



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Química

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS  
DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE  
HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO**

**Gabriela Fernanda López Bautista**

Asesorado por la Inga. Mercedes Esther Roquel Chávez

Guatemala, julio de 2022



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS  
DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE  
HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
POR

**GABRIELA FERNANDA LÓPEZ BAUTISTA**  
ASESORADO POR LA INGA. MERCEDES ESTHER ROQUEL CHÁVEZ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**INGENIERA QUÍMICA**

GUATEMALA, JULIO DE 2022



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA**

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Kevin Vladimir Armando Cruz Lorente
VOCAL V	Br. Fernando José Paz González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
EXAMINADORA	Inga. Cinthya Patricia Ortiz Quiroa
EXAMINADORA	Inga. Mercedes Esther Roquel Chávez
EXAMINADOR	Ing. Adolfo Narciso Gramajo Antonio
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez



## HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

### **EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 6 de junio de 2021.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gabriela Fernández', with a circular stamp or mark above the end of the signature.

**Gabriela Fernanda López Bautista**



Guatemala 15 de febrero de 2022

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
DIRECTOR  
Escuela Ingeniería Química  
Presente.

Estimado Ingeniero Williams Álvarez:

Le saludo cordialmente, deseándole éxitos en sus actividades. Por medio de la presente hago constar que he revisado y aprobado el Informe Final del trabajo de graduación titulado: "EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO", elaborado por el estudiante de la carrera de Ingeniería Química, Gabriela Fernanda López Bautista quien se identifica con el registro académico 201602493 y con el CUI 3304 78710 12 02.

Agradeciendo la atención a la presente, me suscribo de usted,

Atentamente,



Mercedes Esther Raquel Chávez  
Mercedes Esther Raquel Chávez  
Colegiado No. 1451  
ASESORA  
Ingeniera Química  
Colegiado activo no. 1451





Guatemala, 29 de abril de 2022.  
Ref. EIQ.TG-IF.011.2022.

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo **017-2021**, le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

**INFORME FINAL**

Solicitado por el estudiante universitario: **Gabriela Fernanda López Bautista**.  
Identificado con número de carné: **3304787101202**.  
Identificado con registro académico: **201602493**.  
Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química**.  
En la modalidad: **Informe Final, Seminario de Investigación**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS DE EXOSQUELETO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

**Mercedes Esther Roquel Chávez, profesional de la Ingeniería Química**

Habiendo encontrado el referido trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

“ID Y ENSEÑAR A TODOS”

Licda. Ingrid Lorena Benítez P.  
Química  
Maestría Ciencia y Tecnología  
del Medio Ambiente  
Colegiado No. 19791

Ingrid Lorena Benítez P.  
Profesional de la Ingeniería Química  
COORDINADOR DE TERNA  
Tribunal de Revisión  
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo





LNG.DIRECTOR.128.EIQ.2022

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor, el visto bueno del Coordinador de Área y aprobación del área de lingüística del trabajo de graduación titulado: **EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN (Litopenaeus vannamei) MEDIANTE HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO**, presentado por: **Gabriela Fernanda López Bautista**, procedo con el Aval del mismo, ya que cumple con los requisitos normados por la Facultad de Ingeniería.

*“Id y Enseñad a Todos”*

  
Ing. Williams G. Alvarez, M.Sc., M.U.I.E.  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química

  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DIRECCIÓN  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

128.EIQ.2022

Guatemala, junio de 2022.



Decanato  
Facultad de Ingeniería  
24189101- 24189102  
secretariadecanato@ingenieria.usac.edu.gt

LNG.DECANATO.OI.447.2022

La Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN (Litopenaeus vannamei) MEDIANTE HIDRÓLISIS PROTEICA ENZIMÁTICA A NIVEL LABORATORIO**, presentado por: **Gabriela Fernanda López Bautista**, después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Inga. Aurelia Ariabela Cordova Estrada

Decana

Guatemala, julio de 2022

AACE/gaoc



## **ACTO QUE DEDICO A:**

<b>Dios</b>	Por darme la vida, sabiduría, y guía a lo largo de la carrera, permitiendo que cumpla esta meta.
<b>Mis padres</b>	Fabiola Bautista y Aramis López. Por ser los pilares en mi vida, con mucho amor les dedico mi esfuerzo en reconocimiento a todo el sacrificio que han hecho por mí.
<b>Mi esposo</b>	Mario Fuentes. Por creer en mí, brindándome su apoyo y amor incondicional, por ser mi compañía y aliento cada día.
<b>Mis hermanos</b>	Cristian López y Emilio López. Por estar siempre que los necesito y alentarme a cumplir todas mis metas y sueños.
<b>Mis abuelos</b>	Por sus consejos, atenciones y cariño, en especial a mi abuela Roselina Aguilar por su amor incondicional.
<b>Mi familia</b>	Tíos, primos y familia que a pesar de la distancia se preocupan y me motivan a ser una mejor persona día a día.

**Familia Fuentes López**

A mis suegros y cuñada por todo su apoyo y cariño que Dios los colme de bendiciones.

**Mis amigos**

De la universidad y de San Marcos por impulsarme y aligerar la carga a lo largo de la carrera. Gracias por su amistad.

**Mis catedráticos**

Por su conocimiento, paciencia y educación que permitió formarme como profesional.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

<b>Universidad de San Carlos de Guatemala</b>	Por brindarme tantas oportunidades y enriquecerme en conocimiento.
<b>Facultad de Ingeniería</b>	Por darme las herramientas y conocimientos necesarios para culminar mi carrera.
<b>Mis amigos de la Facultad</b>	Sara Boche, Karla González, Carlos Cruz, William López, Luis Díaz y María Alejandra de León.
<b>Mi asesora</b>	Inga. Mercedes Roquel. Por sus enseñanzas, colaboración y tiempo dedicado en la asesoría de esta investigación
<b>Mi revisora</b>	Licda. Ingrid Benítez. Por su apoyo y tiempo dedicado en la revisión de esta investigación.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	V
LISTA DE SÍMBOLOS .....	VII
GLOSARIO .....	IX
RESUMEN .....	XI
OBJETIVOS.....	XIII
HIPÓTESIS.....	XV
INTRODUCCIÓN .....	XVII
1. MARCO CONCEPTUAL.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación .....	2
1.3. Determinación del problema.....	4
1.3.1. Definición .....	4
1.3.2. Delimitación temática.....	4
1.3.3. Delimitación temporal .....	4
1.3.4. Delimitación espacial .....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Quitina .....	7
2.2. Quitosano .....	7
2.3. Propiedades de la quitina .....	8
2.4. Tipos de Quitina .....	9
2.5. Métodos de obtención de quitina.....	10
2.5.1. Desproteínización .....	10
2.5.2. Desmineralización .....	11

2.5.3.	Decoloración .....	11
2.6.	Desproteínización por el método enzimático.....	13
2.7.	Enzima papaína .....	13
2.8.	Código enzimático de la papaína EC 3.4.22.2 .....	14
2.9.	Principales aplicaciones de la quitina.....	14
2.9.1.	Industria Alimentaria.....	14
2.9.2.	Medicina .....	15
2.9.3.	Farmacia .....	15
2.9.4.	Agricultura .....	15
3.	METODOLOGÍA .....	17
3.1.	Variables .....	17
3.2.	Recursos humanos disponibles .....	18
3.3.	Recursos materiales disponibles.....	18
3.3.1.	Materia prima .....	18
3.3.2.	Reactivos.....	18
3.3.3.	Instrumentos de medición .....	18
3.3.4.	Equipo adicional .....	19
3.3.5.	Cristalería y materiales.....	19
3.3.6.	Equipo de protección personal.....	19
3.4.	Técnica Cuantitativa.....	20
3.5.	Recolección y ordenamiento de la información .....	20
3.6.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	21
3.7.	Análisis estadístico.....	23
3.8.	Plan de análisis de los resultados .....	27
3.8.1.	Diseño factorial al azar .....	27
3.8.2.	Métodos y modelos de los datos según tipo de variables.....	28

4.	RESULTADOS .....	31
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
6.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	37
	CONCLUSIONES .....	41
	RECOMENDACIONES.....	43
	BIBLIOGRAFÍA.....	45
	APÉNDICES .....	49



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

1.	Estructuras moleculares de (a) quitina y (b) quitosano .....	8
2.	Arreglos estructurales de los tipos de quitina .....	9
3.	Diagrama de flujo del proceso general de obtención de quitina por medio de hidrólisis proteica enzimatica.....	12
4.	Obtención de quitina expresada por el porcentaje de nitrogeno total en función de la relación enzima/exoesqueleto.....	32
5.	Obtención de quitina expresada por el porcentaje de nitrogeno total en función de la temperatura en la etapa de desproteinización .....	33
6.	Obtención de quitina expresada por el porcentaje de nitrogeno total en función del pH en la etapa de desproteinización.....	34

### TABLAS

I.	Variables propuestas para la obtención de quitina.....	17_Toc331409622
II.	Combinaciones de parámetros independientes .....	21
III.	Cálculos de análisis de varianza para 3 factores con n replicas .....	26
IV.	Mezcla de diseño factorial 2*2*2 .....	28
V.	Resultados óptimos de las condiciones de obtención de quitina .....	31
VI.	Análisis de varianza .....	35



## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetros cúbicos
<b>M</b>	Concentración molar
<b>Hz</b>	Frecuencia Hertz
<b>h</b>	Hora
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>g</b>	Gramo
<b>g/g</b>	Gramo sobre gramo
<b>l</b>	Litro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>%</b>	Porcentaje
<b>Q</b>	Quetzales
<b>v/v</b>	Relación volumen / volumen
<b>V</b>	Voltaje



## GLOSARIO

<b>Álcali</b>	Sustancia química soluble en agua que se comporta como una base fuerte, al combinarse con ácidos forman sales
<b>Artrópodos</b>	Animales invertebrados que tienen el cuerpo cubierto por un exoesqueleto externo, cuerpos segmentados y patas articuladas.
<b>Biopolímero</b>	Sustancias poliméricas naturales que forman parte de las paredes celulares de células animales y vegetales.
<b>Exoesqueleto</b>	Estructura o armazón rígida que protege el interior de algunos animales, cumple con la función de proteger y dar sostén.
<b>Eutrofización</b>	Fenómeno en ecosistemas acuáticos con efectos irreversibles, caracterizado por el aumento de nutrientes como nitratos y fosfatos, que generan cambios en la composición de la comunidad de los seres vivos.
<b>Enzima</b>	Son proteínas que catalizan reacciones químicas, es decir que sin consumirse en la reacción aumentan la velocidad.

<b>Fermentación</b>	Proceso de oxidación incompleta que no requiere oxígeno para llevarse a cabo y produce una sustancia orgánica como resultado.
<b>Hidrólisis</b>	Reacción química en la que el agua actúa sobre otra sustancia para formar una o más sustancias enteramente nuevas.
<b>Inhibidor enzimático</b>	Molécula que se une a una enzima y disminuye su actividad.
<b>Polisacárido</b>	Es un hidrato de carbono formado por una larga cadena de monosacáridos.

## RESUMEN

Se estudió la obtención de quitina a partir de los desechos de exoesqueletos de camarón mediante hidrólisis proteica enzimática, utilizando la enzima papaína en la etapa de desproteínización. Se evaluó la viabilidad de sustituir el uso de NaOH en el proceso de desproteínización de la quitina por el uso de la enzima papaína, se utilizó como variable independiente dos proporciones 1:4 y 1:8 de enzima en relación a la cantidad de exoesqueleto de camarón.

Adicionalmente, se evaluaron diferentes niveles en los parámetros de pH y temperatura para determinar si influyen en el rendimiento de la obtención de quitina en la etapa de desproteínización. Las temperaturas consideradas fueron de 60 °C y 70 °C y los valores de pH de la solución buffer fueron de 6 y 7.

