



Obtención, caracterización y aplicación de Quitosano en alimentos industrializados para consumo de ganado lechero

Obtaining, characterizing and application of chitosan in industrialized foods for dairy cattle consumption

Obtenção, caracterização e aplicação de quitosana em alimentos industrializados para consumo de gado leiteiro

Sonia Elisa Peñafiel-Acosta ^I
sonia.penafiel@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-1658-8596>

Guido Gonzalo Brito-Zúñiga ^{II}
guido.brito@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-3467-9309>

Carmen Alicia Zavala-Toscano ^{III}
alicia.zavala@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-0720-3479>

Vanessa Pamela Pérez-Pazmiño ^{IV}
vperez@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-0275-2295>

Correspondencia: sonia.penafiel@esPOCH.edu.ec

Ciencias sociales y políticas
Artículo de investigación

***Recibido:** 05 de julio de 2020 ***Aceptado:** 20 de agosto 2020 * **Publicado:** 07 de septiembre de 2020

- I. Doctora en Química. Master en Protección Ambiental. Docente Investigadora Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Doctor en Química. Master en Protección Ambiental. Docente Investigador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Bioquímica Farmacéutica. Técnica del laboratorio de Bromatología. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador
- IV. Estudiante de la Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

Resumen

El quitosano es un polímero natural que ha sido desaprovechado y su importancia radica en los diferentes usos que se le puede atribuir. En el presente estudio se utiliza quitosano extraído mediante hidrólisis ácido-base, el mismo es caracterizado mediante cromatografía de gases para valorar su composición aminoacídica; para su posterior aplicación en un alimento balanceado de referencia. Comparando el contenido nutricional aminoacídico, los balanceados sin quitosano (t0) y enriquecido con quitosano (t1), en el mismo se evidencia el incremento porcentual de ciertos aminoácidos. En la metodología de estudio el t1 es el tratamiento al que se aplica quitosano al 1.5 % en relación al alimento, es decir 3g de quitosano en 200g de balanceado para dosificar la cantidad, se debe tomar en cuenta los siguientes estándares mín. De proteína 13%, humedad máx 13%, grasa mín 2.5%, máx. Fibra cruda 15%, máx. Cenizas 8% según datos bibliográficos.

El análisis de su composición nutricional se realizó por espectroscopia ir – cercano (nirs) y por cromatografía de gases para evaluar la composición aminoacídico del alimento enriquecido. Evidentemente el t1 frente al t0 presenta un incremento en porcentaje en aminoácidos esenciales como: metionina, lisina, histidina fenilalanina, siendo estos responsables de diversos procesos como la síntesis de proteínas de los tejidos y la leche, o la síntesis de otros metabolitos corporales. El incremento de metionina fue del 0.63% y de lisina de 2.6% estos aminoácidos se podrían relacionar con el rendimiento del hato para producir concentraciones máximas de proteína de la leche.

Palabras Claves: quitina; quitosano; derivatización; aminoácidos esenciales

Abstract

Chitosan is a natural polymer that has been wasted and its importance lies in the different uses that can be attributed to it. In the present study, chitosan extracted by acid-base hydrolysis is used, it is characterized by gas chromatography to assess its amino acid composition; for subsequent application in a reference balanced food. Comparing the nutritional amino acid content, those balanced without chitosan (t0) and enriched with chitosan (t1), the percentage increase in certain amino acids is evidenced. In the study methodology, t1 is the treatment to which 1.5% chitosan is applied in relation to the food, that is, 3g of chitosan in 200g of balance to dose the amount, the following min. Standards must be taken into account. Protein 13%, humidity max 13%, fat min 2.5%, max. Crude fiber 15%, max. Ashes 8% according to bibliographic data.

The analysis of its nutritional composition was carried out by near-ir spectroscopy (nirs) and by gas chromatography to evaluate the amino acid composition of the enriched food. Obviously, t1 versus t0 presents an increase in percentage in essential amino acids such as: methionine, lysine, histidine phenylalanine, these being responsible for various processes such as the synthesis of proteins in tissues and milk, or the synthesis of other body metabolites. The increase in methionine was 0.63% and lysine 2.6%. These amino acids could be related to herd performance to produce maximum concentrations of milk protein.

