

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**Inmovilización enzimática de lipasa mediante el agente  
quitosano obtenido del exoesqueleto de cangrejo *cancer*  
*setosus***

Tesis

para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutica

Autor

Mercedes Garcés Yapuchura

Asesores

César Máximo Fuertes Ruitón

Gloria Gordillo Rocha

**Lima – Perú**

**2013**

## DEDICATORIA

**A Dios**, por brindarme la gracia y la fuerza de voluntad para la obtención de este logro profesional.

**A mis padres:** Eleuteria y Genaro, por su cariño, consejos y confianza depositada en mí.

**A mis hermanos:** Hernán y Paulino, por brindarme su cariño incondicional y apoyo día a día.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Jurado Examinador y Calificador conformado por:

Presidente: Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte

Miembros: Q.F. Haydée Zúñiga Cáceres

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera

Dr. Mario Carhuapoma Yance

Por sus sugerencias y consejos, que han permitido enriquecer este trabajo.

- Al Magíster César Máximo Fuertes Ruitón, por sus consejos y tiempo brindado en el asesoramiento de este trabajo, permitiendo la ejecución y el término de esta tesis.
- A la Magíster Gloria Gordillo Rocha, por el apoyo brindado.
- Al Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M. por haber brindando sus instalaciones para la realización de esta tesis.
- A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M., donde encontré un segundo hogar.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	4
<b>RESUMEN</b>	5
<b>SUMMARY</b>	6
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	7
1.1 Objetivo general	8
1.2 Objetivos específicos	8
1.3 Hipótesis	8
<b>II GENERALIDADES</b>	9
2.1 Enzimas	9
2.2 Lipasas	9
2.2.1 Reacción de hidrólisis	10
2.2.2 Reacción de transesterificación	10
2.3 Inmovilización de enzimas	11
2.4 Inmovilización enzimática en medio orgánico	14
2.5 Soportes de inmovilización	15
2.5.1 Elección del soporte	16
2.6 Qitosano	17
2.6.1 Obtención de qitosano	21
2.6.1.1 Acondicionamiento de la materia prima	21
2.6.1.2 Decoloración	21
2.6.1.3 Desmineralización	21
2.6.1.4 Desproteínización	22
2.6.1.5 Desacetilización de la quitina y obtención de qitosano	22
2.6.2 Caracterización básica del qitosano	25
2.6.2.1 Determinación del grado de desacetilación	26
2.6.2.2 Determinación del porcentaje de proteínas	27
2.6.3 Inmovilización de enzimas sobre qitosano	27
<b>III PARTE EXPERIMENTAL</b>	30

3.1 Equipos, materiales y reactivos	30
3.1.1 Reactivos	30
3.1.2 Equipos y materiales	30
3.2 Metodología	31
3.2.1 Colección y procesamiento de los cangrejos	31
3.2.2 Obtención del quitosano	31
3.2.2.1 Desmineralización	31
3.2.2.2 Desproteización	32
3.2.2.3 Decoloración	32
3.2.2.4 Desacetilación	32
3.2.2.5 Análisis del quitosano	32
3.2.2.5.1 Determinación del grado de desacetilación por espectrofotometría infrarrojo	32
3.2.2.5.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford	33
3.2.2.5.3 Solubilidad	34
3.2.3 Activación del soporte e inmovilización de lipasa	34
3.2.3.1 Análisis de inmovilización de lipasa	34
3.2.3.1.1 Actividad hidrolítica de lipasa inmovilizada sobre quitosano	34
3.2.3.1.2 Cromatografía en papel	35
<b>IV RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1 Rendimiento del quitosano obtenido	36
4.2 Análisis del espectro infrarrojo del quitosano obtenido	36
4.3 Determinación del grado de desacetilación por espectroscopía infrarrojo	37
4.4 Determinación de proteína en quitosano por método Bradford	39
4.5 Solubilidad	40
4.6 Cálculos en la concentración de EI y ENI expresado en proteína	41
4.6.1 Cálculos de la concentración de proteínas estándar diluidas	41
4.6.2 Cálculos de la concentración E expresado en proteína	42

4.6.3 Cálculos de la concentración ENI expresado en proteína	42
4.6.4 Cálculos de la concentración EI expresado en proteína	42
4.7 Actividad enzimática de la lipasa libre e inmovilizada	43
4.8 Cromatografía en papel	45
<b>V DISCUSIÓN</b>	46
<b>VI CONCLUSIONES</b>	49
<b>VII RECOMENDACIONES</b>	50
<b>VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51
<b>IX ANEXOS</b>	57
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	58
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	59

## ABREVIATURAS

<b>FT - IR:</b>	Espectrofotometría infrarroja
<b>RMN:</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>DA:</b>	Desacetilación de quitina
<b>BSA:</b>	Estándar de albúmina sérica
<b>MP:</b>	Muestra de quitosano obtenido en el laboratorio
<b>EI:</b>	Enzima inmovilizada
<b>ENI:</b>	Enzima no inmovilizada
<b>E:</b>	Enzima

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de inmovilizar la lipasa sobre el quitosano por medio de un enlace covalente usando la base de Schiff como unión entre la enzima, glutaraldehído y quitosano. El quitosano es un derivado de la quitina, ambos presentan múltiples áreas de aplicación. El quitosano se ha obtenido en el laboratorio a partir de la cubierta de "cangrejo" *Cancer setosus* por el método químico, siendo modificado en el proceso de desacetilación usando la autoclave. El quitosano obtenido presenta un alto grado de desacetilación 67,06 % determinado por espectroscopía infrarroja y bajo porcentaje de proteína 0,5445 % determinado por el método de Bradford, siendo el soporte para la inmovilización de la lipasa con un rendimiento del proceso de inmovilización de 49,55 % y el rendimiento de reciclado de la enzima inmovilizada fue de 79,40 %, según el modelo basado en la generación de ácido oleico a partir de la hidrólisis del aceite de oliva.

**Palabras claves:** Quitosano, autoclave, lipasa inmovilizada, espectroscopía infrarroja, actividad específica enzimática, ácido oleico.



## SUMMARY

The present study was performed with the aim of lipase immobilize on chitosan by covalent bonding using the Schiff base linkage between the enzyme, glutaraldehyde and chitosan. Chitosan is derived from chitin, both present many application areas. The chitosan was obtained in the laboratory starting from the cover "crab" *Cancer setosus* by the chemical method, being modified in the deacetylation process using the autoclave. The obtained chitosan has a deacetylation degree of 67.06% as determined by infrared spectroscopy and low percentage of protein 0.5445% determined by the method of Bradford, being the support for the immobilization of lipase with a yield of immobilization process 49.55% and the recycling performance of the immobilized enzyme was 79.40% according to the model based on the generation of oleic acid starting from the hydrolysis of olive oil.

**Keywords:** Chitosan autoclave immobilized lipase, infrared spectroscopy, specific enzymatic activity, oleic acid.

## I INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos altamente eficientes y tienen la ventaja de realizar las conversiones químicas complejas bajo ciertas condiciones de reacción con una alta especificidad, lo cual lo hace atractivo ambientalmente. A pesar de estas ventajas, la aplicación de las enzimas a nivel industrial se ha visto limitada por varios factores, principalmente su alto costo, inestabilidad y disponibilidad en cantidades pequeñas.

Estas dificultades han sido superadas con la investigación de nuevas técnicas como la llamada “inmovilización de las enzimas”, que es asociada a una reacción de la matriz insoluble o soporte, a fin de que puedan mantenerse en reacción y posterior reutilización en condiciones establecidas en virtud a su valor económico. Dentro de una gran gama de materiales de soporte de inmovilización, el quitosano es una excelente opción, siendo el soporte ideal para este proceso por ser un material biocompatible, no tóxico, biodegradable y de remarcada afinidad con las proteínas.

El uso de biopolímeros naturales como el quitosano tiene varias ventajas como: disponibilidad para la agricultura o fuentes de alimentos marinos, biocompatibilidad, biodegradabilidad, enmarcado en una coherencia ecológica por la posibilidad de obtener múltiples derivados para fines específicos y de uso enzimático. La aplicación potencial del quitosano es multidimensional; tanto a nivel de alimentos, nutricional, biotecnología, farmacéutica, agricultura, protección del ambiente y terapia génica, entre otros. La red catiónica presente en los múltiples grupos funcionales reactivos en la molécula de quitosano lo hace codiciado, como biomolécula. El quitosano ofrece una amplia posibilidad para la manipulación y preparación de un amplio espectro de derivados específicos para aplicaciones de uso final en diversas áreas.

## 1.1 Objetivo general

- Inmovilizar la enzima sobre quitosano obtenido a partir de la cubierta de “cangrejo”.

## 1.2 Objetivos específicos

- Obtener quitosano a partir del exoesqueleto de “cangrejo”
- Analizar el quitosano obtenido
- Inmovilizar la enzima mediante el agente ligante quitosano
- Analizar la actividad hidrolítica de la lipasa

## 1.3 Hipótesis

El quitosano, obtenido y caracterizado a partir del exoesqueleto de “cangrejo”, posee efecto inmovilizante enzimático sobre la lipasa.

## II GENERALIDADES

### 2.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas específicas de constitución heteropoliméricas de diferentes aminoácidos como monómeros de unidades y unidas por un enlace peptídico, poseen acción catalítica termodinámicamente posible, por lo cual se le denomina biocatalizadores, la actividad catalítica depende de la formación de enlaces o de interacciones moleculares semejantes, establecidas en las reacciones orgánicas ordinarias entre los aminoácidos y grupos prostéticos con un sustrato para la obtención de un producto en particular<sup>1</sup>.

Las enzimas difieren de otros catalizadores por su especificidad, siendo su actividad afectada por agentes ambientales como: temperatura, pH, presión y/o agentes externos; asimismo, la presencia de inhibidores que disminuyen la actividad enzimática usualmente conduce a trabajar con concentraciones de sustratos y productos bajos, encareciendo y brindando poca estabilidad en la etapa de purificación del producto<sup>1,2</sup>.

### 2.2 Lipasas

La lipasa está conformada por un sistema de enzimas como son: triacilglicerol hidrolasas, que tienen acción catalítica sobre los enlaces éster en el triglicérido, liberando di o monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol de grasa animal y vegetal bajo condiciones naturales<sup>2,3</sup>. Asimismo, cataliza otras reacciones como: la esterificación, interesterificación y transesterificación<sup>3,4</sup>. Usualmente los factores que afectan la actividad enzimática de la misma suelen ser: la temperatura y pH principalmente. Se destaca que, la temperatura puede ejercer un efecto desnaturalizante sobre las proteínas al sobrepasar su óptimo funcional y con ello una disminución significativa de la actividad enzimática<sup>1,3,5</sup>. Una de las lipasas más usadas es la proveniente de la *Cándida rugosa*, que tiene un peso molecular de

120,000, su punto isoelectrico es de pH 4.5 y una actividad óptima entre pH 6.5 y 7.5 e hidroliza el aceite de oliva con muy buen rendimiento<sup>5</sup>.

### 2.2.1 Reacción de hidrólisis

La reacción natural de las lipasas es la hidrólisis del enlace éster de acilgliceroles.

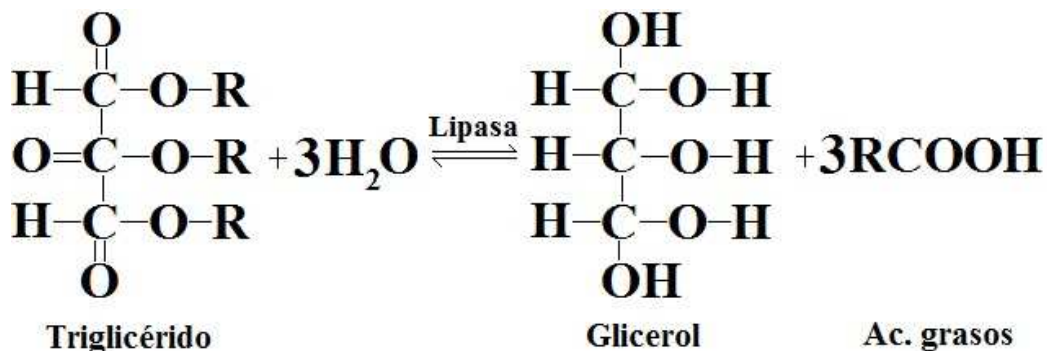


Fig. 1 La reacción de hidrólisis<sup>6</sup>.

### 2.2.2 Reacción de transesterificación

Es la síntesis en la cual el grupo acil donador es un éster, distinguiéndose dos tipos de transesterificaciones: glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o alcohol el acil receptor<sup>6-8</sup>.

