

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECUPERADAS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE QUITOSANO

Adrián Chávez Huerta^{1*}, Sabrina Acevedo¹, Ana C. Valbuena², Marinela Colina Rincón³

1. Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT). Municipio La Cañada de Urdaneta, Edo. Zulia, Venezuela. Correo electrónico: ajchavez3000@gmail.com
2. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Carretera Panamericana, km 11, Altos de Pipe.
3. Empresa Mixta Innovación Ambiental Quitosano CA. (INNOVAQUITO CA). Av 4 San Francisco Sector El Bajo No 29–25, Maracaibo, Venezuela

Recibido: Febrero 2015; Aceptado: Enero 2016

RESUMEN

El proceso para la obtención de quitosano se realiza a partir de los desechos provenientes de la industria procesadora de cangrejos y camarones. Este proceso requiere varios pasos como la desproteinización de las conchas, la desmineralización, la despigmentación y la desacetilación de la quitina. En la desproteinización, la proteína que se encuentra en las conchas se desnatura y se dispersa en la solución de NaOH, para recuperar la proteína de este líquido se emplearon dos procedimientos; el primero consiste en la precipitación con etanol a distintas concentraciones y la segunda en la neutralización del hidróxido de sodio con el líquido ácido proveniente de la desmineralización, disminuyendo el pH hasta obtener el punto isoelectrico de la proteína. Empleando la extracción con etanol se observó la banda de FTIR de amida II en 1.560 cm^{-1} (CN estiramiento, N–H flexión) y empleando el líquido de la desmineralización la banda en 1.710 cm^{-1} que corresponde al grupo carboxílico (C = O estiramiento) que se encuentran en los extremos de las proteínas. Las proteínas extraídas posiblemente serían útiles como suplemento en formulaciones de alimentos para animales y comúnmente están formadas por aminoácidos como ácido aspártico y ácido glutámico.

Palabras clave: Quitosano, desproteinización, proteínas.

ABSTRACT

The process for obtaining chitosan was made from industry waste of crabs and shrimp. This process requires several steps as deproteinization, demineralization, depigmentation and deacetylation of chitin. In deproteinization, the protein found in the shells of crabs denatured and is dispersed in the NaOH solution, to recover the protein of this liquid two procedures were employed; The first was the precipitation with ethanol at different concentrations and the second was in the neutralization with sodium hydroxide in demineralization process, lowering the pH to obtain the isoelectric point of the protein. The results with different method were: the first method was obtaining the FTIR band showed amide I group at 1.654 cm^{-1} (stretching C = O) and the amide II at 1.560 cm^{-1} were observed (C–N stretching, N–H deflection) when used second method FTIR showed bands amide I at 1.656 cm^{-1} (C = O stretch) and another band at 1.710 cm^{-1} corresponding to the carboxyl group (C = O stretch) located at the ends of proteins. The proteins extracted maybe are useful as a supplement in animal food formulations and are commonly formed by amino acids such as aspartic acid and glutamic acid.

Keywords: Chitosan, deproteinization proteins.

INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Se encuentra en los crustáceos, en el exoesqueleto de algunos insectos y en las paredes celulares de muchos hongos y algas. El quitosano es su derivado, su principal fuente de producción es a partir de la desacetilación de la quitina en medio alcalino. En general, los pasos para la obtención de quitosano a partir de los

desechos de la industria cangrejera son: la desproteínización, la desmineralización, la decoloración y la desacetilación de la quitina [1,2].

La quitina se extrae del exoesqueleto de crustáceos, especialmente de los desechos de la industria cangrejera y camaronesa. Las conchas de crustáceos contienen 20–40% de proteína, 30–60% de sales de magnesio y calcio (mayormente fosfatos y carbonatos), 20–30% de quitina y 0–14% de lípidos [2]. La cantidad de quitina presente se puede afectar por un número de factores, tales como: tipo de conchas (cangrejo, camarón, langosta, calamar) y la porción de concha usada. Debido a su composición, la extracción del polímero de la concha de cangrejo involucra varios pasos: la primera es la desproteínización que consiste en tratar las conchas de los crustáceos en medio alcalino a altas temperaturas lográndose desnaturalizar la proteína presente; luego, la desmineralización permite remover el CaCO_3 empleando HCl o H_3PO_4 diluido a temperatura ambiente (para prevenir la degradación del polímero). Los crustáceos contienen pigmentos coloreados como: astaceno, astaxantinas, cantaxantinas, luteína y β -caroteno. Éstos pueden removerse a través de una decoloración con etanol, metanol, éter, acetona, cloroformo o éter de petróleo. Posteriormente, se obtiene quitosano por medio de la desacetilación de la quitina, repitiendo varias veces el proceso de desacetilación con soluciones altamente concentradas de NaOH a elevadas temperaturas [4].

