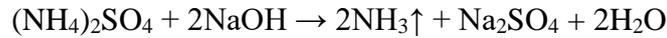
Se basa en una volumetría ácido-base para la determinación de nitrógeno total en materiales biológicos. Se define el nitrógeno total ( $N_T$ ) como la suma del nitrógeno amoniacal ( $N_{Am}$ ) y nitrógeno orgánico ( $N_{Org}$ ). Consiste en los tres procesos básicos que se describen a continuación:

1. **Digestión:** La descomposición del  $N_{Org}$  en la muestra se realiza con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en presencia de un catalizador (mezcla reactiva de selenio en este caso). Posteriormente la mezcla se calentó hasta su digestión (solución color verde). Al final del proceso el N se encuentra disuelto como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

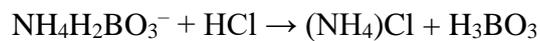


2. **Destilación:** se adiciona un exceso de solución alcalina a la mezcla ácida obtenida de la digestión para convertir el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). En seguida se

lleva a ebullición, se condensa el NH<sub>3</sub> como gas, y se colecta en una disolución de concentración conocida H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.



3. **Titulación:** la cantidad de N presente en la muestra puede ser calculada mediante titulación a partir de la cantidad cuantificada de amonio en la disolución de concentración conocida de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.



### **Nitrógeno total**

Se define como la suma de nitrógeno proteico (N<sub>P</sub>) y nitrógeno no proteico (en este caso corresponde al nitrógeno de quitina, N<sub>Q</sub>) que son convertidos a sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante el tratamiento descrito anteriormente (NMX-AA-026-SCFI-2010).

$$N_T = N_P + N_Q$$

Donde:

N<sub>T</sub> = Nitrógeno total determinado por el método de Kjeldahl.

N<sub>P</sub> = Nitrógeno proteico.

N<sub>Q</sub> = Nitrógeno de quitina, debido al grupo amida que posee.

### **Nitrógeno proteico**

El nitrógeno proteico calculado se convirtió a porcentaje de proteína (%P) utilizando el factor de conversión 6.25 indicado por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990 número 954.01. El porcentaje de nitrógeno proteico fue obtenido como la diferencia de nitrógeno de quitina (N<sub>Q</sub>) y nitrógeno total (N<sub>T</sub>).

$$\% P = (N_T - N_Q) * 6.25$$

Donde:

% P = Porcentaje de proteína presente en la muestra.

$N_T$  = Nitrógeno total determinado por el método de Kjeldahl.

$N_Q$  = Nitrógeno de quitina, debido al grupo amida que posee.

6.25 = Factor de conversión concertado por la AOAC, 1990, para muestras diferentes de granos de trigo, en este caso para proteína cruda en alimento para animales.

## **ANEXO 2. TECNICAS DE ANÁLISIS**

### **A2.1. Determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson (1977)**

#### **Reactivos**

*A) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio:*

En 250 ml de agua destilada se disolvieron: 25g de carbonato de sodio (J. T. Baker, lote 3598-01), 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado (J. T. Baker, lote 1843-01), 0.5 g de tartrato de sodio y potasio (J. T. Baker).

*B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Reasol, reactivo analítico, 99 %, L. 6743):*

Se disolvieron 25g de SDS en 250 ml de agua destilada.

*C) Solución de hidróxido de sodio:*

Se disolvieron 8g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

#### ***Reactivo A***

Se mezclaron las soluciones A, B y C, y se aforó con agua destilada a 1L. El reactivo se conservó en refrigeración, y antes de utilizarlo se calentó a baño maría (25-30° C) hasta redissolver el SDS.