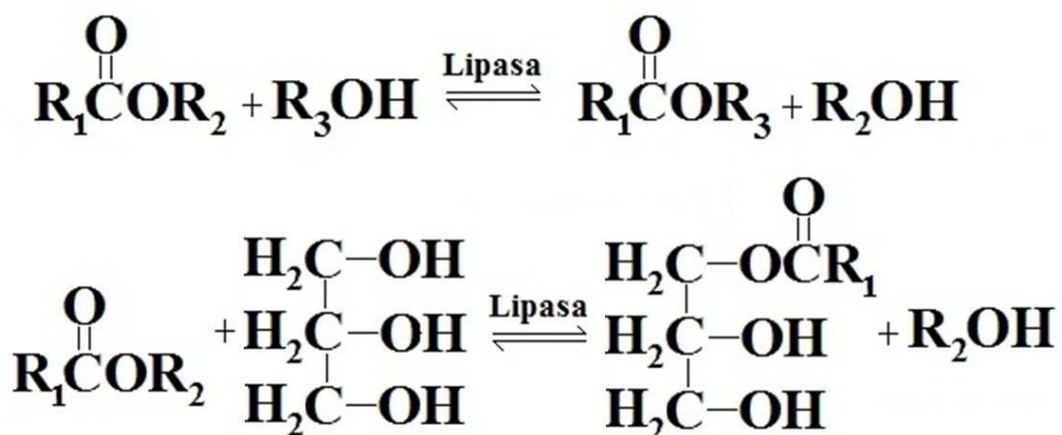


Fig. 2 La reacción global de transesterificación<sup>6</sup>.

## 2.3 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de proteínas y enzimas en soportes insolubles se viene trabajando desde hace mucho tiempo, como consecuencia de la investigación en nuevas metodologías para la industria; sin embargo, aún no se ha logrado un pleno desarrollo de técnicas claras debido a la propia naturaleza de las mismas; por ello, la búsqueda continua de nuevos métodos<sup>9, 10</sup>.

La inmovilización de una enzima es un proceso en el que se la confina o localiza en un soporte para dar lugar a formas insolubles<sup>8</sup>, por medio de la interacción de los grupos funcionales de los aminoácidos presentes en la enzima y la matriz del soporte, manteniendo al mismo tiempo una actividad catalítica deseada, con la ventaja de facilitar su separación, aumentar su estabilidad y la posibilidad de reutilizarla<sup>11-13</sup>. La inmovilización genera un aumento en la productividad, en consecuencia constituye un sistema económicamente más rentable para fines industriales<sup>6</sup>, ya que mejora el almacenamiento, la operatividad, características térmicas y en algunos casos la estabilidad conformacional<sup>14</sup>. Las enzimas inmovilizadas dimensionalmente son más grandes y resistentes a los cambios ambientales que las enzimas en solución<sup>12,15</sup>, siendo las enzimas más estudiadas las proteasas y lipasas<sup>16</sup>.

Existen diversos métodos para la inmovilización, los cuales pueden clasificarse basándose sobre todo en la solubilidad y el tipo de interacción responsable entre la enzima y el soporte, los cuales se presentes en el siguiente diagrama.

Tabla 1: Clasificación de los métodos de inmovilización de enzimas según la solubilidad de la enzima<sup>8,12-13</sup>.

No existe un método de inmovilización universal válido para todas las enzimas, debido a las distintas características químicas y composición de las mismas, así como las distintas propiedades de los substratos y productos. Por tanto, para cada aplicación de una enzima inmovilizada es necesario encontrar un procedimiento sencillo y barato, con el que se obtenga un producto que conserve la actividad y una estabilidad operacional óptima<sup>12,13,18</sup>.

Todos los métodos presentan ventajas y desventajas. La adsorción es simple, barata y eficaz, pero con frecuencia reversible. La unión covalente y el entrecruzamiento son eficaces y duraderos, pero costosos y fácilmente empeoran el funcionamiento de la enzima; sin embargo, en la membrana presentan problemas disfuncionales de atrapamiento y microencapsulación, los cuales son inherentes al proceso de inmovilización<sup>12,15,18</sup>.

En general, una inmovilización a nivel industrial ayudaría a poder reciclar la enzima y que el proceso pueda ser operado de manera continua y fácilmente controlada; siendo el producto fácil de separar y en algunos casos se alcanza una modificación estructural favorable de la enzima o se obtiene un alto grado de pureza del producto no contaminante con otras enzimas. Sin embargo, existen limitaciones durante una inmovilización como: el costo de la enzima soluble, de la inmovilización en el soporte y el proceso de inmovilización; generando una gran necesidad de investigar nuevas metodologías que puedan implementarse y que favorezcan el proceso de inmovilización<sup>9</sup>. En la práctica, una regla para encontrar las condiciones óptimas de la inmovilización para una enzima elegida y sus aplicaciones son encontradas empíricamente por un proceso de ensayo y error en una vía que asegure la retención más alta posible de la actividad de la enzima, su estabilidad operacional y durabilidad<sup>12</sup>.

La inmovilización de enzimas ha sido tradicionalmente concebida como un proceso viable sólo en fase acuosa; sin embargo, muchas investigaciones



han descartado esta idea, demostrándose que las enzimas pueden ser activas en solventes orgánicos, solventes gaseosos y fluidos supercríticos<sup>2</sup>.

## 2.4 Inmovilización enzimática en medio orgánico

La sustitución parcial o total del agua por un solvente orgánico, produce profundos cambios estructurales en la enzima que usualmente van asociados a la pérdida total o parcial de su funcionabilidad catalítica. Sin embargo, posee las siguientes ventajas:

- Cambios en el equilibrio de la reacción,
- Facilidad de recuperación de productos y el biocatalizador,
- Menos riesgo de contaminación microbiana<sup>2,19</sup>.

Principalmente existen dos sistemas de biocatálisis en solventes orgánicos: homogéneos y heterogéneos. Los sistemas homogéneos son mezclas de agua con solventes orgánicos miscibles, muestran que los sistemas heterogéneos pueden dividirse en sistemas macro heterogéneos y sistemas micro heterogéneos (micelas reversas). Entre los sistemas macro heterogéneos tenemos el sistema líquido- líquido con dos fases formadas por agua y por solventes inmiscibles, sistema sólido- líquido- líquido en el que la enzima se encuentra inmovilizada en un soporte, ya sea por enlace covalente o por entrapamiento en geles poliméricos; una vez que la enzima ha sido inmovilizada, la suspensión acuosa que la contiene se introduce en un solvente orgánico inmiscible para obtener un sistema trifásico de reacción<sup>2</sup>.

Las características de las enzimas inmovilizadas son regidas por las características de la enzima y del soporte. La interacción entre ambos brinda una enzima inmovilizada con propiedades fisicoquímicas y cinéticas específicas que generan un uso práctico final; en consecuencia, un soporte elegido que a juicio pueda llevar perceptiblemente al funcionamiento operacional del sistema inmovilizado<sup>12,13</sup>.

## 2.5 Soportes de inmovilización

Uno de los factores más importantes que afecta al desempeño de una enzima inmovilizada es el material de soporte. Existen diferentes tipos de ellos para cada una de las enzimas y métodos de inmovilización. Al considerar un soporte para una enzima se deberá pensar en factores tales como: pH, temperatura, área de superficie, permeabilidad, insolubilidad química y mecánica, estabilidad térmica, mayor rigidez, tamaño de partícula, resistencia microbiana, regenerabilidad, la fuerza iónica, presión, agitación, conjugación de cofactores y proceso de separación del sustrato del producto, entre otros<sup>9,12</sup>.

Los soportes pueden variar de forma (láminas, tubos, cilindros, esferas), tamaño y propiedades físicas o químicas muy particulares, encontrándose una gran variedad de compuestos, ya sean naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos<sup>18</sup>.

**Soportes inorgánicos:** Pueden ser *naturales*: arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc. o *manufacturados*: óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.

**Soportes orgánicos** tales como: polímeros naturales: *polisacáridos* (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano); *proteínas fibrosas* (colágeno, queratina) y *polímeros sintéticos*: poliolefinas (como el poliestireno); polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos); otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas).

Los polisacáridos que se han utilizado como soportes varían desde microesferas a lechos de alginatos, dextranos, carragenatos, agarosa, celulosa, quitosano, entre otros; todos ellos han sido utilizados con el fin de

minimizar los problemas presentados en otras técnicas de atrapamiento como: baja eficiencia, uso de solventes orgánicos volátiles que contribuyen a problemas ambientales, uso de solventes orgánicos que pueden alterar la estructura y funcionalidad de las proteínas<sup>18</sup>.

### 2.5.1 Elección del soporte

El soporte que se une a la enzima debe tener algunas propiedades físicas y químicas.

**Propiedades físicas:** un soporte adecuado debe poseer la facilidad de asumir diferentes configuraciones, dotar al sistema con la permeabilidad y la superficie adecuada para una biotransformación elegida. La densidad de la superficie del sitio de unión a disposición de la enzima, determina la capacidad de unión máxima. Los materiales de soporte también deben tener una buena estabilidad mecánica, rigidez y buenas propiedades de flujo para la estabilidad de la enzima y la actividad de almacenamiento.

**Propiedades químicas:** los soportes hidrofílicos generalmente son los más preferidos para la inmovilización de enzimas. Debido a que suelen ser inertes a la enzima, el sustrato y los cofactores, poseen grupos funcionales disponibles de las reacciones directas y modificaciones químicas, con alta afinidad a las proteínas, tienen la capacidad de ser reutilizadas<sup>11</sup>. También deben tener una gran superficie con un alto contenido de los grupos reactivos. Asimismo, deben ser biodegradables y biocompatibles, sin alterar la estructura natural de la enzima y que afectan su actividad biológica<sup>18,20</sup>. Los soportes que tienen grupos aminos pueden reaccionar con glutaraldehído dando a la matriz un grupo aldehído activo<sup>18</sup>, también actúa con el glioxal<sup>21</sup>.

Tanto la quitina como el quitosano ofrecen la mayor parte de las características antes mencionadas, siendo éstos los soportes naturales de mayor interés en los últimos tiempos<sup>10-12, 17,21</sup>.

## 2.6 Quitosano

La quitina fue descubierta por Braconnot en 1811 estudiando las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos; posteriormente Odier en un artículo sobre insectos le adjudicó el término "quitina" (del griego *tunic*, envoltura). Payen en 1943, generó controversia sobre las diferencias entre la quitina y la celulosa. El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, en un experimento al tratar la quitina con una solución caliente de KOH obteniendo un producto soluble en ácidos orgánicos y en 1894 fue estudiada por Hoppe-Seyler, quien la denominó "quitosano"<sup>22</sup>.

El quitosano es un polisacárido lineal<sup>21</sup> del tipo (1-4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucopiranososa obtenido por desacetilación alcalina de la quitina y dependiendo de la fuente y proceso de obtención el peso molecular puede variar de 300 hasta 1000 kDa<sup>17,23</sup>; por lo tanto, el quitosano es una poliamina alifática primaria<sup>24,25</sup>, es un biopolímero, no elástico, nitrogenado que se encuentra en las paredes de algunos hongos y en el exoesqueleto de artrópodos y crustáceos<sup>25</sup>.

La quitina es el segundo compuesto orgánico más abundante en la naturaleza después de la celulosa; está distribuido extensamente en los invertebrados marinos, insectos, hongos; sin embargo, no está presente en plantas y animales<sup>23,26</sup>. Generalmente es seleccionado del caparazón que contiene 30-40 % de proteína, 30-50 % de Carbonato de Calcio y Fosfato de Calcio, 20-30 % de quitina, siendo la principal fuente los crustáceos<sup>26-30</sup> que son desechados al mar continuamente, por lo cual muchos países industrializados muestran interés debido al bajo costo del caparazón<sup>29,31-32</sup>.

Como soporte proporciona varias ventajas, por ejemplo: su versatilidad y disponibilidad en diferentes formas (hojuelas, lechos porosos, geles, fibras y membranas)<sup>21,33</sup>, posee baja biodegradabilidad, bajo costo, fácil manejo, alta afinidad con proteínas y libre de toxicidad<sup>10,26,34</sup>; además, presenta propiedades físicas, químicas y biológicas muy particulares debido a sus iones catiónicos, debido a que los grupos aminos protonados del quitosano en disoluciones ácidas las convierte en un polication capaz de formar complejos polielectrolíticos con polianiones<sup>9</sup>, esta carga puede ser usada en procesos de floculación en formación de capas e inmovilización de reactivos biológicos como enzimas<sup>35</sup>. Esta condición singular permite aplicarla en un extenso abanico de aplicaciones<sup>26, 36</sup>.

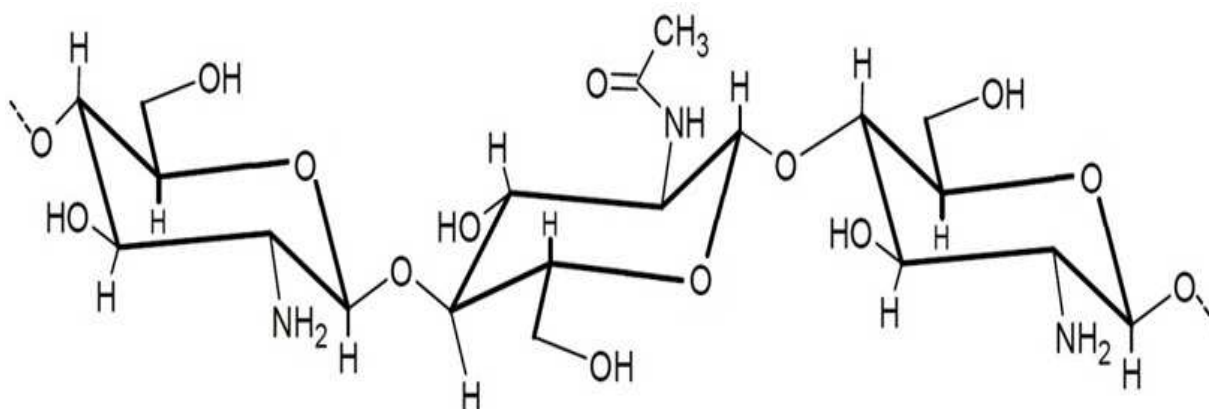


Fig. 3 Estructura química de quitosano parcialmente acetilado.

