

Extracción biotecnológica de quitina del desecho de camarón para la producción de quitosano como bioestimulante en semillas de melón

Gabriel I. Tovar^{1,3*}, Mildre Gómez¹, Verónica Obediente^{1,2}, Alexander Rodríguez¹, Livia Soto¹, Alicia Chirinos¹

¹Universidad Politécnica Territorial del Estado Falcón Alonso Gamero (UPTAG), Departamento de Química, Coro, Venezuela. ²UPTAG, Departamento Académico de Ciencias Agropecuarias Coro, Venezuela. ³CONICET- Universidad De Buenos Aires (UBA). Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA). *Correo electrónico: gabrieltovarj@gmail.com

RESUMEN

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y puede ser obtenida por diversas técnicas. Este trabajo propone la extracción de quitina a partir de desechos agroindustriales y la producción de quitosano como bioestimulante de semillas de melón (*Cucumis melo* L.). La quitina fue aislada del exoesqueleto de camarón (*Litopenaeus schmitti*) por el proceso biotecnológico de fermentación ácido láctica (FAL) en biorreactores estacionarios, usando las bacterias endémicas del cefalotórax del camarón y los *Lactobacillus* sp. de lactosuero. La optimización de los parámetros de FAL se analizó por análisis de varianza con la metodología de superficie de respuesta, usando como variable de respuesta el porcentaje de desproteinización. La quitina fue purificada y desacetilada (NaOH45 %) para obtener quitosano, el cual se evaluó por FTIR y TGA. Se determinó la solubilidad del quitosano (>98 %), grado de desacetilación (90 %) y peso molecular (157,68 kg.mol⁻¹). Semillas de melón se trataron con una solución de quitosano, en dos concentraciones, 0,75 y 1 % (p/v), Q1 y Q2 respectivamente, evaluando 4 tratamientos en semillas (control T0, desinfección T1, desinfección + escarificación T2 y escarificación T3) y se comparó el efecto del quitosano con un producto comercial. Los resultados de porcentaje de germinación para los tratamientos de Q1 y producto comercial fueron 100,00 y 47,21 %; el índice de germinabilidad fue de 1 día y 2,7 días, respectivamente. Los tratamientos T0 y T3 mostraron mejores resultados con el uso de suelo local como sustrato.

Palabras clave: biopolímero, *Cucumis melo* L., exoesqueleto, *Litopenaeus schmitti*.

Biotechnological extraction of chitin from shrimp waste for chitosan production as biostimulant in Muskmelon seeds

ABSTRACT

Chitin is the second most abundant biopolymer in nature after cellulose and can be obtained by various techniques. This work proposes the extraction of chitin from agroindustrial wastes and the production of chitosan as a biostimulant of Muskmelon seeds (*Cucumis melo* L.). Chitin was isolated from the shrimp exoskeleton (*Litopenaeus schmitti*) by the biotechnological process of lactic acid fermentation (FAL) in stationary bioreactors, using the endemic bacteria of the shrimp cephalothorax and *Lactobacillus* sp. of whey. The optimization of the FAL parameters was analyzed by analysis of variance with the response surface methodology, using the percentage of deproteinization as the response variable. Chitin was purified and deacetylated (NaOH45 %) to obtain chitosan, which was evaluated by FTIR and TGA. The solubility of chitosan (> 98 %), degree of deacetylation (90 %) and molecular weight (157.68 kg / mol) were determined. Muskmelon seeds were treated with a chitosan solution, in two concentrations, 0.75 and 1 % (w/v), Q1 and Q2 respectively, evaluating 4 seed treatments (control T0, disinfection T1, disinfection + scarification T2 and scarification T3) and the effect of chitosan was compared with a commercial product. The germination percentage results for the Q1 and commercial product treatments were 100.00 and 47.21 %, and the germination rate was 1 day and 2.7 days, respectively. The T0 and T3 treatments showed better results using local soil as a substrate.

Key words: biopolymer, *Cucumis melo* L., exoskeleton, *Litopenaeus schmitti*.

Recibido: 20/01/18 Aprobado: 06/11/18

INTRODUCCIÓN

El camarón, un crustáceo cuyo cuerpo se divide principalmente en cabeza, tórax y cola (40 %, 20 % y 40 %, respectivamente). Es una especie de alto valor comercial, de la que se estima una producción mundial de 5×10^9 Kg para el 2017 (Anderson y Valderrama 2013). De forma tradicional, al procesarse para la venta, se elimina la cabeza, la coraza corporal, las aletas anteriores y posteriores, desechos que representan aproximadamente un 80 % del peso vivo.

Los desechos generados por la industria camarонера no son aprovechados, aunque contienen un 30 % de minerales, casi un 40 % de proteínas y 30 % de quitina (Xu *et al.* 2008). Esta composición de los desechos representa una oportunidad de mercado y un beneficio a las comunidades de pescadores que procesan este rubro (Calderón *et al.* 2015); ya que, pueden utilizarlos para su transformación a biopolímeros, como son la quitina y el quitosano.

La quitina o β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil-D-glucosamina) es un polisacárido natural de gran importancia (Figura 1). En el estado nativo, se presenta como microfibrillas cristalinas ordenadas que forman componentes estructurales en el exoesqueleto de los artrópodos o en las paredes celulares de los hongos y las levaduras. Su obtención consiste en un proceso de desproteínización y desmineralización, que tradicionalmente se realiza por tratamientos químicos que tienden a ser abrasivos y corrosivos al ambiente; por esto, se desarrollaron métodos alternativos por medio

de la biotecnología (Synowiecki y Al-Khateeb 2000). La quitina tiene más aplicaciones cuando se transforma en quitosano (por desacetilación parcial en condiciones alcalinas). El quitosano es un copolímero aleatorio con una fracción molar DA (grado de acetilación) de β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil-D-glucosamina y una fracción de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina (Figura 1).

En la obtención de quitina se usa lactosuero. Este es un subproducto residual del proceso de la transformación de leche en queso, contaminante con efecto significativo cuando se desecha en los afluentes de agua (Guerra *et al.* 2013). Sin embargo, el lactosuero contiene lactosa que puede ser fermentada por bacterias ácido láctica. El resultado de esta fermentación es la producción de ácido láctico, que puede recuperarse para otros usos y así disminuir el impacto ambiental del lactosuero. La fermentación ácido láctica (FAL) es un proceso prometedor para la recuperación de quitina, debido a la producción de ácido láctico que solubiliza los minerales y activa enzimas proteolíticas que pueden desproteínizar el desecho *in situ* (Shirai *et al.* 2001). Cabe destacar que la FAL por las bacterias endémicas del *Litopenaeus schmitti* no está reportada.