Las proteínas de los cangrejos, están formadas por aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano y valina. Estos aminoácidos se combinan para formar las proteínas del cangrejo. Los seres vivos que consumen estas proteínas, las emplean para construir los tejidos que forman los músculos. Estas proteínas también son útiles y necesarias para el mantenimiento de los músculos ya existentes, por lo cual, de no ser consumidas se debilitaría y reduciría paulatinamente la masa muscular. Las proteínas del cangrejo se descomponen en aminoácidos para su asimilación. Las proteínas que el cuerpo sintetiza, además de ser útiles para la creación de nueva masa muscular, también intervienen en funciones fisiológicas sin las cuales, el organismo no podría subsistir [4].

En este trabajo se pretende obtener una metodología con la que se puedan recuperar, las proteínas provenientes del proceso de desproteínización utilizado en la producción de quitosano.

MÉTODOS

Desproteínización. Se realizan varios tipos de condiciones en la desproteínización; en la primera no se limpian los desechos y se utilizan tal cual como vienen de la planta que los genera. En la segunda desproteínización se limpian previamente los desechos. En el primer procedimiento de desproteínización se emplean 100 g de desechos sin limpieza, estos fueron secados a 100°C

durante 24 horas y triturados. A continuación 100 g de este material triturado se calienta a 80°C en una solución al 10% de NaOH, empleando una plancha de agitación magnética (aprox. 300 rpm) por durante horas. La mezcla obtenida se filtra, se separan y se guardan los líquidos y se lavan los sólidos con agua hasta obtener un pH neutro del líquido que se desecha y se repite el procedimiento dos veces más. En la segunda desproteínización se realiza limpiando previamente los desechos, otra diferencia con el primer procedimiento es que no es necesario repetir el procedimiento de desproteínización. Una tercera desproteínización se realizó a temperatura ambiente empleando las conchas sin triturar, ni limpiar, introducidas en soluciones de NaOH al 1, 3, 5, y 10%, durante varios días hasta obtenida su desproteínización [4].

Recuperación de proteínas. Un procedimiento que se utilizó para recuperar las proteínas, presentes en el líquido de la etapa de desproteínización, es la precipitación de las mismas con etanol. Esto se realizó con 90 mL del líquido que se obtuvo luego de la desproteínización; a éste se le agregaron 10 mL de etanol (hasta una concentración de 10% v/v de etanol), se agitó y se dejó reposar hasta la precipitación de las proteínas. También se realizó el mismo experimento con concentraciones de etanol del 1, 2, 3, 4, 5, y 10% v/v. El tiempo de precipitación fue de aproximadamente 2 horas, cuando se realiza al 5 y al 10% v/v de etanol y de 6 a 12 horas con las otras concentraciones de etanol [4].

También se separó la proteína del líquido de la desproteínización agregándole el líquido proveniente del proceso de desmineralización ácida. Esta mezcla dio como resultado una neutralización entre ambos líquidos y la separación de la proteína. Para esto se agregaron 500 mL de la solución de desproteínización en un vaso de precipitado (esta solución presenta un pH aproximado de 12) y se le agrega una solución proveniente del proceso de desmineralización, con un pH de 3 aproximadamente, hasta que el pH de la solución resultante fuera de aproximadamente 5. La solución se agitó y se dejó reposar durante 1 día. A diferencia del procedimiento de separación con etanol, en este caso la proteína no precipita, quedando en la superficie de la solución [4].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de obtención de quitosano a nivel de laboratorio requiere mucho tiempo, este tiempo disminuye considerablemente al limpiar las conchas previamente. Normalmente el tiempo de secado de los desechos se realiza durante aproximadamente 24 horas (a 100°C), este tiempo se disminuye al limpiar las conchas previamente reduciéndose a 1 hora (a 100°C). La limpieza previa reduce considerablemente la cantidad de proteínas en los desechos. Por lo que se puede desproteínizar una cantidad mucho mayor con la misma cantidad de reactivos. En la Tabla 1 se muestran los resultados del proceso de obtención de quitosano, obtenidos de un promedio de 15 repeticiones con o sin limpieza de los desechos y además se comparan con resultados obtenidos en

la literatura [5]. Se puede observar que en el procedimiento experimental con limpieza, la cantidad de proteínas disminuye considerablemente por lo que se obtiene mayor cantidad porcentual de quitina en el proceso.