Keywords: chitin; chitosan; derivatization; essential amino acids

Resumo

Chitosan is a natural polymer that has been wasted and its importance lies in the different uses that can be attributed to it. In the present study, chitosan extracted by acid-base hydrolysis is used, it is characterized by gas chromatography to assess its amino acid composition; for subsequent application in a reference balanced food. Comparing the nutritional amino acid content, those balanced without chitosan (t0) and enriched with chitosan (t1), the percentage increase in certain amino acids is evidenced. In the study methodology, t1 is the treatment to which 1.5% chitosan is applied in relation to the food, that is, 3g of chitosan in 200g of balance to dose the amount, the following min. Standards must be taken into account. Protein 13%, humidity max 13%, fat min 2.5%, max. Crude fiber 15%, max. Ashes 8% according to bibliographic data.

The analysis of its nutritional composition was carried out by near-ir spectroscopy (nirs) and by gas chromatography to evaluate the amino acid composition of the enriched food. Obviously, t1 versus t0 presents an increase in percentage in essential amino acids such as: methionine, lysine, histidine phenylalanine, these being responsible for various processes such as the synthesis of proteins in tissues and milk, or the synthesis of other body metabolites. The increase in methionine was 0.63% and lysine 2.6%. These amino acids could be related to herd performance to produce maximum concentrations of milk protein....

Palavras-chave: quitina; quitosana; derivação; Aminoácidos essenciais

Introducción

En los últimos años, los polímeros naturales han recibido una mayor atención como alternativa a los polímeros sintéticos, con el fin de combinar la fabricación de productos manufacturados, con la protección del medio ambiente, la reducción de los costos de materiales y el reciclado de

residuos (Israel Barros, 2015). El aumento de la producción de camarón de cultivo ha dado lugar a una mayor cantidad de residuos, lo que conlleva a nuevos problemas ambientales (AL-SAGHEER, AL-SUGHAYER, MUSLIM, & ELSABEE, 2009). Según (Colina, 2014) manifiesta que debido al crecimiento que han tenido estos productos de mar, se busca reducir el impacto ambiental que ocasionan los residuos orgánicos provenientes de la inadecuada disposición de los desperdicios del procesamiento pesquero, los cuales son vertidos al mar sin tratamiento previo. Estos residuos sólidos de origen marino tienen un gran potencial de aplicación en las diferentes industrias; como por ejemplo en la industria farmacéutica y de alimentos, entre otras (Israel Barros, 2015). Según (Israel Barros, 2015) la carne del camarón es separada de los caparazones, y los desechos de este procesamiento se componen principalmente del cefalotórax, caparazón y en conjunto representan entre el 50% y 70% de todo el camarón. (CAHÚ, y otros, 2012). Surge la propuesta de la estandarización del proceso de extracción de quitosano como una alternativa de solución a lo anteriormente mencionado. Ecuador actualmente realiza un cultivo de camarón que ha consolidado como el primer sector acuícola organizado, con una fuerte vocación para la comercialización de sus distintos productos hacia los mercados internacionales y nacionales. La producción de camarón en este último año presentó una disminución debido a la enfermedad de muerte temprana. Los protocolos para el proceso de extracción de quitina y quitosano a partir de caparazón de crustáceos, constan de al menos cuatro etapas que incluyen la preparación de las muestras, desproteinización, desmineralización, y desacetilación, usando reactivos químicos a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos de reacción. Se debe tener en cuenta que el contenido de quitina, proteínas, minerales y carotenoides presentes en las cáscaras de camarón dependen de factores como la especie, la parte del organismo que se escogerá para trabajar, el estado de nutrición y el ciclo reproductivo. Al respecto, (MEYER & BLIGH, 1981.) (Ayala, 2014) realizan el estudio de los rendimientos de quitina y quitosano realizando variaciones en concentraciones de reactivos y tiempos de reacción para identificar el mejor tratamiento posible; ya que estos factores son fundamentales para la calidad del producto. Mediante las diferentes investigaciones se tiene que la quitina es un polisacárido presente ampliamente en la naturaleza y como segundo biopolímero más abundante después de la celulosa. La cáscara de camarón tiene un alto contenido de quitina (14 a 35 %), del cual se obtiene quitosano. El quitosano es un polisacárido con muchos usos en la industria de la agricultura, biomedicina, alimentos, en tratamientos de agua residuales y potabilización, en cosmético, entre otros. Esto debido a que posee grupos aminos libres que le infieren mejores propiedades químicas y físicas (RUIZ, y

