

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

**“Estudio de la obtención de quitosano a partir de caparazón
de camarón (*Penaeus Vannamei*) y su aplicación en la
estabilidad de una emulsión aceite en agua”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO DE ALIMENTOS

Presentada por:

Luis Mario Soro Guevara

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2007

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que de uno u otro modo colaboraron en la realización de este trabajo y especialmente a la M Sc. Fabiola Cornejo Directora de Tesis, y Tcnlga. Grace Vásquez por su invaluable ayuda.

DEDICATORIA

A mis padres Luis y Sonia

A mi hermana Gabriela

A mi familia.

TRIBUNAL DE GRADUACION



Ing. Eduardo Rivadeneira P.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

M Sc. Fabiola Cornejo Z.
DIRECTORA DE TESIS

Ing. Luis Miranda S.
VOCAL

M Sc. Andrés Rigall C.
VOCAL

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



LUIS MARIO SORO GUEVARA

RESUMEN

En el Ecuador, en términos económicos, la exportación de camarón ha representado durante las dos últimas décadas un rubro importante para la obtención de divisas. La Cámara Nacional de Acuicultura registra que en el año 2003 Ecuador exportó 114'765.210 libras de camarón, en diversas presentaciones, con un valor de \$278,8 millones. Se constituyó el tercer producto de exportación del país. Por esta razón, se han creado muchas empresas empacadoras que se dedican a la exportación del crustáceo, en diversas presentaciones.

Lamentablemente, estas industrias generan grandes cantidades de desecho ya sea de cabezas, caparazones y otros desperdicios en general. Aproximadamente entre el 65 – 70% corresponde a la cola del camarón, por lo que el porcentaje de desperdicios constituye el 30 y el 35%. Dado de que el volumen es alto es necesario adoptar una tecnología que permita aprovechar estos desperdicios. Existen en la actualidad diversos estudios en los cuales se obtiene quitosano a partir de los caparazones de camarón.

El presente trabajo consiste en la obtención de quitina y quitosano a partir de cáscaras del camarón variedad vannamei cultivado en el Ecuador. Este estudio tiene la finalidad de caracterizar al quitosano como emulsionante.

Para obtener el quitosano se utilizará tres métodos diferentes. El primero es un método procedente de la India, de la Central Institute of Fisheries Technology (CIFT), que consiste en trabajar con *Penaeus monodon*, el tipo de camarón mas grande encontrado en las aguas del sureste asiático. El segundo, corresponde a una recopilación de diferentes métodos propuestos y estudiados, para lo cual se utilizó el criterio de que exista semejanza con otras técnicas y que pueda ser aplicado bajo las condiciones de nuestro medio. Por último un tercer método que se basa en el trabajo realizado por M Sc. Juan de Dios Alvarado como parte del Proyecto CYTED XI.20, Películas biodegradables para alimentos en Iberoamérica.

Una vez obtenido el quitosano se caracterizará como emulsionante en una mezcla de aceite en agua, con el objetivo de definir cuál método es el más adecuado. Adicionalmente, se analizará el efecto del pH, la concentración quitosano y la fuerza iónica en la estabilidad de la emulsión.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1	
1. GENERALIDADES.....	5
1.1. Quitosano.....	5
1.1.1. Propiedades químicas del quitosano.....	7
1.1.2. Fuentes donde se encuentra el quitosano.....	9
1.1.3. Aplicaciones del quitosano.....	10
1.2. Definición de la Materia Prima.....	12
1.2.1. Morfología del camarón.....	12
1.2.2. Composición química de la materia prima.....	14
1.2.3. Variables de deterioro de la materia prima.....	15
1.3. Emulsiones.....	17
1.3.1. Estabilidad de las emulsiones.....	22

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1. Métodos de obtención de quitosano.....	27
2.1.1. Método Hindú.....	27
2.1.2. Método Propuesto.....	30
2.1.3. Método Universidad Técnica de Ambato.....	32
2.2. Técnica de Preparación de Emulsiones.....	39
2.3. Técnica de Estabilidad de la Emulsión.....	41

CAPITULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
3.1. Valoración de los métodos estudiados como emulsionante.....	46
3.2. Efecto del pH en la estabilidad de la emulsión.....	53
3.3. Efecto de la concentración de quitosano.....	56
3.4. Efecto iónico en la emulsión.....	58

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
--	----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Estructura de quitosano.....6
Figura 2	Morfología del camarón.....13
Figura 3	Actividad enzimática relativa y velocidad de crecimiento bacteriano en función a la temperatura.....16
Figura 4	Mecanismos de desestabilización de emulsiones.....19
Figura 5	Diagrama de flujo de los tres procesos de obtención de quitosano.....38
Figura 6	Valoración de los métodos como emulsionantes.....53
Figura 7	Efecto pH vs índice de cremado.....55
Figura 8	Concentraciones de quitosano vs índice de cremado.....56
Figura 9	Uniones electrostáticas quitosano – cloruro. Altas concentraciones.....59
Figura 10	Uniones electrostáticas quitosano – cloruro. Bajas concentraciones.....59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Estudio comparativo de diferentes tipos de quitosano grado comercial.....9
Tabla 2	Composición química del exoesqueleto.....15
Tabla 3	Blanco (80% 0,1 M HCl + 20% aceite).....48
Tabla 4	Proceso 1.....49
Tabla 5	Proceso 2.....50
Tabla 6	Proceso 3.....51
Tabla 7	Fuerza iónica (0,01 M HCl + 0,3 M NaCl).....60
Tabla 8	Fuerza iónica (0,01 M HCl + 0,7 M NaCl).....61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1 Extracción con hidróxido de sodio 0.5%.....	28
Gráfica 2 Extracción con ácido clorhídrico 1.25 N.....	29
Gráfica 3 Extracción con hidróxido de sodio 50%.....	30
Gráfica 4 Extracción con ácido clorhídrico 2 N.....	31
Gráfica 5 Extracción con hidróxido de sodio 2%.....	31
Gráfica 6 Materia prima, caparazones de camarón.....	33
Gráfica 7 Extracción con hidróxido de sodio 50%.....	34
Gráfica 8 Medición de índice de cremado.....	39
Gráfica 9 Medida de la estabilidad de la emulsión.....	42

INTRODUCCIÓN

En un mundo globalizado, la conservación del ecosistema, la producción de un bien apetecido en el mercado y el aprovechamiento al máximo de la materia prima utilizada son, entre otros, objetivos en el nivel industrial. Aunque esto es lo importante, existen además desperdicios en el proceso que deben ser considerados, de manera muy relevante, en el sector alimenticio.

Ecuador, uno de los más grandes exportadores de camarón del mundo, reconocido en mercados internacionales por su calidad y frescura, tiene hoy, gran porcentaje de “desperdicios” producto de su industrialización. Aprovechar estos subproductos ricos en compuestos químicos aplicables en la elaboración de otros productos alimenticios es el reto que se ha trazado.

El presente trabajo de investigación parte del estudio de desperdicios del camarón blanco (*Penaeus Vannamei*), variedad existente en nuestro país, la caracterización de quitosano como emulsionante, y la aplicación en la estabilidad de una emulsión tipo aceite en agua.

Entre otras, la quitina, insoluble en todo sistema orgánico e inorgánico, puede ser encontrada en alto contenido, en el exoesqueleto de los invertebrados, “subproductos” desechados para la exportación del camarón. Tratada con un

álcali caliente genera un producto soluble en ácidos orgánicos al cual se lo denomina quitosano.

El quitosano se aplica en el campo de la química analítica, biomedicina, cosméticos, dietéticos, tratamiento de aguas, entre otros, y en la industria alimenticia. La utilización de aditivos en el procesamiento de casi todos los productos tiene como objetivo principal mejorar condiciones de almacenamiento, propiedades físicas, químicas y organolépticas. En el caso específico, es un aditivo que actúa como espesante, preservante, emulsionante.

Su característica principal es la inocuidad a la salud humana, se lo utiliza en el campo de alimentos y bebidas, como espesante y gelificante para lograr mayor viscosidad y consistencia, estabilizador de emulsiones y como agente preservante en la panificación por su acción antifúngica y antibacteriana.

Por sus propiedades químicas, el quitosano es muy versátil, capaz de realizar modificaciones, al reaccionar con enzimas y obtener películas biodegradables. Es biodegradable, inhibe el crecimiento microbiano en la formación de films o películas comestibles. Es soluble en medio ácido, aumentando así su reactividad.

Este trabajo de investigación considera cuatro capítulos. En el primer capítulo se analiza la materia prima, el camarón blanco variedad *Penaeus Vannamei*, la composición química y las variables de deterioro. Basado en tres métodos diferentes para la obtención del quitosano, se lo caracterizará como emulsionante en una mezcla de aceite en agua; siendo el objetivo, definir cuál método es el más adecuado. El análisis del efecto del pH, la concentración quitosano y la fuerza iónica en la estabilidad de la emulsión, son los factores que se han considerado.