La materia prima se sometió a un proceso de cuatro pasos: 1) limpieza y molienda, 2) desproteínización con dos proporciones de papaína/exoesqueleto en una solución buffer de fosfato por un tiempo de 2 horas, 3) desmineralización con ácido clorhídrico a 0,5 M por 1 hora y 4) decoloración utilizando peróxido de hidrógeno al 3 % por 30 minutos. El tamaño de la muestra fue de 23 tratamientos con 3 repeticiones, dando un total de 24 tratamientos.



## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la obtención de quitina a partir de los desechos del exoesqueleto de camarón mediante el método de hidrólisis proteica enzimática.

### **Específicos**

1. Evaluar la efectividad del uso de dos proporciones de papaína respecto a la cantidad de exoesqueleto de camarón en el proceso de desproteización para la obtención de quitina.
2. Determinar la obtención de quitina variando el parámetro de temperatura en la etapa de desproteización.
3. Determinar la obtención de quitina variando el parámetro de pH en la etapa de desproteización.
4. Someter el producto del exoesqueleto desproteizado a los procesos posteriores de desmineralización y decoloración para obtener quitina.



## **HIPÓTESIS**

Es posible la obtención de quitina a partir de los desechos del exoesqueleto de camarón mediante hidrólisis proteica utilizando papaína comercial.

### **Hipótesis nula 1:**

No existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar el parámetro de temperatura en la etapa de desproteización.

### **Hipótesis alternativa 1:**

Existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar el parámetro de temperatura en la etapa de desproteización.

### **Hipótesis nula 2:**

No existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar el parámetro pH en la etapa de desproteización.

### **Hipótesis alternativa 2:**

Existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar el parámetro pH en la etapa de desproteización.

**Hipótesis nula 3:**

No existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar la proporción de papaína y exoesqueleto de camarón en la etapa de desproteización.

**Hipótesis alternativa 3:**

Existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar la proporción de papaína y exoesqueleto de camarón en la etapa de desproteización.

## INTRODUCCIÓN

Los desechos de mariscos quitinosos como los camarones son un problema ambiental, se consideran peligrosos debido a su alta perecibilidad y contaminación, los exoesqueletos de estos son desechados a las aguas sin tratamiento previo, lo que genera eutrofización<sup>1</sup>. Para solucionar este problema y aprovechar la abundancia de los recursos, los desechos de exoesqueleto de camarón han sido utilizados como fuente de quitina. La quitina es un biopolímero importante con propiedades que le permiten aplicaciones en áreas de medicina, tratamiento de aguas, uso cosmético, en la industria agrícola como herbicidas y pesticidas<sup>2</sup>.

Para obtener quitina es necesario someter los desechos de exoesqueleto a tres procesos químicos, desproteínización, desmineralización y decoloración, sin embargo, el proceso implica el uso de productos químicos ácidos lo que genera desechos que siguen siendo un problema para el ambiente. Por lo tanto, se han buscado opciones que permitan mejorar el rendimiento, las propiedades de la quitina y reducir los desechos generados.

---

<sup>1</sup>ISLAM, M. Shahidul; KHAN, Saleha; TANAKA, Masaru. *Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. Marine Pollution Bulletin*, 49(1–2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018>. Consulta: 20 de mayo del 2021.

<sup>2</sup> BANDARA, Subhani; DU, Hongbo; CARSON, Laura; BRADFORD, Debra; KOMMALAPATI, Raghava. *Agricultural and biomedical applications of chitosan-based nanomaterials. Nanomaterials*, 10(10), 1–31. <https://doi.org/10.3390/nano10101903>. Consulta: 20 de mayo del 2021.

El objetivo de esta investigación fue evaluar un proceso de obtención de quitina mediante hidrólisis proteica enzimática. En la etapa de desproteización se sustituyó el uso de álcalis por la enzima papaína.

La función proteolítica de la papaína permite degradar los enlaces peptídicos de las proteínas contenidas en el exoesqueleto de los crustáceos, o en los alimentos en general<sup>3</sup>.

La desproteización se realizó con dos soluciones buffer de fosfatos de pH 6 y 7, a temperatura de 60 y 70 °C y dos variaciones de la relación de la cantidad enzima / exoesqueleto de camarón para determinar su influencia en el rendimiento de obtención de quitina final.

Posterior al proceso de desproteización, el sólido obtenido se sometió a desmineralización con HCl a 0,5 M por una hora, luego el sólido seco se decoloró para eliminar los pigmentos que no fueron eliminados en las etapas anteriores, se utilizó peróxido de hidrógeno al 3 % v/v por 30 minutos. Para cada muestra se realizaron tres repeticiones para tener datos representativos de la investigación, la determinación del contenido de proteína de la quitina final se obtuvo determinando la cantidad de nitrógeno total por el método de Kjeldahl.

El impacto de la investigación consistió en encontrar una alternativa al proceso de desproteización química y sustituirlo por el proceso enzimático, para disminuir los desechos generados y mejorar el rendimiento del producto final de quitina.

---

<sup>3</sup> GIL, Maritza; BEDOYA, Vanesa; MILLÁN, Leónidas; Benavides, Licceth. *Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (Carica papaya L. Artículo Original. J. Eng. Technol, 1, 18-25. p. 8.*

# 1. MARCO CONCEPTUAL

## 1.1. Antecedentes

La quitina es uno de los polisacáridos estructurales más abundantes en la tierra, los desechos de los crustáceos como la cáscara, tórax, conchas y cabezas, han sido aprovechados en la industria para la obtención de quitina y posteriormente la obtención de oligosacáridos o quitosano, para usos como la inhibición de hongos, filtraciones, fabricación de películas de recubrimiento, usos médicos, en nanotecnología, uso cosmético y farmacéutico<sup>4</sup>.

A través de los años ha incrementado el interés de encontrar métodos de obtención de quitina que reduzcan el nivel de contaminación de los métodos químicos usados en la industria. Las enzimas más utilizadas comercialmente en la actualidad para este proceso son la alcalasa, quimotripsina y papaína.

Se han investigado también las fermentaciones con bacterias productoras de enzimas proteolíticas y quitinolíticas, la influencia de la irradiación gamma, la extracción por medios físicos y a través de membranas. Todos estos métodos con el fin de generar alternativas que permitan mejorar las propiedades de la quitina y sus derivados obtenidos.

---

<sup>4</sup> PERCOT, Aline; VITON, Christophe, & DOMARD, Alain. *Optimización de la extracción de quitina a partir de cáscaras de camarón*. Bm025602K. 12–18. p.18.

Con todos estos avances se ha logrado una prometedora solución a la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de crustáceos, sin embargo, continúa la búsqueda de mejorar el proceso.

## 1.2. Justificación

La obtención de quitina es posible mediante el proceso de desmineralización, desproteinización y decoloración de los exoesqueletos de crustáceos, la quitina es uno de los compuestos más abundantes de la tierra y el segundo polisacárido identificado por el hombre, debido a su abundante producción mundial, el interés por aprovechar este recurso natural ha aumentado a través de los años<sup>5</sup>.

Mediante desacetilación enzimática o química, la quitina puede convertirse en su derivado más importante, el quitosano<sup>6</sup>. Este biopolímero presenta importantes aplicaciones biomédicas como: la ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y fabricación de membranas. En la industria agrícola, por su actividad antifúngica y antibacteriana, se ha usado como pesticidas, herbicidas e insecticidas, y también se ha utilizado en la industria vinícola.

---

<sup>5</sup> SHAIKH, Aatif Hassan; RANA, Majid; SHAIKH, Aashfa Hassan. *Ureteric pellet causing non-functioning kidney*. In *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* (Vol. 15, Issue 9). <https://doi.org/09.2005/JCPSP.580581>. Consulta: 23 de mayo de 2021.

<sup>6</sup> ROBERTSON, John. *The American Mathematical Monthly*, 111(10), 915. <https://doi.org/10.2307/4145104>. Consulta: 23 de mayo de 2021.

Cada año los millones de toneladas de residuos procedentes de la industria marisquera son desechados al mar o a vertederos. En el mar estos desechos conducen a la eutrofización y ejercen contaminación debido a la demanda bioquímica de oxígeno, por lo que son considerados de alta contaminación<sup>7</sup>. En la industria los residuos marisqueros han sido utilizados como fuente de quitina. Actualmente, la quitina en su mayoría es obtenida por procesos químicos usando ácidos y álcalis fuertes.

Estos métodos químicos generan grandes cantidades de desechos peligrosos y la desacetilación parcial de quitina e hidrólisis del polímero pueden ocurrir, conduciendo a propiedades fisiológicas inconsistentes en los productos finales.

Con el propósito de encontrar una vía enzimática de extracción que proporcione mejores características físico-químicas al producto final y mejore el rendimiento y control de los desechos del proceso de extracción, se sustituyó el uso de álcalis en el proceso de desproteínización por la enzima papaína obtenida de la semilla de la papaya en virtud de sus propiedades proteolíticas que provocan la ruptura de múltiples enlaces en las proteínas. Evitando el uso de productos químicos que provocan la despolimerización de la quitina y la modificación de sus propiedades fisiológicas, como peso molecular; viscosidad y grado de acetilación.

---

<sup>7</sup> ISLAM, Shahidul; KHAN, Saleha; TANAKA, Masaru. *Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. Marine Pollution Bulletin*, 49(1–2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018>. Consulta: 23 de mayo de 2021.

### **1.3. Determinación del problema**

Obtener quitina a partir de exoesqueletos de camarón mediante la vía enzimática con el uso de la enzima papaína, con el fin de sustituir el uso de álcalis en el proceso.

#### **1.3.1. Definición**

Para la obtención de  $\alpha$ -quitina a partir de exoesqueletos de mariscos se emplea los procesos de desproteínización, desmineralización y decoloración.

Una de las problemáticas actuales en los procesos de obtención de quitina químicos y enzimáticos es el bajo rendimiento, por lo que se han empleado y se continúan buscando numerosas variaciones al proceso con el fin de incrementar el rendimiento en la etapa de desproteínización, mejorando el rendimiento de quitina final. Otra problemática en el proceso ha sido el aspecto ambiental debido a que el método químico, aunque es el más viable económicamente genera grandes cantidades de desechos peligrosos debido al uso de ácidos y álcalis.

#### **1.3.2. Delimitación temática**

Se estudió la obtención de quitina mediante hidrólisis proteica enzimática, utilizando la enzima papaína EC 3.4.22.2 comercial de GNC en el proceso de desproteínización.

#### **1.3.3. Delimitación temporal**

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en los meses de junio hasta noviembre del año 2021.

#### **1.3.4. Delimitación espacial**

Este estudio se ubicó a nivel laboratorio, dentro de las instalaciones de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en los laboratorios del área de química de la Escuela de Ingeniería Química.



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Quitina**

La quitina es un polisacárido natural de gran importancia identificado por primera vez en 1884 por Albert Hofmann. Se encuentra presente como microfibrillas cristalinas ordenadas que forman componentes estructurales en el exoesqueleto de artrópodos o en las paredes celulares de hongos y levaduras.

La  $\alpha$ -quitina es la forma polimórfica que se obtiene de los exoesqueletos de crustáceos y las paredes celulares de levaduras y hongos, para la obtención de la quitina a partir de estos exoesqueletos se requiere de un tratamiento químico o enzimático que permita la remoción de pigmentos y el uso de álcalis o enzimas desproteinizantes.

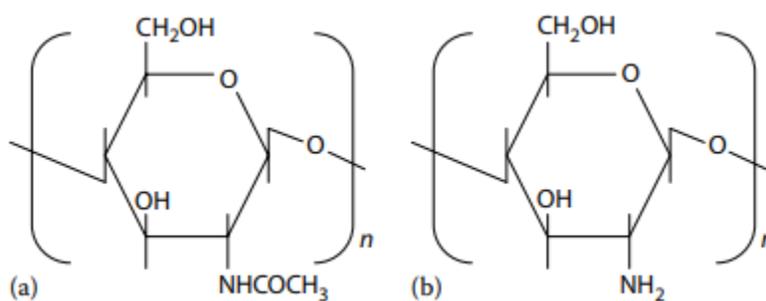
Uno de los limitantes de la quitina a las aplicaciones es su insolubilidad en agua y solventes orgánicos, es allí donde surgen las aplicaciones de su derivado el quitosano, que a pesar de ser insoluble en agua es soluble en ácidos orgánicos. Otros de los derivados principales de la quitina son los oligosacáridos.