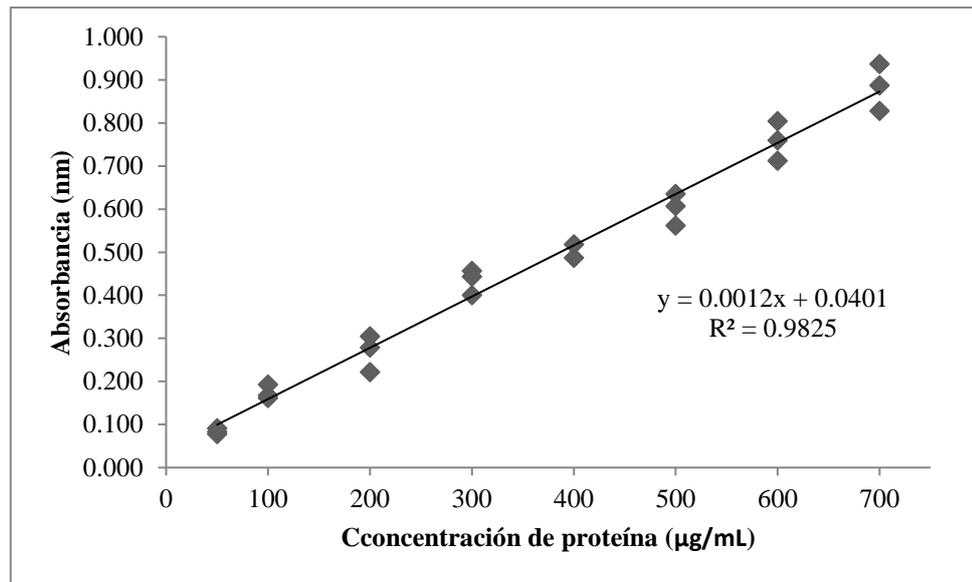
#### ***Reactivo B***

Se preparó en fresco diluyendo 1:1 el reactivo fenol Folin-Ciocalteu (Hycel, L. 304970) con agua destilada, y se conservó en la oscuridad (frasco con papel aluminio).

#### **Procedimiento:**

Se realizó una curva estándar con seroalbúmina bovina de 50 a 700  $\mu\text{g/mL}$ , con diluciones a intervalos de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

1. A 1 mL de muestra se le adicionó 1 mL de reactivo A, se mezcló y se incubó a 30°C durante 10 min en oscuridad.
2. Se adicionó 0.5 mL de reactivo B, se agitó y se incubó a 30°C durante 30 min.
3. Se determinó absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 6 (Thermo Spectronic).



**Figura 31.** Curva estándar, ecuación de ajuste lineal y factor  $r^2$  obtenidos para la determinación de proteína soluble por el método de Lowry-Perterson.

## A2.2. Análisis proximal

### Determinación de humedad

1. Un crisol (C) de porcelana se llevó a peso constante en una estufa a 95 -100 °C durante 24 h y se registró el peso hasta con 4 cifras decimales.
2. Posteriormente en el crisol se pesó 1 g de muestra ( $CM_1$ ) y se llevó nuevamente a peso constante como se describió anteriormente.
3. Se dejó enfriar el crisol con la muestra ( $CM_2$ ) en un desecador y después se pesó.
4. El porcentaje de humedad (% H) se calculó con la ecuación siguiente:

$$\%H = 100\% - \left( \left( \frac{CM_2 - C}{CM_1 - C} \right) \times 100 \right)$$

Donde (peso en gramos):

%H = Porcentaje de humedad presente en la muestra.

C = Crisol a peso constante.

CM<sub>1</sub> = Crisol con muestra húmeda (antes de ser llevada a peso constante).

CM<sub>2</sub> = Crisol con muestra seca (después de ser llevada a peso constante).

#### **Determinación de cenizas**

1. El crisol con muestra seca (CM<sub>2</sub>), obtenido en el paso 3 de determinación de humedad, se calcinó durante 5 h en una mufla a 550-600 °C.
2. Se dejó enfriar el crisol con cenizas (CC) en un desecador y después se pesó.
3. El porcentaje de cenizas (%C<sub>Z</sub>) se calculó con la ecuación siguiente:

$$\%C_Z = \left( \frac{(CC - C)}{CM_2 - C} \right) \times 100$$

Donde (peso en gramos):

%C<sub>Z</sub> = Porcentaje de cenizas presentes en la muestra.