otros, 2013.) De igual forma, (JIANG, CHEN, & ZHONG, 2003) demostró el efecto del quitosano en el proceso de clarificación de aguas contaminadas con residuos hidrocarburíferos, demostrando así la capacidad del quitosano como agente biocoagulante bajo condiciones de altos niveles de contaminación. (Volkers, 2003) determinó que varias de las propiedades de la quitina y sus derivados (quitosano) están estrechamente relacionados con su grado de N-acetilación. Este es el parámetro fundamental que influye en las propiedades y comportamientos de los polímeros. La pureza del polisacárido puede ser cuantificada por su grado de N-acetilación, es decir, a mayor grado de acetilación mayor será la pureza del quitosano. El principal objetivo de la presente investigación consiste en estandarizar el proceso de obtención de quitosano a partir de las mezclas de exoesqueleto de camarón por medio de la desmineralización, desproteinización, desacetilización y determinación del grado de N-acetilación a partir de titulación potenciométrica de las muestras de quitosano.

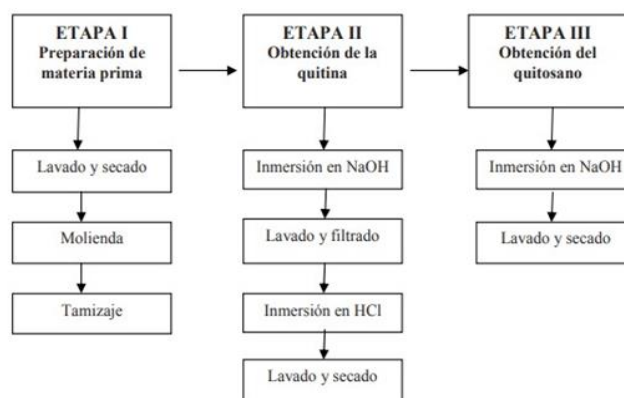
Metodología

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias, ESPOCH, localizada en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, a una altura de 2750 msnm con una temperatura promedio de 12 °C. En el presente Laboratorio se cuenta con el equipo Cromatógrafo de gases de marca Perkin Elmer clarus 580, el mismo que nos permite realizar el análisis aminoácido por derivatización y poder evaluar la calidad proteica del T0 frente a T1.

Obtención y caracterización del quitosano

La extracción del Quitosano fue realizada siguiendo el protocolo establecido por (Diana Marcela Escobar Sierra, 2013).

Tabla 1: Metodología para la obtención de la quitina y quitosano.



Fuente. (Diana Marcela Escobar Sierra, 2013)

Preparación de la materia prima.

Se realizó la obtención de la cascara de camarón, recolectados en industrias procesadoras de productos marinos y en restaurantes. Cada cáscara se lavó con agua potable para retirar la materia orgánica adherida, se secó en una estufa a 40°C por 2 horas y finalmente se trituró y tamizó hasta obtener tamaños de partícula entre 0,8 mm y 1,5 mm.

Desproteínización y desmineralización.

Para la desproteínización se usó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 3,5%, en una relación de sólido: líquido 1:10 a 50 °C bajo agitación constante por 2 horas; y para la desmineralización se usó una solución de ácido clorhídrico (HCl) 2N en una proporción sólido: líquido 1:5 por 90 minutos a temperatura ambiente. La quitina obtenida en esta etapa fue lavada y secada en estufa por 2 horas a 50 °C (K. Heller, 1959).