El capítulo 2 trata sobre los métodos y materiales utilizados para la investigación. El método Hindú, logra el mayor porcentaje de producción de 8.63% al tratar la muestra con NaOH al 50% durante una hora. El segundo corresponde a una recopilación de varios métodos de obtención de la quitina desarrollado por García y sus colaboradores en 1996, en La Habana. El tercer método corresponde al más complejo de todos que fue elaborado por Juan de Dios Alvarado de la Universidad Técnica de Ambato, como parte de un proyecto para películas biodegradables.

La investigación se centra, en este momento, en las Técnicas de Preparación de Emulsiones, y se procede a realizar el análisis y mediciones de los índices de cremado en los tres tipos de quitosano obtenidos, y determinar así cuál se comporta con mejores propiedades como emulsionante.

Experimentos posteriores incluyen la producción de nuevas emulsiones con variaciones en la concentración de quitosano, cambio en el pH del medio y por último, la adición de cloruro de sodio en el medio.

En el capítulo 3 se analizan los resultados. Partiendo de la composición química del exoesqueleto, alterada por la eliminación de proteínas y minerales, quedando la estructura de la quitina, el mayor desafío fue transformar la quitina en quitosano, con las limitaciones de la tecnología. Luego se procedió a la valoración de los métodos estudiados como emulsionante, en función del tiempo de exposición y en relación al valor del índice de cremado.

El análisis continúa con la determinación estimada de la concentración de quitosano que una emulsión puede tener a fin de prolongar el tiempo de estabilidad. De igual manera, el pH tiene un rol muy importante para conocer bajo que condiciones de alcalinidad y acidez puede desarrollarse efectivamente el emulsionante. Finalmente el cloruro de sodio se adicionó para poder determinar en que grado la adición de este compuesto retarda la estabilidad de la emulsión.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Quitosano

En la naturaleza existen varios polímeros muy importantes, ya sea por su abundancia, fácil acceso o variedad de usos. En ella se puede encontrar tanto a la celulosa como la quitina.

La quitina es el componente mayoritario del exoesqueleto de los invertebrados y de las paredes celulares de los hongos, los cuales a pesar de tener una corta vida, tienen una gran capacidad de regeneración, pudiendo producir grandes cantidades de biomasa. Constituye un precursor de un sinnúmero de derivados. Este polímero está formado por unidades de 2-acetamida-2-desoxiglucosa unidas por medio de enlaces 1,4-beta-glucosídico. Prácticamente es

insoluble en todo sistema orgánico e inorgánico. Es el segundo compuesto orgánico en abundancia en la naturaleza. Su estructura es similar a la celulosa.

El término quitosano fue determinado por Hoppe-Seyler en 1894, basándose en los estudios de Rouget en 1859 quien encontró que si la quitina es tratada con un álcali caliente genera un producto soluble en ácidos orgánicos.

El quitosano es un polímero marino derivado de la quitina, por lo que tiene una cadena más corta que la de quitina original, alrededor de 25-30 unidades menos de glucosamina. Su fórmula es beta(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa. (Fig. 1). La principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en un medio alcalino a altas temperaturas, generando una desacetilación parcial de la quitina.

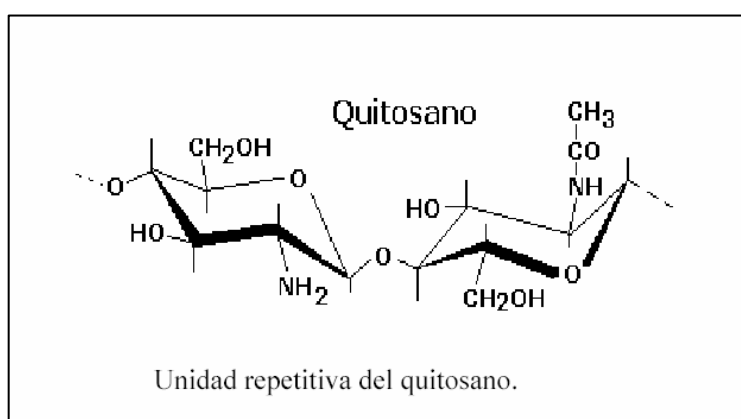


Figura 1. Estructura de quitosano
Fuente: Lárez Cristóbal, 2003

Cuando ocurre la desacetilación parcial de quitina se generan diferentes tipos de quitosano, con rangos de grados de desacetilación y diferentes pesos moleculares. El grado de desacetilación, del quitosano se halla en un rango aproximado de 70 – 95%, mientras que en el caso de la quitina es alrededor del 5 – 15%. (Shuang Chi, 2004). Por otra parte Baxter, 2004, indica que el peso molecular del quitosano tipo comercial puede variar entre 100 y 800 kDa.

1.1.1. Propiedades químicas del quitosano

Las propiedades del quitosano son muy similares a la celulosa, tanto en su estructura química como en su actividad. Debido a la presencia de grupos amino en la cadena polimérica, el quitosano es un material muy versátil. Tiene la capacidad de realizar varias modificaciones, como reacción con enzimas y obtención de películas biodegradables.

Debido a la presencia grupos amino libres tiene la propiedad de protonarse y por lo tanto ser soluble en medio ácido, aumentando así su reactividad. Su característica principal es la inocuidad a la salud humana.

Es una sustancia polimérica de origen natural y como posee la habilidad de captar los lípidos, muy importante en el ámbito de la salud. Según Shirai 2004, el quitosano es un polisacárido catiónico y se une de forma electrostática a las moléculas con carga eléctrica negativa, formándose largos polímeros, que desde el punto de vista de salud y para pérdida de peso, no pueden ser atacados por los jugos gástricos y son eliminados directamente por las heces. Como otra propiedad interesante, el chitosán es no digerible.

Químicamente el chitosán está constituido por largas moléculas de glucosamina y moléculas de N – acetil – glucosamina.

Además el quitosano tiene la propiedad de formar un gel y tiene alta capacidad de adsorción. Asimismo es biodegradable y posee poder bacteriostático, inhibiendo el crecimiento microbiano con la gran importancia de poder formar films o películas comestibles.

A continuación se presenta una tabla en la que se muestra diferentes propiedades de quitosano producido por tres casas comerciales. SSSBiotic, Dalwoo y Peakchem se dedican a la venta, entre otros productos, de quitosano para diferentes usos.

Tabla 1
Estudio Comparativo
de diferentes tipos de quitosano grado comercial

Parámetros	SSSBiotic	Dalwoo	Peakchem
Apariencia	Blanco	Polvo blanco o amarillo	Polvo amarillo
Viscosidad	5 – 20 cps	< 5 cps	
Humedad	< 10 %	<10%	4.52%
Ceniza	< 2 %	0.1%	0.91%
Metales pesados	< 2 ppm	10 ppm	20 ppm
Mesh	80	60	80
Total Plate Count	< 1 x 10 ⁴ ufc/g		1000 ufc/g
Hongos y levaduras			100 ufc/g
Salmonella	Negativo		Negativo
E. Coli	Negativo		Negativo

Elaborado por: Luis Soro G.

1.1.2. Fuentes donde se encuentra el quitosano

Como se mencionó anteriormente, el quitosano es un polisacárido producto natural derivado de la hidrólisis de la quitina. La quitina se la encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de

muchos hongos, levaduras y algas. En la industria se obtiene por desacetilación parcial de la quitina, ya sea por métodos químicos o enzimáticos.

De manera particular, el quitosano se lo encuentra en el caparazón de camarones, langostinos, cangrejos y langostas.

1.1.3. Aplicaciones del quitosano

El campo de utilización del quitosano es muy variado y comprende: tratamiento de aguas, industria alimentaria, medicina, biotecnología, agricultura, cosmética, industria papelera, tecnologías de membrana, alimentos nutraceuticos (debido a la característica de solubilidad y posibilidad de obtener múltiples compuestos derivados) y en la industria textil.

Como interés especial, en el campo de alimentos y bebidas, el quitosano se lo utiliza principalmente como aditivos. Ya sean éstos espesantes (proporcionando mayor viscosidad al producto), gelificantes (debido a que precipita a un pH superior a 6), estabilizando emulsiones y como agente preservante (utilización en productos de panificación por su acción antifúngica y antibacteriana). Adicionalmente el quitosano se

utiliza como recubrimiento protector de frutas y hortalizas. Las películas de quitosano son resistentes, duraderas y flexibles incidiendo directamente en la vida útil del producto. De esta manera, estas películas minimizan la velocidad de respiración y pérdida de agua de la fruta o del vegetal.

Cuando se elaboran alimentos mínimamente procesados la acción del quitosano es importante como agente preservante frente a microorganismo como bacterias, levaduras y hongos. El uso de concentraciones mayores al 0.02% protegen al alimento frente a una posible contaminación por *Escherichia coli*. La acción antimicrobiana se realizan privando a los microorganismos de iones vitales como el cobre, bloqueando o destruyendo la membrana, filtrando constituyentes intracelulares, y formando complejos polielectrolíticos con polímeros ácidos y células de superficie. La acción antimicrobiana del quitosano es influenciada por factores intrínsecos tales como tipo de quitosano, el grado de polimerización, la composición química y las condiciones ambientales. (Baxter, 2004).

En el caso de la elaboración de alimentación animal, se utiliza el quitosano en la recuperación de proteína de desechos de ovoproductos.

