

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PAPEL DE QUITOSANO

Adrián Chávez Huerta^a, Marinela Colina Rincón^{a,b}, Ana Carmen Valbuena^a y Adriana López^a

^a) Laboratorio de Química Ambiental. Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo 4001, Venezuela. Correo electrónico: colinamarinela@gmail.com

^b) Empresa Mixta Innovación Ambiental Quitosano CA. (INNOVAQUITO CA). Av 4 San Francisco Sector El Bajo No 29–25, Maracaibo, Venezuela.

Recibido: Diciembre 2011; Aceptado Febrero 2012

RESUMEN

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. El quitosano es su derivado, su principal fuente de producción es a partir de la desacetilación de la quitina en medio alcalino. El quitosano tiene muchas aplicaciones en distintas áreas de investigación, Por ejemplo, en la industria farmacéutica, la cosmética, la medicina, la biotecnología, la alimenticia y la agricultura, entre otros. Este compuesto tiene propiedades y actividad útiles en nuevas aplicaciones. En esta investigación se sintetizó y caracterizó papel de quitosano. El proceso para la obtención de quitosano a partir de desechos de cangrejo requiere varios procesos como la desproteinización de las conchas con NaOH, la desmineralización con HCl, la despigmentación o decoloración con etanol, la desacetilación de la quitina con NaOH y posterior purificación del quitosano con CH₃COOH. El quitosano fue caracterizado por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y se observaron las bandas correspondientes al quitosano que son la tensión N–H a 1.528 del grupo amino, y 1.628 del grupo acetamido. El grado de desacetilación calculado fue entre el 80–95; sin embargo, para la formación de papel 33% es suficiente. También fue realizado un espectro Raman al papel de quitosano el cual presenta una banda doble a 1.600 correspondiente a los grupos amino y acetamido. La morfología del papel fue observada mediante microscopía electrónica de barrido modo ambiental (ESEM).

Palabras clave: Quitosano, papel, desacetilación.

ABSTRACT

Chitin is the second most abundant polysaccharide in nature. Chitosan is its derivative, its main production source is from the chitin deacetylation in alkaline media. Chitosan has many applications in different investigation areas. For example in the pharmaceutical industry, cosmetic, medicine, biotechnology food industry and agriculture. This compound has useful properties and activities in new applications. In this research, chitosan paper was elaborated and characterized. The chitosan obtention process from crab industry wastes required several steps such as: the deproteinization of the shells with NaOH, the demineralization with HCl, the discoloration with CH₃OH, the deacetylation of the chitin with NaOH and later a purification with CH₃COOH. The chitosan obtained was characterized by means of FTIR and the chitosan bands were observed which are the bands to N–H tension at 1,528 cm⁻¹ corresponding to an amine group and 1628 cm⁻¹ band corresponding to acetamide group, the percentage of deacetylation calculated was 80–95 %, however 35% is enough to make paper. The chitosan paper Raman Spectrum shows a double band at 1,600 cm⁻¹ corresponding to the amine and acetamide groups. The morphology of paper was observed using scanning electronic microscopy in environmental mode (ESEM).

Keywords: Chitosan, paper, characterization, crab

INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Se encuentra en los crustáceos, en el exoesqueleto de algunos insectos y en las paredes celulares de muchos hongos y algas. El quitosano es su derivado, su principal fuente de producción es a partir de la desacetilación en medio alcalino de la quitina proveniente de los desechos de la industria cangrejera y camaronera. El quitosano es un polisacárido compuesto de dos subunidades D–glucosamina y N–acetil–D–glucosamina, las cuales están conectadas por la unión (1–4) glicosídica (véase la Figura 1) [1].