Desacetilación de la quitina obtenida con el fin de hidrolizar los grupos amino presentes y obtener así el quitosano. (h. F. Mark, 1985)

Para ello se utilizó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 50%, en una relación sólido: líquido 1:10 a una temperatura de 100 °C con agitación constante por 1 hora. Finalmente, la muestra del biopolímero obtenida se lavó con agua destilada, se filtró y se secó en una estufa por 60 minutos a 50 °C. (A.O.A.C., 1984.)

Aplicación de quitosano en el balanceado

Para poder realizar la investigación se decidió comprar una marca comercial de balanceado para ganado bovino lechero el cual será usado en dos tratamientos, el primero que no tendrá absolutamente nada de quitosano (T0) y el segundo que es el balanceado comercial más quitosano (T1). (Brugnerotto, (2001)

El primer balanceado sin cambio alguno se sabe que no utilizan aditivos en su formulación solo materias primas de alta inclusión.

El segundo tratamiento esta dado por el mismo balanceado comercial, pero añadiendo quitosano (T1) el cual está dado al 1.5 % en relación al alimento. (Fernández, 2007)

Por lo cual el T1 como muestra posee 3g de quitosano en 200g de balanceado ya que si se suministra una cantidad superior de aditivo podría alterar los niveles de proteína del concentrado y no ser digerible para el animal, puesto que en la dieta del balanceado para ganado bovino lechero se debe tomar en cuenta los siguientes estándares:

Tabla 1: Tabla de cantidades mínimas de nutrientes en balanceados.

NUTRIENTE	CANTIDAD (%)
Mínimo de proteína	14 %
Humedad	13 %
Grasa	3 %
Máximo fibra	5 %
Máximo ceniza	10 %

Determinación del análisis proximal

La caracterización nutricional se realizó a través de la empresa AVIPAZ quien dispuso el equipo NIRS – DA 7250 de marca PERTEN, el mismo que usa un sensor con una excelente relación señal/ruido y sensibilidad; además utiliza un detector indio-galio y Arsenio con un Rango de longitud de onda: 950-1650 nm. El equipo recoge más de 20 espectros por segundo, mientras la muestra gira, trabaja utilizando NETPLUS un software basado en la WEB. El equipo Infrarrojo cercano (NIRS) el mismo que trabaja con curvas de calibración para generar datos exactos y precisos (PhD. Astrid Rivera Rivera, 2017), mediante espectroscopia IR-cercano, analizó los alimentos considerados T0 y T1 con el fin que la empresa desarrolle balanceados bovinos en la fase de crecimiento se ve la iniciativa mediante el uso de subproductos como es el caso de la cascara de camarón, con el fin de tener costos bajos en las materias primas que se usan en producción. (Alomar, 1997)

Determinación de aminoácidos

Las muestras fueron analizadas utilizando kits fisiológicos EZ: faast para GC-FID (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.); los presentes kits permitieron dar una preparación a la muestra para su posterior análisis. Cada una de las muestras tanto el tratamiento cero como el tratamiento 1 fueron analizados directamente; todos los pasos, incluida la limpieza de muestras, la derivación y el análisis se realizaron como se describe la tabla del manual del equipo; no se realizó ninguna preparación de muestra adicional antes de EZ: Análisis de faast. Todos los análisis se realizaron en el Equipo de Marca PERKIN ELMER CLARUS 580 con un detector de ionización de llama (FID) e inyección manual (1 µL) usando una jeringa SGE de 1 µL (SGE Europe Ltd., Reino Unido: <http://www.uk@sge.com>). Se trabaja con una columna GC capilar Zebron ZB-AAA de 10 mx 0,25 mm. El programa de temperatura del horno de la columna es

de 32 °C por minuto de 110 a 320 °C. La temperatura del detector FID fue de 320 °C y se inyectó 1 µL a una temperatura de inyección de 250 °C y un nivel dividido de 1:2. El gas portador H₂ a una presión de 7 psi (un caudal de 1 ml / min). Será necesario ajustar el caudal, el ajuste de presión y las relaciones divididas, según las especificaciones del instrumento de GC mediante la utilización de un software denominado CHOMERA el mismo que permite visualizar las condiciones necesarias para empezar el trabajo de análisis; las condiciones de análisis del estándar se basaron en la descripción del manual del Kit, el trabajo experimental se realiza en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias.