### **2.2. Quitosano**

El quitosano es obtenido por medio de la desacetilación alcalina de la quitina, es uno de los principales derivados de este polímero. En la actualidad tiene múltiples aplicaciones debido a su biodegradabilidad, bio renovabilidad, biocompatibilidad, inercia fisiológica y accesibilidad a los reactivos debido a su estructura menos cristalina en comparación a la quitina.

A medida que la quitina se transforma en quitosano se hace menos estable térmicamente, exhibiendo una máxima velocidad de descomposición a menores temperaturas, probablemente debido a la preponderancia de la forma no acetilada y a la menor cristalinidad mostrada por el quitosano.

Figura 1. Estructuras moleculares de (a) quitina y (b) quitosano



Fuente: SHAIKH, Aatif. *Quitina, quitosano, oligosacáridos y sus derivados*. p.13.

### 2.3. Propiedades de la quitina

La quitina es un biopolímero con propiedades similares a las de la celulosa, estructuralmente se diferencian por que la quitina tiene en su estructura un grupo N-acetamida en lugar del grupo hidroxilo en el carbono en posición 2 de la glucosa en la celulosa<sup>8</sup>. Los grupos funcionales de la quitina son química o enzimáticamente modificables, estas modificaciones permiten la obtención de su derivado quitosano.

La quitina tiene una apariencia blanca, dura y cristalina, su peso molecular es elevado por su cadena lineal nitrogenada, su cristalinidad la limita en su uso

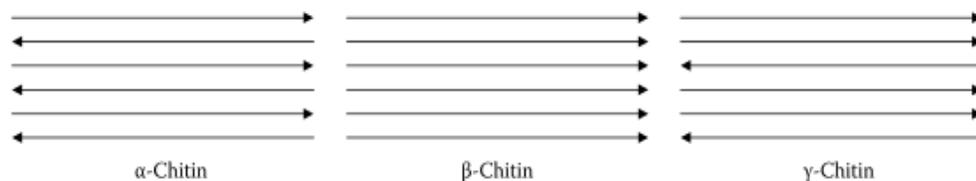
<sup>8</sup> GARDNER, Howard; BLACKWELL, James. *Refinement of the structure of  $\beta$ -chitin*. *Biopolymers* 1975, 14, 1581–1595. p. 1 585.

como material polimérico ya que provoca poca solubilidad en medios acuosos como solventes orgánicos. La quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes. Para llevar a cabo la disolución, es necesario introducir disolventes que inducen las repulsiones entre las cadenas o desequilibran los puentes de hidrógeno intermoleculares presentes en el estado sólido.

#### 2.4. Tipos de Quitina

Se han identificado tres formas de quitina en la naturaleza, denominadas alfa, beta y gamma. Cada tipo se diferencia por su estructura cristalina y su origen biológico, la más estudiada ha sido la  $\alpha$ -quitina, por ser más abundante, esta se encuentra en los crustáceos en su exoesqueleto, en algas y hongos, su estructura cristalina es muy compactada con enlaces de hidrógeno extensos. El tipo  $\beta$ -quitina tiene una estructura más abierta en las cadenas y sus interacciones intermoleculares son más débiles en la naturaleza se encuentra en los corales y calamares, mientras que la  $\gamma$ -quitina se encuentra predominantemente en el revestimiento del estómago de calamares y sepias.

Figura 2. **Arreglos estructurales de los tipos de quitina**



Fuente: SHAIKH, Aatif. *Quitina, quitosano, oligosacáridos y sus derivados* p.13.

## **2.5. Métodos de obtención de quitina**

Para la obtención de quitina de los exoesqueletos de crustáceos se requieren tres procesos químicos:

### **2.5.1. Desproteínización**

Para la desproteínización química de los exoesqueletos de crustáceos normalmente se emplean soluciones ácidas, el tiempo depende del tipo de crustáceo, hasta que se fragmentan por hidrólisis: metaloproteasa, proteasas, péptidos, aminoácidos; sus proteínas. Al final de esta etapa el residuo es una solución de hidróxido de sodio con un alto nivel de proteínas.

Para el proceso enzimático se utilizan enzimas desproteínizantes que descomponen las proteínas en fragmentos más pequeños como péptido o aminoácidos. Este proceso consiste en la digestión o fermentación con bacterias proteolíticas con actividad no quitinolíticas.

La ventaja de este proceso es que disminuye la degradación química de la quitina y además no afecta las condiciones del medio ambiente de igual magnitud que la vía química, una de las desventajas es que no se logra la eliminación completa de la proteína ya que el método no es tan severo. La eliminación completa de proteínas es especialmente importante para aplicaciones biomédicas, ya que un porcentaje de la población humana es alérgica a los mariscos, siendo el principal culpable el componente proteico.

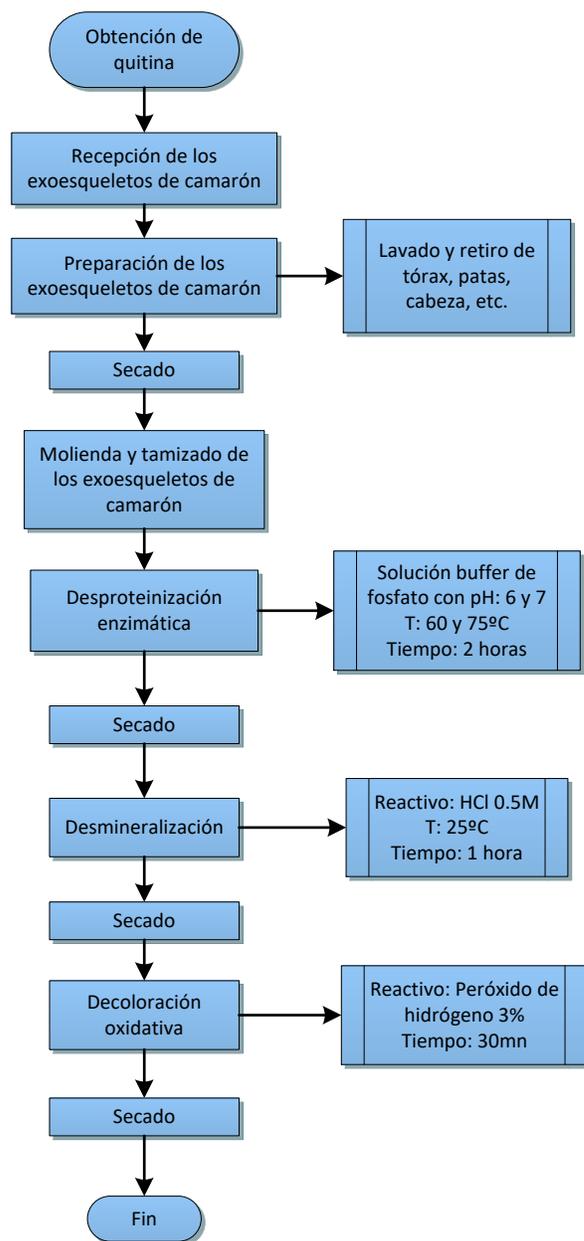
### **2.5.2. Desmineralización**

Consiste en eliminar los minerales de los crustáceos, se realiza empleando soluciones diluidas de ácido clorhídrico a temperatura ambiente, aunque se han utilizado otros ácidos el más común es el HCl, la concentración de este y el tiempo de tratamiento de la materia prima depende del tipo de crustáceo. Para evitar la degradación del polímero en el proceso se evita el uso de temperaturas altas.

### **2.5.3. Decoloración**

Este proceso se realiza debido a que los tratamientos de desmineralización y desproteinización, generalmente no son capaces de eliminar los pigmentos de color de los caparzones o exoesqueletos de los crustáceos. Para lograrlo se utilizan soluciones de peróxido de hidrógeno, acetona, etanol, acetato de etilo o mezclas de solventes.

Figura 3. Diagrama de flujo del proceso general de obtención de quitina por medio de hidrólisis proteica enzimática



Fuente: elaboración propia.

## **2.6. Desproteínización por el método enzimático**

El uso de proteasas ha sido una de las alternativas en el proceso de desproteínización para los exoesqueletos de crustáceos, las proteasas son obtenidas principalmente de fuentes vegetales como la papaya o la piña.

Una de las ventajas de este método enzimático es que se evita el uso de los tratamientos alcalinos reduciendo los desechos que contaminan el medio ambiente y son menos agresivos para los exoesqueletos de crustáceos. El rendimiento obtenido de una desproteínización enzimática depende de las condiciones de la proteasa y de la estructura del exoesqueleto del camarón.

Para disminuir los inhibidores enzimáticos es necesario realizar el proceso de desmineralización antes, para agilizar la acción enzimática. Una de las principales razones por las que no es común el uso de desproteínización enzimática es el elevado costo de la extracción de enzimas de bacterias, por lo que se busca la extracción en bruta de proteasas coexistentes para disminuir los costos y mejorar el rendimiento.

## **2.7. Enzima papaína**

La papaína es una enzima extraída del fruto de la papaya, a partir del látex de la fruta verde antes de su maduración, esta enzima proteolítica tiene una alta actividad biológica, por lo tanto, se usa ampliamente en la industria como aclarador y ablandador.

La función proteolítica de la papaína le permite degradar los enlaces peptídicos de las proteínas contenidas en las cáscaras de los crustáceos, o en

los alimentos en general. Es utilizada también en la industria cosmética y farmacéutica como cicatrizante, o en productos para suavizar la piel.

En el proceso de extracción se puede ver afectada su actividad enzimática por factores como temperaturas altas, exposición al oxígeno, a la luz, o el tiempo de recolección. Por lo que el proceso debe ser cuidado en estos parámetros.

## **2.8. Código enzimático de la papaína EC 3.4.22.2**

El número EC, número de comisión de enzima, es un esquema de clasificación numérica para las enzimas, basado en las reacciones químicas que catalizan. Como sistema de nomenclatura de enzimas, cada número EC está asociado a un nombre recomendado para dicha enzima. El número de EC codifican reacciones catalizadas por enzimas.

El código de cada enzima está formado por cuatro números separados por puntos, cada número representa una clasificación progresiva específica.

## **2.9. Principales aplicaciones de la quitina**

Las principales aplicaciones de la quitina en la industria por sus propiedades como biopolímero son:

### **2.9.1. Industria Alimentaria**

En la industria alimentaria es empleado como estimulador de crecimiento, como antifúngico, protector de semillas y granos básicos frente a hongos y bacterias. Se utiliza como suplemento dietético, como film o películas para la conservación de los alimentos.

### **2.9.2. Medicina**

En la subrama de la medicina, la biomedicina se emplea la quitina como agente cicatrizante, sutura de heridas biodegradables, tratamiento de tumores, recuperación de lesiones cutáneas, como una membrana para usos como la regeneración dérmica, acelerando la cicatrización en heridas, en películas secas y húmedas.

Se ha empleado en la cura de diabetes, enfermedades del hígado, además de la ayuda al organismo por medio de defensas.

### **2.9.3. Farmacia**

En la industria de fármacos es utilizado en la dosificación de fármacos, en tabletas, microesferas, dosificación de vacunas, sistemas de liberación transdermal, microcápsulas.

### **2.9.4. Agricultura**

La agricultura es uno de los campos donde mayor aplicación tiene la quitina y el quitosano, se emplea como películas antimicrobianas, aditivo en alimentos, floculante de efluentes, encapsulación de nutraceuticos, pero su aplicación potencial consiste en su doble cualidad de inhibir el crecimiento in vitro de hongos y bacterias fitopatogénas, así como activar mecanismos de defensa en las plantas estrechamente relacionados con la resistencia al ataque de microorganismos.