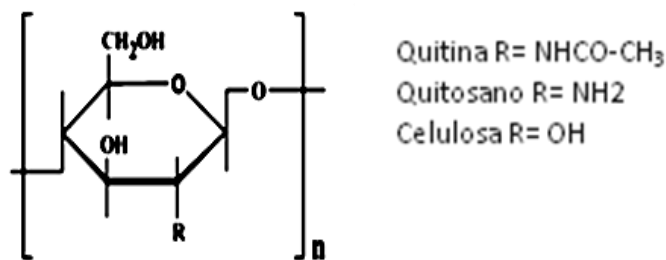


Figura. 1 Estructuras de quitina, quitosano y celulosa.

En general, los pasos para la obtención de quitosano a partir de los desechos de la industria cangrejera son: la desproteinización, la desmineralización, la decoloración y la desacetilación de la quitina. La caracterización de quitosano se puede realizar mediante UV, viscosimetría, difracción de rayos-X, valoración conductimétrica, RMN, análisis elemental y espectrometría infrarroja con Transformada de *Fourier* (FTIR). Esta última brinda información cualitativa acerca de grupos funcionales y cuantificación del grado de desacetilación (DD) [2].

El interés hacia el quitosano y algunos derivados es debido a que su carácter catiónico es único, este compuesto tiene propiedades y actividad útiles en nuevas aplicaciones. La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se pueden estudiar, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones [3]. El quitosano también es susceptible a modificaciones químicas debido al grupo hidroxilo [4]. Sin embargo, existen diferencias de comportamiento fisicoquímico de este compuesto dependiendo del origen, la forma de extracción, así como de la forma de desacetilación de la quitina [5]. El quitosano tiene muchas aplicaciones en distintas áreas de investigación, por ejemplo, en la industria farmacéutica, la cosmética, la medicina, la biotecnología, la alimenticia y la agricultura, entre otros [6]. Una aplicación importante es la obtención de películas de quitosano, las cuales tienen como utilidad el tratamiento y regeneración de piel con quemaduras. Otros son los derivados de quitosano del tipo base de *Schiff* los cuales son aplicados como agentes antifúngicos. El quitosano también se utiliza para mejorar la calidad del papel de celulosa, ya que posee grupos funcionales positivos (al protonarse las aminos), los cuales estabilizan los grupos funcionales negativos que posee la celulosa. El quitosano en polvo entre algunas de sus aplicaciones está el tratamiento de agua en la adsorción de cationes metálicos como el plomo [9], cadmio [10], cobre [11], cromo [12] hierro [13], cinc [14], mercurio [15], paladio [16] y níquel [17], adsorción de oxianiones que pueden estar complejados con estos iones metálicos, adsorción de fenoles y bifenilos policlorados, proteínas y en el control de contaminación como un agente quelante [17]. El resultado más impresionante de esta investigación es la producción de papel puro de quitosano, este posee un enorme potencial para

la producción a nivel mundial. La sustitución de la materia prima que se emplea para la fabricación de papel, constituido mayoritariamente de celulosa por el quitosano, evitaría la extracción de este material de los árboles, los cuales son esenciales para la regeneración del ambiente. En un futuro donde la extracción de materia prima a partir de los árboles sea un problema fundamental, podrían emplearse los desechos de las industrias cangrejeras y camaroneras de las cuales se obtiene el quitosano y reemplazarlo como la materia prima fundamental en la fabricación de papel. Actualmente el quitosano se utiliza solo para mejorar la calidad del papel de celulosa, posee grupos funcionales positivos (al protonarse las aminas), los cuales estabilizan los grupos funcionales negativos que posee la celulosa.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Entre los reactivos se empleó agua desionizada, HCl (*Riedel de Häen*) para la desmineralización, CH₃COOH (*Merck*) para formar las películas, CH₃OH (*Merck*) para la despigmentación y para disolver el p-dimetilaminobenzaldehído, CH₃CH₂OH (*Merck*) para la despigmentación, Na₂SO₃ (*Merck*) como antioxidante, NaOH (*Merck*) para la desproteización y para la desacetilación, 4-dimethylaminobenzaldehyd *Riedel de Häen* para la formación de la base de *Schiff*. Se empleó el equipo FTIR *Perkin Elmer Spectrum 100N*, y un microscopio electrónico de barrido en modo ambiental *FEI Quanta 200 F (ESEM)*

Muestras. Las muestras de desechos fueron suministradas por la empresa *Clifford de Venezuela C.A.*, de crustáceos provenientes del *Lago de Maracaibo, Venezuela*.