La determinación de aminoácidos parte de la preparación del medio de elución con reactivos que se encuentran en la bandeja de reactivos dentro del kit que además contiene una rejilla para viales, una rejilla para pipetas y una sección para puntas y viales absorbentes. Para acelerar la preparación de la muestra, se recomienda organizar la estación de trabajo.

Preparación del medio de elución

El volumen del medio de elución preparado depende del número de muestras que se analizarán durante el día (200 ul / muestra) por lo cual se debe realizar minutos antes de ejecutar el análisis. La combinación del medio de elución consiste en colocar tres partes de reactivo 3a (Hidróxido de Sodio 0.33N) con 2 partes de reactivo 3b (n-propanol 80%; 3- picolina 20%).

Preparación de muestras por spe y derivatización

Pipetear 100 ul de muestra problema y 100 uL de reactivo 1 (Norvalina 0.2mM; propanol 10%; Ácido clorhídrico 20mM) en cada vial que se utilizara para la preparación de la muestra, conectar una punta absorbente a una jeringa de 1.5 ml y aflojar el pistón para sumergir la punta dejando que la solución pase a través de la punta absorbente, halar lentamente del pistón de la jeringa, en pequeños pasos. Posterior a ello pipetear 200 uL de reactivo 2 (n-propanol 30%) en el mismo vial y pasar la solución LENTAMENTE a través de la punta del absorbente dentro del cilindro de la jeringa. Drenar el líquido del lecho absorbente tirando aire a través de la punta; colocar 200 ul del medio de elución en el vial que se encuentra la muestra y halar el pistón de la jeringa de 0,6 ml hasta la mitad del cilindro, humedecer la punta absorbente con el medio de elución y observar como sube el líquido a través de las partículas absorbentes para luego expulsar las partículas líquidas y absorbentes de la punta dentro del vial de preparación de muestra.

Con la ayuda de un microdispensador (dialamatico drummond) transferir 50 ul de reactivo 4 (cloroformo 60%; cloroformiato de propilo 20%; Isooctano 20%), al vial de preparación de muestra y emulsionar el líquido en el vial agitándolo repetidamente aproximadamente de 5-8

segundos. El paso de emulsificación es efectivo cuando el contenido del vial se vuelve lechoso. permita que las reacciones continúen 1 minuto o más. La emulsión se separará gradualmente en dos capas, se transfiere con el microdispensador 100 ul de reactivo 5 y mezclar aproximadamente 5 segundos y finalmente se pipetea 100ul de reactivo 6 (ácido clorhídrico 1N), observando la separación de la capa orgánica que contiene derivados de aminoácidos misma que va a ser pipeteada y transferida a un vial para proceder a la inyección manual en el equipo obteniendo los diferentes espectros de absorción.