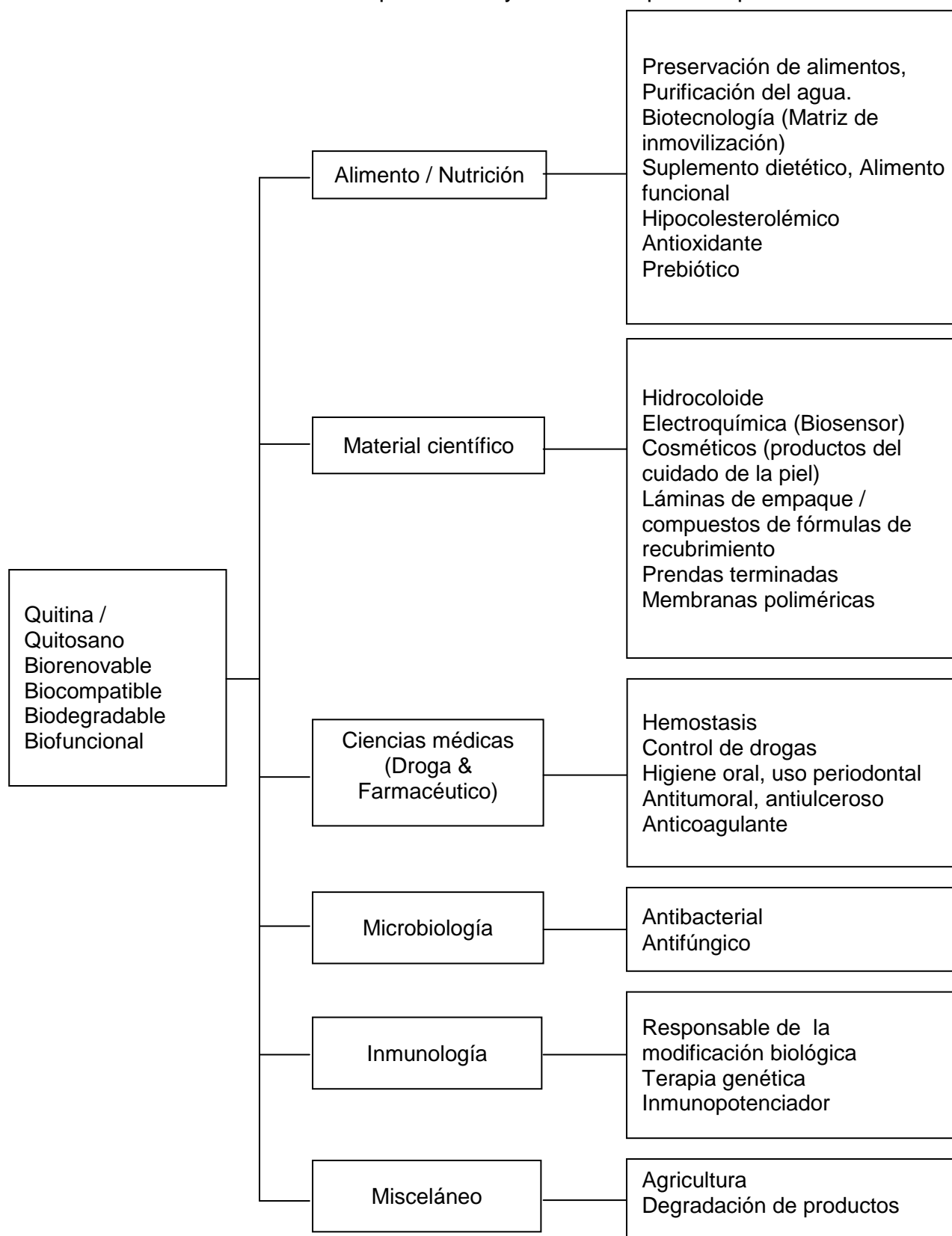
El quitosano es insoluble en agua y diversos solventes orgánicos, soluble en diferentes ácidos como ácido acético, fórmico y otros<sup>37, 38</sup>, los cuales protonan los grupos amino<sup>26</sup>.

Tiene la capacidad de formar películas biodegradables, su característica principal en la salud humana es la inocuidad adicionalmente posee la habilidad de captar lípidos; de acuerdo a Shirai 2004, el quitosano es un polisacárido catiónico y se une de forma electrostática a las moléculas con carga negativa, formándose largos polímeros, que desde el punto de vista de salud ayuda a la pérdida de peso, no pueden ser atacados por los jugos

gástricos y son eliminados directamente por las heces. Asimismo, es biodegradable y posee poder bacteriostático, inhibiendo el crecimiento microbiano con la gran importancia de poder formar films o películas comestibles<sup>39-42</sup>.

En general, entre las propiedades físicas y químicas de este biopolímero destacan sus diferentes grados de desacetilación (DA) entre 50 y 98 % y el quitosano comercial tiene un promedio de 40 a 98 %<sup>16</sup>, el cual se puede caracterizar por FT-IR, RMN o Cromatografía de permeación en gel, entre otros<sup>17,23,26,28,36,42</sup>, su higroscopicidad es similar a la de las fibras de celulosa, pero su superficie es menos activa y permeable al agua que las fibras de celulosas<sup>35</sup>.

Entre sus aplicaciones usuales tenemos las siguientes<sup>10,17,23,25-28,43</sup>:

Tabla 2: Relación de las aplicaciones y usos de la quitina / quitosano<sup>43</sup>

## 2.6.1 Obtención de quitosano

El creciente interés ambiental motiva continuamente el uso de materiales naturales como la quitina y quitosano, conllevando a un incremento en las inversiones que promuevan la investigación de formas económicamente viables para la extracción de estos compuestos, siendo Japón uno de los países líderes<sup>35</sup>.

### 2.6.1.1 Acondicionamiento de la materia prima

Consiste en el lavado de los caparazones para procesar y separar la masa que queda adherida a los mismos. Posteriormente, se procede a su molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción<sup>36</sup>.

### 2.6.1.2 Decoloración

Los caparazones de crustáceos presentan pigmentos carotenoides, tales como la astaxantina, cantaxantina, astacina, luteína y el  $\beta$ -caroteno; los cuales, únicamente se suelen extraer a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes<sup>26, 28, 36-37, 44-45</sup>.

### 2.6.1.3 Desmineralización

Los caparazones de los crustáceos poseen componentes inorgánicos en mayor proporción el carbonato de calcio y en menor cantidad el fosfato de calcio y otros<sup>45</sup>, que son eliminados empleando soluciones diluidas de ácido pudiendo ser: HCl, HNO<sub>3</sub>, HCOOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y CH<sub>3</sub>COOH; dependiendo de la naturaleza de la materia prima variará la concentración del ácido y el tiempo de tratamiento, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas



altas, que provocan la degradación del polímero para disminuir la degradación puede emplearse un agente acomplejante como: EDTA<sup>26,28,36-37,44</sup>.

#### **2.6.1.4 Desproteización**

Adherido al caparazón del crustáceo suelen estar restos orgánicos proteicos y para su eliminación son tratados con soluciones de NaOH que pueden ser de 1 a 100 % a temperaturas de 65 – 100 °C en períodos de 1 a 24 horas con el fin de disolver la proteína<sup>45</sup>. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos<sup>28</sup>. Los tratamientos de tiempos prolongados a temperaturas elevadas ocasionan la ruptura de las cadenas y provoca la desacetilación parcial del polímero<sup>26,28,36,44,46</sup>.

#### **2.6.1.5 Desacetilización de la quitina y obtención de quitosano**

Dependiendo de la naturaleza de la materia prima, el tratamiento preliminar, el grado de desacetilación deseado y de las condiciones de reacción, se obtendrá del quitosano un producto desacetilado de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos o enzimáticos. La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamidas en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas eliminando el grupo acetilo.

Generalmente, la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (40-50 %) a temperaturas superiores a 100 °C, preferiblemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras como el NaBH<sub>4</sub> o el tiofenol para evitar la despolimerización del polímero. Las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como la materia prima, el tratamiento previo y el

grado de desacetilación deseado<sup>26</sup>. No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo grado de desacetilación alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85 %. Tratamientos prolongados suelen provocar la degradación del polímero sin traducirse en un aumento sensible del grado de desacetilación<sup>26,28,36,46</sup>.

El proceso de desacetilación consiste en la remoción del grupo acetil de las cadenas moleculares de la quitina, obteniendo el quitosano con un alto grado de grupo reactivo amino (-NH<sub>2</sub>). El grado de desacetilación está en relación directa con la cantidad de grupos aminos libres<sup>47</sup> y es una propiedad importante en la producción del quitosano debido a que afecta a las propiedades fisicoquímicas, biodegradabilidad y otros<sup>17,26</sup>.

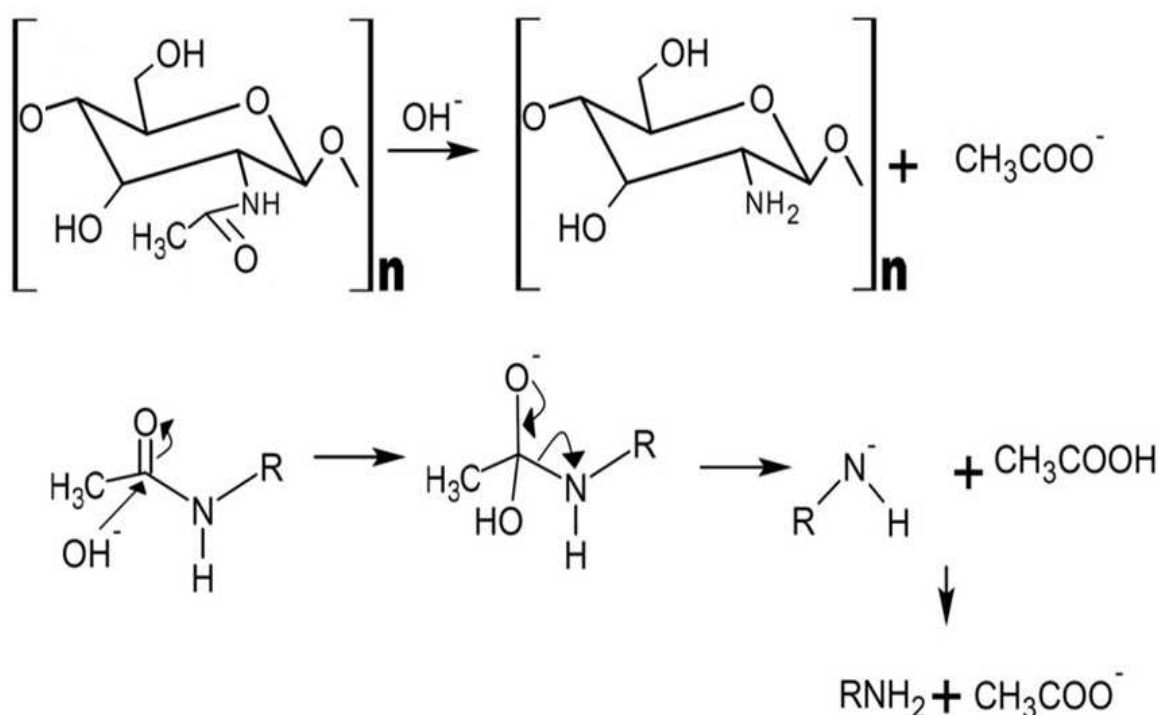
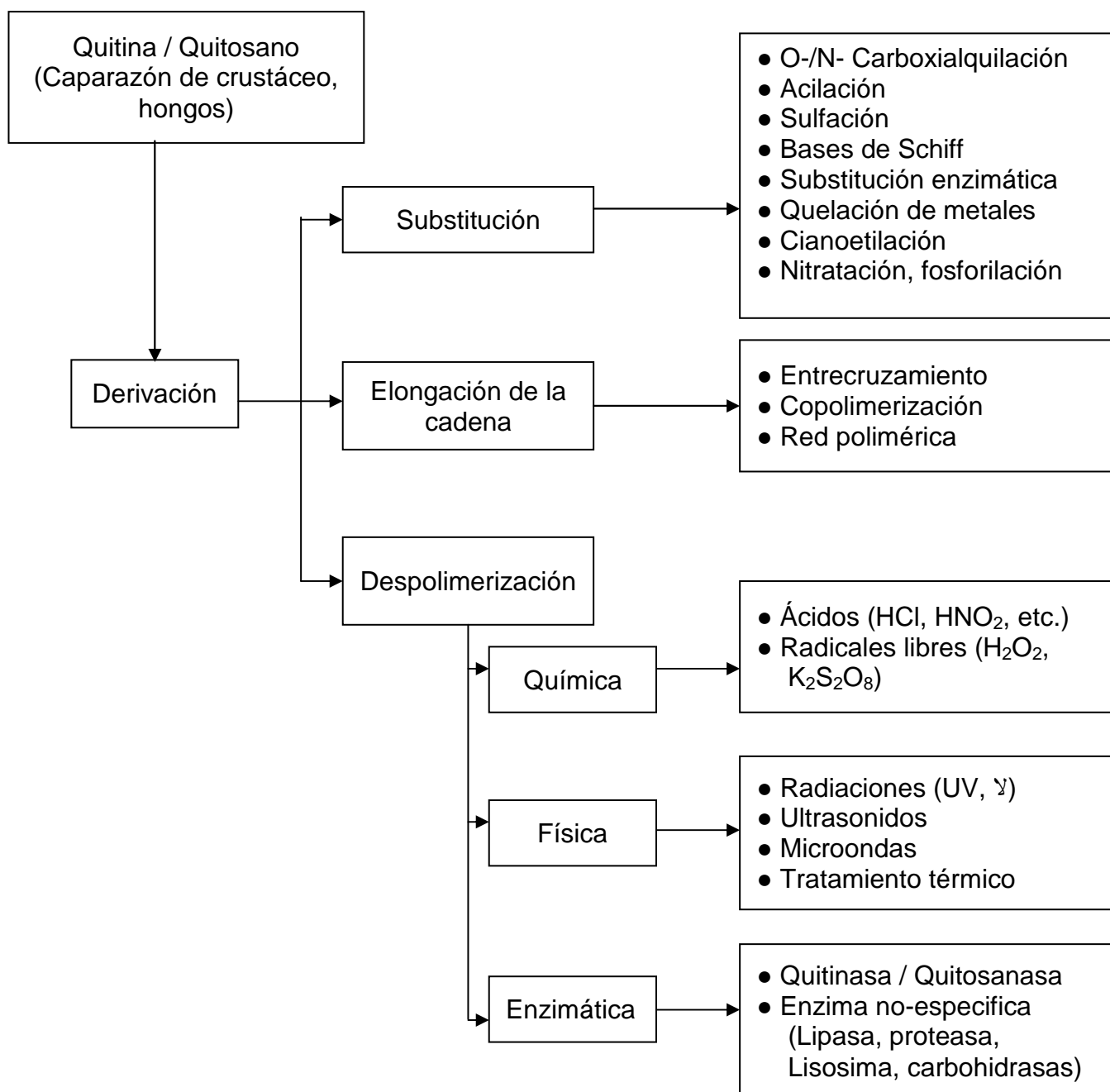