1.2. Definición de la materia prima

La materia prima que se utiliza para la obtención del quitosano es la cáscara o caparazón del camarón. Este estudio utiliza la variedad *Penaeus Vannamei*, conocida también como camarón blanco, encontrado frecuentemente desde las costas de Sonora en México hasta el norte de Perú. En el Ecuador el *P. vannamei* es el que comúnmente se cultiva en nuestras camaroneras.

1.2.1. Morfología del camarón

El camarón es el nombre común de diferentes crustáceos decápodos pertenecientes a la familia de los peneidos (*Penaeidae*). Posee un cuerpo alargado y cilíndrico, aplanado en los lados, más ancho en la parte superior que en la inferior.

Como se puede observar en la Figura 2, un camarón pendido no tiene esqueleto pero sí un recubrimiento quitinoso, delgado y flexible en todo el cuerpo (caparazón) dividido en tres partes:

cefalotórax, abdomen y cola, con cabeza y ojos salientes de gran tamaño. Su color es de un gris claro cuando está crudo que cambia a naranja a la cocción.

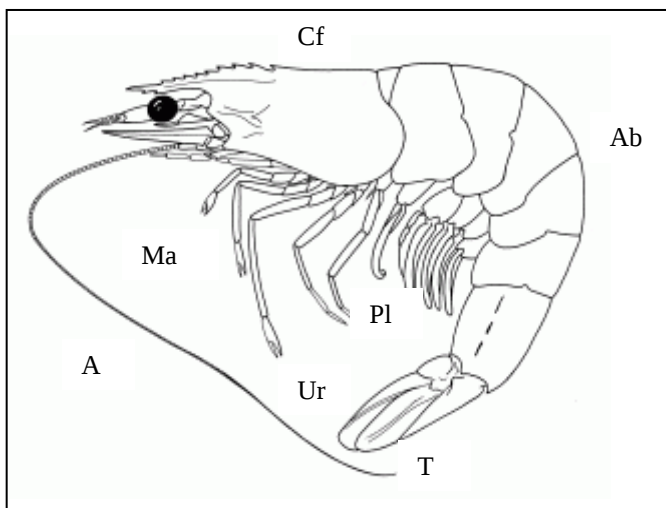


Figura 2. Morfología del Camarón. A: antena; Ab: abdomen; Cf: cefalotórax; Ma: maxilipedio; Pl: pleópodos; T: telson; Ur: urópodos
Fuente: FAO/SIDP Species Identification Sheets

La especie se cría en grandes estanques de por lo menos un metro de profundidad. Son fertilizados con urea o se añaden directamente concentrados suplementarios, pero con frecuencia se utilizan ambas técnicas.

La materia prima que se utiliza es el exoesqueleto del camarón, la cual constituye actualmente un desecho para algunas empresas camaroneras. Esto representa la porción no comestible del mismo y no exportable, dependiendo el mercado

a donde se dirija. Existen mercados que prefieren el camarón entero, otros sin cabeza, pelado y desvenado, o una mejor presentación que significa un valor agregado como brochetas y mariposas.

En el Libro Blanco del Camarón, edición 1989, se establece que de cada 100 libras de camarón, se obtienen entre 65 y 70 libras de cola. Es decir que el porcentaje de desperdicios constituye el 30 y el 35%.

1.2.2. Composición química de la materia prima

El caparazón o materia prima está constituido por: quitina, proteína, pigmentos y cenizas con un alto porcentaje de calcio, seguido de magnesio y fósforo. En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de los componentes básicos del caparazón.

Tabla 2
Composición química del exoesqueleto

Componente	Porcentaje
Quitina	17 – 32
Proteína	17 – 42
Pigmentos	1 – 14
Cenizas	41 - 46

Fuente: Shari Rene Baxter, 2004.

Elaborado por: Luis Soro G

1.2.3. Variables de deterioro de la materia prima

Debido a que es un producto perecible, sufre cambios que se acentúan con el pasar del tiempo. Estos se los puede clasificar en tres tipos: físicos, químicos y microbiológicos y dependen de la presentación del camarón. Si el camarón se encuentra fresco es importantísimo verificar el olor, color, textura blanda, consistencia firme al tacto. Debe ser libre de olores y colores característicos de descomposición, entre ellas verdosa, amarillenta, puntos negros o decoloraciones. Cuando el color amarillo se encuentra en la superficie, es un indicio que el mal manipuleo origina una leve deshidratación del producto. Con respecto a la textura debe estar libre de sustancias extrañas,

estructura pastosa o blanda del músculo, desprendimiento de sustancias viscosas así como ojos manchados y opacos.

Desde el punto de vista microbiológico es muy importante que el producto esté libre de bacterias coliformes, y de putrefacción como pseudomonas. El efecto de la temperatura de almacenamiento es un factor muy importante, en el rango de 0 a 25°C, la actividad microbiana es relativamente más importante, y los cambios en la temperatura tienen mayor impacto en el crecimiento microbiano que en la actividad enzimática. (Fig. 3)

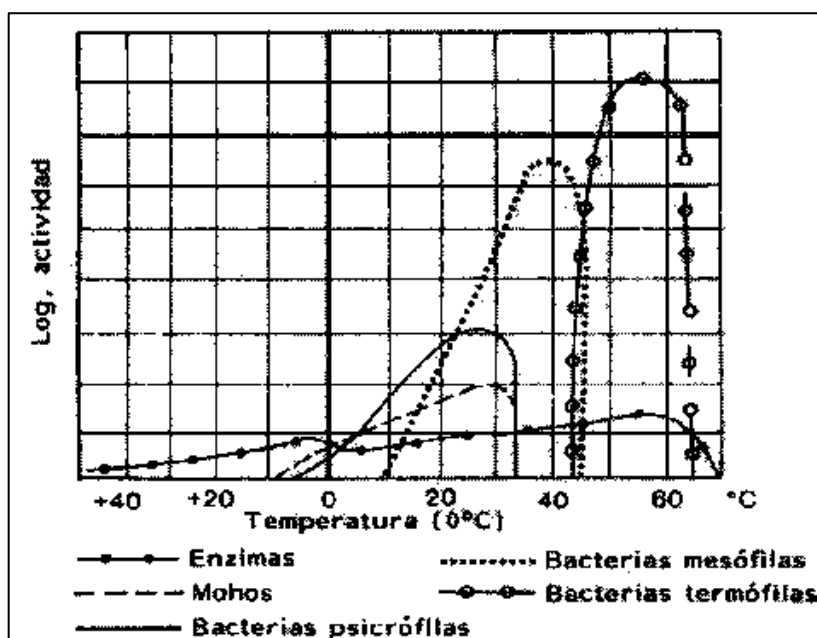


Figura 3: Actividad enzimática relativa y velocidad de crecimiento bacteriano en función a la temperatura

Fuente: <http://www.fao.org>

La actividad microbiana es responsable por el deterioro de la mayoría de los productos pesqueros frescos. Por lo tanto, la duración en almacén de los alimentos se extiende marcadamente cuando los productos son almacenados a bajas temperaturas. En países industrializados es una práctica común almacenar el pescado fresco y mariscos en general, en hielo (a 0 °C).

A los crustáceos casi siempre se le da una precocción y algunas veces se acidifican, se tratan con salmuera, se blanquean, o bien se les aplica alguna combinación de estos procesos. Debido a la mala manipulación del crustáceo en el momento de cosecha, procesamiento y empaque, se generan productos de baja calidad. Es por esto que la importancia de higiene en la manipulación debe mantenerse en un área de trabajo de completa asepsia.

1.3. Emulsiones

Cuando un sistema contiene dos líquidos inmiscibles, uno disperso en el otro, se lo conoce como emulsiones. Aquella fase que contiene pequeñas gotas se la conoce como dispersa, mientras que las gotas

disueltas representan la fase continua. La emulsión se caracteriza por ser un sistema termodinámicamente inestable que ocurre por la fragmentación de las gotas de una fase en otra que poseen entre 0.1 y 50 μm . La clasificación básica de las emulsiones es la siguiente:

- Aceite en agua (o/w)
- Agua en aceite (w/o)

En el caso de la elaboración de alimentos, un sistema aceite en agua se presenta en mayonesas, leches, cremas, sopas, salsas y aderezos. En el caso contrario, emulsiones del tipo agua en aceite se encuentran margarina y mantequilla. (McClements, 1999).

Además existen sistemas denominados como múltiples emulsiones, que se caracterizan por ser del tipo (w/o/w) y (o/w/o). Un ejemplo de una emulsión tipo agua en aceite en agua consiste en gotas de agua dispersas dentro de grandes gotas de aceite, que a su vez están dispersas en una fase continua acuosa.

Debido a la gran cantidad de energía libre que existe en la interfase de ambos líquidos, las emulsiones tienden a desestabilizarse ya sean por diferentes procesos físico – químicos, que incluyen separación gravitacional, (volumen de cremado y sedimentación), floculación y coalescencia. (Fig. 4).