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Variables

Las variables dependientes e independientes para considerar en la parte experimental de la investigación son las descritas en la tabla I.

Tabla I. **Variables propuestas para la obtención de quitina**

No	Variable	Dimensionales	Parámetro constante	Parámetro variable
1	Cantidad de tableta comercial de papaína	g		X
2	Cantidad de exoesqueleto de camarón	g	X	
3	Temperatura	°C		X
4	pH	adimensional		X
5	Tiempo de reacción	h	X	
6	Proporción de papaína/exoesqueleto	g/g		X

Fuente: elaboración propia.

### **3.2. Recursos humanos disponibles**

- Investigadora: Gabriela Fernanda López Bautista
- Asesora: Inga. Mercedes Esther Roquel Chávez

### **3.3. Recursos materiales disponibles**

Se describen los materiales y el equipo de laboratorio utilizados durante la investigación.

#### **3.3.1. Materia prima**

- Desechos de exoesqueleto de camarón
- Enzima papaína en tabletas GNC

#### **3.3.2. Reactivos**

- Ácido clorhídrico, Merck, grado ACS, 37 %, densidad 1,19 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C
- Peróxido de hidrógeno grado comercial 10 % v/v
- Agua desmineralizada, Tipo II según ASTM 1193: 2001
- Ácido fosfórico, Merck, grado ISO, 85 %, densidad 1,71 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C
- Hidróxido de sodio, Merck, grado ISO, 40 %, 2,13 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C

#### **3.3.3. Instrumentos de medición**

- Balanza analítica, Adventur, modelo AR2140, capacidad máxima 210 g, precisión 0,0001 g, de 50 a 60 Hz.
- Potenciómetro digital, marca 410A pH Orion Research, rango 0 a 14 pH, temperatura de -5 a 105 °C, de 50 a 60 Hz.

- Termómetro de vidrio con mercurio de inmersión, rango de temperatura de 0 a 200 °C, 300 x 8,5 mm, precisión  $\pm 1$  °C.
- Matraz aforado, material vidrio Pyrex 4980, 100 ml, 250 ml y 1 000ml.

#### **3.3.4. Equipo adicional**

- Soporte universal de metal.
- Horno de calentamiento, Ser Proma, cámara interior norma AISI 304 I, 60 Hz, 110 V.
- Plancha de calentamiento, marca Corning, precisión  $\pm 2$  °C, rango de temperatura ambiente hasta 550 °C, 60 Hz, 230 V.

#### **3.3.5. Cristalería y materiales**

- Beaker
- Erlenmeyer
- Espátula
- Vidrio de reloj
- Agitadores magnéticos
- Embudo de filtración
- Papel filtro
- Crisol
- Piseta

#### **3.3.6. Equipo de protección personal**

- Guantes térmicos
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla con filtro

- Lentes protectores
- Bata de laboratorio
- Botas industriales

### **3.4. Técnica Cuantitativa**

La técnica analítica será cuantitativa, para la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de camarón se evaluará si fue efectivo el uso de las tabletas de papaína en el proceso de desproteización, posteriormente se someterá el sólido obtenido de esta etapa a los procesos de desmineralización y decoloración. Se determinará cuantitativamente si existe variación en el rendimiento al modificar los parámetros de pH y temperatura en la desproteización enzimática.

El contenido de proteínas en las muestras finales de quitina se cuantificará con el método de Kjeldahl, determinando el porcentaje de nitrógeno.

### **3.5. Recolección y ordenamiento de la información**

La desproteización de la quitina se realizará con tableta de papaína, variando dos veces la cantidad de tableta/exoesqueletos de camarón, dos veces la temperatura de desproteización y dos veces el pH. Para la desmineralización se utilizará ácido clorhídrico 0,5 M, para la decoloración se utilizará peróxido de hidrógeno al 3 % v/v. Dando como resultado un diseño experimental de 8 tratamientos de exoesqueleto, cada tratamiento se repetirá 3 veces, dando un total de 24 tratamientos.

Cálculo del número de combinaciones:

$$2^3 = 8$$

Número de tratamientos

$$8 * 3 = 24$$

El proceso experimental se llevará a cabo en las instalaciones de los laboratorios de química de la Escuela de ingeniería química de la facultad de Ingeniería, Universidad San Carlos de Guatemala.

Tabla II. **Combinaciones de parámetros independientes**

<b>No. Muestra</b>	<b>Enzima/Exoesqueleto g/g</b>	<b>Tiempo h</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>pH</b>
1	1:4	2	60	6
2	1:4	2	60	7
3	1:4	2	70	6
4	1:4	2	70	7
5	1:8	2	60	6
6	1:8	2	60	7
7	1:8	2	70	6
8	1:8	2	70	7

Fuente: elaboración propia.

### **3.6. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información**

Se describe cada uno de los procedimientos a realizar para la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de camarón.

Procedimiento de recolección y preparación de los exoesqueletos:

- Los exoesqueletos se obtendrán de una marisquería del departamento de San Marcos.

- Separar los exoesqueletos del residuo como patas, carne o cola.
- Lavar los exoesqueletos con agua destilada para retirar los residuos.
- Secar los exoesqueletos.
- Moler los exoesqueletos secos.

#### Procedimiento de desproteinización:

- La papaína se dispondrá en forma de tableta.
- Moler las tabletas de papaína.
- Realizar desproteinización con la enzima papaína agregándole al exoesqueleto de camarón en una solución de pH controlado.
- Filtrar al vacío y eliminar el líquido.
- Secar los sólidos recolectados.

#### Procedimiento de desmineralización:

- Preparar una solución de ácido clorhídrico HCl a 0,5 M.
- Desmineralizar el producto obtenido de la desproteinización con la solución de HCl a temperatura ambiente.
- Filtrar al vacío y eliminar el líquido.
- Secar los sólidos recolectados.

#### Procedimiento de decoloración:

- Tratar el producto obtenido de la desmineralización con peróxido de hidrógeno al 3 %.
- Lavar y filtrar la solución.
- Secar los sólidos recolectados.

### 3.7. Análisis estadístico

Media aritmética:

Se realizarán tres repeticiones por muestra, por lo que se determinará la media aritmética y desviación estándar de cada muestra. Se define como la sumatoria de los valores obtenidos entre el número de repeticiones realizadas.

$$\bar{x} = \frac{\sum_i^n x_i}{n}$$

- ANOVA:

Para el análisis estadístico de la investigación se tomarán en cuenta las tres variables independientes; la relación de enzima/exoesqueleto de camarón, pH y temperatura. Por lo que el análisis es de 3 factores A, B y C con los niveles a, b y c, respectivamente. Se supondrán 3 observaciones para las posibles combinaciones de los tres factores, dando un total de 24 tratamientos.

Modelo para el experimento de tres factores:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \alpha\beta\gamma_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

B,  $\alpha$  y  $\gamma$  = factores principales

$i = 1, 2, \dots, a$

$j = 1, 2, \dots, a$

$k = 1, 2, \dots, a$

$l = 1, 2, \dots, a$

Suma de cuadrados para experimento de tres factores:

$$SCA = bnc \sum_{i=1}^a (\bar{y}_i - \bar{y})^2$$

$$SCB = anc \sum_{j=1}^b (\bar{y}_j - \bar{y})^2$$

$$SCC = abn \sum_{k=1}^c (\bar{y}_k - \bar{y})^2$$

Suma de cuadrados interacción dos factores:

$$SC(AB) = cn \sum_i \sum_j (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_i - \bar{y}_j + \bar{y})^2$$

$$SC(AC) = bn \sum_i \sum_k (\bar{y}_{ik} - \bar{y}_i - \bar{y}_k + \bar{y})^2$$

$$SC(BC) = an \sum_j \sum_k (\bar{y}_{jk} - \bar{y}_j - \bar{y}_k + \bar{y})^2$$

Suma de cuadrado interacción de tres factores:

$$SC(ABC) = n \sum_i \sum_j \sum_k (\bar{y}_{ijk} - \bar{y}_{ij} - \bar{y}_{ik} - \bar{y}_{jk} + \bar{y}_i + \bar{y}_j + \bar{y}_k - \bar{y})^2$$

$$STC = n \sum_i \sum_j \sum_k (\bar{y}_{ijkl} - \bar{y})^2$$

$$STE = n \sum_i \sum_j \sum_k (\bar{y}_{ijkl} - \bar{y}_{ijk})^2$$

Donde los promedios en las fórmulas se definen como:

$\bar{y}$  = promedio de todas las ABC n observaciones

$\bar{y}_i$  = promedio de las observaciones para el i-ésimo nivel del factor A

$\bar{y}_j$  = promedio de las observaciones para el j-ésimo nivel del factor B

$\bar{y}_{k\cdot}$  = promedio de las observaciones para el k-ésimo nivel del factor C

$\bar{y}_{ij}$  = promedio de las observaciones para el i-ésimo nivel de A y el j-ésimo nivel de B

$\bar{y}_{ik}$  = promedio de las observaciones para el i-ésimo nivel de A y el k-ésimo nivel de C

$\bar{y}_{jk}$  = promedio de las observaciones para el j-ésimo nivel de B y el k-ésimo nivel de C

$\bar{y}_{ijk\cdot}$  = promedio de las observaciones para la (ijk)-ésima combinación de tratamientos.

Tabla III. Cálculos de análisis de varianza para 3 factores con n réplicas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	$f$ calculada
Efecto principal:				
<i>A</i>	<i>SCA</i>	$a - 1$	$s_1^2$	$f_1 = \frac{s_1^2}{s^2}$
<i>B</i>	<i>SCB</i>	$b - 1$	$s_2^2$	$f_2 = \frac{s_2^2}{s^2}$
<i>C</i>	<i>SCC</i>	$c - 1$	$s_3^2$	$f_3 = \frac{s_3^2}{s^2}$
Interacción de 2 factores:				
<i>AB</i>	<i>SC(AB)</i>	$(a - 1)(b - 1)$	$s_4^2$	$f_4 = \frac{s_4^2}{s^2}$
<i>AC</i>	<i>SC(AC)</i>	$(a - 1)(c - 1)$	$s_5^2$	$f_5 = \frac{s_5^2}{s^2}$
<i>BC</i>	<i>SC(BC)</i>	$(b - 1)(c - 1)$	$s_6^2$	$f_6 = \frac{s_6^2}{s^2}$
Interacción de 3 factores:				
<i>ABC</i>	<i>SC(ABC)</i>	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	$s_7^2$	$f_7 = \frac{s_7^2}{s^2}$
Error	<i>SCE</i>	$abc(n - 1)$	$s^2$	
Total	<i>STC</i>	$abcn - 1$		

Fuente: WALPOLE, Ronald, *Probabilidad y Estadística para ingenieros*. p. 580.

Cuadrado medio de error

$$s^2 = \frac{SC(AB) + SC(AC) + SC(ABC) + SCE}{(a - 1)(b - 1) + (a - 1)(c - 1) + (a - 1)(b - 1)(c - 1) + abc(n - 1)}$$

### **3.8. Plan de análisis de los resultados**

Se describen los métodos utilizados para analizar y organizar los datos experimentales obtenidos.

#### **3.8.1. Diseño factorial al azar**

Este diseño al azar servirá para observar el comportamiento de las muestras de quitina a evaluar, y la interacción de los factores variables entre ellos para el resultado final. Consistirá en que todos los niveles de cada variable independiente sean tomados en combinación con todos los niveles de las otras variables independientes y que ninguna combinación esté repetida.

El diseño de la investigación es el diseño factorial  $2 \times 2 \times 2$ , en donde el valor numérico de cada dígito indicará el número de niveles de la variable independiente. Por lo tanto, cada una de las 3 variables a trabajar, tendrá dos niveles presentes. Se estudiará el efecto de 3 factores; el factor A la relación enzima papaína/exoesqueleto, el factor B la temperatura y el factor C el pH; con lo cual es importante no sólo determinar si los factores influyeron sobre la respuesta, sino también si existió una interacción entre ellos.