La quitina y el quitosano poseen características fisicoquímicas que lo hacen un biomaterial con oportunidades emergentes de aplicación en diversas áreas, como la medicina, industria de alimentos, biotecnología, ambiente y agricultura. En particular, el quitosano se ha estudiado como un producto natural para recubrimiento de

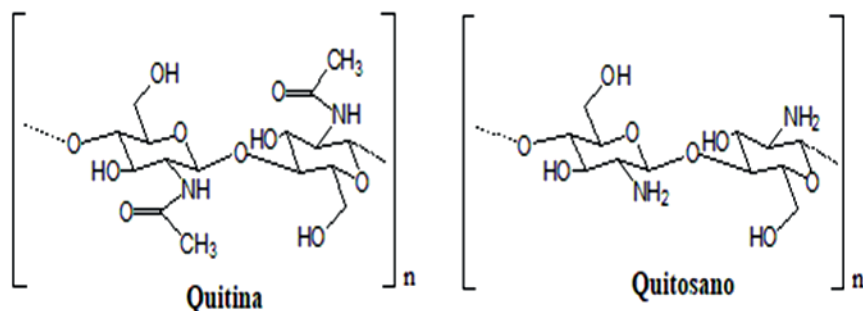


Figura 1. Estructura química de la quitina y quitosano.
Fuente: Goodrich y Winter 2007

semillas, en la conservación de frutas y hortalizas, fungicida, crecimiento bioestimulante, elicitador e inductor de resistencia a patógenos (Shiekh *et al.* 2013, Larez *et al.* 2012, Palma-Guerrero *et al.* 2008, Burrows *et al.* 2007, Rakwal *et al.* 2002).

En la Península de Paraguaná, estado Falcón-Venezuela, uno de los cultivos agrícola de mayor importancia es el melón (*Cucumis melo* L.), se ha señalado que el uso de la tierra bajo este cultivo genera la mayor degradación del suelo en la zona, ya que donde se desarrolla la producción de este rubro se manifiestan problemas de salinización y sodificación del suelo (Mogollón *et al.* 2017). La optimización de la técnica de pretratamiento de semillas se vuelve muy importante a escala comercial en territorios afectados por el cambio climático y procesos de salinización de los suelos (Chan *et al.* 2015). El tratamiento de semillas de melón puede aumentar la velocidad, el porcentaje y la uniformidad de la germinación o la emergencia de las plántulas, principalmente en condiciones ambientales desfavorables (Nascimento 2003). En este sentido, el uso de bioestimulantes que sean de fácil acceso y de bajo costo, se convierte en un reto de investigación para el desarrollo agrícola de las zonas áridas o en proceso de desertificación.

El propósito de este trabajo fue el estudio de factores que afectan el proceso de extracción biotecnológica de quitina de los desechos del camarón. Finalmente, se obtuvo quitosano por desacetilación química de la quitina y se evaluó sus propiedades bioestimulantes en semillas de melón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se utilizó lactosuero fresco, obtenido de la unidad agroalimentaria del Departamento de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Politécnica Territorial de Falcón Alonso Gamero (DACA-UPTAG), Coro, estado Falcón (Venezuela). Este se recolectó en recipientes de plástico (2 L) y almacenado a 4 °C hasta su uso (generalmente < 1 semana). Adicionalmente, se determinó el

valor de pH a temperatura ambiente y el contenido de calcio (Ca^{+2}) (COVENIN 1979, 1986).

Los desechos de camarón (*Litopenaeus schmitti*), identificados en estudios previos (Díaz *et al.* 2015), se obtuvieron durante la temporada de noviembre 2015 en una unidad artesanal procesadora de camarón adscrita al Consejo de Pescadores CONPPA-Indalecio Lugo, ubicada también en la ciudad de Coro. Los desechos se recolectaron manualmente; de acuerdo a un muestreo no probabilístico intencional, se seleccionaron únicamente los exoesqueletos frescos y de buena apariencia, que incluyeron todas las partes de la especie. El material se conservó en bolsas herméticas, a - 20 °C, hasta su uso. Estos no se sometieron a lavados ni esterilizaciones, para conservar las bacterias endémicas del camarón. Las muestras de camarón fueron caracterizadas previamente por su contenido de proteínas (AOAC, 2005), cenizas y humedad (COVENIN 1997, 1999).

Optimización de la extracción de quitina

La extracción se realizó por el método de FAL (Marcia *et al.* 2011), por reacción bioquímica de los microorganismos endógenos del cefalotórax del camarón y los *Lactobacillus* sp. del lactosuero, sin inóculo *in vitro*. La misma se llevó a cabo en biorreactores anaeróbicos de 0,5 L con una capacidad de trabajo del 90 %, dejando 10 % para los gases generados. Las condiciones fueron a presión atmosférica, 168 h de fermentación, con temperatura controlada de 35±3 °C en un baño termostático y agitaciones periódicas.

Con el propósito de optimizar las variables del proceso de extracción se realizó un arreglo factorial multinivel (Cuadro 1), que constó de 18 tratamientos. El diseño experimental corresponde al efecto del estado de agregación de los desechos de camarón (A), así como encontrar concentraciones óptimas entre la sacarosa (B) y lactosuero (C) para la fermentación. El estado de agregación (A), fue triturado (T) y no triturado (NT), usando un triturador doméstico (Oster, Venezuela) por 15 segundos.

Cuadro 1. Matriz del diseño experimental para las fermentaciones.

Factores	Niveles experimentales		
	-1	0	1
A: Agregación	T	-	NT
B: Sacarosa (%)	5	10	15
C: Lactosuero (%)	25	50	100

Se determinó el porcentaje de desproteínización (% DP) del desecho de camarón en cada tratamiento (quitina cruda). Para esto se obtuvo el porcentaje de proteína (AOAC, 2005) de la quitina de acuerdo a la ecuación (1); previamente la quitina cruda se lavó con agua destilada. Con base a ese valor se obtuvo el % DP (2).

$$\%P = GxNx 0.014 xFx 100 * m \quad (1)$$

$$\%DP = \frac{\%P_i - \%P_f}{\%P_i} * 100 \quad (2)$$

Dónde:

G= Volumen de HCl para la muestra en mL
- Volumen de HCl en mL para el blanco sin muestra.

N= Normalidad del HCl

F= 6.25 (Valor asignado para proteínas en general)

m = Masa de la muestra en gramos.

Pi=Proteína inicial del desecho de camarón.

Pf=Proteína final, después del tratamiento.