Tabla 1. Comparación de los resultados en el proceso empleado para la obtención de quitosano (n = 5).

| | <i>Muestra</i> | <i>P (%)</i> | <i>M (%)</i> | <i>Q (%)</i> |
|-----------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| Experimental (sin limpieza) | Desechos (Cangrejo) | 75 ± 4,3 | 13 ± 1,5 | 12 ± 3,7 |
| Experimental (con limpieza) | Conchas de cangrejo | 10 ± 4,1 | 42 ± 4,8 | 48 ± 3,3 |
| Cremaldes, O (3) | Desechos (Cangrejo) | 35 ± 3,8 | 15 ± 2,6 | 16 ± 2,9 |

Proteínas (P); Minerales (M); Quitina (Q)

En la desproteínización de los desechos, se tratan las conchas de los crustáceos en medio alcalino a altas temperaturas lográndose desnaturalizar la proteína presente. Esto se debe a que el NaOH separa los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas a las moléculas de las proteínas, haciendo que se separen y se dispersen en la solución acuosa. Para determinar la cantidad porcentual de proteínas en la muestra se calcula por la pérdida de peso ocurrida luego de realizar este procedimiento [6]

Una tercera desproteínización dio excelentes resultados con la concentración de 5% de NaOH y 5 días de desproteínización, las conchas quedan completamente desproteínizadas sin necesidad de limpieza previa ni trituración. Este procedimiento se aplicó a escala macro con 50 kg de desechos y 300 L de NaOH al 5% dando excelentes resultados.

Se obtuvo el espectro FTIR del material sólido que se obtiene luego de la desproteínización 1 (Figura 1a) y desproteínización 2 (Figura 1b), donde se observan en ambos una banda entre 1.500 y 1.350 cm^{-1} característica de CH_2 de los lípidos (flexión CH_2 en tijera y flexión asimétrica y simétrica del CH_3). También se observa la banda de amida I a 1.650 cm^{-1} característica de la quitina. Las proteínas comúnmente presentan bandas generalmente intensas entre 1.700–1.650 cm^{-1} (que son $\text{C} = \text{O}$ de los grupos terminales COOH de estos polipéptidos). Por lo tanto, se puede decir que ambos procedimientos son efectivos. Este material en este punto del proceso, aunque no se evidencie en estos espectros posiblemente quede una pequeña cantidad de proteínas, pero en los procesos siguientes como la desmineralización ácida o en la desacetilación, cualquier proteína residual sería extraída completamente.