Obtención de quitosano.

Desproteización. La desproteización de los desechos se realizó calentando el desecho (previamente secado) en una solución de NaOH y Na₂SO₃, durante aproximadamente 2 horas.

Desmineralización y decoloración. Se desmineralizó agregando una solución de HCl 6 M, a temperatura ambiente (para evitar la degradación del polímero), hasta desaparición de la efervescencia. Se despigmenta (o decolora) con lavados continuos de CH₃CH₂OH o CH₃OH puro (el alcohol se destila para ser reutilizado y se separan los pigmentos).

Desacetilación. La desacetilación de la quitina se realizó con una solución acuosa de NaOH, a elevadas temperaturas, repitiendo el procedimiento hasta que el compuesto se decolore y pase de rosa pálido a blanco (en agua) o transparente (en ácido acético). Luego se lava con agua y se filtra [20].

Formación de papel de quitosano. Se prepara una pasta de quitosano, a continuación esta pasta es repartida en capsulas de *Petri*. Estas son secadas a temperatura ambiente y al aire libre

durante 2 días; si es necesario son colocadas durante 30 minutos en un horno para su secado completo y desprendidas del molde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la quitina. El primer paso de obtención de quitosano es la desproteínización de los desechos de cangrejo, en este se tratan las conchas de los crustáceos en medio alcalino a altas temperaturas (aproximadamente 85 °C) lográndose desnaturalizar la proteína presente, esto se debe a que el NaOH rompe los enlaces de hidrogeno que mantienen unidas a las moléculas de las proteínas, esto hace que se separen y se dispersen en la solución acuosa, la adición de un antioxidante como el Na₂SO₃ evita la rupturas de las cadenas poliméricas de la quitina, lo cual produciría la disminución del peso molecular de la misma. Al romperse la unión 1–4 glicosídica por acción del álcali, la quitina se despolimeriza perdiendo algunas propiedades físicas esenciales para la obtención de las películas de quitosano, comúnmente las moléculas de glucopiranosas siendo azúcares no reductores, son estables en medio alcalino, pero en condiciones extremas como en la desproteínización y sobre todo en la desacetilación las moléculas poliméricas no resisten estas condiciones y se despolimerizan disminuyendo la longitud de la cadena [16]. Para la desproteínización de los desechos de cangrejo se compararon dos metodologías (Tabla 1). La primera empleada por *Pardo y col.* [16] y la segunda desarrollada durante esta investigación, ambas se aplicaron experimentalmente obteniéndose mejores resultados con la metodología propuesta al disminuir a 2 las repeticiones del proceso (sin limpieza de los desechos) y a 1 sola vez al limpiarlos.

Tabla 1. Desproteínización de los desechos de cangrejo.

<i>1 (Pardo y col. [16])</i>	<i>2 (Este trabajo)</i>
Desecho	Desecho
NaOH y Na ₂ SO ₃	NaOH y Na ₂ SO ₃
Calentar A 60 ° C	Calentar A 85 ° C
Agitación	Agitación
Lavar	Lavar
(Repetir tres veces) Quitina	(Repetir dos veces) Quitina

Para la desmineralización de los desechos de cangrejo también se compararon dos metodologías la primera aplicada por *Pardo y col.* [16] y la segunda es propuesta en esta investigación. La metodología propuesta disminuye el tiempo de exposición a 1 h aproximadamente

(Tabla 2), La cantidad de ácido necesario para la desmineralización debe ser estequiométricamente equivalente a todos los minerales presentes en la concha asegurando que sean disueltos, en este proceso se deben evitar concentraciones más altas de ácido por la posibilidad de degradación de la quitina, por ruptura de las uniones 1–4 glicosídicas esto ocurre al protonarse la unión etérica 1–4, provocando que el grupo acetal en C(1), se repliegue formando un hemiacetal lo cual divide la molécula polimérica, esto no permite que el proceso de desmineralización se realice a valores de pH menores de 3.