Seguimiento de la fermentación

Se monitoreó la fermentación continuamente por 168 h, tomando 5 mL de muestra cada 4 h durante las primeras 24 h; posteriormente, cada 24 h hasta cumplir el tiempo total de monitoreo. Las muestras se analizaron por su contenido de ácido láctico (AcLac). Este se determinó por titulación con NaOH, según la ecuación (3), y por los valores de pH tomados con un pH metro electrónico (HI 8424, Hanna Instruments, Italia).

$$\% AcLac = \frac{ml_{NaOH 0.1 N} * (0.0090 \pm 0.0005) * 100}{ml \text{ muestra}} \quad (3)$$

Finalmente, se obtuvo la velocidad promedio de producción de AcLac (V_{prom}). Esta se determinó mediante la expresión (4), donde se define como la variación de la concentración de AcLac en función del tiempo (t).

$$V_{prom} = \frac{\Delta[AcLac]}{\Delta t} \quad (4)$$

Purificación de quitina y obtención del quitosano

Con base a los parámetros estudiados para la extracción de quitina, se usó la combinación de factores para obtener el mayor % DP, para posteriormente purificar el material, con la intención de generar una quitina libre de impurezas. Para esto, se adicionó NaOH 0,1M (60 min) a la quitina cruda, luego se lavó con agua destilada y se colocó en HCl 0,1M (60 min); en ambos procesos se lavó con agua destilada hasta estabilizar pH cercano al neutro (pH≈7,5). Finalmente, los pigmentos se removieron con NaClO al 3 % por 30 min. Todos estos tratamientos de purificación se realizaron en relación 1:10 (p/v), con una agitación de 60 rpm y a temperatura ambiente.

El quitosano se obtuvo por método químico (Weska *et al.* 2007). La desacetilación de la quitina purificada se realizó con NaOH al 45 % en relación 1:10 (p/v), a una temperatura de 130 °C por 45 min; posteriormente se lavó con agua destilada hasta pH≈8.

Caracterización

La quitina y quitosano obtenidos se caracterizaron mediante el contenido de proteína por el método de Kjeldahl (AOAC 2005); el contenido de ceniza colocando la muestra a 525 ± 25 °C por 5 h y el porcentaje de humedad dejando la muestra a 65± 5 °C hasta obtener un peso constante (COVENIN 1997, 1999); y el porcentaje de solubilidad de los mismos, que se determinó por gravimetría del material insoluble, disolviendo el quitosano al 1 % (p/v) en ácido acético 1 %, para posterior filtrado con papel filtro Whatman N°1 (Francisco *et al.* 2015).

Adicionalmente, se determinó el grado de desacetilación del quitosano (DA) por el método potenciométrico (Parada *et al.* 2004) y el peso

molecular viscosimétrico promedio de acuerdo a la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (Katime y Cesteros 2004); la MHS está dada por la expresión (5), con uso de valores α y K reportados por Rinaudo *et al.* (1993), y valores experimentales de viscosidad intrínseca, tomados con un viscosímetro Cannon–Fenske (serie 100, Cannon Instrument Co, EEUU) en baño termostático ($25 \pm 0,1$ °C) (ASTM-D446-12 2012)

$$[\eta]=K M_v^\alpha \quad (5)$$

El comportamiento de descomposición térmica del quitosano se examinó simultáneamente por calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico con un analizador DSC-TGA (SDT Q600, TA Instruments, Inc.), a una velocidad de calentamiento de 10 °C min^{-1} entre los 30 y 900 °C en atmósfera de aire. Además, se realizó su determinación con un espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR; Frontier, Perkin Elmer, EEUU). Para esto, se pesó 1 mg de muestras de quitina y quitosano para su posterior prensado con 60 mg de KBr, obteniendo una pastilla que se introduce en el equipo para el análisis espectroscópico.

Pruebas de germinación

Las soluciones bioestimulantes de quitosano se prepararon al $0,75$ y 1 % (p/v) en 100 ml de ácido acético al 1 %, denominados Q1 y Q2, respectivamente. La disolución se colocó en agitación por $1,5$ h a 60 °C, con un pH final de 4 ± 0.2 .

Las pruebas de germinación se hicieron en semillas de melón donadas por los agricultores de la comunidad de Tacuato (estado Falcón, Venezuela). En este sentido, se determinaron las condiciones de efectividad del bioestimulante evaluando 5 factores (Cuadro 2): tipo de bioestimulante (A) (experimental y comercial), la concentración (B) ($0,75$ y 1 % p/v), la desinfección de la semilla (C) (desinfectadas y no desinfectadas), igualmente con la escarificación de la semilla (D): escarificadas y no escarificadas, y por último el tipo de sustrato (E) que comprende servilletas absorbentes en capsula Petri y cultivadas en suelo procedente de la comunidad de Tacuato, estado Falcón-Venezuela en el periodo junio-julio 2016. La aplicación del bioestimulante se realizó colocando una capa de la solución sobre la superficie de cada semilla con un pincel, luego se dejó secar por 5 min para su posterior uso o almacenamiento.

La combinación de estos factores genera 32 experimentos, en los cuales se realizaron los cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3) según Cuadro 3 para concentraciones, $0,75$ y 1 % (p/v), Q1 y Q2, respectivamente, solución comercial y el control sin bioestimulantes. Se utilizaron 6 semillas por triplicado para cada experimento, utilizando 576 semillas de melón. En el diseño experimental se obtienen dos variables para evaluar la respuesta del bioestimulante; se determinó el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación de las semillas, según Rodríguez *et al.* (2017).

Cuadro 2. Factores empleados con sus respectivos niveles para el diseño factorial multinivel replicado.

Factor	Niveles del factor			Unidad
	-	-/+	+	
Tipo de Bioestimulante (A)	1	-	2	
Concentración (B)	0	0,75	1	% p/v
Desinfección (C)	No	-	Si	-
Escarificación (D)	No	-	Si	-
Tipo de sustrato (E)	1	-	2	-

Cuadro 3. Tratamientos a utilizar de semillas de melón.

Tratamiento	Descripción
Tratamiento 0 (T0)	semillas seleccionadas (testigos)
Tratamiento 1 (T1)	semillas desinfectadas
Tratamiento 2 (T2)	semillas desinfectadas + escarificadas
Tratamiento 3 (T3)	semillas escarificadas

Análisis de datos

Los resultados de la optimización se analizaron mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), lo cual es una colección de técnicas estadísticas y matemáticas que ha sido utilizada con éxito para el desarrollo, mejora y optimización de procesos (Myers *et al.* 2009). Esto consistió en un análisis tipo análisis de varianza para evaluar el efecto combinado de los factores seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el software estadístico Statgraphics Centurion (versión XV 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materia prima

Se realizó una caracterización previa del lactosuero y de las muestras de camarón para comparar los cambios producidos en cada etapa (Cuadro 4). Se encontró similitud con los datos reportados en otros estudios (Rao y Stevens 2005; Panesar *et al.* 2007), las diferencias obtenidas se deben a que estas características difieren según la especie de crustáceo o el origen del mismo. El valor del pH encontrado en el lactosuero indica que es un suero ácido. Estudios realizados señalan que la mayoría de las bacterias ácido lácticas tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, lo que da la ventaja competitiva sobre otras bacterias que pudieran causar pudrición del fermento (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal 2000).