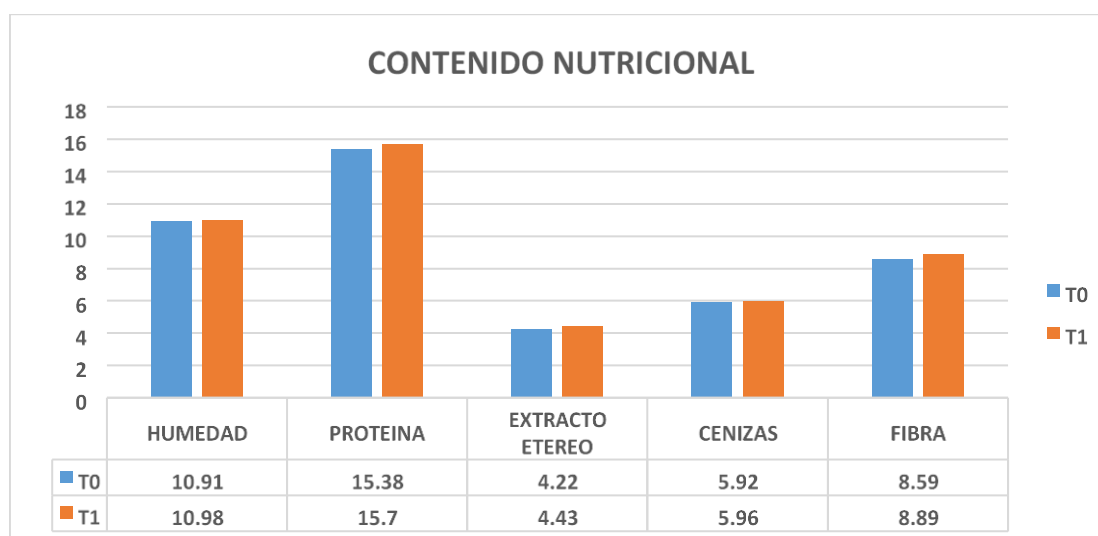
Resultados y análisis

Según (Castro & Kebreau, 2011) indica que un alimento destinado para alimentación animal lo define el cliente (empresas de producción y explotación ganadera, fincas u otros) de acuerdo con los objetivos trazados por el productor, ya siendo producción animal de leche o de carne u otro rubro de producción. Para ello, (Amerling, 1998) clasificó de acuerdo a fuente de nutrientes y energía que proporciona el alimento. Alimentos fibrosos: Son aquellos alimentos con menos del 20% de proteína cruda (PC) y más de 20% de fibra cruda (FC) mientras, los alimentos proteicos contienen más de 20% de PC y menos de 20% de FC, pero, los energéticos contienen menos de 20% de PC y menos de 20% de FC.

Caracterización de los biopolímeros obtenidos

La caracterización nutricional obtenida mediante análisis proximal permite evaluar parámetros de calidad Grafico N°1.

Gráfico 1: Valoración nutricional de los tratamientos.

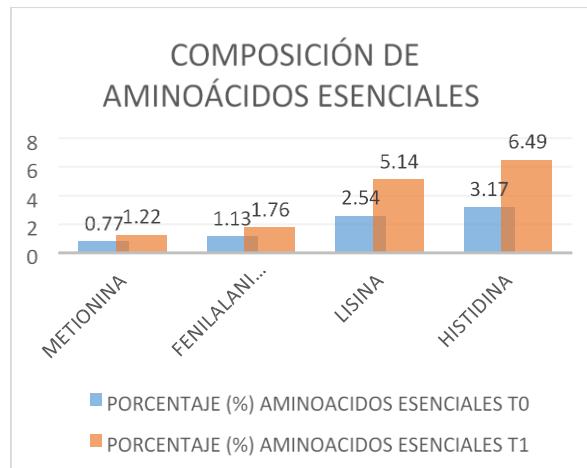


Fuente: Autores

En el Gráfico 1 los resultados de la evaluación nutricional de los tratamientos: T0 y T1 fueron evaluados por metodología IR-cercano, evidentemente se ve un incremento dentro de los parámetros de análisis proximal, la diferencia en porcentaje de los componentes nutricionales entre los tratamientos difiere entre el 0,04% - 0,32%.

Cuantificación de aminoácidos esenciales

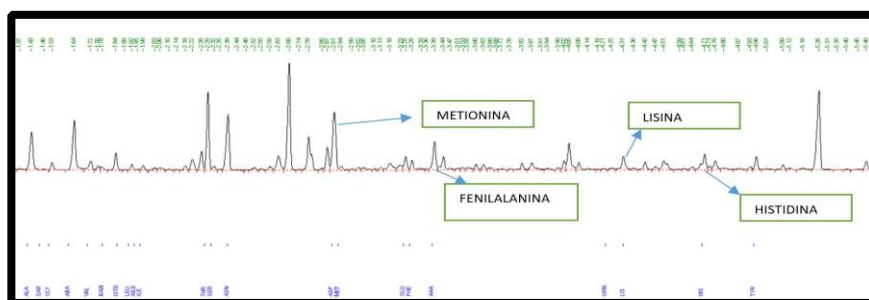
Gráfico 2: Composición de aminoácidos esenciales