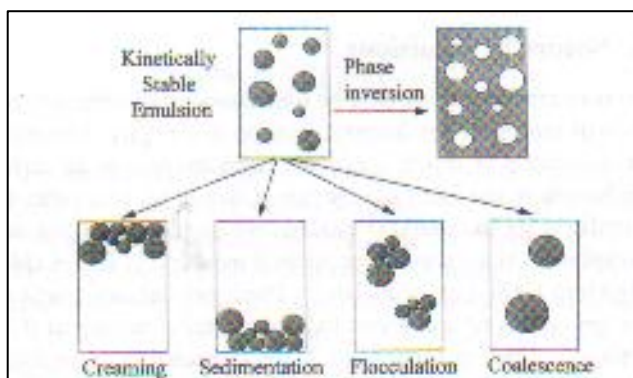


Figura 4: Mecanismos de desestabilización de emulsiones
Fuente: McClements, 1999.

La separación gravitacional consiste en que por medio de la fuerza de gravedad se realiza la separación de las fases. La sedimentación ocurre mediante un movimiento descendente de las gotas que posean una mayor densidad con respecto al líquido en el cual están inmersas. El volumen de cremado, o cremado simplemente, se caracteriza por la migración de las gotas hacia la superficie debido a la menor densidad en relación al líquido.

La floculación como mecanismo de desestabilización de emulsiones, consiste en que los glóbulos de grasa realizan un movimiento como un conjunto y no de manera individual. La floculación no implica la ruptura de la película interfacial que rodea a las gotas, por consiguiente no implica una variación en el tamaño original. El motivo

principal por cual se genera la floculación es porque existe una carga electrostática inadecuada de la superficie del glóbulo.

Por último la coalescencia consiste en el rompimiento total de la interfase de tal manera que se genera un reordenamiento de las gotas y el área interfacial se ve completamente reducida. (Fenema, 1996).

Una excelente manera de alcanzar una estabilización de la emulsión es mediante la fijación por adsorción de las moléculas en la interfaz entre la fase dispersa y la continua. Esto se logra con los emulsionantes o también llamados emulgentes que mediante una disminución de la tensión superficial, las el contacto entre las dos fases se hace mas estrecho y estable. (McClements, 2005).

De acuerdo con el libro de aditivos alimentarios de Multon, una clasificación sencilla de los emulsionantes es la siguiente:

A. Naturales

Iónicos

Sales biliares

Fosfolípidos

Proteínas

Gomas

No iónicos

Colesterol

Saponinas

Gomas

B. Sintéticos

Iónicos

Sales de ácidos grasos

Estearoil – 2 – lactilato de sodio

No iónicos

Esteres de glicerol

Esteres de poliglicerol

Esteres de propilenglicol

Esteres de la sacarosa

Esteres de ácidos grasos de sorbitana

Las interacciones electrostáticas ocurren cuando existen sustancias que tengan cargas eléctricas, ya sea iones y moléculas dipolares.

McClements, 1999 indica que las interacciones electrostáticas poseen un papel muy importante en la determinación de la estructura molecular de algunos polímeros. En el caso de las proteínas, los aminoácidos tienen la capacidad de ionizarse algunos con cargas positivas y otros con cargas negativas. Ejemplos de aminoácidos cargados positivamente son arginina, lisina, prolina, histidina y los del

grupo amino. Caso contrario corresponde al ácido glutámico y aspártico y aquellos aminoácidos pertenecientes al grupo carboxílico (ácidos).

Por su parte algunos los polisacáridos, también poseen grupos ionizables en su estructura, como sulfatos y fosfatos.

Cuando se trabaja con polímeros, las interacciones electrostáticas se vuelven muy sensibles con respecto al pH del medio acuoso y de la concentración.

Cuando un biopolímero contiene grupos que contengan la misma carga, éste tiende a adoptar una configuración extendida ocasionando un distanciamiento entre las cargas y disminuye la repulsión electrostática. Caso contrario, cuando el biopolímero contiene cargas opuestas, tanto positivas como negativas, opta por replegarse y formar una estructura muy compacta de tal manera que maximiza la atracción entre las cargas. (McClements, 1999).

1.3.1. Estabilidad de las emulsiones

Un papel muy importante en las emulsiones de grado alimenticio es el que protagonizan las proteínas y los polisacáridos debido a que ayudan a la estabilidad de la emulsión. Estos biopolímeros pueden

actuar ya sea por separado o mezcladas entre sí. Las interacciones entre proteínas y polisacáridos son afectadas por fuerzas de atracción y repulsión, que varían de acuerdo a la estructura del biopolímero y condiciones ambientales. En el caso de emulsiones aceite en agua, las proteínas, como caseína o suero de leche, ejercen su poder de emulsión debido a la formación de una capa interfacial con propiedades elásticas y por medio de una repulsión estérica, se evita la floculación y coalescencia. (Turgeon, 2004)

Al trabajar con polisacáridos como emulsionantes, en el caso del quitosano, la estabilidad se genera por medio de un efecto de gelatinización o aumento de viscosidad en la fase continua. Es importante destacar que los polisacáridos son generalmente aniónicos, es decir están cargados negativamente. Ejemplos de polisacáridos que actúen mediante el efecto de gelatinización son diferentes gomas como xanthan, carragenina, alginato, carboximetilcelulosa, pectina, entre otros. Otro mecanismo por el cual se estabilizan las emulsiones es mediante una adsorción interfacial como lo realiza la goma guar y arábica. (Turgeon, 2004).

McClements, 2005 indica que muchas investigaciones han demostrado una técnica que crea una membrana interfacial alrededor

de las gotas de aceite compuesta por muchas capas del emulsionantes o de los polielectrolitos.

El quitosano como emulsionante es un polisacárido catiónico que posee zonas hidrofílicas ricas en glucosamina y zonas hidrofóbicas ricas en N – acetil – glucosamina. (Turgeon, 2004). El quitosano puede actuar en una combinación ya sea con proteínas o polisacáridos. El estudio de Laplante, et al 2004, revela que por la naturaleza catiónica del quitosano, opuesta a la aniónica de algunos polisacáridos, favorecen a la interacción entre proteínas y polisacáridos y estabiliza la coadsorción con el suero de leche. En el presente estudio se analizará el quitosano como emulsionante en un sistema aceite en agua, sin la necesidad e combinarse con proteínas.

Otros estudios que indican que el quitosano puede actuar como un útil emulsionante en un sistema múltiple w/o/w. En este caso, la emulsión se realiza por medio de un proceso doble. En la emulsión primaria w/o, se utiliza un emulsionante hidrofóbico, mientras que para la segunda emulsión o/w, se requiere de un emulsionante hidrofílico. (Agulló, 2001).

El quitosano es un material versátil que puede generar este tipo de emulsiones sin añadir ningún surfactante. El motivo por el cual el quitosano se lo puede utilizar en ambos sistemas de emulsión es por la composición química, en la cual presenta moléculas con diferente grado de desacetilación. Cuando las moléculas presentan un alto grado de desacetilación corresponde a emulsiones del tipo aceite en agua (o/w). Por el contrario, aquellas moléculas en las que el grado de desacetilación es mucho menor son más favorables para emulsiones tipo agua en aceite (w/o).

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

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

El aceite de girasol fue comprado en un supermercado local.

Agua destilada fue utilizada para todas las preparaciones.

Con respecto a los equipos utilizados se utilizó lo siguiente:

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

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

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

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

2.1. Métodos de obtención de quitosano

2.1.1. Método Hindú

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

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

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



Gráfica 1. Extracción con hidróxido de sodio 0.5%.

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



Gráfica 2. Extracción con ácido clorhídrico 1.25 N.

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

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



Gráfica 3. Extracción con hidróxido de sodio 50%.

2.1.2. Método Propuesto

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

La primera parte del experimento corresponde a la adición de HCl 2N en relación sólido:líquido de 1:10 a temperatura ambiente por dos horas. Esto genera desprendimiento de volúmenes de CO₂. (Gráf. 4).



Gráfica 4. Extracción con ácido clorhídrico 2 N.

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



Gráfica 5. Extracción con hidróxido de sodio 2%.