Fig. 4 Mecanismo de reacción de desacetilación de la quitina para obtener quitosano mediante hidrólisis alcalina.

(R es el carbohidrato donde el grupo amino se une al átomo de carbono C-2)

Tabla 3: Derivación potencial multifacético de quitina / quitosano<sup>43</sup>.

## 2.6.2 Caracterización básica del quitosano

La quitina, quitosano y celulosa poseen únicamente diferencia estructural química en la posición C-2; el quitosano posee un grupo amino ( $-NH_2$ ) y grupo hidroxilo ( $-OH$ ) en la celulosa. Sin embargo, a diferencia de fibras vegetales, quitosano posee cargas positivas iónicas, que le dan la capacidad de obligar químicamente con carga negativa grasas, lípidos, colesterol, iones metálicos, proteínas y macromoléculas<sup>21,27,26,33</sup>.

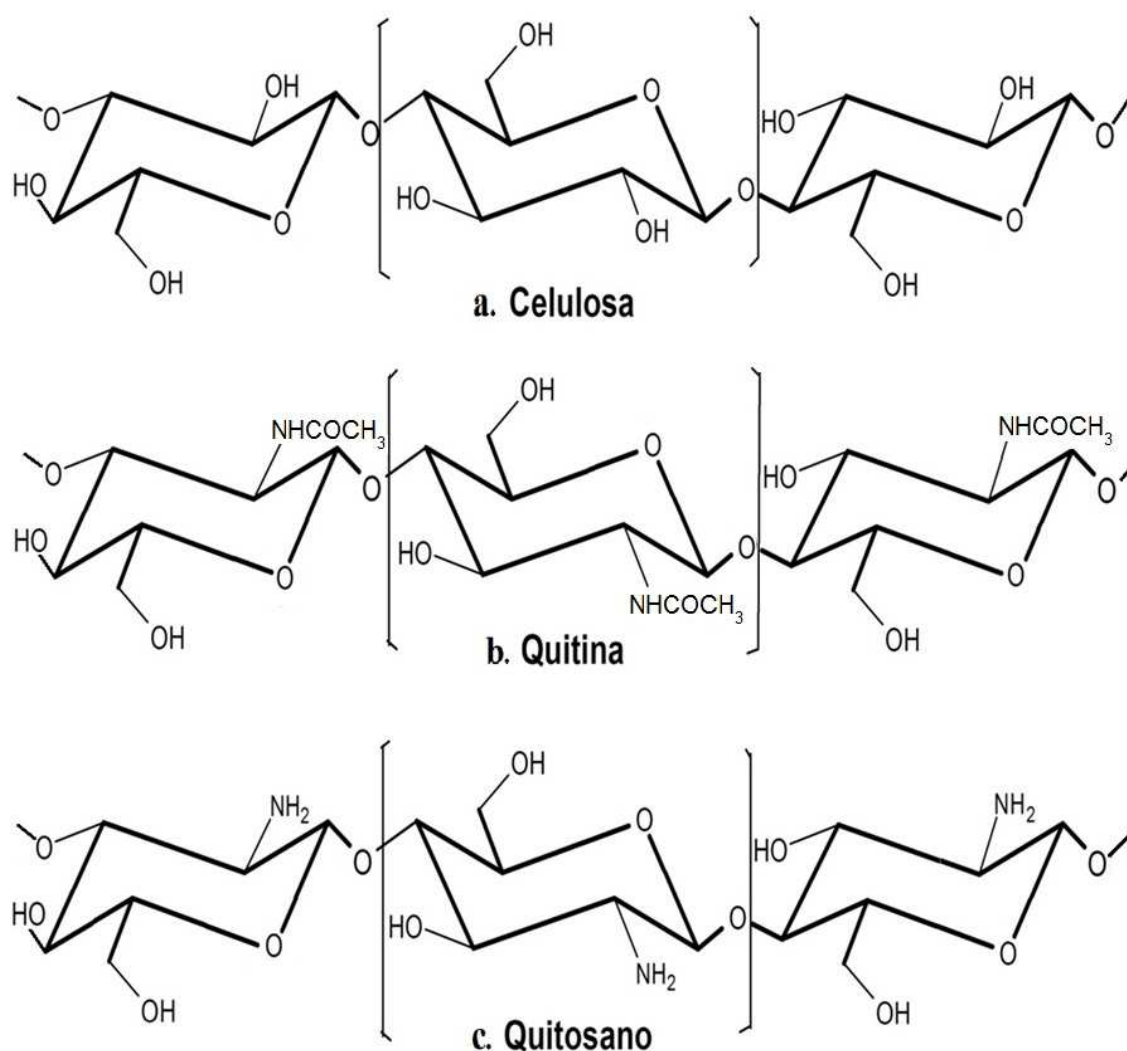


Fig. 5 Estructura primaria de (a) Celulosa, (b) Quitina y (c) Quitosano<sup>23-25</sup>.

### 2.6.2.1 Determinación del grado de desacetilación

El proceso de desacetilación consiste en la eliminación de grupos acetilos de la cadena molecular de la quitina, obteniéndose el quitosano. Dependiendo de factores físico-químicos durante la síntesis se obtendrá el grado de desacetilación, esta es una propiedad importante en la producción de quitosano, debido a que afecta a las propiedades físico-químicas; por lo tanto, determina sus aplicaciones adecuadas<sup>26</sup>.

El grado de desacetilación del quitosano puede oscilar entre 56 a 99 % con un promedio de 80 %, dependiendo de las especies de crustáceos y los métodos de preparación. Varios métodos han sido reportados para la determinación del grado de desacetilación de quitosano. Estas incluyen prueba de ninhidrina, valoración lineal potenciométrica, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear, espectroscopía, bromuro de hidrógeno titrimetría<sup>26</sup>.

El método por espectroscopía IR, que fue propuesto por primera vez por Domszy y Roberts (1980), es comúnmente utilizado para la estimación de valores de quitosano desacetilado. Este método tiene una serie de ventajas y desventajas.

En primer lugar, es relativamente rápido y a diferencia de otros métodos espectroscópicos, no requiere pureza de la muestra para la prueba ni exigir la disolución de quitosano en un solvente acuoso.

En segundo lugar, la preparación de muestras, el tipo de instrumento utilizado y las condiciones pueden influir en el análisis de muestras. El quitosano es higroscópico en la naturaleza y las muestras con menor desacetilación pueden

absorber la humedad más que aquellos con mayor desacetilación, es esencial que el análisis de muestras debe estar completamente seco.

Para el cálculo del grado de desacetilación de quitosano por el método de espectroscopía infrarroja se realiza de la siguiente manera<sup>17,26,28,43,48-49</sup>:

$$DA = 100 - [(A_{1650} / A_{3450}) \times 100 / 1.33]$$

Donde:

DA : Desacetilación

$A_{1650}$  : Absorbancia a 1650

$A_{3450}$  : Absorbancia a 3450

1.33 : valor de la proporción de quitosano para  $A_{1650}/A_{3450}$  totalmente quitosano N-acetilado.

### 2.6.2.2 Determinación del porcentaje de proteínas

Usualmente se realiza empleando métodos colorimétricos por medio del espectro ultravioleta-visible; que sirven para medir la concentración de proteínas de las soluciones problema versus el estándar de BSA previamente calibrado usando como indicador el reactivo de Bradford<sup>50</sup>.

### 2.6.3 Inmovilización de enzimas sobre quitosano

La inmovilización puede ser llevada a cabo por atrapamiento o mediante enlace covalente usando glutaraldehído para la formación de la base de Schiff<sup>11,36,51</sup>. La presencia de grupos hidroxilo (-OH) y amino (-NH<sub>2</sub>) facilita el enlace covalente de las enzimas y la probable derivatización del polímero en los cuales se pueden unir las enzimas fácilmente y/o reticular con moléculas bifuncionales como glioxal o glutaraldehído para prevenir la disolución a pH

menor de 2. La interacción entre la enzima-sustrato es generalmente por fuerzas débiles como Van Der Waals y enlaces puentes de hidrógeno, siendo posible el reciclaje de la enzima<sup>52-53</sup>.

La reacción de entrecruzamiento del quitosano con el glutaraldehído ha sido ampliamente utilizada en la literatura para la inmovilización de las enzimas, para promover la insolubilización y disminuir la degradación del quitosano durante su empleo en la adsorción de iones metálicos en soluciones ácidas, la formación de hidrogeles de quitosano con otros polímeros y la formación de microesferas para la dosificación controlada de fármacos, entre otros<sup>5,36</sup>.