Para identificar las variables independientes en el diseño factorial se utilizaron las letras A, B y C y los números 1 y 2, para los niveles de cada factor. Las combinaciones de letras y números que aparecen en las casillas de la siguiente tabla, representan las mezclas de niveles de dichas variables. Cada una de las celdas es un grupo de muestra.

Tabla IV. Mezcla de diseño factorial 2x2x2

Relación Enzima - exoesqueleto	B1= 60 °C C1=6	B1= 60 °C C2=7	B2= 70 °C C1=6	B2 =70 °C C2=7
A1= 1:4	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>
A2= 1:8	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>

Fuente: elaboración propia.

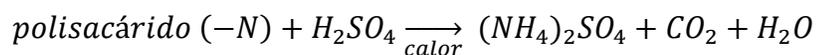
### 3.8.2. Métodos y modelos de los datos según tipo de variables

- Contenido de nitrógeno en el polisacárido quitina:

El método utilizado para determinar la cantidad de nitrógeno total en las muestras finales de quitina será el método Kjeldahl, consiste en tres etapas: digestión, destilación y valoración.

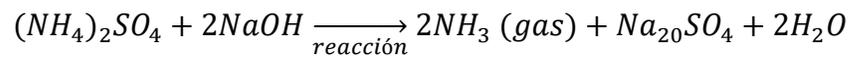
- Digestión:

La digestión se lleva a cabo con ácido sulfúrico a temperatura de 350 °C, en esta etapa se rompen los enlaces de nitrógeno de la muestra de quitina, convirtiéndolos en iones de amonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La materia orgánica se carboniza y se forma un líquido claro, que indica que la reacción de digestión ha terminado. Al finalizar la digestión se deja secar la muestra y se diluye con agua.



- Destilación:

En la etapa de destilación se añade NaOH a la muestra, provocando que los iones de amonio se conviertan en amoníaco. Para evitar que escape el gas amoníaco se agrega ácido sulfúrico.



- Valoración:

El ácido sulfúrico residual de la etapa de destilación se valorará con una solución estandarizada de hidróxido de sodio.

Cálculo del % de Nitrógeno en la muestra

$$\frac{(ml \text{ ácido} \times M \text{ ácido} - ml \text{ blanco} \times N \text{ álcali}) - (ml \text{ álcali} \times N \text{ álcali} * 14700)}{\text{peso de la muestra en gramos}}$$

- Reactivos:
  - Hidróxido de sodio
  - Ácido sulfúrico
  - Tabletas de Kjeldahl
  - Agua desmineralizada



## 4. RESULTADOS

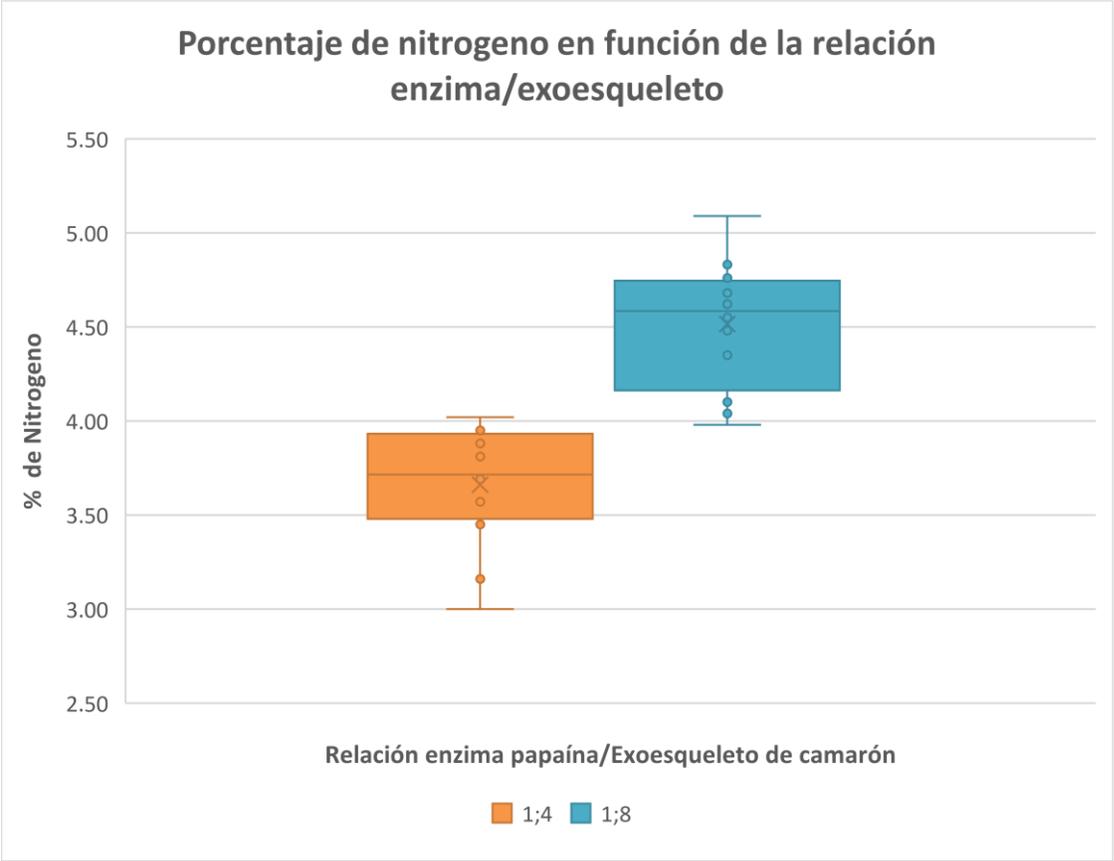
Se logró la obtención de quitina en todos los tratamientos realizados, el rango de porcentaje de nitrógeno total fue de 3,00 a 5,09. Siendo los parámetros experimentales y resultados óptimos los siguientes.

Tabla V. **Resultados óptimos de las condiciones de obtención de quitina**

<b>Relación enzima/exoesqueleto</b>	<b>Temperatura</b>	<b>pH</b>	<b>% Nitrógeno</b>
1:8	70 °C	7	5,09

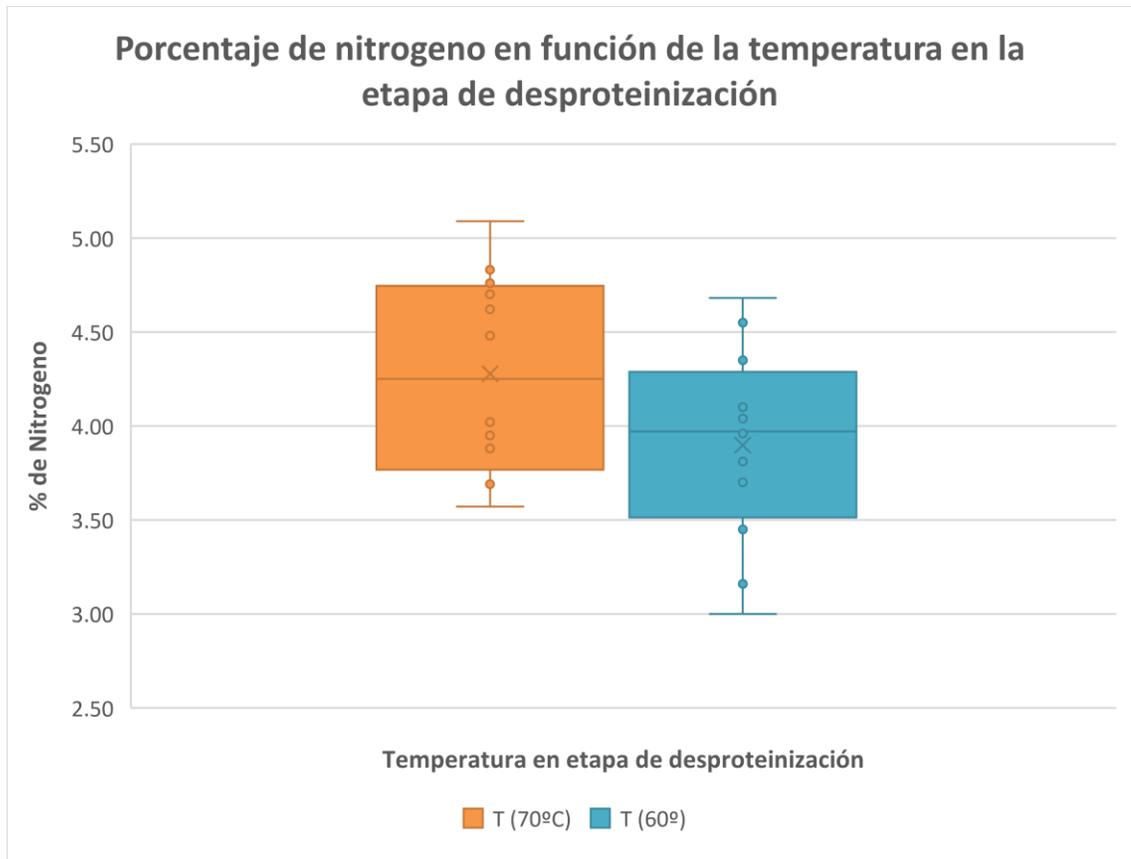
Fuente: elaboración propia.

Figura 4. **Obtención de quitina expresada por el porcentaje de nitrógeno total en función de la relación enzima/exoesqueleto**



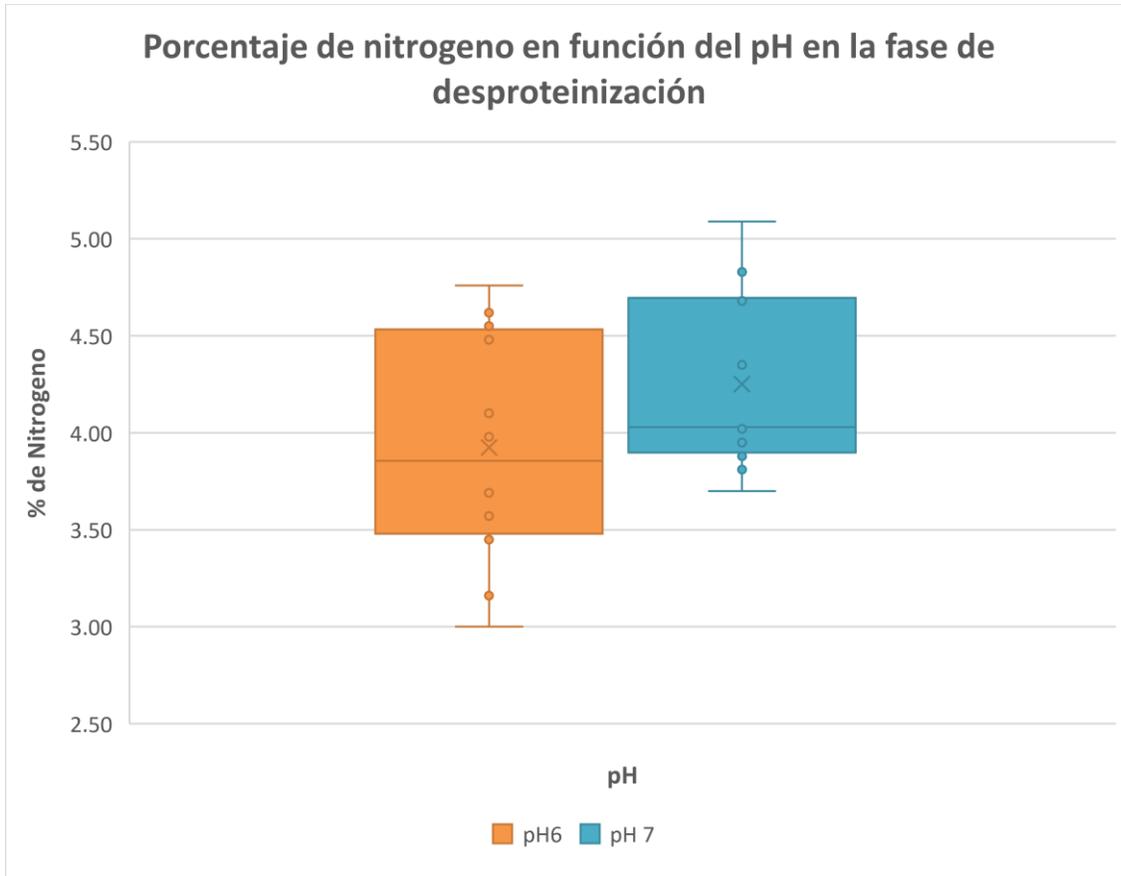
Fuente: elaboración propia.