Tabla 2. Desmineralización de los desechos de cangrejo.

<i>Desmineralización 1</i> <i>(Pardo y col)¹⁶</i>	<i>Desmineralización 2</i> <i>(experimental)</i>
HCl 2 M	HCl 6 M
Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
24 h	1 h
Lavar	Lavar
Quitina	Quitina

Los crustáceos contienen pigmentos coloreados como: astaceno, astaxantinas, cantaxantinas, luteína y β -caroteno. Estos pueden removerse a través de una despigmentación, con un disolvente que tenga afinidad con estos compuestos. Se emplearon dos disolventes, el metanol y el etanol. Obteniéndose mejores resultados empleando etanol disminuyendo el tiempo de exposición al disolvente a solo 1 hora, mientras que con metanol son necesarias más de 12 horas, esto sin agitación (ver Tabla 3).

Tabla 3. Despigmentación de los desechos de cangrejo.

<i>Despigmentación 1</i>	<i>Despigmentación 2</i>
Metanol	Etanol
400 mL	400 mL
1 día	1 hora
Quitina	Quitina

Tal como lo explica la cromatografía [17] se puede aplicar el índice de polaridad a la mayor afinidad de estos pigmentos al etanol, el índice de polaridad es una medida numérica de la polaridad relativa de varios disolventes, los valores son 10,2, 5,1 y 4,3 para los extractantes agua, metanol y

etanol respectivamente, siendo la relación inversamente proporcional al poder de extracción de los solventes etanol, metanol y agua.

Caracterización de la quitina. Luego de la despigmentación se caracterizó la quitina obtenida mediante FTIR, La Figura 2 muestra el espectro FTIR de la quitina, este muestra una banda de tensión de vibración –OH a $3.600\text{--}3.500\text{ cm}^{-1}$, las bandas correspondientes a la tensión de vibración –NH secundaria a 1636 cm^{-1} que se solapa con la banda de tensión C=O a 1.670 cm^{-1} del grupo acetamido. Se observa a una pequeña banda a 1.528 cm^{-1} , correspondiente a una mínima cantidad de grupos aminos presentes en la quitina luego del proceso de desproteínización con NaOH.

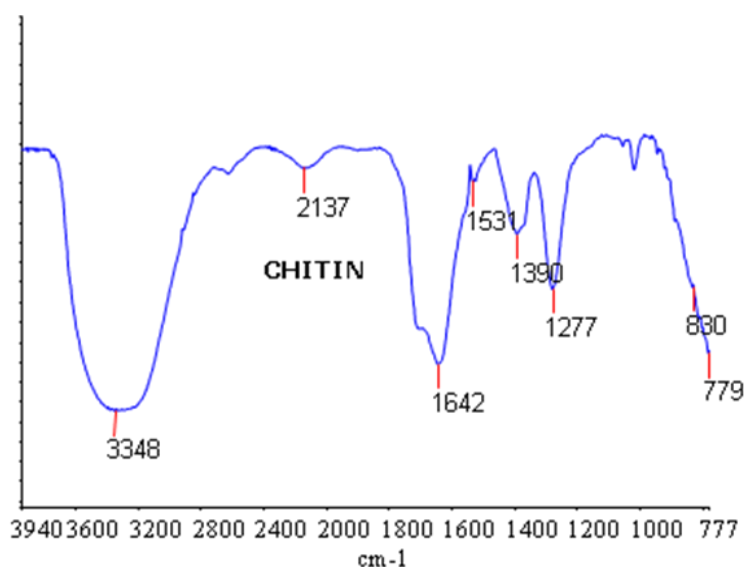


Figura 2. Espectro FTIR de la quitina.