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

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

2.1.3. Método Universidad Técnica de Ambato

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

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



Gráfica 6. Materia prima, caparazones de camarón

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

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

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



Gráfica 7. Extracción con hidróxido de sodio 50%.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

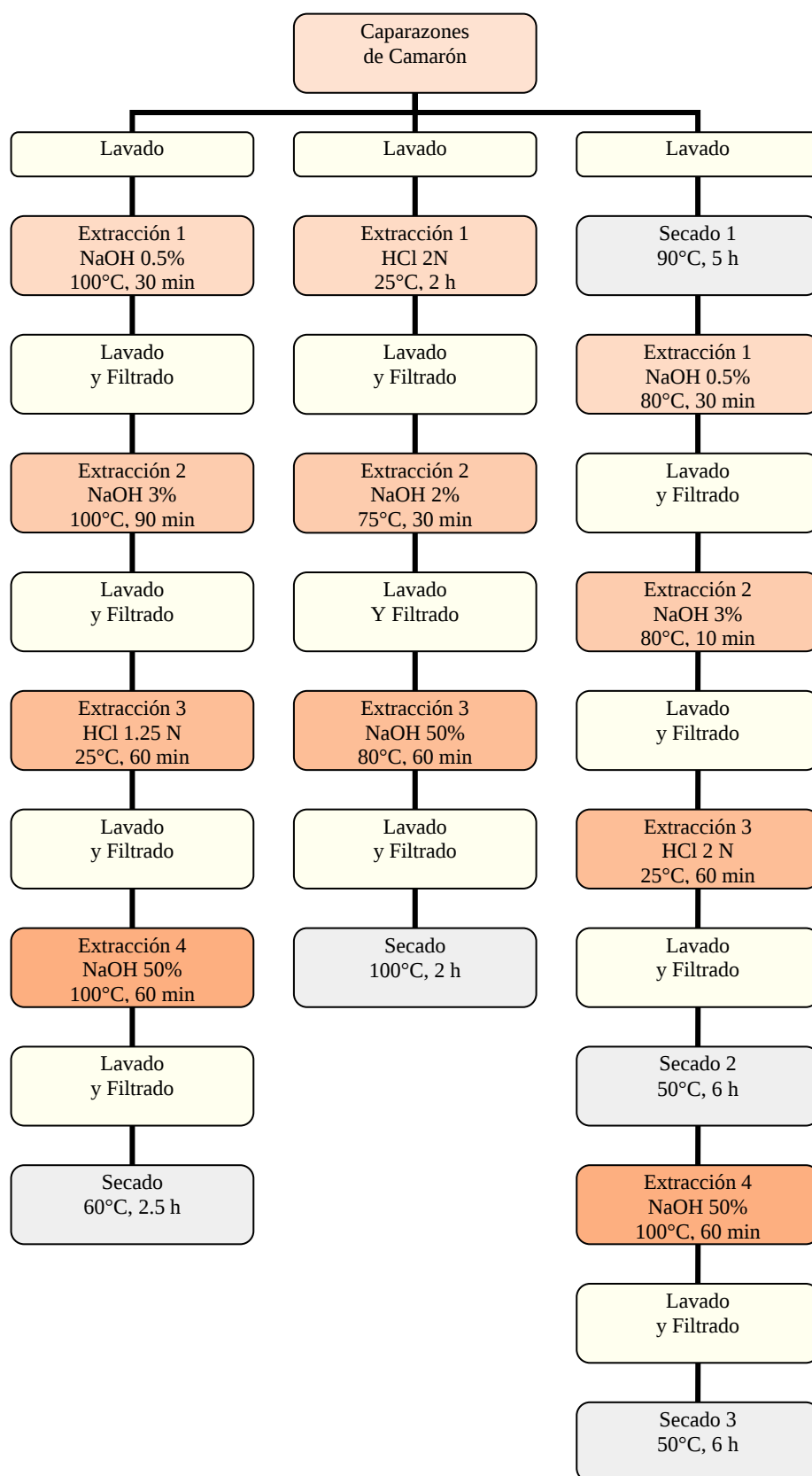


Figura 5. Diagrama de flujo de los tres procesos de obtención de quitosano
 Elaborado por: Luis Soro G.

2.2. Técnica de Preparación de Emulsiones

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

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



Gráfica 8. Medición de índice de cremado

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

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

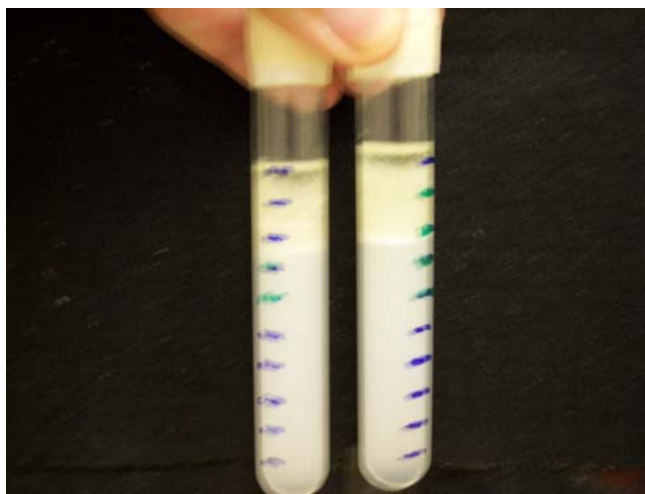
El segundo tipo corresponde a un área bastante importante en el campo de las emulsiones, pues es el efecto del pH. Para preparar la emulsión a diferentes valores de pH se adiciona ácidos y álcalis. En el rango de los ácidos se preparan soluciones de 0.1M y 0.01M de ácido clorhídrico. Mientras que para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

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

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

2.3. Técnica de Estabilidad de la Emulsión

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



Gráfica 9. Medida de la estabilidad de la emulsión

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

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

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

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

CAPITULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con la finalidad de demostrar que actualmente se están realizando nuevos estudios y aplicación de nuevas tecnologías con respecto al desperdicio del exoesqueleto del camarón, se manifiesta que el quitosano obtenido por medio de las extracciones es un polisacárido y que gracias a su versatilidad, puede ser usado en un sinnúmero de aplicaciones.

Si bien es cierto lo principal en este tema de estudio es la caracterización como emulsionante, es de suma importancia recalcar primero que se debe obtener el quitosano. En la actualidad el quitosano es un compuesto que esta siendo muy estudiado y muchas empresas y universidades se dedican a determinar el mejor procedimiento de obtención del quitosano. Dentro del exoesqueleto del camarón existe una

gran cantidad de compuestos químicos, los cuales deben de ser transformados, modificados y eliminados hasta obtener el quitosano. Los métodos utilizados para la extracción de quitosano guardan cierta similitud entre ellos, pero la base es siempre la misma y su importancia radica en la acción sobre los compuestos químicos. Las variaciones en tiempos, temperaturas y concentraciones para la extracción son las variables que afectan directamente a la calidad de quitosano que se desea obtener en función del grado de desacetilación.

El hecho de adicionar una solución alcalina a bajas concentraciones genera en los caparazones la desnaturalización proteica por hidrólisis y un debilitamiento de su estructura, y por consiguiente disminuye el volumen. Debido a que el exoesqueleto presenta grandes cantidades de calcio, la acción de adicionar ácido clorhídrico como método de extracción ayuda en la formación de complejos de cloruro de calcio, por una disociación del cloro y el hidrógeno, los cuales son removidos por medio del lavado. De tal manera, la composición química del exoesqueleto se ve alterada por la eliminación de proteínas y minerales, quedando así, la estructura de la quitina. El mayor desafío fue transformar la quitina en quitosano, lo cual se consiguió por medio de hidróxido de sodio a una concentración muy alta. Esto se logró por medio de la remoción de los

grupos acetilo de la estructura original logrando así un quitosano que, para efecto de mejor presentación y uso, se lo procedió a secar y moler.

3.1. Valoración de los métodos estudiados como emulsionante

Una vez obtenido el quitosano, lo mas importante fue definir cual método de extracción resultó el mejor para ser aplicado como emulsionante. Puesto que la emulsificación no es una ciencia exacta, son necesarias ciertas generalizaciones fundadas en la experiencia de tanteos y pruebas realizadas. Debido a las limitaciones de la tecnología fue un poco difícil de predecir el grado exacto de desacetilación de cada uno de los tres tipos de quitosano. Haciendo referencia a la literatura, a medida que el grado de desacetilación aumenta, el quitosano estabiliza en mayor medida una emulsión de tipo aceite en agua. Este tipo de emulsión fue la escogida para las pruebas porque al realizar la remoción del grupo acetilo, el monómero de la cadena que se origina, representa la parte hidrofílica de la cadena. Si el grado de desacetilación es mayor, por consiguiente más cantidad de monómeros hidrofílicos se va a formar.

La preparación de la emulsión consiste por lo tanto en 20% de aceite de girasol, 80% de ácido clorhídrico en una concentración de 0.1M y

0.2% de quitosano, por cada uno de los diferentes métodos, es decir el Hindú, el propuesto y el de la Universidad Técnica de Ambato.

Un buen emulsionante es aquel que puede crear una emulsión tal que visiblemente no sea fácil de detectar. El volumen de cremado es una herramienta muy útil para determinar la estabilidad en una emulsión. A medida que el cremado o volumen de separación entre el agua y el aceite aumenta, mayor es la inestabilidad de la emulsión y, por lo tanto, menos eficiente resulta ser el emulsionante.

Adicionalmente, se preparó una emulsión denominado “Blanco”. Esta consiste en realizar la preparación de la emulsión sin la adición de emulsionante. En esta solo constituye una mezcla el aceite y la solución acuosa de ácido clorhídrico, en las proporciones antes establecidas. Este Blanco va a funcionar como el patrón con el cual los tres métodos serán comparados, ya que ambas fases se van a separar rápidamente en dos fases diferenciadas por el contraste de la densidad. En la tabla 3 podemos observar que la desestabilización de la emulsión se realizó casi de inmediato. Al primer minuto que se concluyó la emulsión, ya se había formado un 50% de cremado y la tendencia fue en crecimiento progresivo hasta llegar a un 90%, solamente 20 minutos de finalizada la emulsión.

Con esto se ratifica el hecho de que las emulsiones son sistemas muy inestables y que siempre van a ser propicios para la desestabilización, ya sea a corto, largo o mediano plazo.