Cuadro 4. Caracterización de la materia prima camarón y lactosuero.

Análisis	Experimental	Reportado
Camarón		
Proteína (%)	29,4	28,6±1,6*
Ceniza (%)	18,47	19,1± 1,2*
Humedad (%)	65,50	83,8 ± 2,1*
Lactosuero		
pH	5,21	5,35*
Calcio (g/L)	6,5	1,2-1,6**

*Rao y Stevens 2005; **Panesar *et al.* 2007

Optimización de la extracción de quitina

En general, la eficiencia de la extracción de quitina, por procesos biotecnológicos de fermentación, está influenciada por la temperatura, el tiempo, la fuente de carbono y el inóculo utilizado (Arbia *et al.* 2013). Como resultado de la fermentación se obtiene una fracción sólida que contiene la quitina cruda y una fracción líquida (subproducto de fermentación) rica en proteína natural de camarón, minerales y pigmentos (Rao y Stevens 2005).

El % DP es uno de los parámetros más influenciado por las bacterias y enzimas en el proceso de FAL, por lo cual se consideró este parámetro como variable respuesta. Diversos trabajos de extracción biotecnología de quitina han usado inóculos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pediococcus acidolactici*, *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus*, *L. casei*, entre otras (Sedaghat *et al.* 2016, Bajaj *et al.* 2015, Le y Nguyen 2014, Arbia *et al.* 2013). Pero muy poco se conoce el efecto de la FAL con bacterias endémicas de residuos del camarón, la cual ocurre presumiblemente debido a la presencia de microflora intestinal en estos residuos (Rao *et al.* 2000).

Dicho parámetro se determinó para las 18 combinaciones de los factores en sus diferentes

Cuadro 5. Diseño experimental de las fermentaciones.

Tratamiento	A	B	C	% DP media
1	NT	25	15	64,28
2	NT	25	5	74,70
3	NT	25	10	69,04
4	NT	50	15	55,35
5	NT	50	5	52,38
6	NT	50	10	57,14
7	NT	100	15	95,83
8	NT	100	5	68,45
9	NT	100	10	87,50
10	T	25	10	41,69
11	T	25	5	37,52
12	T	25	15	27,41
13	T	50	5	43,48
14	T	50	15	50,62
15	T	50	10	32,76
16	T	100	5	42,29
17	T	100	15	28,00
18	T	100	10	55,38

T: Triturado; NT: No Triturado. A: tipo de bioestimulante
B: Desinfección C: Concentración

niveles, como se presenta en la Cuadro 5. Se obtuvo la mejor desproteinización a máxima concentración de los factores, recuperando quitina con un 95,83 % DP para el tratamiento 7. Este tratamiento le aporta a las bacterias de fermentación una mayor cantidad de fuente de carbón (15 mg.ml⁻¹), por tanto el crecimiento bacteriano es mayor y la fermentación es más efectiva.

Una vez obtenidos los datos de las combinaciones experimentales se procede al análisis estadístico del diseño correspondiente. El modelo de regresión arrojó un coeficiente (R²) de 0,7855 (78,55 %) lo cual indica una buena respuesta al modelo no lineal con un error residual bajo de 12,31 %. La expresión de la ecuación del

modelo ajustado (6) permite conocer los valores óptimos de las variables significativas.

$$\% DP = 61,6055 - 3,35813xA - 0,787698xB + 2,01389xC - 0,0890023xAxB - 0,62004xAxC + 0,00584656xB^2 + 0,0196429xBxC - 155754xC^2 \quad (6)$$

Donde; A= Estado de agregación; B=Lactosuero y C=Sacarosa.

La representación gráfica de la interacción mutua entre la concentración de lactosuero, sacarosa y estado de agregación para la desproteinización se muestra en la Figura 2. Este diagrama de MSR muestra los efectos globales de las interacciones generadas a partir de

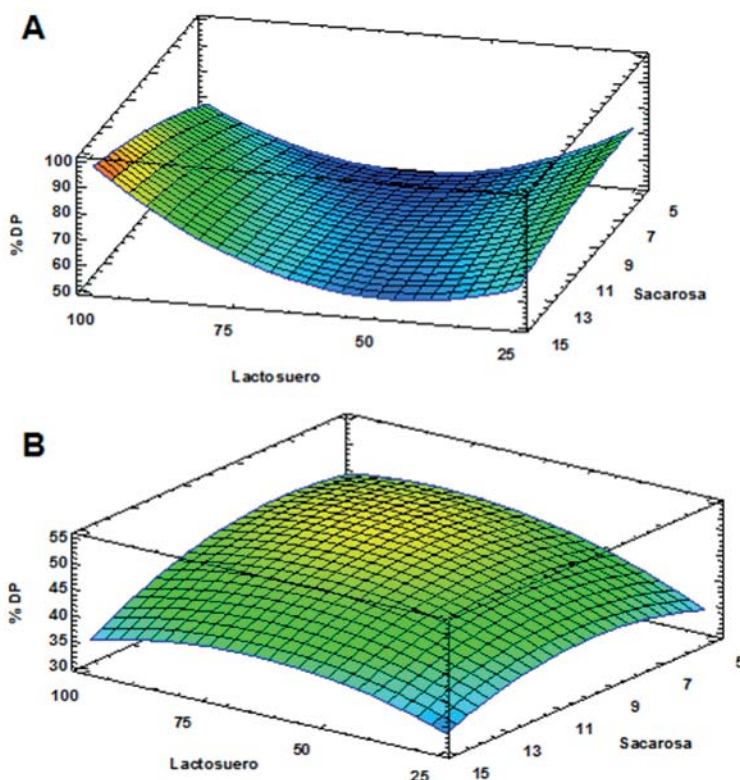


Figura 2. Superficie de respuesta ajustada al diseño de experimento óptimo A) No Triturado. B) Triturado.

la representación tridimensional de la ecuación polinómica del modelo ajustado (6) obtenido a partir de los datos experimentales.