Desacetilación de la quitina. La reacción de desacetilación de la quitina con hidróxido de sodio, es la hidrólisis de los grupos acetamido presentes en el C(2) de la quitina. Debido a la resistencia que presentan estos grupos por la conformación *trans* de los sustituyentes en C(2)–C(3) es necesario el tratamiento térmico a altas temperaturas para obtener quitosano. La principal diferencia entre el quitosano y la quitina es su solubilidad en soluciones de ácidos diluidas debida a que la fracción de grupos NH_3^+ es suficiente como para favorecer la solubilización del polímero. Esta solubilidad también depende del peso molecular obtenido, mientras más grande sean las moléculas más difícil será su solubilización, el quitosano soluble de bajo peso molecular no es muy útil para la obtención de películas debido a que son muy frágiles. Esto posiblemente se debe a que durante el reordenamiento de las moléculas, estas no tienen suficientes ramificaciones para entrecruzarse (de forma física) y se requiere mayor espesor para que sean más resistentes. Para mantener un alto peso molecular se plantea que la adición de un antioxidante, como el Na_2SO_3 ,

evita que el NaOH reaccione con los grupos hemiacetálicos (formados durante la desmineralización) oxidándolos y formando grupos carboxilos. Igual que en los procesos anteriores se comparó el procedimiento aplicado por *Pardo y col.* [16] (véase la Tabla 4) con el procedimiento propuesto en este trabajo. Se empleó la misma temperatura, tiempo y concentración de hidróxido de sodio pero, para mantener un alto peso molecular se agregó Na_2SO_3 , el cual es empleado en la desproteinización para evitar la ruptura de las uniones 1–4 glicosídicas. Con esto se obtuvo un quitosano de alto peso molecular, con propiedades fisicoquímicas completamente distintas a las reportadas en la literatura. El quitosano obtenido no se disuelve en medio ácido, en vez de esto los gránulos blancos de quitosano obtenidos se hinchan y aumentan considerablemente su volumen como los geles al agregarles ácido y se tornan totalmente transparentes al agregarles agua. Para romper estos gránulos hinchados se debe aplicar presión o utilizar una mezcladora, para obtener una solución totalmente transparente de quitosano. Normalmente una solución de quitosano es de color amarillo, debido a la degradación durante la desacetilación en la cual se rompen las cadenas poliméricas del quitosano, en esta investigación la solución obtenida es totalmente transparente, debido a que la degradación es mínima.

Tabla 4. Desacetilación de la quitina.

<i>Desacetilación 1</i>	<i>Desacetilación 2</i>
NaOH	NaOH Na_2SO_3
Calentar con agitación	Calentar con agitación
Lavar	Lavar
(Repetir 3 veces) Sólido	(Repetir 3 veces) Sólido
Purificación: disolución en CH_3COOH	No se disuelve, los sólidos se hinchan en forma de gel
Quitosano en solución	Quitosano en gel
Amarillo en medio ácido.	Transparente en medio ácido.

Experimentalmente se logró comprobar a través del FTIR (Figura 3) que la quitina al desacetilarse más del 85%, esta cambia de color blanco a transparente en ácido acético acuoso (30% v/v). Este quitosano no se disuelve en medio ácido, en vez de esto las hojuelas blancas de quitosano se hinchan y aumentan su volumen y se tornan totalmente transparentes al agregarles agua. Para romper estos gránulos hinchados se debe aplicar presión o utilizar una mezcladora obteniendo una disolución transparente. Esto se debe a que el quitosano posee grupos aminos los cuales se protonan en medio ácido, en toda la superficie polimérica se producen cargas positivas las cuales les brindan solubilidad y por ende transparencia.