Tabla 3
Blanco (80% 0,1 M HCl + 20% aceite)

Tiempo (h)	CI 1	CI 2	CI promedio
0,02	55	50	52,5
0,03	55	65	60,0
0,05	55	65	60,0
0,08	60	80	70,0
0,17	60	85	72,5
0,25	70	85	77,5
0,33	70	90	80,0
0,5	75	90	82,5
1	80	90	85,0
2	80	90	85,0

Elaborado por: Luis Soro G

En la estabilidad de la emulsión las partículas o gotas se mueven hacia la superficie hasta llegar a un límite en el cual no puedan subir más y se empiezan a agrupar formando una capa o “crema”.

En la tabla 4 se puede apreciar los valores de índice de cremado para el Proceso 1. Se puede apreciar que desde los 15 minutos hasta que se cumplió las 48 horas el índice de cremado no sufrió cambios

considerables. Pero en un principio la emulsión se desestabilizó muy pronto, lo cual indica que la energía del sistema es baja ya que en pocos minutos de finalizada la homogenización, las partículas de aceite se dirigen a la superficie.

Tabla 4

Proceso 1

Tiempo (h)	CI 1	CI 2	CI promedio
0,03	40	30	35
0,08	50	40	45
0,17	60	50	55
0,25	65	60	62,5
0,33	65	60	62,5
0,42	65	60	62,5
0,5	65	60	62,5
1	65	60	62,5
19	70	65	67,5
20	70	65	67,5
24	70	65	67,5
48	70	65	67,5

Elaborado por: Luis Soro G

Para el Proceso 2 se puede apreciar en la tabla 5 que durante el mismo tiempo en el cual se desestabiliza la emulsión, el volumen de cremado es ligeramente mayor, haciendo que el quitosano obtenido en el Proceso 1 tenga mejores propiedades para considerarlo como emulsionante. El cambio de los diferentes valores del índice de cremado es muy drástico en comparación con el método 1. Si bien es cierto el valor del índice de cremado se mantuvo constante en

promedio por mayor tiempo, al inicio se notó muy claramente una desestabilización de la emulsión.

Tabla 5

Proceso 2

Tiempo (h)	CI 1	CI 2	CI promedio
0,02	50	30	40
0,03	60	45	52,5
0,08	60	50	55
0,17	70	60	65
0,25	70	60	65
0,33	70	60	65
0,42	70	65	67,5
0,5	70	65	67,5
1	75	70	72,5
20	75	70	72,5
24	75	70	72,5
48	75	70	72,5

Elaborado por: Luis Soro G

Por último, el método de la Universidad Técnica de Ambato resultó ser el quitosano que mejor se aplica para ser considerado un emulsionante. El quitosano obtenido pudo ejercer la permanencia de la emulsión por mucho más tiempo hasta ser desestabilizado en relación a los otros tipos de quitosano.

Durante la primera hora de observación, no se produjo un cambio en el índice de cremado, pero entre las 19 y 48 horas posteriores sí se pudo ver un incremento considerable.

Esto nos indica que este tipo quitosano se adaptó mejor a las condiciones y tipo de emulsión establecidas. La energía del sistema es mucho mayor en comparación a los dos métodos anteriores puesto que se requiere mayor tiempo para poder romper y desestabilizar el sistema. Incluso se puede pensar que el grado de desacetilación es mayor en este quitosano que los anteriores, puesto que se acopló mejor a la emulsión aceite en agua.

Tabla 6

Proceso 3

Tiempo	CI 1	CI 2	CI promedio
0,08	0	0	0
0,17	0	0	0
0,25	0	0	0
0,33	0	0	0
0,42	0	0	0
0,5	0	0	0
1	0	0	0
19	70	70	70
20	70	70	70
24	70	70	70
48	75	80	77,5

Elaborado por: Luis Soro G

El quitosano es un emulsionante catiónico que produce una separación entre las gotas de aceite. De tal manera que las gotas se cargan eléctricamente en su superficie, siendo esta carga del mismo

signo para todas las gotas y por lo que la repulsión electrostática impide que se unan entre sí.

En la siguiente figura se observa el resumen de los resultados de la acción del quitosano como emulsionante. Como se puede apreciar el mejor procedimiento corresponde al de la Universidad Técnica de Ambato, que obtiene un mejor quitosano para la emulsión aceite en agua. Para un mismo punto de referencia, a las 20 horas desde que se inició la emulsión, se puede apreciar que los valores de CI de los tres métodos son similares, pero la ventaja del tercero es que antes transcurrió el tiempo con un valor del índice de cremado mucho menor. La desestabilización de los dos primeros métodos fue tan precipitada que no conviene ese tipo de quitosano ser usado como emulsionante.

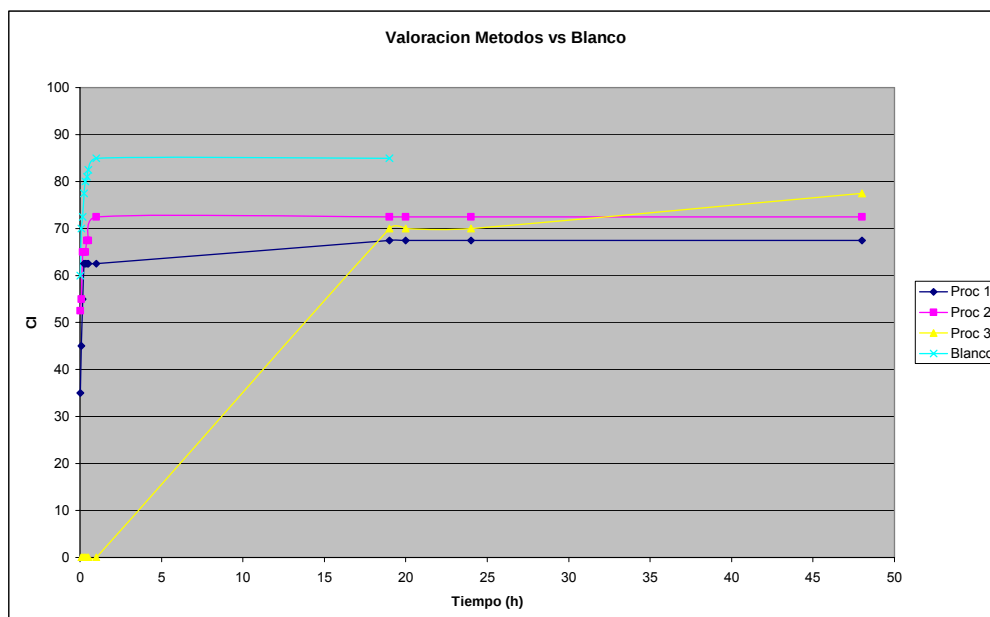


Figura 6. Valoración de los métodos como emulsionantes

Elaborado por: Luis Soro G.

3.2. Efecto del pH en la estabilidad de la emulsión

La estabilidad de una emulsión depende de la carga electrostática del emulsionante, del pH del medio y de la fuerza iónica en la fase acuosa.

Cuando los valores de pH están por debajo de la neutralidad la carga eléctrica de las gotas evita la floculación porque forma repulsión entre las mismas. Por el contrario, cuando los valores de pH son cercanos al punto neutro, la repulsión de las cargas es baja por lo tanto se desestabiliza la emulsión.

Para este análisis se utilizó solución acuosa de ácido clorhídrico para obtener el medio ácido en dos concentraciones: 0.1 M y 0.01 M dando como pH finales 4 y 6 respectivamente. En el punto neutro solamente se utilizó agua destilada, confirmando así un pH de 7. Por otro lado, en el rango del pH alcalino se utilizó como sustancia bicarbonato de sodio en concentraciones de 1 y 3%. Con esto los valores finales del pH resultaron ser 8 y 9. Siempre se respetó la relación de 80% de la solución acuosa, ya sea de ácido o álcali (fase continua), 20% de aceite de girasol y 0.2% de quitosano.

El quitosano es un biopolímero catiónico que tiene un grupo amino en su estructura, y debido a este grupo, la estabilización de una emulsión es producida por una repulsión electrostática, de tal manera que es afectada con el pH. En la figura 7 se puede observar el comportamiento del quitosano a diferentes valores de pH. Es notorio que cuando está en un pH ácido, la estabilidad de la emulsión es mucho mayor. Esto se debe a que en medios ácidos aumenta la concentración de protones en la solución, de tal manera que el grupo amino se mantiene positivamente cargado, produciendo la separación electrostática entre las gotas.