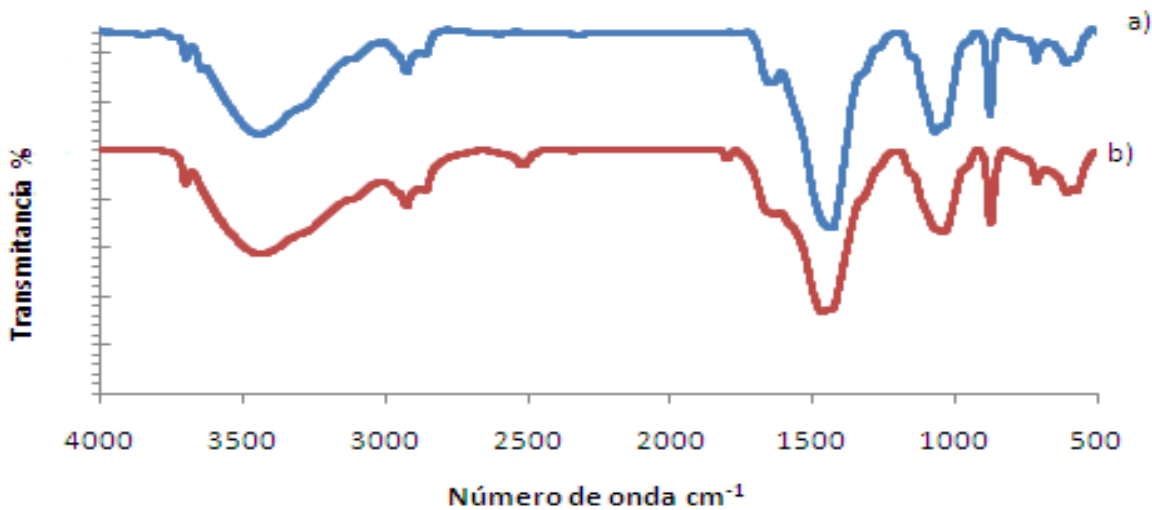


Figura 1. Espectro FTIR del material ldespués de a) desproteinización 1, y b) desproteinización 2.

El líquido que se desecha en la desproteinización contiene proteínas, estas proteínas pueden ser precipitadas de la solución básica, empleando un solvente que sea afín a la proteína como es el caso del etanol esto produce la formación de agregados coloidales y la subsecuente precipitación. Se agregaron cantidades de etanol al líquido de desproteinización que dieron concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, y 10%. El resultado con 1 y 2% no fue suficiente la concentración y no se observa precipitación aparente o muy poca. Con 3 y 4% hay mayor precipitación, pero puede durar de 6 a 12 horas. Con 5% la precipitación dura aproximadamente 2 horas y al 10% es el mismo tiempo por lo que no se emplean concentraciones mayores.

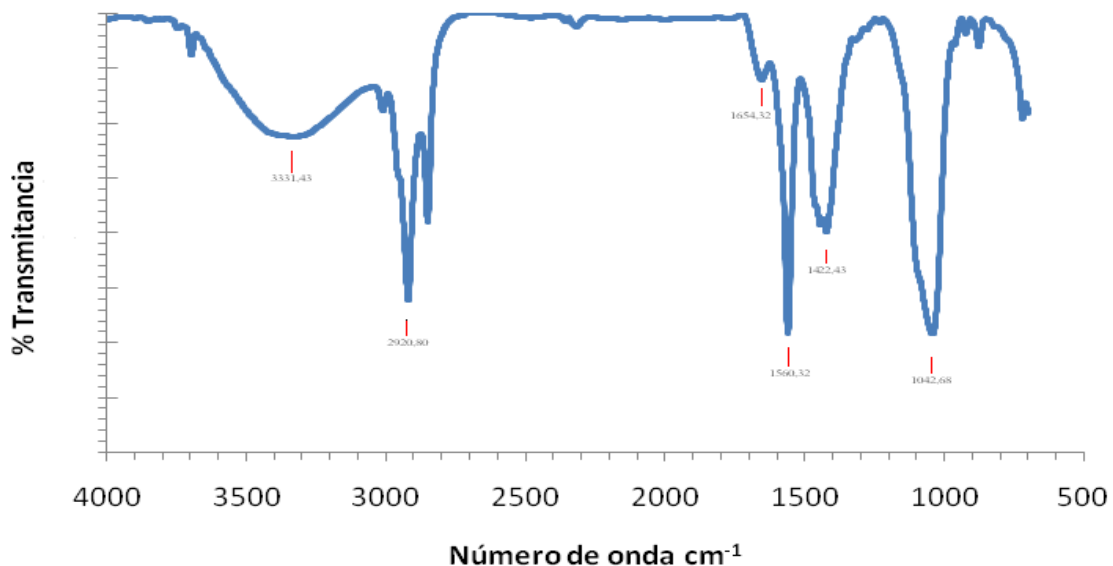


Figura 2. Espectro FTIR de proteínas extraída con etanol a partir de una solución de NaOH al 3%.

En la Figura 2 se observa el espectro de las proteínas extraídas con etanol, a partir de la solución básica, en el cual se observa la banda amida I en 1.654 cm⁻¹ (C = O estiramiento) y la banda amida II en 1.560 cm⁻¹ (CN estiramiento, NH flexión) además de estar solapada por la banda

del COO^- del grupo ácido terminal en las proteínas COOH , el cual al estar a pH básico se presenta en forma de acetato [7].