Figura 5. **Obtención de quitina expresada por el porcentaje de nitrógeno total en función de la temperatura en la etapa de desproteínización**



Fuente: elaboración propia.

Figura 6. **Obtención de quitina expresada por el porcentaje de nitrógeno total en función del pH en la etapa de desproteínización**



Fuente: elaboración propia.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla VI. Análisis de varianza

Variación	F calculada	Valor crítico para $f$	Resultado
<b>Varianza con un solo factor</b>			
Temperatura	3375,353	4,0517	Se rechaza la hipótesis nula
pH	251,3467	4,0517	Se rechaza la hipótesis nula
Enzima/exoesqueleto	1221,083	4,0517	Se rechaza la hipótesis nula
<b>Interacción de dos factores</b>			
Temperatura / pH	0,0732	4,3512	Se acepta
Temperatura/ Enzima/exoesqueleto	0,5804	4,3512	Se acepta
pH/ Enzima/exoesqueleto	1,1602	4,3512	Se acepta
<b>Interacción entre los tres factores</b>			
pH/Enzima- exoesqueleto/ Temperatura	1,7011	3,2388	Se acepta

Fuente: elaboración propia.



## 6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El proceso de obtención de quitina por hidrólisis proteica enzimática consistió en tres etapas; desproteización, desmineralización y decoloración. En la primera etapa se variaron tres parámetros pH, temperatura y relación enzima/exoesqueleto, para determinar las condiciones óptimas de obtención de quitina empleando el método enzimático con papaína.

Se obtuvo quitina por medio del proceso de hidrólisis proteica, en la tabla V se observa el rango de porcentaje de nitrógeno total obtenido que fue de 3 a 5,09. Peter Mohn indica que podemos afirmar la obtención del amino polisacárido catiónico, quitina, cuando el contenido de nitrógeno va de 2,80 a 7 %. Si se supera el 7 % en peso, se prefiere el término quitosano<sup>9</sup>.

En la tabla V de la sección de resultados se muestran los datos experimentales de las condiciones óptimas del proceso de obtención de quitina, los cuales son; temperatura de 70 °C, relación enzima papaína/exoesqueleto de camarón 1:8 y pH 7, obteniéndose con estas condiciones 5,09 % de nitrógeno.

En la figura No. 4 se muestran los resultados de la obtención de quitina expresada en porcentaje de nitrógeno total en función de la relación enzima papaína/exoesqueleto de camarón. Se observa que los tratamientos con relación en peso 1:8 tuvieron mayor porcentaje de nitrógeno, logrando un rango de 4,04 a 5,09. Este comportamiento es en debido a la cantidad de enzima superior en relación al exoesqueleto, permitiendo un mayor grado de desproteización

---

<sup>9</sup> Mohn Peter. *Structural studies on sclerotized insect cuticle. In: Chitin in Nature and Technology*, eds. R.A.A. Muzzarelli, Jeuniaux, C., and G.W. p. 26.

debido al área de contacto y al porcentaje de alta probabilidad de romper el enlace proteína-quitina.

En la figura No. 5 se observa el resultado de la obtención de quitina expresada en porcentaje de nitrógeno total en función de la temperatura utilizada en la etapa de desproteínización. Los valores altos de porcentaje de nitrógeno se obtuvieron en las muestras tratadas con temperatura de 70 °C, con la cual se logró un rango de porcentaje de nitrógeno comprendido entre 3,57 a 5,09.

Demostrando que la condición de 70 °C, en la etapa de desproteínización es la óptima para la enzima papaína, permitiéndose un mayor nivel de actividad catalítica en la reacción. Es importante considerar esta temperatura porque de ser excedida la enzima es desnaturalizada térmicamente reduciendo la actividad enzimática, y una menor temperatura a la óptima reduce la velocidad de reacción.

En la figura No. 6 se muestra la obtención de quitina expresada en porcentaje de nitrógeno total en función del pH de la solución en la etapa de desproteínización. Se observa que las muestras tratadas con solución buffer de pH 7 tuvieron un mayor porcentaje de nitrógeno total.

En general, las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH, la conformación de las proteínas está influida por las cargas eléctricas de los grupos ionizables presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos integrantes, los cambios significativos de pH pueden provocar la desnaturalización de las proteínas, tal como lo indica el libro de estructuras de proteínas y enzimas de la fundación Allende Connelly, en el caso de la papaína, es una peptidasa y la actividad enzimática se modifica entre reducidos márgenes de pH. Por tal razón

al modificar el pH de 6 a 7 se observa un cambio en la sensibilidad de la actividad enzimática<sup>10</sup>.

En la tabla VI se muestran los datos calculados para el análisis estadístico, utilizando las fórmulas de varianza ANOVA, con un nivel de confianza de  $\alpha = 0,05$ , con lo cual se comprueban las hipótesis del trabajo de investigación. Las tres hipótesis nulas fueron rechazadas, debido a que el valor de  $f$  calculada fue mayor al valor de  $f$  crítico en todos los casos, por lo tanto, experimentalmente existe variación en el rendimiento de obtención de quitina al variar los parámetros independientes en la etapa de desproteínización.

En la tabla VI de la sección de análisis estadístico se muestra también los resultados del diseño al azar que se realizó para observar el comportamiento de las muestras de quitina y la interacción de los factores variables independientes en la investigación. Se demostró estadísticamente que el efecto entre dos y tres factores no varía el rendimiento de quitina final, debido a que en todas las interacciones de factores independientes el valor de  $f$  calculada fue menor al valor de  $f$  crítico.

---

<sup>10</sup> MEDINA, Carlos. *Estructura de proteínas y enzimas*. <https://laboratoriosportatiles.cl/wp-content/uploads/2016/11/Libro-Proteinas-y-Enzimas2.pdf>. Consulta: 16 de enero de 2022.



## CONCLUSIONES

1. La obtención de quitina se logró a partir de los desechos del exoesqueleto de camarón mediante el método de hidrólisis proteica enzimática estableciendo el porcentaje de nitrógeno total.
2. La mayor efectividad en el proceso de desproteización se logró con el uso de la proporción 1:8 de exoesqueleto de camarón respecto a la cantidad de papaína.
3. El mayor porcentaje de nitrógeno en los tratamientos se logró con el parámetro de temperatura a 70 °C en la etapa de desproteización.
4. El mayor porcentaje de nitrógeno en los tratamientos se logró con el parámetro de pH en la etapa de desproteización.
5. La interacción de los tres factores experimentales temperatura, pH y relación enzima papaína/exoesqueleto de camarón no influye significativamente sobre el contenido de nitrógeno total de quitina.



## RECOMENDACIONES

1. Realizar previo al estudio de la obtención de quitina la limpieza del exoesqueleto de camarón para evitar desechos no deseados como patas, cabezas y residuos que pueda tener el crustáceo.
2. Utilizar una solución buffer en el proceso de desnaturalización que no exceda el pH de 8 ya que podría desnaturalizar la enzima papaína.
3. Utilizar una temperatura que no exceda los 70 °C para no desnaturalizar la enzima papaína y poder aprovechar su velocidad de reacción
4. Continuar con el estudio de la obtención de quitina por medio de hidrólisis enzimática y usarla en posibles aplicaciones como la obtención de quitosano.



## BIBLIOGRAFÍA

1. BAI, Yani; EIJSINK, Vicent; KIELAK, Anna M; VAN VEEN, Johannes A; DE BOER, Wietse. *Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria. Environmental Microbiology*, 18(1), 38–49. [en línea]. <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12545>>. [Consulta: 20 de mayo de 2021].
2. BANDARA, Subhani; DU, Hongbo; CARSON, Laura; BRADFORD, Debra; KOMMALAPATI, Raghava. *Agricultural and biomedical applications of chitosan-based nanomaterials. Nanomaterials*, 10(10), 1–31. [en línea]. <<https://doi.org/10.3390/nano10101903>>. [Consulta: 20 de mayo del 2021].
3. BAUTISTA, Jover. *Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. Process Biochemistry*, 37(3), 229–234. [en línea]. <[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00202-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00202-3)>. [Consulta: 20 de mayo de 2021].
4. CASADIDIO, Cristina; PEREGRINA, Dolores; GIGLIOBIANCO, Maria Rosa; DENG, Siyuan; CENSI, Roberta; DI MARTINO, Piera. *Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. Marine Drugs*, 17(6). [en línea]. <<https://doi.org/10.3390/md17060369>>. [Consulta: 23 de mayo de 2021].

5. DHANABALAN, Vignaesh, et. Al. *Characterization of chitin extracted from enzymatically deproteinized Acetes shell residue with varying degree of hydrolysis*. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117203. [en línea]. <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117203>>. [Consulta: 20 de mayo de 2021].
6. ESCOBAR, Diana; OSSA, Claudia; OSPINA, Alexander. *Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos*. *Scientia et Technica*, 18(1), 260–266. [en línea]. <<https://doi.org/10.22517/23447214.7555>>. [Consulta: 20 de mayo de 2021].
7. GARDNER, Howard; BLACKWELL, James. *Refinement of the structure of  $\beta$ -chitin*. *Biopolymers*. Cleveland, Ohio: 1975. 14, 1581–1595. 1 585 p.
8. GARZÓN, Andrea Gil; BEDOYA Mejía; CARDONA Jesús Millán; PAZ Licceth Benavides. *Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (Carica papaya L.), por medio de microondas con aplicación en el ablandamiento de la carne bovina 1*. Artículo Original. *J. Eng. Technol*, 1, 8–23. Colombia: 2014. 16 p.
9. GIL, Maritza; BEDOYA, Vanesa; MILLÁN, Leónidas; BENAVIDES, Licceth. *Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (Carica papaya L.* Artículo Original. *J. Eng. Technol*, 1, 18-25. Antioquia, Colombia: 2012. 8 p.

10. MEDINA, Carlos. *Estructura de proteínas y enzimas*. [en línea]. <<https://laboratoriosportatiles.cl/wp-content/uploads/2016/11/Libro-Proteinas-y-Enzimas2.pdf>>. [Consulta: 16 de enero de 2022].
11. MHON Peter. *Structural studies on sclerotized insect cuticle*. In: *Chitin in Nature and Technology*, eds. R.A.A. Muzzarelli, Jeuniaux, C., and G.W. Gooday. p. 21–28. New York: Plenum Press. 26 p.
12. PERCOT, Aline; VITON, Christophe; DOMARD, Alain. *Optimización de la extracción de quitina a partir de cáscaras de camarón*. *Bm025602K.Pdf*. 12–18. Villeurbanne, Francia: 2002. 18 p.
13. SOUSA, Vania; DE BARROS, Neto. *Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) a factorial study*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(4), 149–153. Maceió, Brazil: 2003. 5 p.
14. SHAIKH, Aatif Hassan; RANA, Majid; SHAIKH, Aashfa Hassan. *Ureteric pellet causing non-functioning kidney*. In *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* (Vol. 15, Issue 9). [en línea]. <<https://doi.org/09.2005/JCPSP.580581>>. [Consulta: 23 de mayo de 2021].
15. YOUNES Islem. *Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications*. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. [en línea]. <<https://doi.org/10.3390/md1303113>. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>>. [Consulta: 23 de mayo de 2021].