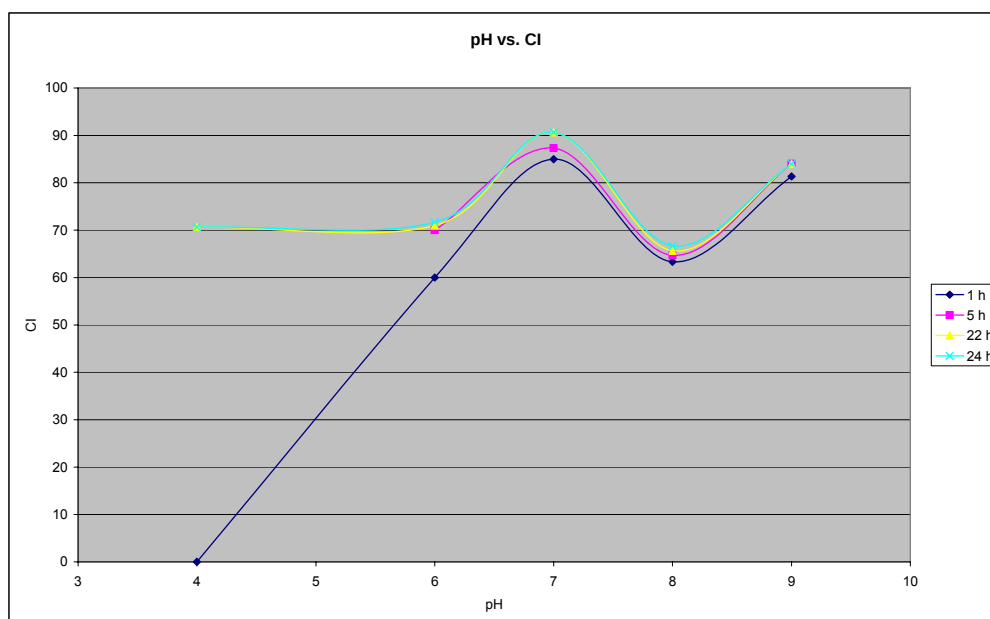


Figura 7. Efecto pH vs índice de cremado
Elaborado por: Luis Soro G.

Muchos estudios mencionan que en medios ácidos el poder emulsionante del quitosano se incrementa debido a que la estructura helicoidal del quitosano se mantiene reduciendo su movilidad.

Por otro lado, se puede observar que a medida que el pH se acerca al pKa del quitosano ($\approx 6.3 - 7$) la solución se vuelve más inestable. Esto es debido a que cuando $\text{pH} = \text{pKa}$ la carga positiva del quitosano desaparece, reduciendo la repulsión entre gotas.

Cuando el valor del pH se incrementa con bicarbonato de sodio, se puede notar un ligero aumento de estabilidad, paulatinamente. Esto indicaría que al disminuir la solubilidad incrementaría la interacción

entre polímeros, formando una estructura gelificante lo cual mantiene separada las gotas de aceite.

3.3. Efecto de la concentración de quitosano

En una emulsión es muy importante controlar y determinar la concentración que se necesita para que un emulsionante actúe eficientemente. Para las pruebas de laboratorio se escogió un rango entre 0.2% al 1% de quitosano obtenido.

En la figura 8 se puede apreciar el comportamiento del quitosano a diferentes concentraciones:

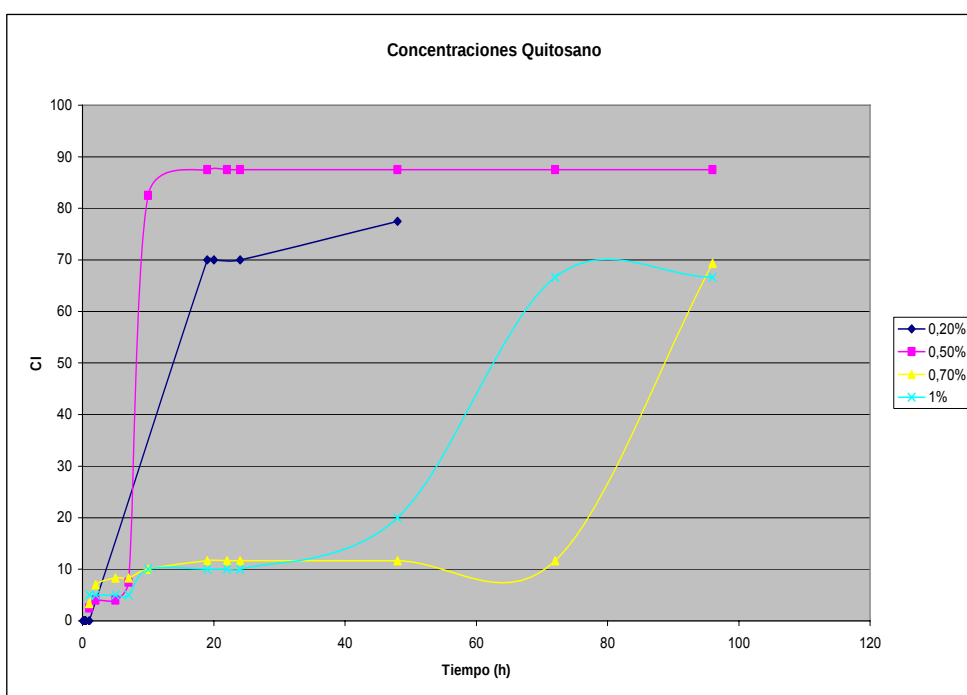


Figura 8. Concentraciones de quitosano vs índice de cremado
Elaborado por: Luis Soro G.

Cuando se utilizó 0.5% se pudo observar que el valor del índice de cremado fue aumentando progresivamente, pero entre las 7 y 10 horas existió una violenta separación entre las fases, haciendo que el índice de cremado se incrementara y por lo tanto el sistema se desestabilizó bruscamente.

Cuando se realizó las pruebas con concentraciones de 0.7% y 1% se pudo apreciar considerablemente una mejoría de la estabilidad de la emulsión. Las fases de aceite y de agua se homogenizaron satisfactoriamente y presentaron un comportamiento similar inicial. La emulsión funcionó mejor con una concentración de 0.7% de quitosano pues pudo permanecer por mayor tiempo sin que se desestabilice el sistema en comparación con la de 1%. Esta, (1%), funcionó muy bien como emulsionante pero debido a sus propiedades de gelificación, formó una capa entre las gotas de aceite y agua creando un distanciamiento y así evitando que se reagrupen.

Cabe recalcar, que la concentración de un emulsionante, se ve afectada directamente a la eficacia de la homogenización. Esto es que, a medida que es mejor la homogenización, mayor cantidad de partículas se van a crear por disminución de tamaño, y el área

interfacial va a aumentar requiriendo así que exista una mayor cantidad de quitosano.

3.4. Efecto iónico en la emulsión

El efecto iónico en la emulsión es un factor muy importante en el cual se determinó que el cloruro de sodio reacciona con el quitosano formando interacciones electrostáticas. La fuerza iónica en una solución acuosa depende de la concentración de los iones contenidos. Así, a medida que la fuerza iónica aumenta, la repulsión electrostática es progresivamente menor.

En las figuras 9 y 10 se explica claramente el comportamiento que tiene el quitosano y el efecto de adicionar una solución salina a la emulsión. Al ser el quitosano un biopolímero catiónico, interactúa con el cloruro de sodio. De esta manera se disminuye la repulsión electrostática entre las gotas de aceite. Así, el quitosano actúa con el ión cloruro disminuyendo la carga positiva en la superficie de la gota. Como las gotas están cargadas eléctricamente en su superficie, siendo esta carga del mismo signo para todas las gotas, la repulsión electrostática impide que se unan entre sí.

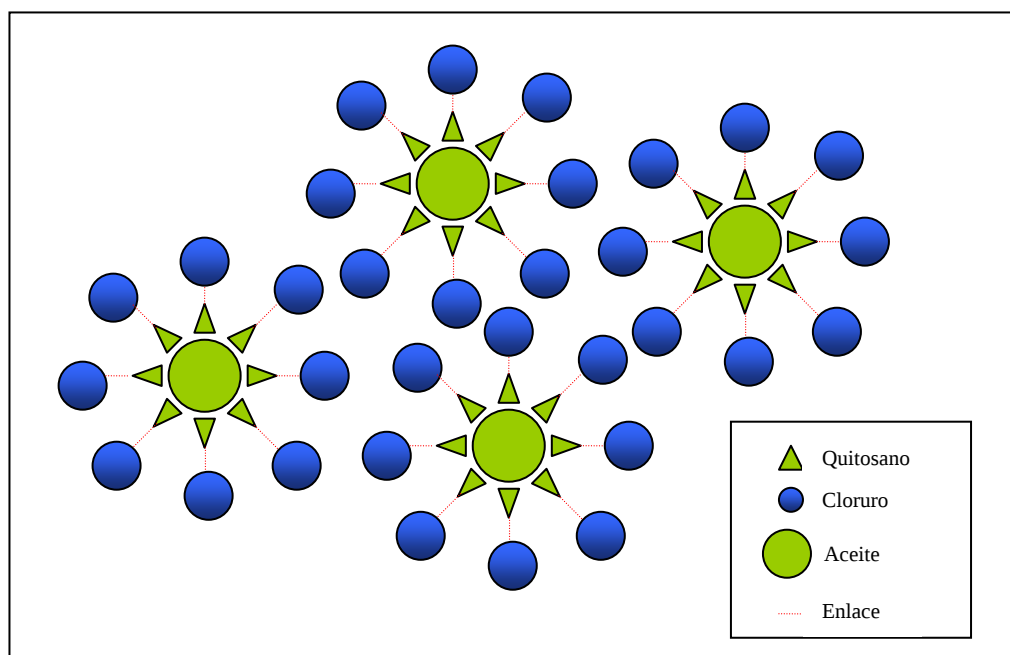


Figura 9. Uniones electrostáticas quitosano – cloruro. Altas concentraciones
Elaborado por: Luis Soro G.