C = Crisol a peso constante del paso 1 de Determinación de humedad.

CC = Crisol con cenizas.

CM<sub>2</sub> = Crisol con muestra seca (después de ser llevada a peso constante) del paso 3 de Determinación de humedad.

#### **Determinación de proteína total por el método de Kjeldahl**

Consiste digestión, destilación y titulación de la muestra, en la Tabla 16 se encuentran resumidos los reactivos necesarios para cada uno de estos procesos.

**Tabla 16.** Reactivos necesarios en cada proceso para la determinación de proteína total por el método de Kjeldahl.

<b>Reactivos necesarios según el proceso</b>		
<b>Digestión</b>	<b>Destilación</b>	<b>Titulación</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (Meyer, pureza 95-98 %, lote C0814475), 20 mL por muestra.</li> <li>• Mezcla reactiva de selenio, 4 g por muestra (Merck KGaA, especificación: sulfato de cobre 1.45%, sulfato de sodio 94 %, selenio 1.5 %; lote 228).</li> <li>• 3 L de NaOH al 20 % para atrapar vapores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 L de NaOH al 32 % para destilar.</li> <li>• 60 mL de ácido bórico (Meyer, ≥ 99.5 %, lote C0714411) al 4 % para coleccionar la muestra destilada.</li> <li>• Agua destilada para enjuagar el equipo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 L de solución valorada de HCl 0.2 M para titulación (Meyer, pureza 36.5-38 %, lote C0113014).</li> </ul>

### **Procedimiento para digestión de muestras**

Se empleó la unidad de digestión Büchi B-426 con tubos de digestión Kjeldahl de 300 ml. La unidad se conectó a un lavador de gases Büchi B-412.

- 1) Se pesó 1 g de muestra seca en papel cera y se colocó dentro de un tubo de digestión (se registraron hasta 4 decimales).
- 2) A cada tubo se le adicionaron 4 g de mezcla reactiva de selenio y 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (se cuidó no derramar ácido en los soportes).
- 3) Se acomodó la base con los tubos en el digestor y se colocó la tapa cuidando que sellará perfectamente; se conectaron las mangueras del lavador de gases al digestor.
- 4) La unidad de aspiración y el digestor se puso en funcionamiento, la perilla de este último se giró en 2 unidades cada 5 min hasta llegar al nivel máximo (10).
- 5) Se digirió 1 h aproximadamente, se estuvo verificando continuamente el funcionamiento del equipo y el cambio de color de las muestras.

- 6) Una vez que las muestras eran de color verde traslúcido, se apagó el digestor y los tubos se colocaron en la sección de enfriamiento. La unidad de aspiración se apagó hasta que ya no salían vapores de los tubos.
- 7) Una vez que las muestras estuvieron frías, se destilaron.

### **Procedimiento para destilación de muestras**

Se utilizó la unidad de destilación Büchi B-323.

- 1) Se abre el flujo de agua del condensador y se encendió el equipo.
- 2) Se precalentó y se realizaron 2 lavados con NaOH.
- 3) En la salida del condensador se colocó un matraz con 60 mL de ácido bórico al 4 %
- 4) Se colocó el tubo de digestión con la muestra y se destiló.
- 5) Se guardó el matraz con la muestra destilada para titularla posteriormente.
- 6) Se lavó el equipo con agua destilada, después se apagó y el flujo de agua del condensador se cerró.

### **Procedimiento para titulación de muestras**

- 1) En una bureta se colocó HCl 0.2 M valorado.
- 2) Se colocó el matraz con la muestra en agitación magnética vigorosa.
- 3) Se tituló la muestra hasta alcanzar un pH entre 4.3 y 4.7.
- 4) Se registró el volumen de ácido gastado.
- 5) El porcentaje de N se calculó como

$$\% N_T = \left( \frac{HCl_{Normalidad} * HCl_{Vol} * 1.4}{Peso} \right)$$

$HCl_{Normalidad}$  = Normalidad del HCl

$HCl_{Vol}$  = Volumen de HCl gastado en la titulación.

Peso = Peso de la muestra (g).