La Figura de superficie de la Figura 2A se refiere a los desechos del camarón no triturado, donde se puede observar que una alta concentración de lactosuero y de sacarosa condujeron a altos rendimientos del % DP. De forma contraria, en la Figura 2B al estar los desechos triturados, el alto nivel de los factores condujo a valores bajos en % DP, obteniendo mejor rendimiento con valores intermedios de lactosuero-sacarosa.

Resultados similares obtuvo, donde mayores % DP se lograron con el material no triturado, posiblemente al no estar triturado se conserva las condiciones anaeróbicas de las bacterias lácticas requeridas en el proceso de fermentación.

Las ventajas de este proceso ante el método químico es la posibilidad de disminuir las

concentraciones de los reactivos químicos y que el líquido hidrolizado, subproducto de la fermentación, contiene una gran cantidad de nutrientes, tales como astaxantina (Armenta-López *et al.* 2002), retinol, α -tocoferol y colesterol (López-Cervantes *et al.* 2006), aprovechables para la formulación de alimentación animal (Plascencia-Jatomea *et al.* 2002) y otros usos que le dan valor agregado a la cadena de producción (Bueno-Solano *et al.* 2009).

Seguimiento de la fermentación

El V prom para el suero concentrado presenta un aumento espontáneo en la reacción el día 2 (Figura3), donde la máxima velocidad se obtuvo con valores de sacarosa máximo (15%). Esto estaría relacionado al máximo % DP que se mencionó anteriormente, ya que hay una mayor actividad de *Lactobacillus* sp. productores de proteasas que causan la hidrólisis de proteínas y su reducción a AcLac (Jung *et al.* 2006),

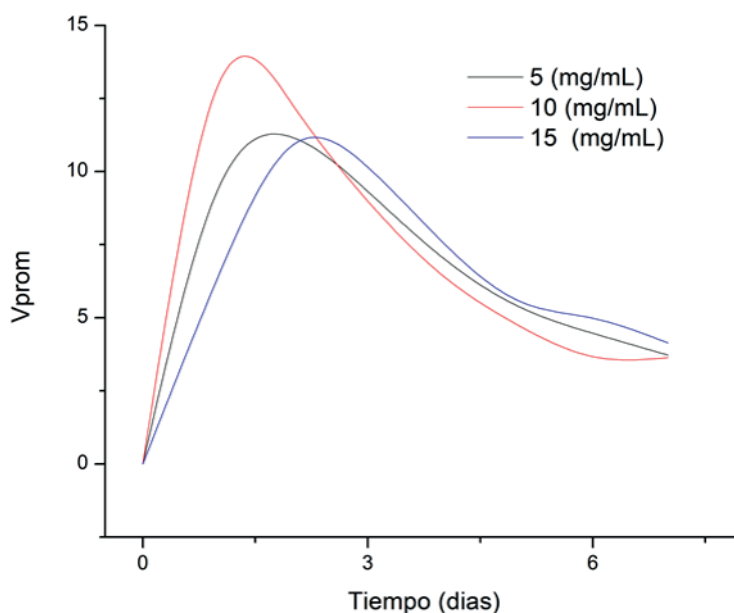


Figura 3. Velocidad de producción Ácido-Láctico en sustrato No Triturado (NT) y lactosuero 100% p/v.

disolviendo a su vez los minerales de calcio del camarón por efecto del AcLac que forma lactato de calcio (Rao *et al.* 2000).

Para el tratamiento 7 se obtuvo una concentración de Ac Lac de 10 %, y con un descenso del pH de 4,73 al iniciar la fermentación, hasta 3,25 a las 168 h (Figura 4). La disminución del pH en el medio confiere a las bacterias ácido lácticas una gran ventaja competitiva, donde se inhibe la posible presencia de algunas bacterias gram negativa y otros microorganismos de putrefacción (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal 2000). Esto se debe a la producción de sustancias antimicrobianas de los *Lactobacillus* sp. y del mismo ácido láctico (Savadogo *et al.* 2006).

Quitina y quitosano

La caracterización físico-química de la quitina y quitosano se muestran en el Cuadro 6. Se observa un contenido de ceniza mayor a lo reportado en otros estudios. Aunque el exoesqueleto se desmineralice en el proceso de fermentación se evidencia que no todos los minerales son extraídos por el método FAL. Los valores de solubilidad obtenidos para quitosano fueron de 98 %. Además, la cantidad de proteína en el quitosano

fue casi nula, puesto que el uso del NaOH concentrado (40-50%) para la desacetilación elimina los posibles residuos del contenido proteico de la quitina. Respecto al grado de desacetilación se obtuvo un 90,16 %, similar a otros estudios con quitina obtenida por el método de FAL (Rao y Stevens 2005).

En este sentido, el peso molecular del quitosano obtenido fue de 157,68 Kg.mol⁻¹, muy similar a lo reportado en la literatura (Rao y Stevens 2005), el quitosano obtenido de especies como cangrejo reportan pesos moleculares mayores, entre los 500 a 800 Kg.mol⁻¹ (Colina *et al.* 2014, No *et al.* 2003). Es importante señalar que las propiedades de biopolímero difieren dependiendo de las especies de crustáceos y métodos de preparación. Además, se debe considerar que los métodos biotecnológicos de obtención de quitina pueden disminuir la depolimerización del material, al disminuir el uso de reactivos químicos sería posible la conservación del peso molecular y producir biopolímeros con características diferentes que a los obtenidos por vía química (Pacheco *et al.* 2011).

La estabilidad térmica de quitosano se determinó mediante análisis TGA-DSC en atmósfera de

Cuadro 6. Caracterización fisicoquímica de la quitina y el quitosano que se obtuvo.

Análisis	Quitina		Quitosano	
	Exp.	Rep.	Exp.	Rep.
Proteína	1,2%	<1,05%	<1%	<0,95
Ceniza	7,5%	0,08	<1%	0,07
Solubilidad	-	-	>98	>98
Desacetilación	-	-	90,16	86,10

Exp: Experimental. Rep: Reportado (Rao y Stevens 2005).