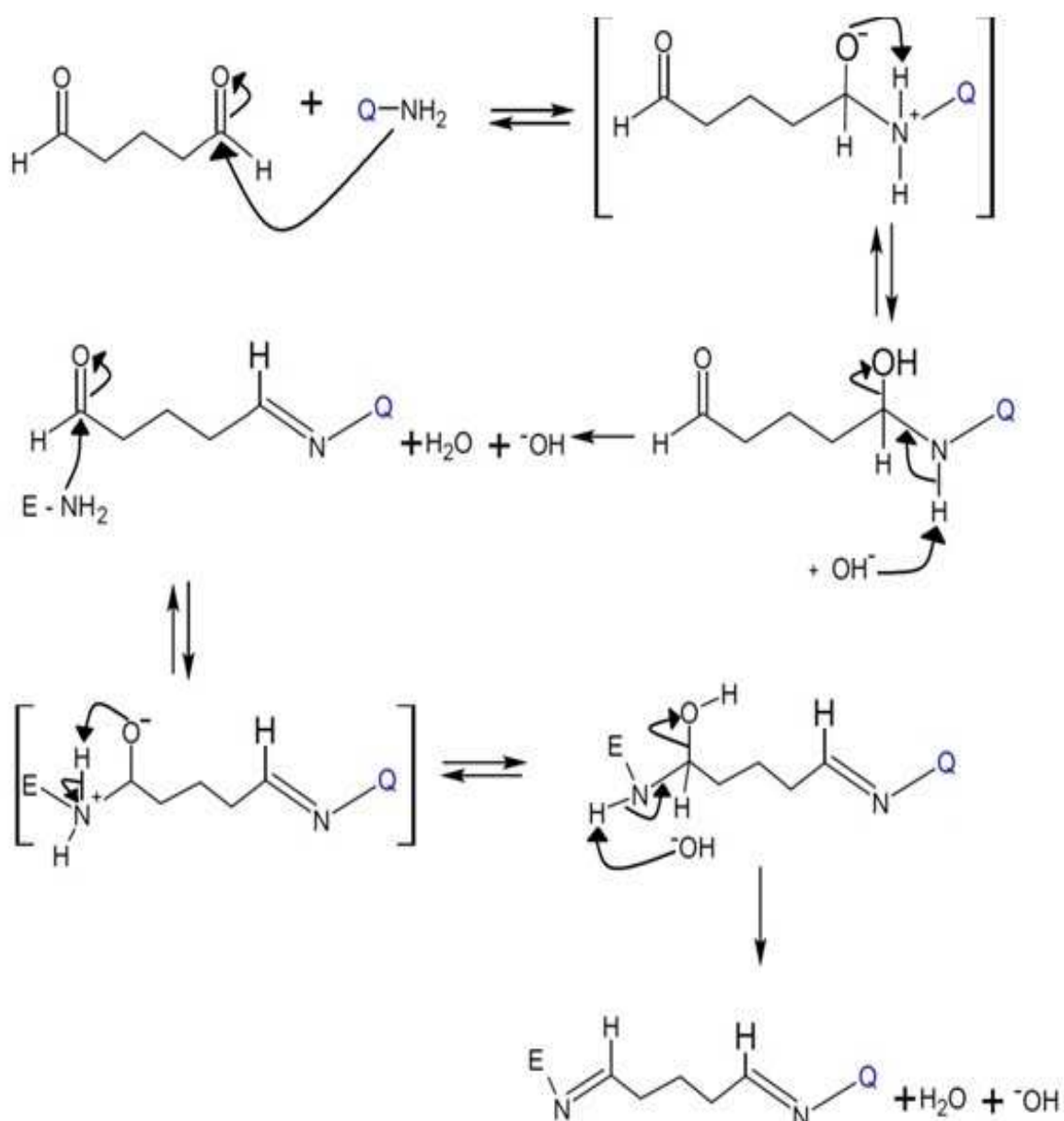


Fig. 6 Mecanismo de reacción del glutaraldehído con el soporte y la enzima en medio básico, se forma una doble base de Schiff <sup>53</sup>  
(QN<sub>H</sub><sub>2</sub>=Quitosano, EN<sub>H</sub><sub>2</sub>=Enzima).



### III PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reactivos, equipos y materiales

##### 3.1.1 Reactivos

Acido Clorhídrico (2.0 N, 30 %)

Hidróxido de sodio (1.0 N, 0.02 N y 50 %)

Soluciones tampones: Buffer fosfato pH 7.2

Lipasa de *Candida rugosa*

Glutaraldehido al 25 % grado II Sigma-USA

Reactivo Bradford

Aceite de Oliva extra virgen marca El Olivar, acidez < 0,8 %

Acido acético glacial al 0,1 % y 1 %

Cloroformo Q.P.

BSA 0,1 mg/mL

Fenolftaleína

Agua destilada

Acido sulfúrico al 10 %

Acido Cítrico

Acido Oxálico

Alcohol Etílico al 96°

n-Butanol

n-hexano

Ácido Oleico Q.P.

##### 3.1.2 Equipos y materiales

Autoclave

Espectrofotómetro IR: Perkin Elmer FT-IR Modelo: Spectrum 1000

Espectrofotómetro UV: Thermo Scientific, Modelo Genesys 10s VIS

pH-98103 Economical pH Tester

Balanza analítica Metler, sensibilidad 0.001g

Micropipeta de 100 y 1000  $\mu$ L

Tamizador: U.S. Estándar Sieve Series, Fisher Scientific Company

Estufa

Agitador magnético

Material de vidrio de uso general en el laboratorio

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Colección y procesamiento de la muestra

La muestra de “cangrejo” *Cancer setosus* fueron obtenidos del terminal pesquero de Villa El Salvador, los cuales fueron lavados, previo retiro de los restos de materia orgánica; quedando solo el exoesqueleto, que fue secado en la estufa y molido en el mortero.

### 3.2.2 Obtención del quitosano

La obtención del quitosano a partir del “cangrejo” *Cancer setosus* se realizó por el método químico con una variación en la desacetilación, el cual fue el uso de la autoclave. La obtención consta de las 3 siguientes etapas:

#### 3.2.2.1 Desmineralización

En un matraz se colocó el caparazón molido y se agregó 450 mL de HCl al 3 % por 24 horas a temperatura ambiente, se filtró y lavó con agua destilada, posteriormente se secó en la estufa a 40 °C.

### **3.2.2.2 Desproteización**

Los caparazones desmineralizados fueron tratados con 750 mL de NaOH 1 N por 48 horas a temperatura ambiente, se filtro y lavó con agua destilada, luego se secó en la estufa a 40 °C.

### **3.2.2.3 Decoloración**

Previa a la decoloración de los caparazones con cloroformo se realizó el tamizado con tamiz malla N° 40 (400-420 mics). Se colocó los caparazones desproteinizados y desmineralizados en un beaker y se añadió el cloroformo hasta cubrirlo, se almacenó por 24 horas a temperatura ambiente; luego se procedió a retirar el sobrenadante, se filtró y lavó con agua destilada, posteriormente se secó en la estufa a 40 °C.

### **3.2.2.4 Desacetilación**

La muestra desmineralizada y desproteinizada fue tratada con una solución de NaOH al 50 % (1:10 w/v) y llevada a una autoclave por 30 minutos a 115 psi y 121 °C, posteriormente se filtró y lavó con agua destilada, luego se secó en la estufa a 40 °C.

### **3.2.2.5 Análisis del quitosano**

#### **3.2.2.5.1 Determinación del grado de desacetilación por espectrofotometría infrarrojo**

La lectura del espectro infrarrojo del quitosano obtenido en el laboratorio se realizó en un espectrofotómetro IR Perkin Elmer FT-IR, analizándolo en el rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2.5.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford

**Fundamento:** Se basa en la absorbancia del colorante Azul Brillante de Coomassie con la proteína presente en la muestra a un espectro de absorción de 595  $\text{nm}$ . Este método posee una sensibilidad de 0 a 1400  $\text{mg/mL}$ . El complejo es formado por la interacción del reactivo de Coomassie, el cual dona su electrón libre a la proteína, la cual forma un enlace no covalente en la región no polar del colorante por medio de fuerzas de Van Der Waals, tornándose la solución de roja a azul; por lo que la cantidad de complejo presente en la solución es una medida de la concentración de proteínas. La ventaja primordial es que es menos susceptible a la interferencia por varios productos químicos que podrían estar presentes en la muestra; sin embargo, es susceptible a elevadas concentraciones de detergentes.

Se preparó una batería de tubos, vertiendo en cada uno los reactivos indicados en la siguiente tabla.

Tabla 4: Determinación de proteínas en el BSA y quitosano obtenido en el laboratorio.

	Blanco	1	2	3	4	5	MP
[BSA]	-	1 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	6 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	-
BSA 0,1 $\text{mg/mL}$	-	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	-
Buffer	800 $\mu\text{L}$	790 $\mu\text{L}$	780 $\mu\text{L}$	760 $\mu\text{L}$	740 $\mu\text{L}$	720 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$
MP*	-	-	-	-	-	-	50 $\mu\text{L}$
Bradford	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Total	1000 $\mu\text{L}$						

\*1 % de quitosano de "cangrejo" *Cancer setosus* obtenido en el laboratorio en 1 % de ácido acético glacial

### 3.2.2.5.3 Solubilidad

Se preparó el quitosano obtenido con una batería de tubos con soluciones de agua, ácido sulfúrico al 10 %, n-butanol, ácido acético, ácido acético glacial, ácido oxálico, ácido cítrico, en cada tubo de ensayo se puso 4 mL de cada solvente y se añadió 300 mg de quitosano, se agitó de manera continua y se observó.

### 3.2.3 Activación del soporte e inmovilización de lipasa

Para activar el soporte se pesó 500 mg del quitosano obtenido en el laboratorio y luego fue tratado con 5 mL de solución al 30 % de glutaraldehído al 25 % y almacenado a 30 °C a 200 rpm por 24 horas; luego se realizó lavados sucesivos, se secó a 39 °C por 24 horas, luego se pesó. Posteriormente se adicionó 5 mL de solución de lipasa de concentración de 7,14 mg/mL en buffer fosfato a pH 7.2 manteniendo a 37 °C y bajo agitación constante por 24 horas, luego de realizar lavados sucesivos con buffer (se trasvasó en una probeta el volumen total de los lavados para cuantificarlo-ENI) y posteriormente se filtró, secó en la estufa a 39 °C y se procedió a realizar el pesado.

#### 3.2.3.1 Análisis de Inmovilización de Lipasa

##### 3.2.3.1.1 Actividad hidrolítica de lipasa inmovilizada sobre quitosano<sup>9,54</sup>

A la enzima inmovilizada sobre el quitosano obtenido en el laboratorio se le adicionó el aceite de olivo extra virgen diluido en n-hexano a pH 7.2, manteniéndolo a temperatura de 37 °C, 300 rpm y 30 minutos, posteriormente se decantó

separando la fase orgánica de la acuosa, se tomó la fase orgánica y se procedió a titular con NaOH 0.02 N usando como indicador fenolftaleína al 1 %, este procedimiento se realizó igualmente para lipasa libre y sin lipasa.

Para calcular la actividad de la enzima se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática (U/mg)} = \frac{\Delta V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}}}{\text{mg de EI}} \times 100$$

V: Volumen de NaOH

N: Normalidad del NaOH

EI: Peso en seco de la enzima inmovilizada (mg)

### 3.2.3.1.2 Cromatografía en Papel

Se preparó el sistema de solvente n-butanol: ácido acético: agua en proporción 4:1:5 v/v, se dejó reposando por 24 horas, posteriormente se vertió en la cubeta cromatográfica, se aplica el producto de la hidrólisis en banda en papel Whatman N° 3 y del estándar de ácido oleico, se dejó desarrollarse en la cámara de desarrollo por 18 horas, posteriormente se secó evitando el contacto a la luz, se reveló con rojo de metilo y luz de la lámpara ultravioleta.

## IV RESULTADOS

### 4.1 Rendimiento del quitosano obtenido

Tabla 5: Composición química de los caparazones de “cangrejo” *Cancer setosus* en base a 507,5 g de muestra seca y triturada

Procesos	Peso en seco (g en seco)	%
Desmineralización	432,69	85,23
Desproteización & Decoloración	10,15	2,03
Quitina	64,66	12,74

Tabla 6: Rendimiento de la desacetilación de la quitina de “cangrejo” *Cancer setosus*

	Quitosano (g en seco)	%
En relación a la quitina	48,55	75,08
En relación a la muestra total		9,56

### 4.2 Análisis del espectro infrarrojo del quitosano obtenido

El espectro de infrarrojo del quitosano obtenido en el laboratorio presentan las siguientes bandas:

Tabla 7: Espectro infrarrojo de la muestra de quitosano obtenido del “cangrejo”  
*Cancer setosus* en el laboratorio

Grupos funcionales	Bandas $\text{cm}^{-1}$
Oxidrilo	3402,12
Carbono-Hidrogeno	2880,42
Amida primaria	1623,86
Amino (2 <sup>da</sup> absorción)	1588,13
Amino (1 <sup>ra</sup> absorción)	1375,64
Puente oxígeno del anillo piranósico	1150,20

#### 4.3 Determinación del grado de desacetilación por espectroscopía infrarrojo

El quitosano obtenido en el laboratorio presenta una banda característica del hidroxilo a 3402,12, cuya absorbancia es 0.105 y la amida primaria a 1623,86 siendo su absorbancia de 0.046.

Sobre la base de las bandas obtenidas, se determinó el grado de desacetilación del quitosano obtenido en el laboratorio siguiendo el método propuesto por Domszy y Roberts<sup>17,28,48</sup> fue de:

$$DA = 100 - \left( \frac{\left[ \frac{0.046}{0.105} \right]}{1.33} \times 100 \right)$$

$$DA = 100 - 32,94$$

$$DA = 67,06 \%$$



Fig. 7 Espectro infrarrojo de la muestra de quitosano obtenido del “cangrejo” *Cancer setosus* obtenido en el laboratorio.

#### 4.4 Determinación de proteína en quitosano por método de Bradford

Para la determinación de proteína del quitosano obtenido en el laboratorio se realizó la curva de calibración usando como estándar albúmina sérica (BSA).