16. YUSOF, Nealda; WEE, Aileen; YONG, Lim; KHOR, Eugene. *Flexible chitin films as potential wound-dressing materials: Wound model studies. Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 66(2), 224–232. [en línea]. <<https://doi.org/10.1002/jbm.a.10545>>. [Consulta: 23 de mayo de 2021].

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Presupuesto de investigación

<b>Gastos</b>	<b>Descripción</b>	<b>Fuente</b>	<b>Rubro Q</b>
Recursos disponibles	Computadora	Personal	-
	Teléfono celular		-
Recursos necesarios	Materia Prima:		-
	Desechos de exoesqueleto de camarón	Marisquería en el departamento de San Marcos	150
	Enzima papaína	Personal	540
	Agua desmineralizada, Salvavidas	Varios	15
	Peróxido de hidrógeno. Merck		374
	Ácido Clorhídrico		400
	Ácido sulfúrico		425
	Hidróxido de sodio		300
Equipo de protección persona	Guantes de nitrilo y térmicos	Personal	-
	Mascarilla		-
	Bata de laboratorio		-
	Botas industriales		-
	Lentes de protección		-
Material y equipo		Varios	500
<b>Valor Neto</b>			<b>2 704</b>

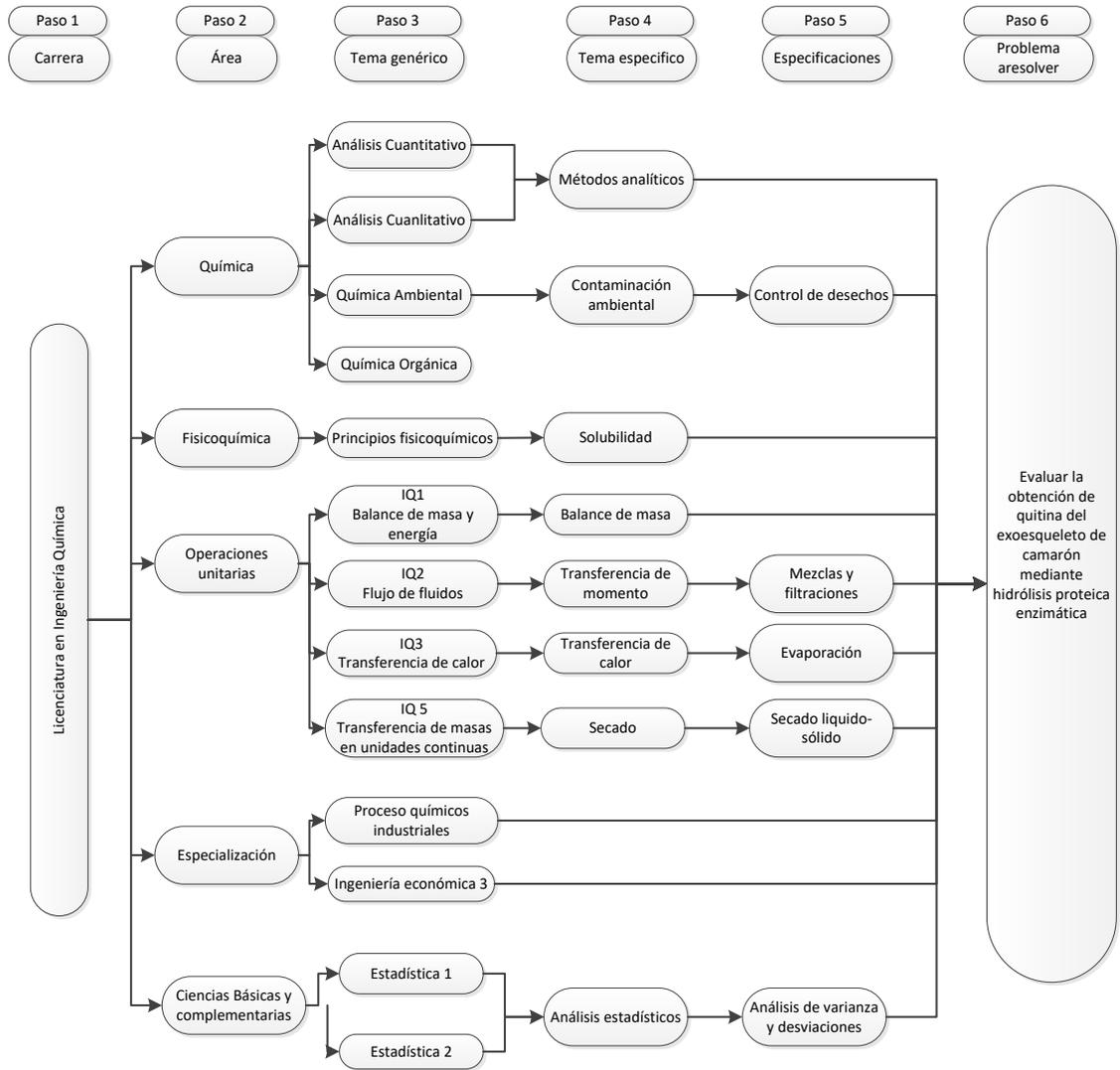
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. **Diagrama de Gantt, cronograma de actividades**

<b>Fase</b>	<b>Actividad</b>	<b>Abril</b>	<b>Mayo</b>	<b>Junio</b>	<b>Julio</b>	<b>Agosto</b>	<b>Septiembre</b>
<b>Aprobación del tema de investigación</b>	Aprobación del protocolo en el curso de seminario						
	Ingreso de papelería a la escuela de ingeniería química						
	Aprobación del tema de investigación por el revisor						
	Aprobación del tema de investigación por la terna evaluadora						
<b>Preparación de elementos necesarios</b>	Coordinación con áreas involucradas						
	Preparación de equipo y reactivos						
	Definición de fechas de inicio de pruebas						
	Recolección de materia prima						
	Preparación de materia prima						
<b>Recolección de datos</b>	Ejecución de experimentación						
	Obtención de datos						
	Tabulación de datos						
<b>Análisis e interpretación de datos</b>	Análisis estadístico						
	Discusión de resultados						
	Evaluación de objetivos logrados						
<b>Finalización del proyecto</b>	Entrega final						

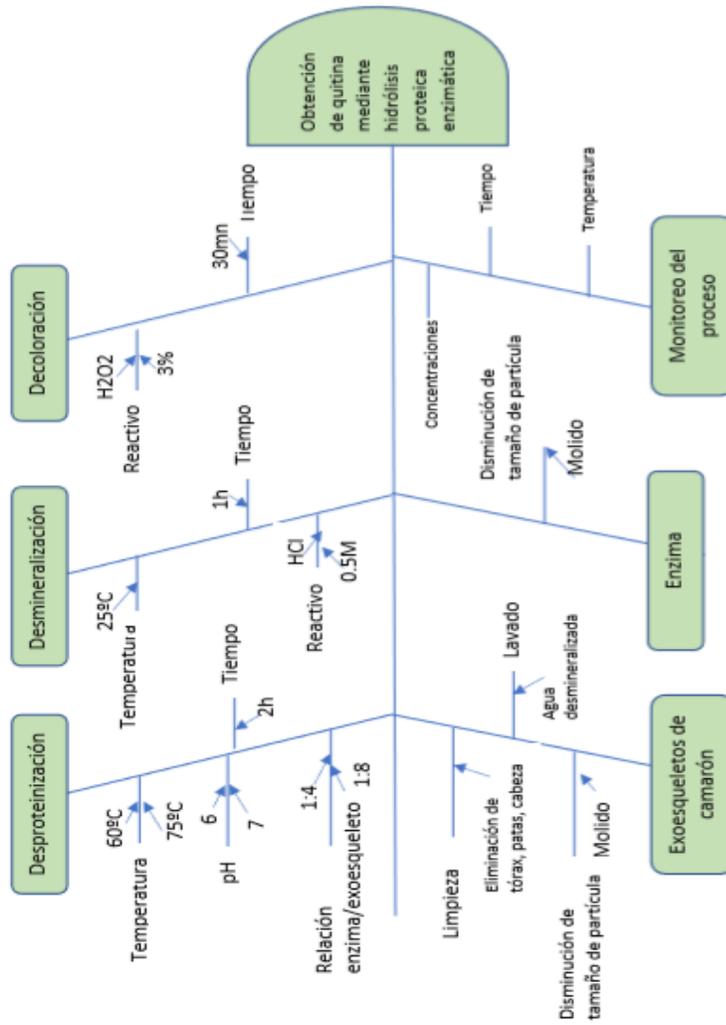
Fuente: elaboración propia.

### Apéndice 3. Requisitos académicos



Fuente: elaboración propia.

#### Apéndice 4. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. **Datos obtenidos en la etapa de desproteización**

No.	Repetición	Relación g/g	pH	Temperatura °C	Peso de tara g	Peso final g	Producto final g
1	1	2/0,5	7	70	108,96	109,82	0,86
	2		7	70	109,19	110,12	0,93
	3		7	70	115,69	116,57	0,88
2	1	2/0,5	6	70	106,32	107,28	0,96
	2		6	70	115,69	116,59	0,90
	3		6	70	109,05	110,02	0,97
3	1	2/0,5	7	60	115,84	116,70	0,86
	2		7	60	98,30	99,22	0,92
	3		7	60	119,39	120,28	0,89
4	1	2/0,5	6	60	110,63	111,55	0,92
	2		6	60	107,41	108,30	0,89
	3		6	60	106,45	107,38	0,93
5	1	3/0,375	7	70	100,17	101,11	0,94
	2		7	70	104,40	105,29	0,89
	3		7	70	112,53	113,41	0,88
6	1	3/0,375	6	70	107,80	108,62	0,82
	2		6	70	113,68	114,56	0,88
	3		6	70	119,70	120,64	0,94
7	1	3/0,375	7	60	109,50	110,39	0,89
	2		7	60	106,23	107,10	0,87
	3		7	60	104,53	105,39	0,86
8	1	3/0,375	6	60	106,65	107,56	0,91
	2		6	60	106,11	106,96	0,85
	3		6	60	104,85	105,78	0,93

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. **Datos obtenidos en la etapa de desmineralización**

No.	Repetición	Relación	HCl ml	Peso final g	Peso producto final g
1	1	2/0,5	10	112,53	0,83
	2		10	107,80	0,89
	3		10	113,68	0,84
2	1	2/0,5	10	119,70	0,91
	2		10	106,32	0,85
	3		10	115,69	0,93
3	1	2/0,5	10	109,05	0,82
	2		10	115,84	0,87
	3		10	111,52	0,84
4	1	2/0,5	10	120,20	0,88
	2		10	105,48	0,82
	3		10	113,40	0,88
5	1	3/0,375	10	105,60	0,86
	2		10	107,38	0,83
	3		10	101,11	0,82
6	1	3/0,375	10	105,29	0,79
	2		10	110,12	0,86
	3		10	116,57	0,91
7	1	3/0,375	10	107,28	0,86
	2		10	116,59	0,84
	3		10	104,16	0,81
8	1	3/0,375	10	106,40	0,86
	2		10	108,94	0,83
	3		10	114,60	0,89

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. **Datos obtenidos en la etapa de decoloración**

No.	Repetición	Relación	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ml	Peso final g	Quitina g
1	1	2/0,5	10	106,45	0,61
	2		10	100,17	0,72
	3		10	104,40	0,65
2	1	2/0,5	10	108,53	0,76
	2		10	111,52	0,70
	3		10	109,20	0,79
3	1	2/0,5	10	110,48	0,56
	2		10	113,40	0,67
	3		10	105,60	0,71
4	1	2/0,5	10	105,29	0,62
	2		10	110,12	0,63
	3		10	116,57	0,72
5	1	3/0,375	10	107,28	0,74
	2		10	109,50	0,76
	3		10	112,36	0,72
6	1	3/0,375	10	108,56	0,53
	2		10	115,20	0,69
	3		10	109,50	0,71
7	1	3/0,375	10	113,60	0,69
	2		10	108,48	0,72
	3		10	110,86	0,63
8	1	3/0,375	10	109,46	0,68
	2		10	114,60	0,64
	3		10	113,66	0,72