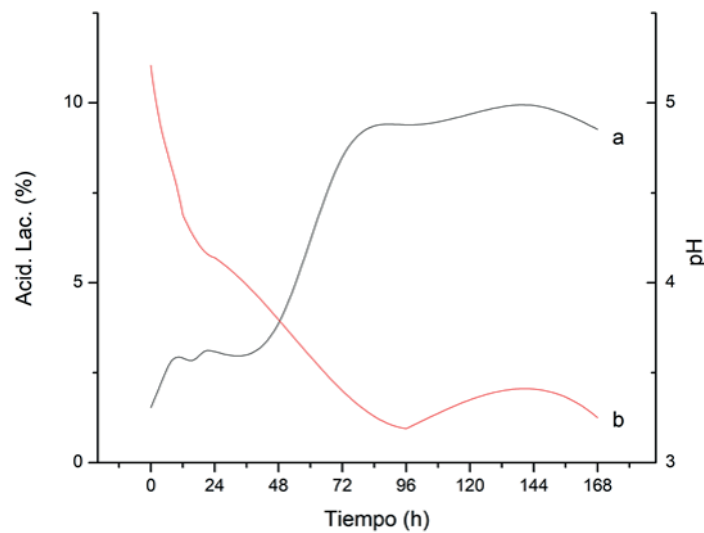


Figura 4. Comportamiento del ácido láctico (a) y pH (b) para el tratamiento 7 (A:NT; B: 100; C:15).

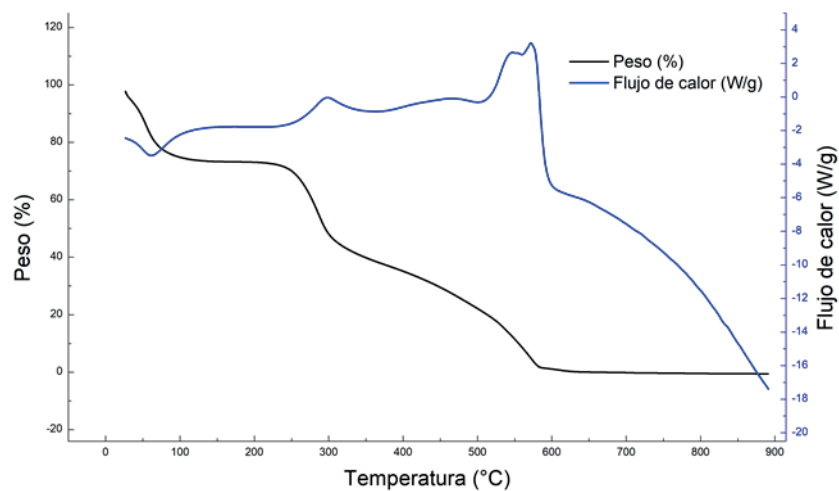


Figura 5. Curvas de análisis térmico del quitosano experimental.

aire, como se muestra en la Figura 5. El cambio del TGA es a los 54 °C, representando una pérdida de peso de 14 % que es correspondiente a la evaporación de agua absorbida físicamente o conectado por enlace débil de hidrógeno para las cadenas de quitosano. La segunda transición del TGA se torna a los 286 °C, este corresponde a la degradación térmica de quitosano, que se acompaña de una despolimerización de las cadenas de quitosano, la descomposición de anillos de piranosa a través de la deshidratación, la desaminación y finalmente la reacción de apertura de anillo (Zawadzki y Kaczmarek 2010). Finalmente, a los 570 °C sugiere una descomposición oxidativa de los residuos, como consecuencia del efecto de la atmosfera de oxígeno en la que se realizó el análisis (Peniche-Covas *et al.* 1993). Un residuo final de 1,44 % indica la presencia de fase inorgánica en el quitosano experimental.

La quitina y el quitosano se caracterizaron mediante FTIR (Figura 6), para la quitina se observan las señales típicas de vibración -OH a 3.448 cm^{-1} y -NH a 3.267 cm^{-1} , se observan las bandas de la amida I a 1.660 y 1.625 cm^{-1} y amida II

a 1.559 , propias de la quitina (Goodrich y Winter 2007). Para el quitosano se denota la ausencia de la banda amidas secundarias, evidenciándose la aparición de la banda del grupo amida primaria del quitosano a 1.592 cm^{-1} debido al proceso de desacetilación (Briceño *et al.* 2017).

Pruebas de germinación

El porcentaje de germinación aumentó en relación al control cuando se aplicó el bioestimulante de quitosano (Cuadro 7). Esto es un efecto que puede estar determinado por la estimulación de algunas enzimas en la semilla que facilitan su metabolismo secundario inicial (Rodríguez *et al.* 2004). La aplicación en semillas de arroz estimula el crecimiento de la planta bajo estrés salino, aumentando la actividad de catalasas, peroxidasas y la biomasa del cultivo (Martínez-González *et al.* 2015). Sin embargo, el uso de quitosano puede disminuir la emergencia de la semilla cuando este es gelificado en NaOH (Peña-Datoli *et al.* 2016).

El efecto de la germinación se ve influenciado por el tipo de bioestimulante utilizado y la desinfección de semillas. Se observan bajos %

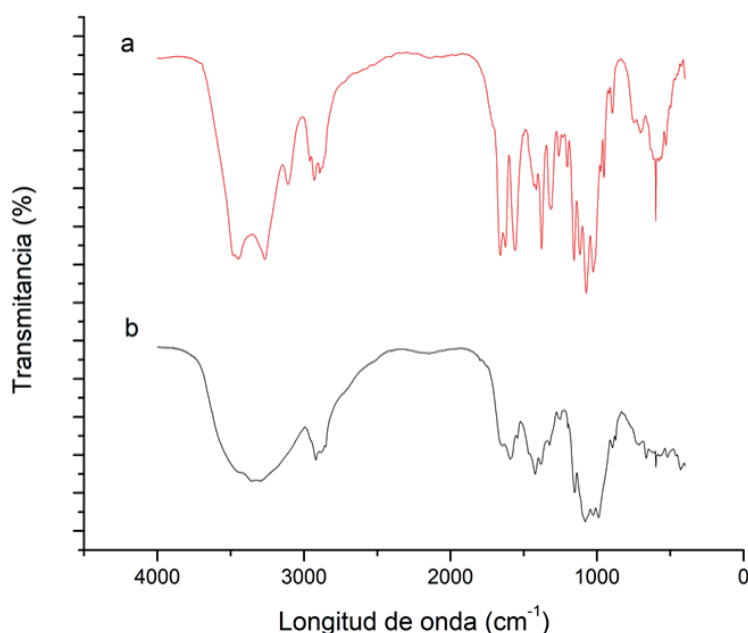


Figura 6. Espectro infrarrojo de la quitina (a) y quitosano (b).

Cuadro 7. Efecto del quitosano sobre la germinación de semillas de melón en diferentes condiciones.