Tabla 8: Lectura de estándar albúmina sérica (BSA)

BSA µg/mL	Lectura corregida (Abs.)
1	0.05
2	0.063
4	0.121
6	0.187

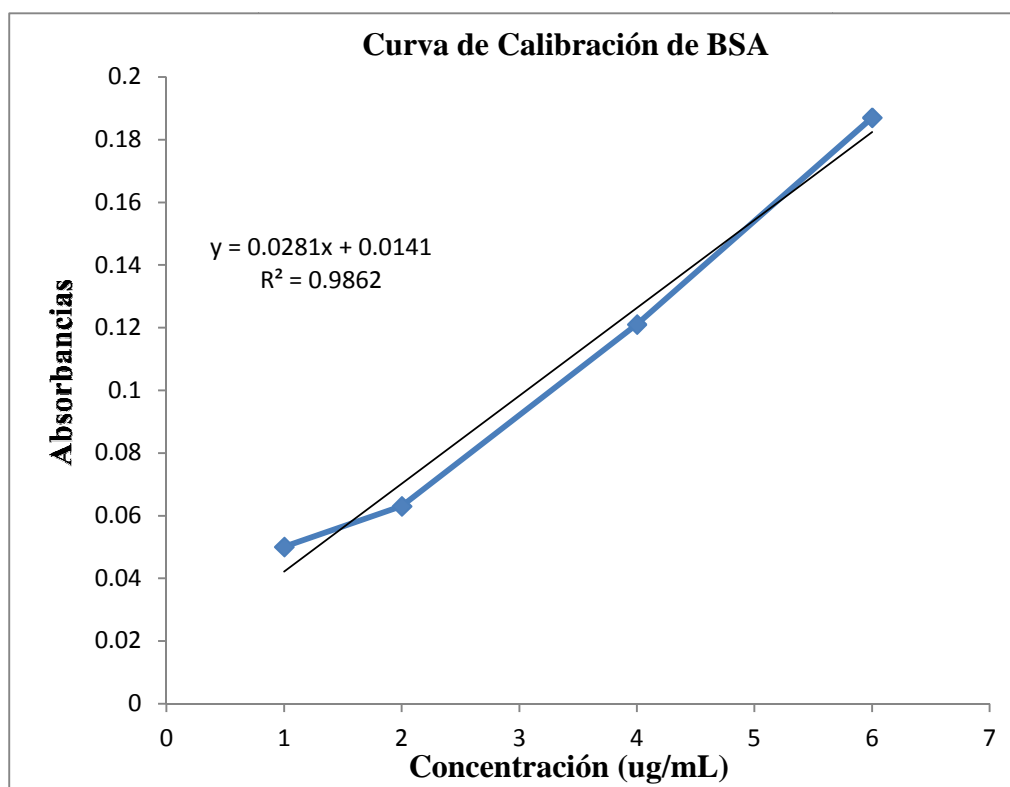


Fig. 8 Curva de calibración de estándar albúmina sérica (BSA)

De la muestra de quitosano obtenida del caparazón de “cangrejo” *Cancer setosus* en el laboratorio se obtuvo 5,445 µg de proteína por mililitro.

$$\begin{array}{l}
 5,445 \mu\text{g} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\
 X \text{ ----- } 100 \text{ mL} \quad \longrightarrow \quad X = 544,5 \mu\text{g} \times \frac{1\text{g}}{1000 \mu\text{g}} \\
 \\
 X = 0,5445 \text{ g}
 \end{array}$$

Es decir el porcentaje de proteína encontrado fue de 0,5445 %.

#### 4.5 Solubilidad

Tabla 9: Solubilidad de la muestra de quitosano obtenido del “cangrejo” *Cancer setosus* en distintos compuestos orgánicos

	Agua	Acido Sulfúrico al 10 %	n-Butanol	Acido Acético	Acido Acético glacial	Acido Oxálico	Acido Cítrico
Quitosano	-	-	-	++	+++	+	+

- Insoluble
- + Ligeramente soluble
- ++ Soluble
- +++ Muy soluble

#### 4.6 Cálculos de la concentración de EI y ENI expresado en proteína

Las soluciones de ENI y E fueron analizadas por medio de la determinación de proteínas por el método de Bradford, luego de separar el sobrenadante en viales se preparó una batería de tubos con buffer, BSA, lipasa y las soluciones sobrenadantes que se obtuvieron en los lavados.

Proteínas ligadas(**EI**) = Proteína inicial(**E**) – Proteína no inmovilizada(**ENI**)

Las lecturas de absorbancia fueron leídas a 595 nm para la lipasa inmovilizada sobre quitosano obtenido en el laboratorio y lipasa libre siendo los resultados los indicados en la tabla 10:

Tabla 10: Lectura de las absorbancias

	Absorbancia	Corrección
<b>Blanco</b>	0,0355	-
<b>BSA</b>	0,0586	0,0231
<b>Lipasa (E)</b>	0,40783	0,37233
<b>ENI</b>	0,10023	0,06473

Estándar diluido 1 en 50

##### 4.6.1 Cálculos de la concentración de proteína estándar diluida

Teóricamente se preparó BSA a concentración final de 0,1 mg/mL, el cual se diluyó a 1/50  $\mu$ L.

En la práctica la concentración de proteína real en solución del BSA fue:

$$[\text{BSA}] = 0,1 \text{ mg/ mL} \times 1/50 = 0,002 \text{ mg/mL}$$

#### 4.6.2 Cálculos de la concentración de E expresado en proteína

La concentración de E (lipasa) expresado en proteína fue de:

$$[E] = 0,37233/0,0231 \times 0,002 \text{ mg/mL} = 0,0322 \text{ mg/mL}$$

La concentración final de la enzima en solución (E) expresada en proteína fue de 0,0322 mg/mL, de la cual se usaron 5 mL para la inmovilización, correspondiéndole 0,1611 mg de la proteína de la enzima que se puso en contacto con el quitosano activado obtenido en el laboratorio.

#### 4.6.3 Cálculos de la concentración de ENI expresado en proteína

$$[ENI] = 0,06473/0,0231 \times 0,002 \text{ mg/mL} = 0,0056 \text{ mg/mL}$$

La concentración de la enzima no inmovilizada expresada en proteína (ENI) producto de los diversos lavados luego de la inmovilización de la lipasa sobre el quitosano activado obtenido en el laboratorio fue de 0,0056 mg/mL, el volumen acumulado de los lavados sucesivos fue 9,2 mL correspondiéndole 0,0515 mg de la proteína de la enzima que no fue inmovilizada.

#### 4.6.4 Cálculos de la concentración de EI expresada en proteína

La cantidad de enzima inmovilizada expresada en proteína sobre el quitosano activado obtenido en el laboratorio, se determinó por la diferencia de:

$$[EI] = 0,16118 - 0,0515598 = 0,1096 \text{ mg}$$

Donde el porcentaje de la enzima que fue inmovilizada expresada en proteína fue de:

$$\frac{0,1096 \text{ mg}}{0,1611 \text{ mg}} \times 100 = 68,01 \%$$

#### 4.7 Actividad enzimática de la lipasa libre e inmovilizada

La hidrólisis se realizó a pH 7.2, 39 °C y por 30 minutos obteniéndose los siguientes gastos de NaOH 0.02 N.

Tabla 11: Gastos de NaOH para lipasa libre e inmovilizada

	Gastos	Corrección
Blanco	0,925	-
E	4,8	3,875
*E <sub>1</sub>	6,295	5,37
*E <sub>2</sub>	5,189	4,264

\*E<sub>1</sub> gasto de NaOH del primer ciclo y E<sub>2</sub> gasto de NaOH del segundo ciclo, reciclando la misma enzima inmovilizada.

La actividad enzimática de la lipasa libre a los 30 minutos:

$$\text{Actividad de lipasa libre (U/mg)} = \frac{3,875 \times 0.02}{7,14} \times 100 = 1,0854 \text{ U/mg}$$

$$\text{Actividad específica de la lipasa libre (U/mg de proteína)} = \frac{1,08543}{0,1611} = 6,7342 \text{ U/mg de proteína}$$

Primer ciclo: la lipasa inmovilizada sobre el quitosano obtenido en el laboratorio a los 30 minutos:

El peso promedio en seco de la enzima fijada en el soporte fue de 29,36 mg.

$$\text{Actividad de lipasa inmovilizada 1}^{\text{er}} \text{ ciclo (U/mg)} = \frac{5,37 \times 0,02}{29,36} \times 100 = 0,3658 \text{ U/mg}$$

$$\text{Actividad específica de la lipasa inmovilizada (U/mg de proteína)} = \frac{0,3658038}{0,1096} = 3,337 \text{ U/mg de proteína}$$

Segundo ciclo, reciclado de la lipasa inmovilizada sobre el quitosano obtenido en el laboratorio a los 30 minutos:

$$\text{Actividad de lipasa inmovilizada 2}^{\text{do}} \text{ ciclo (U/mg)} = \frac{4,264 \times 0,02}{29,36} \times 100 = 0,2904 \text{ U/mg}$$

$$\text{Actividad específica de la lipasa inmovilizada (U/mg de proteína)} = \frac{0,290463}{0,1096} = 2,6497 \text{ U/mg de proteína}$$

Rendimiento del reciclado de la enzima inmovilizada sobre el quitosano activo:

$$\text{Rendimiento del reciclado de la enzima inmovilizada} = \frac{n^{\text{th}} \text{ ciclo}}{1^{\text{er}} \text{ ciclo}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento del reciclado de la lipasa inmovilizada} = \frac{0,2904}{0,3658} \times 100 = 79,404 \%$$

Rendimiento de la enzima inmovilizada sobre el quitosano activo:

$$\text{Rendimiento de la enzima inmovilizada} = \frac{\text{Actividad específica de la lipasa inmovilizada}}{\text{Actividad específica de la lipasa libre}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento de la lipasa inmovilizada} = \frac{3,337}{6,7342} \times 100 = 49,55 \%$$

#### 4.8 Cromatografía en papel

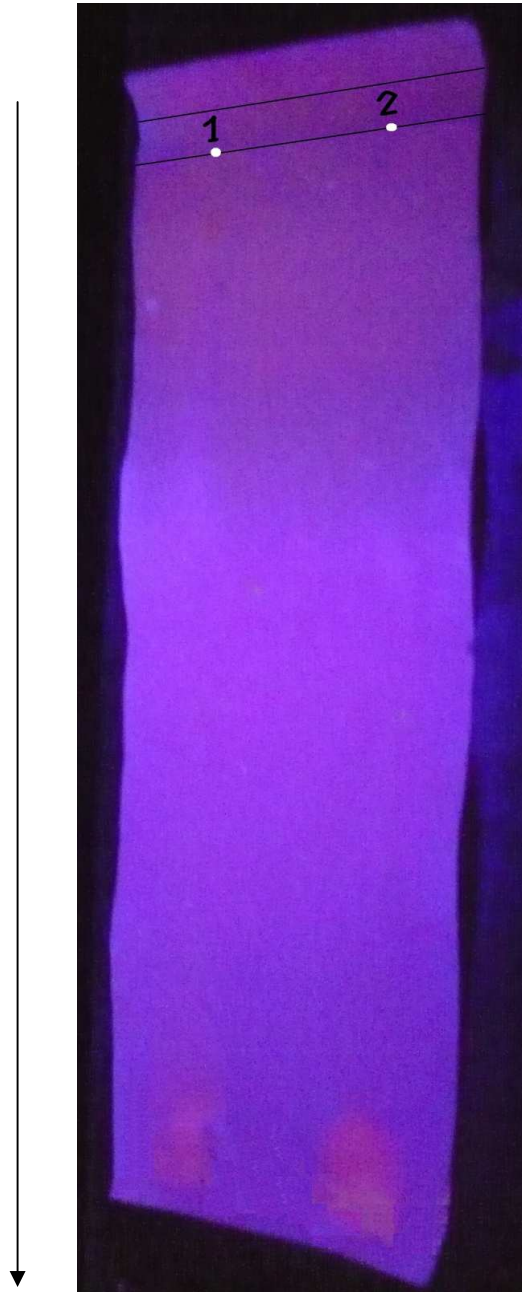


Fig. 9 Cromatograma en papel descendente del hidrolizado del aceite de oliva\* (1) y estándar de ácido oleico (2)

\* sobre la lipasa inmovilizada en el quitosano obtenido del “cangrejo” *Cancer setosus* liberando el ácido oleico que aparece como manchas violetas con el indicador rojo de metilo.



## V DISCUSIÓN

En el Perú existe una gran variedad de productos hidrobiológicos como “cangrejo”, “langostino” y “camarón”, de los cuales se puede extraer la quitina; sin embargo, continuamente son desechados. Para el aislamiento de la quitina en el laboratorio se utilizó el método químico modificado usando autoclave en la desacetilación obteniendo un rendimiento de 12,74 % de quitina con respecto al peso seco de los caparazones de “cangrejo” de la variedad *Cancer setosus* en polvo (Tabla 5), mayor que en el “langostino” *Penaus spp.* 6,2 % y caparazones de *Callinectes sapidus* 7,3 % pero menor que los “cangrejos” de la variedad *Paralithodes camtschaticus* y *Chionectes opilio* (15,5 y 26,65 %) <sup>36</sup>; por lo tanto, el método químico modificado permitió la remoción eficiente de las sustancias químicas desechables a fin de obtener la quitina y posteriormente el quitosano caracterizado principalmente por espectroscopía infrarroja (Fig. 7).

El método químico modificado usando el autoclave evidenció un alto rendimiento en la obtención del quitosano siendo de 9,56 % en comparación al método químico tradicional 7,02 % <sup>55</sup>. Al usar el autoclave se controla mejor la temperatura y tiempo, protegiendo mejor el quitosano obtenido a fin de disminuir la obtención de polimorfismo <sup>36,28</sup>.