Fuente: Autores

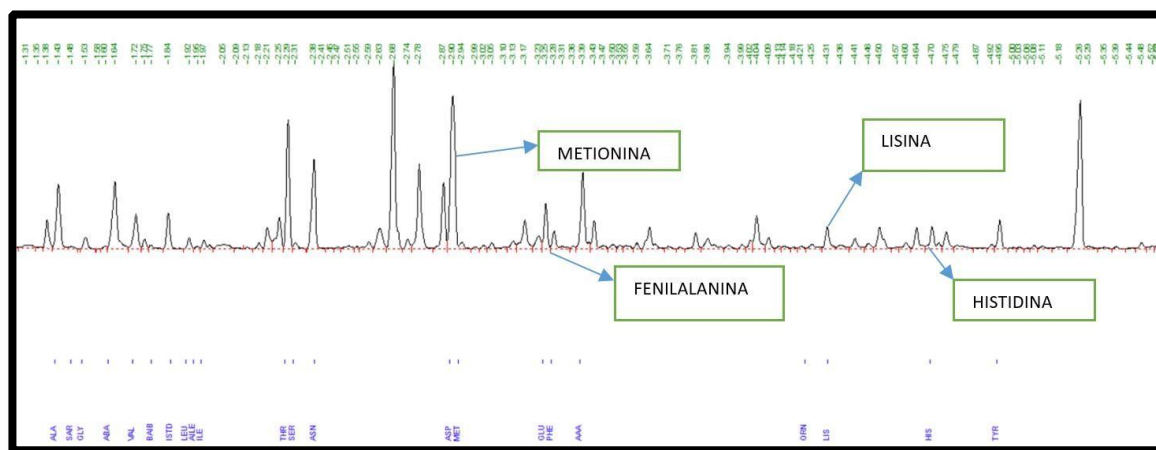
En el Gráfico 2, se evidencia un incremento significativo en los tratamientos, siendo el aminoácido esencial con mayor incremento la Histidina el porcentaje de incremento es de 3,32; la presencia de los aminoácidos esenciales atribuye el contenido nutricional del alimento para consumo animal. Los Gráficos N°3. y N°4, evidencia el registro gráfico obtenido en un medio absorbente, que muestra la separación de sustancias mediante una cromatografía de gases. El método utilizó ciertos estándares, componentes químicos que permitieron obtener patrones visibles, picos que reflejan la separación física de los componentes de una mezcla.

Gráfico 3: Cromatograma de aminoácidos por derivatización en t0.



Fuente: Laboratorio de Bromatología-Nutrición Animal – F.C.P- ESPOCH

Gráfico 4: Cromatograma de aminoácidos por derivatización en t1.



Fuente: Laboratorio de Bromatología-Nutrición Animal – F.C.P- ESPOCH

Discusión de resultados y conclusiones

Los espectros obtenidos representan cada uno de los aminoácidos con su correspondiente tiempo de retención al cuál estos fueron detectados, el cromatograma presenta aminoácidos esenciales y no esenciales con sus derivados, la importancia de la presente Investigación radica en el incremento de los principales aminoácidos esenciales como metionina, fenilalanina, lisina e histidina; de tal manera que los microorganismos del rumen en los bovinos requieren de proteínas degradables, los animales requieren de aminoácidos para su nutrición. Según (GANADERO, 2018) señalan que los rumiantes requieren cantidades esenciales para su óptimo crecimiento y lactación. La investigación de estudio permitió evidenciar el incremento en porcentaje de algunos aminoácidos esenciales como: Metionina 0,45%; Fenilalanina 0,43%; Lisina 2,6%; Histamina 3,32%, todos los aminoácidos esenciales detectados estarían participando en diversos procesos como la síntesis de proteínas de los tejidos y la leche, o la síntesis de otros metabolitos corporales. La mayoría de aminoácidos sirven como precursores para la gluconeogénesis y todos pueden ser convertidos a ácidos grasos.

Por lo tanto, se puede utilizar el quitosano como aditivo dentro de la formulación del alimento balanceado ya que puede optimizar la función ruminal y rendimiento de la proteína microbiana. Sin embargo, la dosificación con cantidades adecuadas del aditivo ayudara alcanzar los niveles deseados de nitrógeno ureico en la leche; la dosificación debe ser adecuada para comprobar su efecto nutricional, en virtud de que el incremento de la dosis lo convertiría en un alimento toxico para el animal siendo anti nutricional al efecto deseado.