En esta investigación para la separación de las proteínas se utilizó el líquido ácido proveniente del proceso de desmineralización con ácido clorhídrico, el cual neutraliza este líquido básico que tiene dispersas a las proteínas. Este líquido se agregó hasta obtener un pH de 5 en el cual se observó la separación de la proteína presente, la solución resultante tiene una concentración elevada de NaCl lo cual aumenta la densidad de la solución y ésta mayor densidad desplaza a las proteínas a la superficie, lo que hace fácil su separación física. En comparación se puede dar el ejemplo de *Escorcia y col.* (4), los cuales trabajaron en una planta de fabricación de quitina y de recuperación de proteínas. Para la recuperación de proteínas se trabajó con las soluciones provenientes de la etapa de desproteínización. Para ello, la solución fue tratada con HCl concentrado hasta alcanzar la precipitación, en el punto isoelectrico, a un pH entre 3,5 – 4,5. Posteriormente la mezcla fue filtrada, secada y almacenada. La recuperación de proteínas se llevó a cabo con las soluciones provenientes de la etapa de desproteínización del caparazón de camarón. Estos datos revelan que hay mayor precipitación de las proteínas a pH de 4,0 y se obtiene mayor cantidad de producto a partir de soluciones provenientes de la desproteínización de crustáceos sin triturar [4].

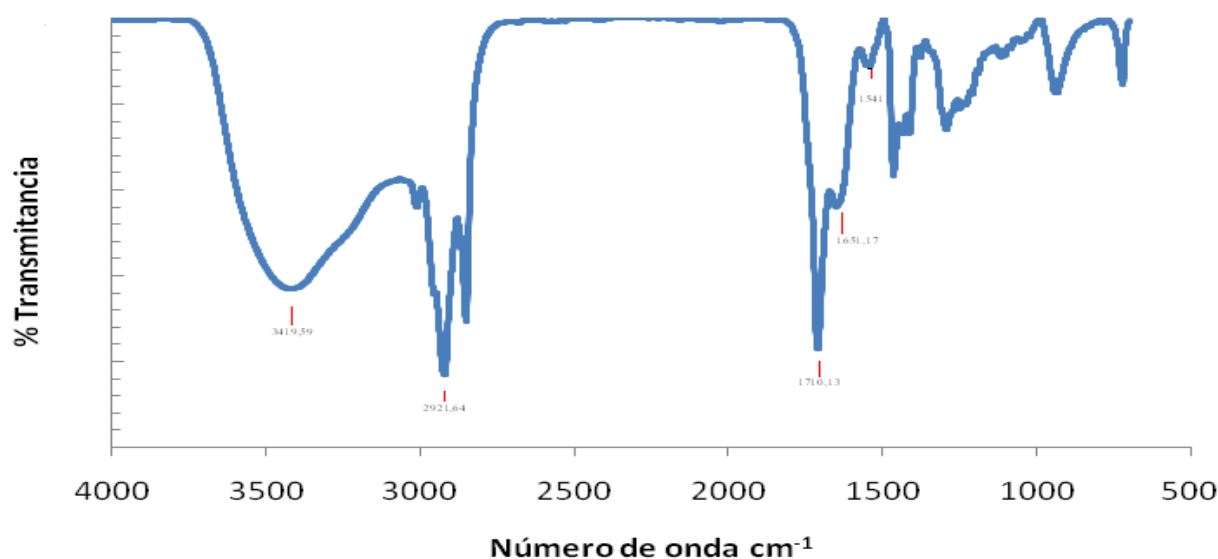


Figura 3. Espectro FTIR de proteína extraída a partir de una solución de NaOH al 3% (neutralizada con solución residual de HCl).

En la Figura 3 se muestra el espectro FTIR de las proteínas precipitadas con la solución residual ácida proveniente del proceso de desmineralización, las bandas que muestran son de amida I en 1656 cm^{-1} ($\text{C} = \text{O}$ estiramiento) y otra banda en 1710 cm^{-1} que corresponde al grupo carboxílico ($\text{C} = \text{O}$ estiramiento) que se encuentran en los extremos de las proteínas, los cuales están en la forma ácida COOH al estar el pH en 5. Se puede observar la pequeña banda de amida II

en 1.560 cm^{-1} (CN estiramiento, NH flexión) [5].