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. **Datos obtenidos del porcentaje de nitrógeno total**

No.	Repetición	Relación g/g	pH	Temperatura °C	% N	
1	1	1:4	7	70	3,95	
	2				4,02	
	3				3,88	
2	1		6		3,57	
	2				3,73	
	3				3,69	
3	1	1:4	7	60	3,70	
	2				3,96	
	3				3,81	
4	1		6		6	3,45
	2					3,00
	3					3,16
5	1	1:8	7	70	4,83	
	2				4,70	
	3				5,09	
6	1		6		6	4,48
	2					4,76
	3					4,62
7	1	1:8	7	60	4,35	
	2				4,68	
	3				4,04	
8	1		6		6	3,98
	2					4,55
	3					4,10

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. **Ilustración del proceso experimental de obtención de quitina**



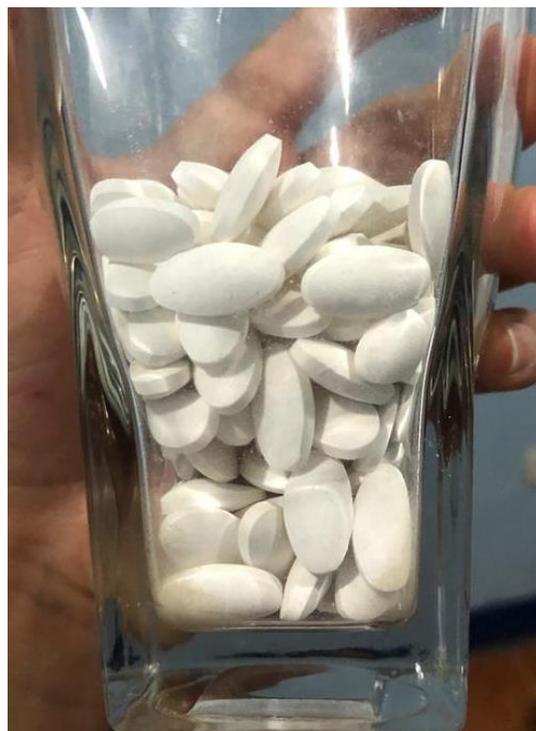
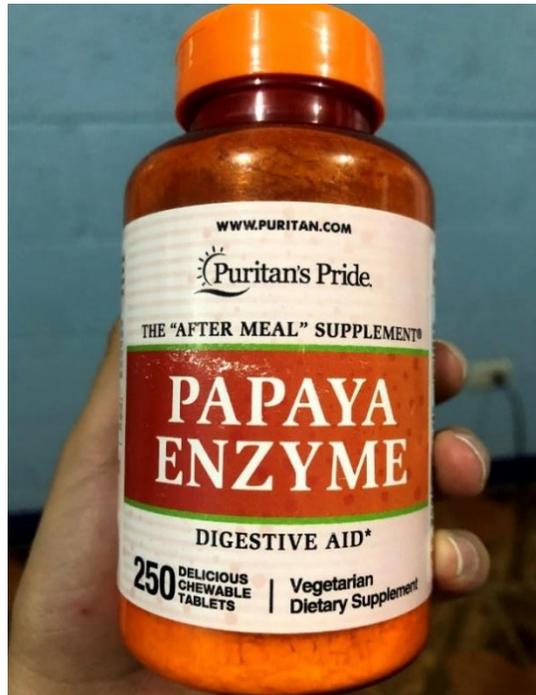
Continuación de apéndice 9.



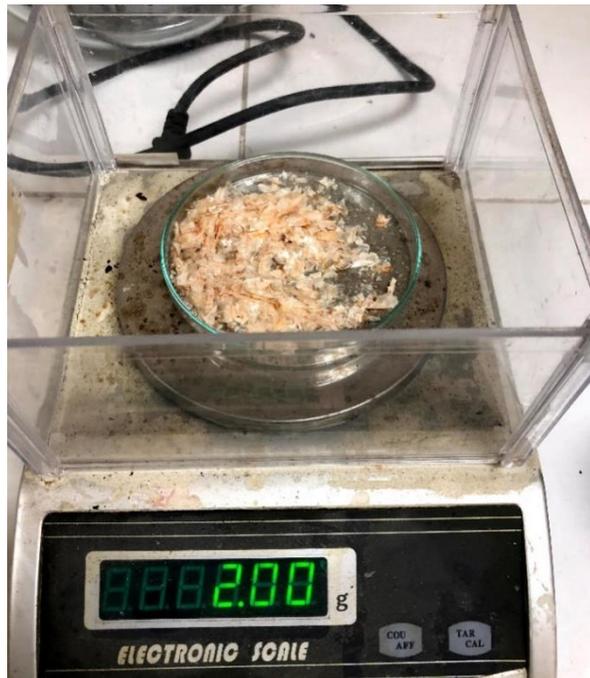
Continuación de apéndice 9.



Continuación de apéndice 9.



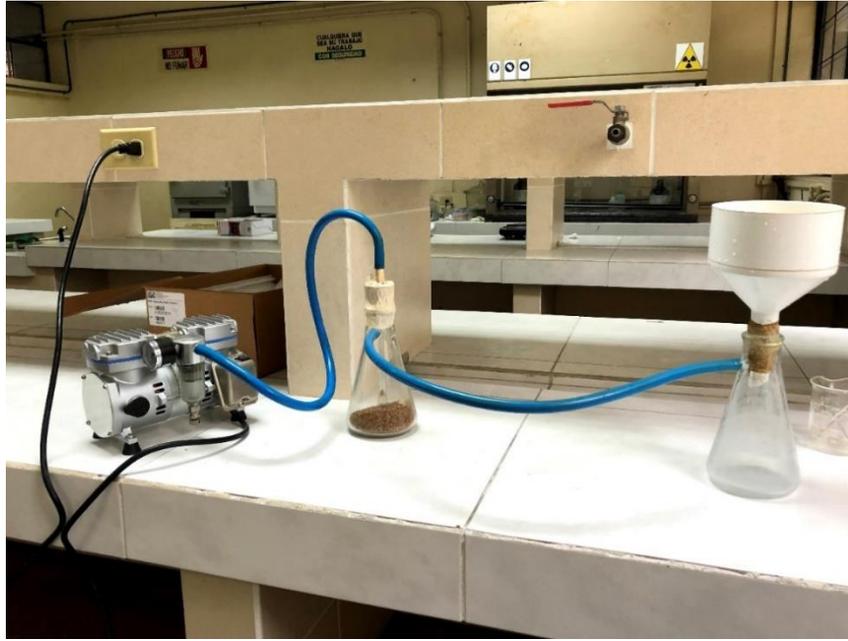
Continuación de apéndice 9.



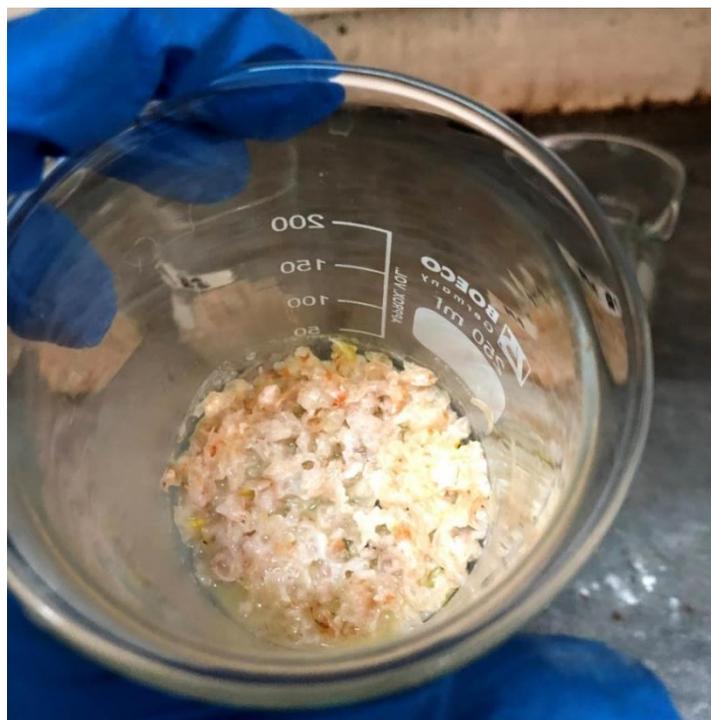
Continuación de apéndice 9.



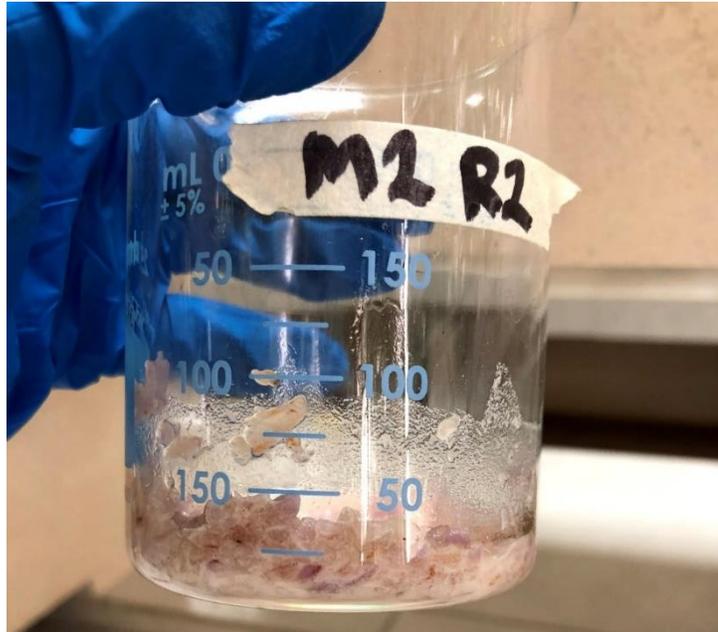
Continuación de apéndice 9.



Continuación de apéndice 9.



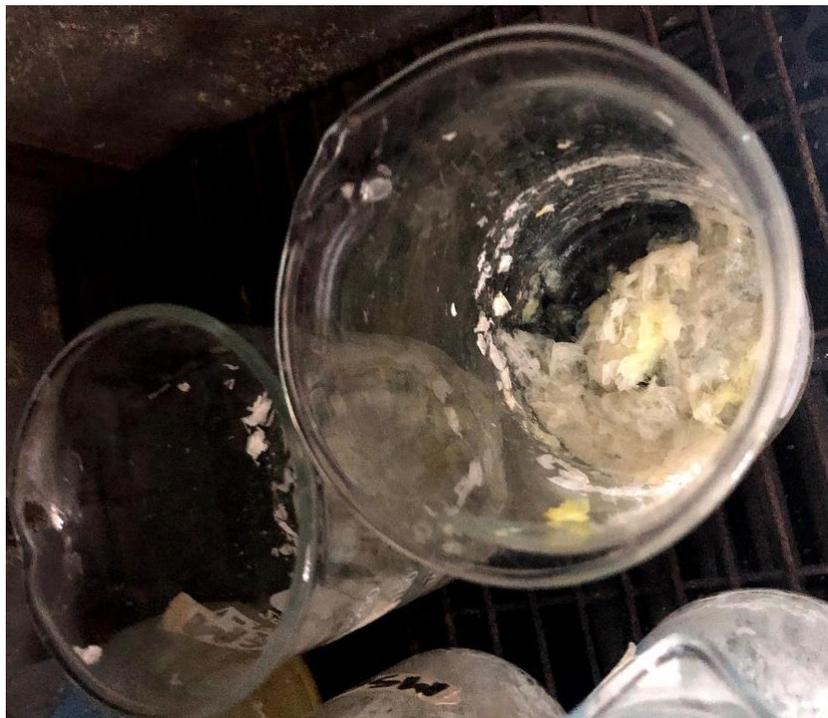
Continuación de apéndice 9.



Continuación de apéndice 9.



Continuación de apéndice 9.



Fuente: elaboración propia.