Si la concentración de cloruro disminuye el esquema se lo visualizaría de la siguiente manera:

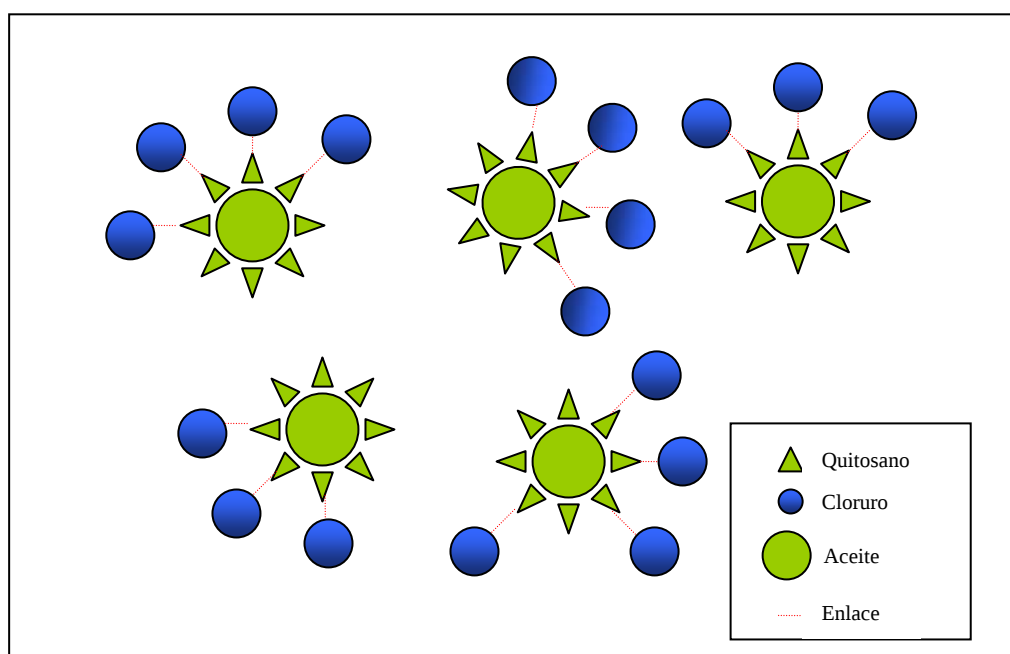


Figura 10. Uniones electrostáticas quitosano – cloruro. Bajas concentraciones
Elaborado por: Luis Soro G.

Esto lo podemos observar en las siguientes tablas, donde varían la concentración de cloruro de sodio entre 0.3 M y 0.7 M.

Cuando se adicionó 0.3 M de NaCl, la menor concentración, el comportamiento del índice de cremado se mantuvo en los primeros minutos un poco más estable, ya que no se separó las fases con la misma rapidez que a una concentración de 0.7 M.

Tabla 7

Fuerza iónica (0,01 M HCl + 0,3 M NaCl)

Tiempo (h)	CI 1	CI 2	CI prom
0,02	0	0	0,0
0,03	0	0	0,0
0,08	30	3	16,5
0,17	59	57	58,0
0,33	61	59	60,0
0,5	61	60	60,5
0,67	61	60	60,5
0,83	62	60	61,0
1	62	60	61,0
6	62	60	61,0
11	62	60	61,0
17	62	61	61,5
24	62	61	61,5

Elaborado por: Luis Soro G

Tabla 8**Fuerza iónica (0,01 M HCl + 0,7 M NaCl)**

Tiempo (h)	CI 1	CI 2	CI prom
0,02	0	0	0,0
0,03	57	53	55,0
0,08	58	60	59,0
0,17	60	60	60,0
0,33	60	60	60,0
0,5	65	61	63,0
0,67	65	63	64,0
0,83	70	70	70,0
1	70	70	70,0
6	71	70	70,5
11	71	70	70,5
17	71	70	70,5
24	71	70	70,5

Elaborado por: Luis Soro G

Cuando hay 0.3 M de concentración, una parte del cloruro se une al quitosano (cargas positivo – negativo) y existe una mayor repulsión entre las gotas en comparación cuando existe una concentración mayor (0.7 M). Por lo tanto, el índice de cremado es menor y por ende la estabilidad es mayor.

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de revisar los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio, se puede concluir y recomendar lo siguiente:

1. Existen a nuestro alcance un sinnúmero de compuestos químicos y sustancias consideradas como desechos, pero con un análisis profundo se encuentran sustancias aptas para ser utilizadas.
2. En el caso particular de los caparazones de camarón, el compuesto fundamental es la quitina, que transformada en quitosano, permite establecer variadas aplicaciones como aditivos alimentarios, y de manera muy específica, como emulsionante.

3. La extracción del quitosano es un procedimiento complejo que requiere de mucho cuidado, ya que se trabaja con soluciones ácidas y alcalinas, con el objetivo de eliminar otros compuestos, tales como proteínas y minerales entre ellos el calcio. De los métodos empleados, el quitosano obtenido en el proceso 3 es el que mejor tiene propiedades como emulsionante, por cuanto prolonga la estabilidad de la emulsión por un tiempo mayor, en comparación con los otros métodos.
4. El pH es un factor muy importante en la actividad de una emulsión. Se pudo determinar que el quitosano es un polisacárido que mejor se adapta a las condiciones ácidas que a la neutralidad y la alcalinidad. Por lo tanto, a un pH de 4, el valor del índice de cremado fue mucho mejor que los demás, ya que se mantuvo por más tiempo estable; en los otros ensayos el volumen de la crema se evidenció muy pronto.
5. La concentración del quitosano usado como emulsionante pudo determinar que la concentración ideal es al 0.7%. El motivo, es la mayor estabilidad de la emulsión. Para las concentraciones menores, la emulsión no fue lo suficientemente estable, por lo que no se consideraron como resultados positivos para el estudio.

6. El efecto iónico tiene un papel muy importante en la emulsión. Como las uniones son de tipo electrostáticas, el hecho de adicionar un compuesto, como el cloruro de sodio, hace que la repulsión aumente conforme disminuya la concentración de iones, y así se genera mayor estabilidad del sistema.
7. A una concentración de NaCl de 0.3 M la emulsión se comportó de manera estable en comparación con la de 0.7 M.
8. Este estudio de caracterización del quitosano como emulsionante es una base de laboratorio, en la que se puede proyectarlo de manera industrial siempre que se adecuen y establezcan los tiempos de una doble homogenización. El objetivo de este estudio es determinar el efecto del emulsionante como tal, el cual podría ser posteriormente aplicado en un producto y estabilidad del mismo.

Como recomendaciones se puede citar que:

9. El quitosano es muy versátil, el ser gelificante es una propiedad adicional encontrada. Se recomienda investigaciones al respecto y su aplicación en el campo de aditivos alimentario.

10. Se recomienda dar aplicación en productos como mayonesas, salsas y aderezos para ensaladas.
11. También es necesario realizar un estudio de la aplicación, a nivel de la industria nacional, como fuente de aprovechamiento de los residuos.

BIBLIOGRAFIA

1. FESSENDEN RALPH, Química Orgánica, Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1983.
2. KRISTOTT J., Stability and shelf-life of food, fats and oils, 2000.
3. LAPLANTE S., TURGEON S., PAQUIN P., Effect of pH, ionic strength, and composition on emulsion stabilizing properties of chitosan in a model system containing whey protein isolate, 2004.
4. LAPLANTE S., TURGEON S., PAQUIN P., Emulsion stabilizing properties of various chitosans in the presence of whey protein isolate, 2004.
5. LAREZ CRISTOBAL, Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 4(2), 2003.
6. Libro blanco del camarón, Edición 1989.

7. MADRID VICENTE, Nuevo manual de Industrias Alimentarias, Tercera Edición, Madrid, 2001.
8. MCCLEMENTS DAVID J, Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques, CRC Press, 1999.
9. MUN S., DECKER E., MCCLEMENTS D., Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil – in – water emulsions stabilized by surfactant – chitosan membranes, 2005.
10. RODRIGUEZ M., ALBERTENGO L., AGULLO E., Emulsification capacity of chitosan, 2001.
11. SHARI RENE BAXTER, Molecular Weight and Degree of Acetylation of Ultrasonicated Chitosan, The University of Tennessee, Knoxville, 2004
12. SHIRAI K., Utilización de desechos de crustáceos para la obtención de quitina, quitosano, proteína y quitinasas mediante biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 2004.

13. SHUANG CHI, Development and characterization of antimicrobial food coatings based on chitosan and essential oils, The University of Tennessee, Knoxville, 2004.

14. <http://www.biopol.cl>

15. <http://www.corpei.org>

16. <http://www.educ.ar>

17. <http://www.ehu.es>

18. <http://www.fao.org>

19. <http://www.fquim.unam.mx>

20. <http://www.oceansatlas.org>

21. <http://www.poscosecha.com>

22. <http://www.peakchem.com>

23. <http://www.pcierd.dost.gov.ph/food/pdf/403.pdf>

24. <http://www.superban.gov.ec>