En la Figura 4 se pueden observar ambos espectros de las proteínas extraídas en medio básico y en medio ácido, en los cuales se observa la disminución en la intensidad de la banda COO^- en 1.560 cm^{-1} en medio básico y el aumento de la banda en 1.710 cm^{-1} correspondiente al COOH en medio ácido. Las posición de la banda amida I puede dar indicios de cuál es la estructura secundaria de la proteína obtenida y según el valor de 1.656 cm^{-1} la proteína obtenida se puede decir que es α -hélice [5,6].

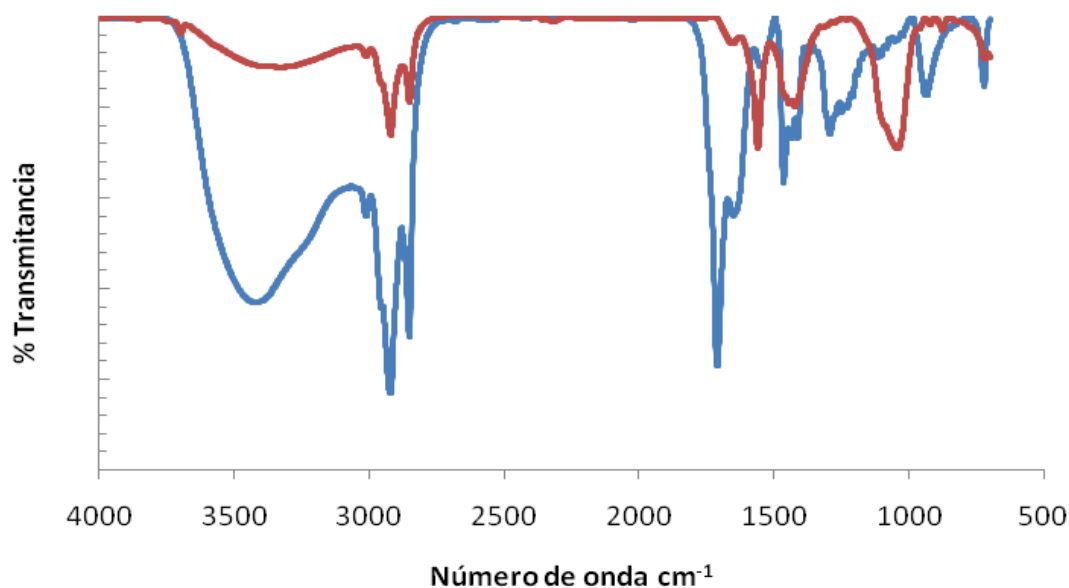


Figura 4. Superposición de espectros de las Figuras 2 y 3.

CONCLUSIONES

Las proteínas procedentes de cualquiera de los tres procesos empleados de desproteínización de la quitina, pueden precipitarse con etanol; a concentraciones entre 5–10% v/v. Estas pueden separarse para su posterior empleo y se puede reutilizar el hidróxido de sodio presente en este líquido de desproteínización.

Las proteínas provenientes de la desproteínización pueden también separarse, usando el líquido ácido proveniente del proceso de desmineralización. En este caso el hidróxido presente en el líquido de desproteínización no puede ser reutilizado, debido a que es neutralizado con la solución ácida empleada.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la *Universidad del Zulia (LUZ)*, y al *FONACIT* por el financiamiento para la realización de este trabajo a través del Programa Misión Ciencia. Y al *Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT)* por prestar sus instalaciones para tal fin.

BIBLIOGRAFÍA

1. Heux L, Brugnerotto J, Desbrières VM, Rinaudo M “Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan”, *Biomacromol.*, **1**, 746 (2000)
2. Velásquez C “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”, *Rev. Iberoam. Polímeros*, **4(2)**, 91 (2003)

3. Chaussard G, Domard A "New Aspects of the Extraction of Chitin from Squid Pens", *Biomacromol.*, **5**, 559 (2004)
4. Escorcia D, Hernández D, Sánchez M, Benavente M "Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas", *Rev. Cient. Nexo*. **22 (2)**, 45 (2009)
5. Cremaldes O, Ponce E, Corpas R, Gutierrez F, Jover M "Processing of Crawfish (*Procambarus clarkii*) for the Preparation of Carotenoproteins and Chitin", *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5468(2001)
6. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F, Monal A "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization", *Polymer*, **42**, 3569 (2001)
7. Osman Z, Arof A "FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes", *Electroch. Act.*, **48**, 993 (2003)