Tratamiento	<i>In vitro</i>		suelo		
	% Germinación	IG	% Germinación	IG	
Control	T0	33,33	1	88,88	3
	T1	22,22	2	77,77	3
	T2	22,22	1,6	88,88	2,6
	T3	33,33	2	50	3,3
Comercial	T0	55,55	3,3	66,66	3,6
	T1	11,1	2	66,66	3,6
	T2	27,77	3,3	44,4	3,6
	T3	44,44	2,6	61,11	3
Q1	T0	100	1,3	100	1
	T1	66,6	2	88,88	2
	T2	50	2	88,88	2
	T3	100	1,6	100	1,3
Q2	T0	77,77	2,3	100	2
	T1	66,66	2,6	94,44	2,6
	T2	38,88	2,3	100	2,6
	T3	88,88	2	100	2,3

IG: Índice de Germinación; T0: Semillas seleccionadas (testigo); T1: semillas desinfectadas; T2: semillas desinfectadas + escarificadas; T3: semillas escarificadas; Q1: solución de quitosano al 0,75 %; Q2: solución de quitosano al 1 %.

germinación al realizar desinfección de las semillas con NaClO_4 . Además, estudios anteriores han demostrado la eficiencia antifúngica y antibacteriana del quitosano, en tanto la desinfección química de la semilla puede ser sustituida por la aplicación del quitosano (Li *et al.* 2009).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre Q1 y Q2 ($P > 0,05$); sin embargo, si hay diferencias cuando se germina directamente en el suelo y cuando se hace el germinado *in vitro* ($P \leq 0,05$). En general, se observó un alto % de germinación en el suelo y con la aplicación del bioestimulante de quitosano formulado. El quitosano en el suelo puede estimular la actividad de las quitinasas (Algam *et*

al. 2010) y estas a su vez la de otras enzimas que mejoran la interacción de las raíces de la planta con la micorriza (Pozo *et al.* 1998). Incluso, el quitosano desplaza la abundancia de agentes de control biológico residentes e inoculados en la rizosfera para suprimir agentes patógenos del cultivo (Mwaheb *et al.* 2017). En este sentido, se observa que al utilizar el bioestimulante comercial la germinación disminuye significativamente respecto a Q1 y Q2 ($P \leq 0,05$).

Algunas formulaciones que incluyen quitosano con diferentes pesos moleculares y grosor de recubrimiento (número de capas de revestimiento) aumentaron en todos los casos el crecimiento de plantas de alcachofa y disminuyeron la

actividad fúngica (Ziani *et al.* 2010). Otros autores (Lárez *et al.* 2012), también reportan efectos de bioestimulación con la aplicación de capas de quitosano en semillas de *Cucurbita pepo*. En este trabajo se demostró la eficiencia de la aplicación de quitosano como bioestimulante para semillas de melón, sustituyendo el uso de pretratamientos químicos y mecánicos en la semilla, tales como la desinfección y la escarificación, lo que aporta un beneficio en la rentabilidad agrícola del cultivo.

CONCLUSIONES

La extracción de quitina por fermentación ácido láctica se optimizó sin triturar los desechos del camarón y con una concentración alta de sacarosa (15 %) y lactosuero (100 %), obteniendo hasta un 95 % DP en la recuperación de quitina. Asimismo, se reporta la eficiencia de las bacterias endémicas, del cefalotórax del *L. schmitti* y los *Lactobacillus* sp. del lactosuero, en la desproteinización y extracción de quitina de los desechos de camarón.

El quitosano obtenido por desacetilación química tiene características acordes a lo reportados en otros trabajos. El empleo del quitosano experimental en el tratamiento de semillas de melón fue mejor que el tratamiento control ya que mejoró la velocidad de germinación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Dr. Alexander Guarenas por sus enseñanzas de quimiometría y al Departamento de Química de la Universidad Politécnica Territorial Alonso Gamero (UPTAG) por el financiamiento de este proyecto. Igualmente, al Laboratorio de Polímeros (ULA) por la colaboración con el FTIR y al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en los TGA-DSC. Agradecemos a nuestro compañero Pedro Vera por su apoyo técnico.

LITERATURA CITADA

Algam, S; Xie, G; Li, B; Yu, S; Su, T; Larsen, J. 2010. Effects of *Paenibacillus* strains and

chitosan on plant growth promotion and control of Ralstonia wilt in tomato. Journal of Plant Pathology:593-600.

Anderson, JL; Valderrama, D. 2013. Shrimp Production Review. Alliance, GA (ed.). p. 43.

AOAC. (2005). Official methods of analysis of AOAC International. s.l., AOAC International.

Arbia, W; Adour, L; Amrane, A; Lounici, H. 2013. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. Food Hydrocolloids 31(2):392-403.

Armenta-López, R; Guerrero, I; Huerta, S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the caroteno protein complex. Journal of food Science 67(3):1002-1006.

ASTM-D446-12. 2012. Standard Specifications and operating Instructions for glass Capillary Kinematic Viscometers. ASTM International, WC (ed.). (D446-93). DOI: <https://doi.org/10.1520/D0446-12>.

Bajaj, M; Freiberg, A; Winter, J; Xu, Y; Gallert, C. 2015. Pilot-scale chitin extraction from shrimp shell waste by deproteination and decalcification with bacterial enrichment cultures. Applied microbiology and biotechnology 99(22):9835-9846.

Briceño, S; Suarez, J; Gonzalez, G. 2017. Solvothermal synthesis of cobalt ferrite hollow spheres with chitosan. Materials Science and Engineering: C 78:842-846.

Bueno-Solano, C; López-Cervantes, J; Campas-Baypoli, O; Lauterio-García, R; Adan-Bante, N; Sánchez-Machado, D. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. Food chemistry 112(3):671-675.

Calderón, CS; Paz, RJG; Baudrit, JRV; Ruiz-Bravo, RM. 2015. Estrategia para el desarrollo sostenible del sector social costarricense de escasos recursos económicos mediante