La caracterización del quitosano empleando espectroscopía infrarrojo se basa en la interpretación de las bandas a  $1623,86\text{ cm}^{-1}$ , que se debe a la presencia de la amida primaria, la banda del oxidrilo presente en  $3402,12\text{ cm}^{-1}$  y el enlace puente de oxígeno del anillo piranósico en  $1150,2\text{ cm}^{-1}$  <sup>10,21,25,28,49</sup>.

El quitosano obtenido a partir del “cangrejo” *Cancer setosus* por el método químico modificado presenta un grado de desacetilización por el método de espectroscopía infrarroja de 67,06 % y un contenido de proteína de 0,5445 % por el método de Bradford. Estos resultados indican que el método usado permite la obtención de un producto altamente desacetilado y desproteínizado. El método espectrofotométrico IR para la cuantificación del porcentaje de desacetilación es más sensible que el método potenciométrico.

De acuerdo a los datos obtenidos, nuestra muestra de quitosano es insoluble en agua, alcohol y ácido sulfúrico al 10 %; sin embargo, es soluble en ácido oxálico, ácido cítrico, ácido acético y ácido acético glacial, esto debido a la protonación de los grupos aminos presentes en el quitosano<sup>26</sup>.

El porcentaje de lipasa inmovilizada sobre el quitosano activado con glutaraldehído (expresado en proteína) fue de 68,01 %, si consideramos que procesos con rendimiento mayores a 40 % son óptimos, se demuestra que la metodología empleada para la inmovilización covalente según el esquema de la formación de la Base de Schiff fue efectiva<sup>11,36,51</sup>.

La actividad enzimática se estableció midiendo ácido oleico liberado, el cual fue titulado con NaOH 0.02 N, obteniéndose una actividad enzimática de la lipasa inmovilizada de 0,3658 y 0,2904 U/mg en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> ciclo y con actividad específica de la lipasa inmovilizada de 3,337 y 2,6497 U/mg de proteína en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> ciclo mientras que la actividad enzimática de la lipasa libre (no inmovilizada) fue de 1,0854 U/mg con actividad específica de la lipasa libre de 6,7342 U/mg de proteína, con rendimiento de inmovilización de 49,55 % y rendimiento de reciclado de 79,40 %. Al comparar estos resultados con la actividad de la celulasa que presenta un rendimiento de 51 % y rendimiento de reciclado de 54 % y para lipasa de *Rhizopus oryzae* un rendimiento de reciclado de 67 %<sup>4</sup>, muestra que los objetivos de la presente tesis se cumplieron satisfactoriamente<sup>56</sup>.

La hidrólisis del aceite de olivo extra virgen comercial presenta múltiples ácidos grasos, siendo el de mayor proporción el ácido oleico con 55-83 % (anexo 2). En la cromatografía en papel con un sistema descendente se evidenció que el ácido oleico obtenido de la hidrólisis del aceite de oliva extra virgen sobre la lipasa inmovilizada en quitosano obtenido en el laboratorio, sirvió como indicador para la reacción enzimática, la cual se evidencia por la presencia de la mancha con igual Rf que el estándar de ácido oleico.

## VI CONCLUSIONES

Del estudio de la inmovilización enzimática de la lipasa mediante el agente quitosano obtenido del exoesqueleto del “cangrejo” *Cancer setosus* se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se obtuvo quitosano a partir de quitina del “cangrejo” *Cancer setosus* por el método químico modificado usando el autoclave.
2. El quitosano fue caracterizado por espectroscopía infrarroja, el grado de desacetilación fue de 67,06 % y el porcentaje de proteína fue de 0,5445 % usando el método de Bradford por espectrofotometría ultravioleta-visible.
3. La obtención del quitosano a partir del “cangrejo” *Cancer setosus* por medio del método químico modificado usando el autoclave permitió obtener un producto con características fisicoquímicas aceptables (IR, DA, Solubilidad).
4. El método de inmovilización usando como agente ligante el glutaraldehído produce una enzima inmovilizada, formando un enlace covalente a los extremos del glutaraldehído, el enlace covalente se le denomina base de Schiff.
5. La actividad específica de la lipasa inmovilizada fue de 3,337 y 2,6497 U/mg de proteína en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> ciclo mientras que la actividad específica de la lipasa libre (no inmovilizada) fue de 6,7342 U/mg de proteína. El porcentaje de la enzima inmovilizada expresada en proteína fue de 68,01 % y el rendimiento del proceso de inmovilización de la lipasa sobre el quitosano obtenido fue de 49,55 % con un rendimiento de reciclado de 79,40 %.

## **VII RECOMENDACIONES**

Promover estudios sobre desechos marinos en productos con actividad biológica.

Que en futuros trabajos se analicen variables como: temperatura, pH, concentración de solución enzimática a inmovilizar, medios de activación de la enzima y tiempo de acondicionamiento que permitan el adecuado desempeño de la enzima.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cifuentes A, Rojas D. *Inmovilización de lipasa *Cándida rugosa* en soporte de quitosano*. Tesis para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Ciudad Manizales; 2005.
2. Illanes A, Barberis S. *Catálisis enzimática en fase orgánica, Biotecnología de Enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Ciudad Valparaíso; 1994, Monografía 35. Serie Biología. pp. 225-254.
3. García M. *Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W aplicación a formulaciones detergentes*. Tesis para optar por el grado de doctor en Ingeniería Química. Universidad de Granada, Ciudad Granada; 2005.
4. Dong L, Cheol P, Jong Y, Seung K. *Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method*. Journal Industrial Engineering Chemical (Seoul). 2006; 12(5): 777-782.
5. Ramachandra V, Bhat J, Muriswaran P. *Hydrolysis of Oils by using immobilized lipase enzyme: A review*. Biotechnology & Bioprocess Enginery. 2002; 7(2): 57-66.
6. Alarcon M. *Producción de la lipasa LIP2 de *Cándida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: Caracterización y aplicación en reacciones de síntesis*. Tesis para optar al grado de doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma de Barcelona, Ciudad Barcelona; 2008.
7. Machado B. *Preparación y caracterización de lipasas inmovilizadas para utilización en biocatálisis*. Tesis para optar grado académico de Doctor. Universidad Federal de Paraná, Ciudad Paraná; 2008.
8. Minovska V, Winkelhausen E, Kuzmanova S. *Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis*. Journal of the Serbian Chemical Society (Macedonia). 2005; 70(4): 609-624.
9. Öztürk B. *Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. Thesis requirements for the degree of Master of Science. Izmir Institute of Technology, City Turkey; 2001.

10. Orozco Y. *Obtención de quitosano reticulado con propiedades para la inmovilización de celulasas y pectinasas y su aplicación en continuo a escala de laboratorio*. Tesis para obtener el grado de máster en Ciencias Químicas. Universidad del Valle, Ciudad Santiago de Cali; 2007.
11. Huertas M. *Inmovilización de termolisina en quitina para la síntesis enzimática de aspartamo; Determinación de las condiciones óptimas*. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciudad Lima; 2003.
12. Krajewska B. *Application of chitin – and chitosan – based materials for enzyme immobilizations: a review*. Enzyme and Microbial Technology. 2004; 35: 126-139.
13. Arroyo M. *Inmovilización de Enzimas, Fundamentos, Métodos y Aplicaciones*. Ars Pharmaceutica. 1998; 39(2):23-39.
14. Awang R, Rafai M. *Immobilization of lipase from Candida rugosa on Palm-based polyurethane foam as a support material*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2007; 3(3): 163-166.
15. Wingard, L. *Enzyme Engineering*. Interscience Publishers, New York. 1972.
16. Cetina D. *Estudio de la glicerólisis de trioleína para la producción de monoglicéridos vía enzimática con lipasas de Candida rugosa y de Mucoa Miehei*. Tesis para optar al título de Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Bogotá; 2010.
17. Katalinich M. *Characterization of chitosan films for cell culture applications*. Thesis submitted in Partial Fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in Chemical Engineering. University of Maine, City Orono (E.E.U.U.); 2001.
18. Wiseman A. *Manual de biotecnología de las enzimas*. Editorial Acribia S.A. Ciudad Madrid. 2<sup>da</sup> Edición. 1991, Pág. 139-193.
19. Tanaka A, Kawamoto T. *Immobilized enzymes in organic solvents, Protein Immobilization, fundamentals and applications*. Taylor R. Eds. & Marcel Dekker Inc. City New York. 1991, Pág. 183-209.

20. Lee A. *A study on the characteristics of chitosan as an immobilization matrix for biosensors*. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Universiti Sains Malaysia, City Penang; 2007.
21. Sánchez A, Sibaja M, Vega-Baudrit J, Madrigal S. *Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas*. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2007; 8(4): 241-267.
22. Lárez C. *Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos*. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2003; 4(2): 91-109.
23. De Santiago D. *Estudio del efecto de la adición inductores sobre la producción de quitina desacetilasas de hongos fitopágenos*. Tesis para obtener el grado de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México; 2011.
24. Parada L, Crespín G, Miranda R, Katime I. *Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica*. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2004; 5(1): 1-16.
25. Valenzuela C. *Obtención de quitosano de pota (Dosidicus gigas) empleando altas dosis de radiación gamma*. Tesis para optar el grado de título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Ciudad Lima; 2006.
26. Aranaz I, Mengibar M, Harris R. *Functional Characterization of chitin and chitosan*. Current Chemical Biology. 2009; 3(2): 203-230.
27. Lárez C. *Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos*. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2003; 4(2): 91-109.
28. Fernandez-Kim SO. *Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols*. Thesis requirements for the degree of Master of Science. Louisiana State University in Shreveport and Mechanical College, City Louisiana; 2004.
29. Mathur NK, Narang CK. *Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals*, Journal of Chemical Education. 1990; 67(11): 938-942.



30. Canella KNC, Balaban R. *Caracterización de Quitosana por cromatografía de permeación en Gel-influencia do Método de Preparación e do Solvente*. Química Nova. 2001; 24(1): 13-17.
31. Bough W. *Shellfish components could represent future food ingredients*. University of Georgia; 1977.
32. Merzendorfer H. Zimoch L. *Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin syntheses and chitinases*. The Journal of Experimental Biology. 2003; 206:4393-4412.
33. Alvarado J. Arancibia M. Almeida A. *Permeabilidad al vapor de agua de películas biodegradables de quitosano obtenido de caparzones de camarón*. Revista ciencia y tecnología. 2005; 4(2): 39-47.
34. Lárez C. *Quitina y Quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro*. Avances en Química. 2006; 1(2): 15-21.
35. Shirai C. *Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana*. Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México; 1999.
36. Peniche C. *Estudios sobre quitina y quitosano. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias*. Universidad de La Habana, Ciudad La Habana; 2006.
37. Mahmoud N, Ghaly A. *Unconventional Approach for demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitin production*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2007; 3(1): 1-9.
38. Araya A, Meneses L. *Influencia de algunos ácidos orgánicos sobre las propiedades físico-químicas de Películas de Quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo*. Revista Tecnológica ESPOL-RTE (Ecuador). 2010; 23(1): 143-148.
39. Soro L. *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 para optar el grado de Ingeniero de Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral (Ecuador); 2007.
40. López M. *Obtención y caracterización de quitosanos modificados: ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en*

- la industria alimentaria*. Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Madrid; 2012.
41. Vasquez J, Vidal M. *Caracterización y alternativa de uso de una película biodegradable de quitosano a partir de la extracción de quitina de langostino (Pleuroncodes planipes) para la industria de los alimentos*. Tesis de grado para optar Ingeniero de Alimentos y Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador, Ciudad San Salvador; 2011.
  42. Palpandi C, Shanmugam V, Shanmugam A. *Extraction of chitin and chitosan from Shell and Operculum of Mangrove Gastropod Nerita (Dostia) crepidularia Lamarck*. International Journal of Medicine and Medical Science (India). 2009; 1(5):198-205.
  43. Harish K, Tharanathan R. *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential*. Trends in Food Science & Technology. 2007; 18: 117-131.
  44. Salazar P. *Proyecto Obtención de quitina a partir de residuos de camarón, Título del proyecto Aprovechamiento de desechos de camaron para recuperación de productos con alto valor agregado*. Universidad Autonoma Metropolitana, Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas S-130, Ciudad de México; 1999.
  45. Khanafari A, Marandi R. *Recovery of chitin and chitosan from Shrimp waste by chemical and microbial methods*. Journal Environment Salud Science Engineery. 2008; 5(1): 19-24.
  46. Burrows F, Louime C, Abazinge M, Onokpise O. *Extraction and evaluation from crab exoskeleton as a seed fungicide and plant growth enhancer*. Journal Agriculture & Environment science. 2007; 2(2): 103-111.
  47. Exposito R. *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada en fármacos*. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Madrid; 2010.