Además, el incremento de los aminoácidos metionina y de lisina ayudara a producir concentraciones máximas de proteína en la leche; tomando en consideración según menciona

(Anavitarte, 1970) advierte que la suplementación con aminoácidos dentro de la dieta debe tener un manejo cuidadoso, pues está en juego la producción y reproducción de cada animal, que requieren dietas diferenciales.

Referencias

1. Alomar, D. &. (1997). *Fundamentos De La Espectroscopia De Reflectancia En El Infrarojo Cercano (Nirs) Como Método De Análisis De Forrajes*. Obtenido de http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0304-88021998000100011&script=sci_arttext
2. Al-Sagheer, F., Al-Sughayer, M., Muslim, S., & Elsabee, M. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in the Persian Gulf. En *Carbohydr. Polymers*. (págs. 77:410-419.).
3. Amerling, C. (1998). *Tecnología de la carne (Manejo de los subproductos)*. EUNED. S/P, C. 98-103 p.
4. Anavitarte, F. (1970). Manual de Anatomía Comparada de los Animales Domésticos. *INSTITUTO NACIONAL TECNOLÓGICO DIRECCIÓN GENERAL DE FORMACIÓN PROFESIONAL*.
5. Ayala, A. C. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del Quitosano contra el hongo *Mycophorella Fijensis* Morelet que produce la Sigatoka Negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*. , 15, 312-338.
6. Brugnerotto, J. L. ((2001). En *Polymer* (págs. 42, 3569-3580.).
7. Cahú, T., Santos, S., Mendes, A., Córdula, C., Chavante, S., L.B., C. J., . . . Bezerra, R. (2012). Recovery Of Protein, Chitin, Carotenoids And glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. En *Process Biochem*. (págs. 47:570-577).
8. Castro, F. D., & Kebreau, R. J. (2011). Análisis comparativo nutricional y económico de tres alimentos balanceados para vacas lecheras de alta producción. *Zamorano, Honduras*, 37.

9. Colina, M. A. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y Quitosano a partir de los desechos de cangrejos. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, , 15(1), 21-43.
10. Diana Marcela Escobar Sierra, C. P. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et technica*, 7.
11. Exibal, B. (2005). Balanceado Extra Lechero. Riobamba, Ecuador.
12. Fernández, E. N. (2007). Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan. En *Carbohydrate Polymers* (págs. 61, 155-161.).
13. Ganadero, c. (10 de julio de 2018). *¿Cómo funcionan los aminoácidos en la suplementación de los rumiantes?* Obtenido de CONTEXTO GANADERO : <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/como-funcionan-losaminoacidos-en-la-suplementacion-de-los-rumiantes>
14. H. F. Mark, N. M. (1985). En *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Vol. 1.* (Wiley, Nueva York).
15. Israel Barros, L. G. (2015). Extraction And Quantitative Comparison Of Chitin Obtained From The Shellof *Callinectes sapidus* AND *Penaeus vannamei*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.
16. Jiang, X., Chen, L., & Zhong, W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. . *Carbohydr. Polymers*, 54:457-463.
17. José Alejandro Molina Zerpa, M. C. (2014). Efecto del uso de quitosano en el mejoramiento del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L. variedad sd20a). *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, , 15(1), 21-43.
18. K. Heller, L. C. (1959). *Naturforsch*, 14, 476.
19. Meyer, s., & Bligh, d. C. (1981.). *Agric. Food Chem.*

20. Rivera, A (2017). REVISIÓN: NIRS EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS PARA LA NUTRICIÓN ANIMAL . 5, 1-13.
21. Ruiz, A., Cardelle-Cobas, A., García-Bermejo, A., Montilla, A., Olano, A., & Corzo, N. (2013.). Synthesis, characterization and functional properties of galactosylated derivatives of chitosan through amide formation. *Food Hydrocoll.* , 33:245-255.
22. Volkers, K. C. (2003). Prediction of the quality of forage maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 109(1–4), 183–194.