- la alta tecnología (en línea). Revista Digital Universitaria 16(9). Disponible en <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num9/art71/>.
- Chang, I; Prasadhi, AK; Im, J; Shin, HD; Cho, GC. 2015. Soil treatment using microbial biopolymers for anti-desertification purposes. *Geoderma*, 253, 39-47.
- Colina, M; Ayala, A; Rincón, D; Molina, J; Medina, J; Yncierte, R; Vargas, J; Montilla, B. 2014. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 15(1):21-43.
- COVENIN. 1979. Determinación del pH (Acidez lónica). Alimentos Norma N° 1315:79.
- _____. 1986. Determinación de dureza total y calcio. Método volumétrico. Determinación de magnesio por cálculo. Agua Norma N° COVENIN 2408 – 86:10.
- _____. 1997. Determinación de humedad. Alimentos Norma N° COVENIN 1120-97.
- _____. 1999. Determinación de Cenizas. Alimentos Norma N° COVENIN 1220-99.
- Díaz Lugo, ÁA; Álvarez Castillo, RA; Méndez Martínez, JA; González Rodríguez, LV; Chocrón Castellano, MM; Guanipa Maldonado, MV. 2015. Análisis de la comunidad de peces asociada a la pesca artesanal de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, en el Golfo de Venezuela. *Zootecnia Tropical* 33(1):7-22.
- Francisco, FC; Simora, RMC; Nuñal, SN. 2015. Deproteinization and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of crude chitin and chitosan. *AACL Bioflux* 8(1):107-115.
- Goodrich, JD; Winter, WT. 2007. α -Chitin nanocrystals prepared from shrimp shells and their specific surface area measurement. *Biomacromolecules* 8(1):252-257.
- Guerra, ÁVA; Castro, LMM; Tovar, ALQ. 2013. Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 4(2):55-65.
- Hofvendahl, K; Hahn-Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1. Enzyme and microbial technology 26(2):87-107.
- Jung, W; Jo, G; Kuk, J; Kim, K; Park, R. 2006. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* sub sp. tolerans KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied microbiology and biotechnology* 71(2):234-237.
- Katime, I; Cesteros, C. 2004. Química Física Macromolecular II. Servicio Editorial UPV/EHU. (España), 350-405.
- Larez, C; Chirinos, A; Tacoronte, M; Mora, A. 2012. Chitosan oligomers as bio-stimulants to zucchini (*Cucurbita pepo*) seed germination. *Agriculture* 58(3):113-119.
- Le, TH; Nguyen, TH. 2014. Biotechnological process of chitin recovery from shrimp waste using *Lactobacillus plantarum* NCDN4. *Journal of Vietnamese Environment* 6(3):251-255.
- Li, Y-C; Sun, X-J; Yang, B; Ge, Y-H; Yi, W. 2009. Antifungal activity of chitosan on *Fusarium sulphureum* in relation to dry rot of potato tuber. *Agricultural Sciences in China* 8(5):597-604.
- Lopez-Cervantes, J; Sánchez-Machado, D; Rios-Vazquez, N. 2006. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, α -tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *Journal of Chromatography A* 1105(1):135-139.
- Marcia, E; Malespín, J; Sánchez, M; Benavente, M. 2011. Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Revista Científica* 24(1):33-42.

- Martínez González, L; Reyes Guerrero, Y; Falcón Rodríguez, A; Núñez Vázquez, M. 2015. Efecto del tratamiento a las semillas con quitosano en el crecimiento de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5 en medio salino. *Cultivos Tropicales* 36:143-150.
- Mogollón, JP; Rivas, W; Rivas, JG; Martínez, A. 2017. Procesos de degradación de suelos asociados a la desertificación en la península de Paraguaná, Venezuela. *Ágora de Heterodoxias*, 3(2), 94-110.
- Mwaheb, MA; Hussain, M; Tian, J; Zhang, X; Hamid, MI; El-Kassim, NA; Hassan, GM; Xiang, M; Liu, X. 2017. Synergetic suppression of soybean cyst nematodes by chitosan and *Hirsutella minnesotensis* via the assembly of the soybean rhizosphere microbial communities. *Biological control* 115:85-94.
- Myers, RH; Montgomery, DC; Anderson-Cook., CM. 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments*. 3rd ed. Wiley (ed.). New York, 284-286
- Nascimento, WM. 2003. Muskmelon seed germination and seedling development in response to seed priming. *Scientia Agricola*, 60(1), 71-75.
- No, HK; Lee, SH; Park, NY; Meyers, SP. 2003. Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 51(26):7659-7663.
- Pacheco, N; Garnica-Gonzalez, M; Gimeno, M; Bárzana, E; Trombotto, S; David, L; Shirai, K. 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules* 12(9):3285-3290.
- Panesar, PS; Kennedy, JF; Gandhi, DN; Bunko, K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105(1):1-14.
- Parada, LG; Amashta, IAK; Crespín, G; Miranda, R. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista iberoamericana de polímeros* 5(1):1-16.
- Peniche-Covas, C; Argüelles-Monal, W; San Román, J. 1993. A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability* 39(1):21-28.
- Peña-Datoli, M; Hidalgo-Moreno, CMI; González-Hernández, VA; Alcántar-González, EG; Etchevers-Barra, JD. 2016. Recubrimiento de semillas de maíz (*Zea mays* L.) con quitosano y alginato de sodio y su efecto en el desarrollo radical. *Agrociencia* 50:1091-1106.
- Plascencia-Jatomea, M; Olvera-Novoa, MA; Arredondo-Figueroa, JL; Hall, GM; Shirai, K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(7):753-759.
- Pozo, M; Azcón-Aguilar, C; Dumas-Gaudot, E; Barea, J. 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *Journal of Experimental Botany* 49(327):1729-1739.
- Rao, M; Munoz, J; Stevens, W. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6):808-813.
- Rao, MS; Stevens, WF. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80(9):1080-1087.
- Rinaudo, M; Milas, M; Le Dung, P. 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules* 15(5):281-285.

- Rodríguez, AT; Ramírez, M; Falcón, A; Guridi, F; Cristo, E. 2004. Estimulación de algunas enzimas relacionadas con la defensa en plantas de arroz (*Oryza sativa*, L.) obtenidas de semillas tratadas con quitosana. *Cultivos tropicales* 25(3):111-115.
- Rodríguez Beraud, M; Tampe Pérez, J; Hormazábal Vásquez, N; Araneda Durán, X; Tighe Neira, R; Cárcamo-Fincheira, P. 2017. Efecto de la escarificación y estratificación sobre la germinación in vitro de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz. *Gayana. Botánica* 74(2):282-287.
- Savadogo, A; Ouattara, AC; Bassole, HI; Traore, SA. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology* 5(9):678-683.
- Sedaghat, F; Yousefzadi, M; Toiserkani, H; Najafipour, S. 2016. Chitin from *Penaeus merguensis* via microbial fermentation processing and antioxidant activity. *International journal of biological macromolecules* 82:279-283.
- Shirai, K; Guerrero, I; Huerta, S; Saucedo, G; Castillo, A; Gonzalez, RO; Hall, GM. 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology* 28(4):446-452.
- Synowiecki, J; Al-Khateeb, NAAQ. 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food chemistry* 68(2):147-152.
- Weska, R; Moura, J; Batista, L; Rizzi, J; Pinto, L. 2007. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80(3):749-753.
- Xu, Y; Gallert, C; Winter, J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(4):687-697.
- Zawadzki, J; Kaczmarek, H. 2010. Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers* 80(2):394-400.
- Ziani, K; Ursúa, B; Maté, JI. 2010. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection* 29(8):853-859.