48. Maza I, Jacinto C. *Caracterización fisicoquímica de quitosano para su aplicación como biosorbente de metales*. Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI (Lima). 2007; 11(1): 1-5.
49. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F, Argüelles-Monal W, Desbrieres J, Rinaudo M. *An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*. Polymer. 2001; 42: 3569-3580.
50. Pereira E, Zanin G, Castro H. *Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions*. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2003; 20(4): 343-355.
51. Chang R, Shaw J. *The immobilization of Candida Cylindracea lipase on PVC, Chitin and agarose*. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 1987; 28: 33-42.
52. Nasratun M, Said H. *Immobilization of lipase from Candida rugosa on Chitosan Beads for transesterification reaction*. American Journal of applied Science. 2009; 6(9):1653-1657.
53. Machado A. *Preparação e caracterização de lípases imobilizadas para utilização em biocatalise*. Tese como requisito a obtenção do grau de doutor. Universidad Federal de Paraná, Ciudad Paraná; 2008.
54. Li Y, Gao F, Wei W. *Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2010; 66: 182-189.
55. Baltodano L, Yaipen J, Fuertes C. *Obtención, Caracterización y diseño de una forma farmacéutica semisólida (ungüento) a base de quitosano con efecto cicatrizante*. Encuentro Científico Internacional ECI. 2009, 6(2): 77-85.
56. Romo S, Camacho C, Gómez L, Villalonga R. *Inmovilización de celulasa sobre una matriz de quitina-quitosana*. Revista Cubana de Química. 2012; 24(1): 57-64.

## **IX ANEXOS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Clasificación de los métodos de inmovilización de enzimas según la solubilidad de la enzima.	12
Tabla 2: Relación de aplicaciones y usos de quitina / quitosano.	20
Tabla 3: Derivación potencial multifacético de quitina / quitosano.	24
Tabla 4: Determinación de proteínas en el BSA y quitosano obtenido en el laboratorio	33
Tabla 5: Composición química de los caparazones de “cangrejo” <i>Cancer setosus</i> en base a 507,5 g de muestra seca y triturada	36
Tabla 6: Rendimiento de la desacetilación de la quitina de “cangrejo” <i>Cancer setosus</i>	36
Tabla 7: Espectro infrarrojo de la muestra de quitosano obtenido del “cangrejo” <i>Cancer setosus</i> en el laboratorio	37
Tabla 8: Lectura de estándar albúmina sérica (BSA)	39
Tabla 9: Solubilidad de la muestra de quitosano obtenido del “cangrejo” <i>Cancer setosus</i> en distintos compuestos orgánicos	40
Tabla 10: Lectura de las absorbancias	41
Tabla 11: Gastos de NaOH para lipasa libre e inmovilizada	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Fig. 1. La reacción de hidrólisis.	10
Fig. 2. La reacción global de transesterificación.	10
Fig. 3. Estructura química de quitosano parcialmente acetilado.	18
Fig. 4. Mecanismo de reacción de desacetilación de la quitina para obtener quitosano mediante hidrólisis alcalina.	23
Fig. 5. Estructura primaria de (a) Celulosa, (b) Quitina y (c) Quitosano.	25
Fig. 6. Mecanismo de reacción del glutaraldehído con el soporte y la enzima en medio básico, se forma una doble base de Schiff.	29
Fig. 7. Espectro infrarrojo de la muestra de quitosano obtenido del "cangrejo" <i>Cancer setosus</i> obtenido en el laboratorio.	38
Fig. 8. Curva de calibración de estándar albúmina sérica (BSA)	39
Fig. 9. Cromatograma en papel descendente del hidrolizado del aceite de oliva* (1) y estándar de ácido oleico (2)	45
Fig. 10 Secado de la muestra de "cangrejo" <i>Cancer setosus</i>	60
Fig. 11 Desmineralizado de la muestra de "cangrejo" <i>Cancer setosus</i>	60
Fig. 12 Desproteínizado de la muestra de "cangrejo" <i>Cancer setosus</i>	61
Fig. 13 Decoloración de la muestra de "cangrejo" <i>Cancer setosus</i>	61
Fig. 14 Muestras de quitosano obtenido a partir del "cangrejo" <i>Cancer setosus</i> , después de la desacetilización.	62
Fig. 15 Solubilidad de quitosano obtenido a partir del "cangrejo" <i>Cancer setosus</i>	62

## Anexo 1

### Fotos del proceso de obtención de la muestra de quitosano a partir del “cangrejo” *Cancer setosus*



Fig. 10 Secado de la muestra de “cangrejo” *Cancer setosus*



Fig. 11 Desmineralizado de la muestra de “cangrejo” *Cancer setosus*





Fig. 12 Desproteinizado de la muestra de “cangrejo” *Cancer setosus*



Fig. 13 Decoloración de la muestra de “cangrejo” *Cancer setosus*





Fig. 14 Muestras de quitosano obtenido a partir del “cangrejo” *Cancer setosus*, después de la desacetilización

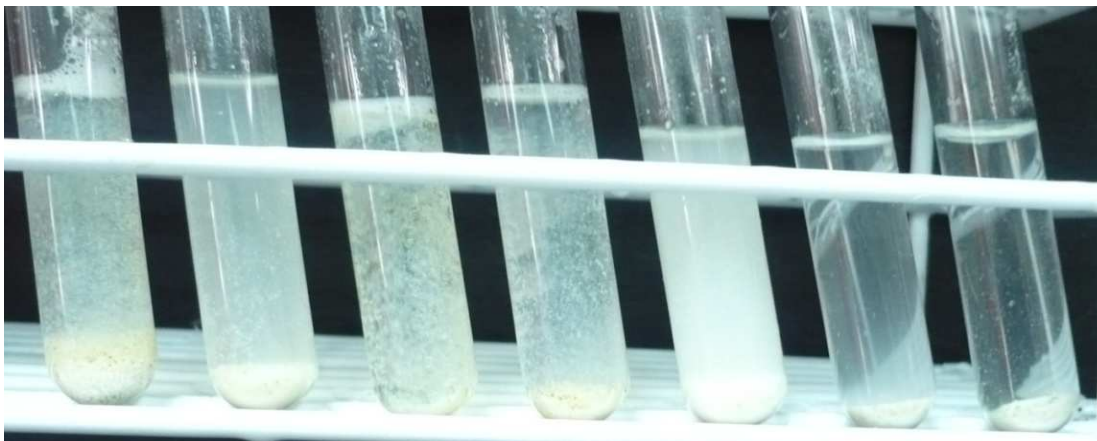


Fig. 15 Solubilidad de quitosano obtenido a partir del “cangrejo” *Cancer setosus*

## Anexo 2

### FICHA TÉCNICA : ACEITE DE OLIVA VIRGEN, EXTRA

#### CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BIEN

---

Denominación del bien	: ACEITE DE OLIVA VIRGEN, EXTRA
Denominación técnica	: ACEITE DE OLIVA VIRGEN, EXTRA
Segmento 50/ Familia 15/ Clase 15 ONU	:
Nombre del Bien en el Catalogo ONU	:
Código ONU	:
Unidad de medida	: Litro (L)
Anexos adjuntos	:
Descripción General	: Se denomina "Aceite de Oliva Extra Virgen" al obtenido mediante la trituración del fruto de variedades determinadas de olivo cultivado, sano, cogido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal, que sometido a procesos exclusivamente mecánicos, se extraiga un zumo natural. En mayor proporción esta compuesto por una mezcla de diversos monoglicéridos y poliglicéridos, constituidos por la unión de glicerina y ácidos grasos saturados e insaturados y un pequeño porcentaje de componentes secundarios que son saponificables.

#### CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FICHA

---

Versión	:
Estado	:
Periodo para recibir sugerencias	:
Fecha de inscripción en el SEACE	:

#### CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DEL BIEN

---

El aceite vegetal comestible deberá cumplir todas y cada una de las siguientes características:

- Color: Color entre amarillo pálido.
- Olor: característico de la aceituna fresca.
- Sabor: característico de la aceituna fresca, amarga y picante

### Características químicas

- Acidez % < 0.8
- Índice de Peróxidos mEq O<sub>2</sub>/kg < 20
- K<sub>270</sub> < 0.10

### Dosis máxima por contaminantes

Contenido de jabón: 10 ppm

Hierro (Fe) : 1.5 ppm

Cobre (Cu) : 0.1 ppm

Plomo (Pb) : 0.1 ppm

Arsénico (As) : 0.1 ppm

Niquel (Ni) : 1.0 ppm

### Requisitos de pureza

El aceite de oliva debe presentar los siguientes requisitos de pureza;

1. Composición de ácidos grasos (% m/m de esteres metílicos)		
Acido mirístico	Menor e igual a 0,05	
Acido palmítico	7,50 - 20,00	
Acido palmítoleico	0,30-350	
Acido heptadecanoico	Menor e igual a 0,30	
Acido heptadecenoico	Menor e igual a 0,30	
Acido esteárico	0,50-5,00	
Acido oleico	55,00 - 83,00	
Acido linoleico	3,50 - 21,00	
Acido linolenico	Menor e igual a 1,00	
Acido araquídico	Menor e igual 0,60	

Acido gadoleico (eiosenoico)	Menor e igual a 0,40	
Acido behénico	Menor e igual a 0,20 <sup>(1)</sup>	
Acido lignocérico	Menor e igual a 0,20	
<b>2. Contenidos de ácidos grasos trans (% de los acidos grasos trans)</b>		
	C18:1T %	C18:2T + C18:3T %
Aceite de oliva virgen extra	Menor e igual a 0,05	Menor e igual a 0,05
<b>3. Composición desmetilesteroles (% de esteroides totales)</b>		
Colesterol	Menor e igual a 0,50	
Brassicasterol	Menor e igual a 0,10 <sup>(2)</sup>	
Campesterol	Menor e igual a 4,50	
Delta -7-estigmasterol	Menor e igual a 0,50	
Betasitosterol + delta-5-acenasterol + delta-5-23-estigmastadienol + colesterol + sistostanol + delta 5-24-estigmastadienol	Mayor e igual a 93,00	
<b>4. Contenido de esteroides totales (mg/kg)</b>		
Aceite de oliva virgen extra	Mayor e igual a 1 000	
<b>5. Contenido de eritrodio y uvaol (% de los esteroides totales)</b>		
Aceite de oliva virgen extra	Menor e igual a 4,50	
<b>6. Contenido en ceras C40 + C42 + C44 +C46 (mg/kg)</b>		
Aceite de oliva virgen extra	Menor e igual a 250	
<b>7. Diferencia máxima entre el contenido real y el contenido teórico en triglicéridos con ECN42</b>		
Aceite de oliva virgen extra	0,50	
<b>8. Contenido en estigmastadienos (mg/kg)</b>		

Aceite de oliva virgen extra	Menor o igual a 0,15
<b>9. Contenido de ácidos grasos saturados en posición 2 en triglicéridos</b>	
Aceite de oliva virgen extra	Menor o igual a 1,50
<b>10. Materia Insaponificable (g/kg)</b>	
Aceite de oliva virgen extra	Menor o igual a 15

Categoría	Acidez libre % m/m expresada en ácido oleico	Contenido en agua y en materiales volátiles (% m/m)	Índice de peróxidos Meq. de oxígeno de los peróxidos por kg de aceite	Absorbancia en UV ( $K^{1\%}_{1cm}$ )			Trazas metálicas mg/kg	
				232 nm	270 nm	$\wedge K$	Hierro	Cobre
Aceite de Oliva Virgen extra	≤ a 1	≤ a 0,1	≤ a 20	≤ 2,50	≤ a 0,22	≤ a 0,01	≤ a 3,0	≤ a 0,1

#### VALOR NUTRICIONAL:

La información nutricional aprox. por cada 100 g. de producto es la siguiente:

- Valor energético 900 Kcal
- Proteínas 0 g.
- Hidratos de carbono 0 g.
- Grasas 100 g. de los cuales.
- Saturadas 10 g.
- Monoinsaturadas 75 g.
- Polinsaturadas 9 g.
- Colesterol 0 g.
- Vitamina E 20 mg (200 % CDR).

#### REQUISITOS

Registro Sanitario emitido por DIGESA

## CERTIFICACION

Obligatoria

## OTRAS ESPECIFICACIONES

### Presentación

Presentación	Peso/ unid.	Caja/ unid.
Botella de Polietileno	4L.	4
Galón de Polietileno	3,78L.	4
Botella de vidrio / Polietileno	1L.	12
Botella de vidrio / Polietileno	500 mL	24
Botella de vidrio	200 mL	24

### Embalaje

Se deben usar cajas de cartón corrugado o envolturas de algún otro material apropiado, que tengan la debida resistencia conmensurable con la calidad existente en el mercado para que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez faciliten su manipulación en el almacenamiento y distribución de los mismos, sin exponer a las personas que los manipulen.

### Rotulado

Nombre o razón social del productor, envasador o vendedor; en el caso de productos importados nombre o razón social importador

Fecha de Producción:

Fecha de Vencimiento:

Numero de Lote:

Registro Sanitario:

Lugar de Origen:

Ingredientes:

Información Nutricional:

### Almacenamiento

El producto terminado debe almacenarse en locales que reúnan los requisitos sanitarios que señala el Ministerio de Salud

*Fuente: Sociedad Nacional de Industria, Lima-Perú.*