Brugnerotto et al. [18] ha estudiado la cuantificación del porcentaje de acetilación (DA) tomando en cuenta la banda de absorción en el infrarrojo a 1.320 cm^{-1} considerada como la contribución de la amida III (Ecuación 1), calculándola a partir del ratio de A_{1320}/A_{1420} .

La correlación entre el valor experimental DA y el ratio la ha expresado mediante la siguiente relación:

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133 \cdot DA \quad (R^2 = 0,99) \quad (1)$$

En esta investigación se obtuvo quitosano con porcentajes de desacetilación DD entre el 80–95%, donde $DD = 100 - DA$.

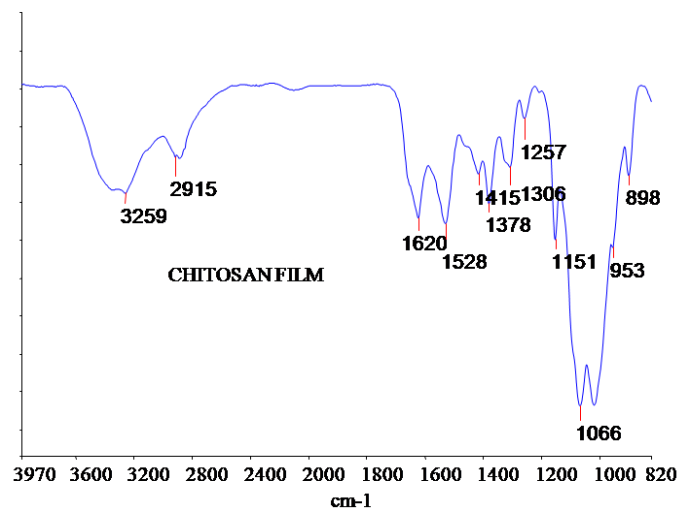


Figura 3. Espectro FTIR de quitosano experimental.

Papel de quitosano. En esta investigación se logró obtener papel puro de quitosano, este posee distintas características dependiendo del grado de desacetilación del quitosano, su color es totalmente blanco, esto sin la necesidad de utilizar blanqueadores. La fabricación de este papel no necesita como materia prima celulosa. En la Figura 4 se observa el papel de quitosano.



Figura 4. Papel de quitosano.

La razón de que el papel de quitosano sea tan parecido al papel de celulosa se debe a que las moléculas de ambos polímeros solo se diferencian en dos grupos funcionales, el quitosano tiene un grupo $-NH_2$ y uno $NHCOCH_3$ mientras que la celulosa tiene un grupo $-OH$. Toda la estructura polimérica es igual. En la Figura 5 se observan ambas moléculas.

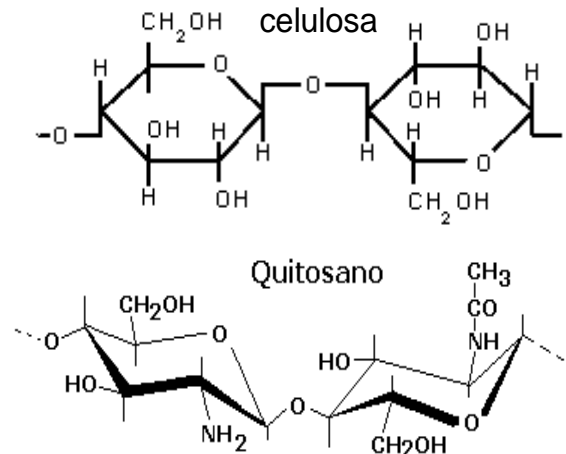


Figura 5. Estructura de la celulosa y del quitosano

El papel de quitosano es un material muy resistente el cual no puede ser pulverizado para obtener el espectro de FTIR, para caracterizarlo se empleo la modalidad *Raman* el cual genera las mismas señales de los grupos funcionales y en la misma zona del espectro. En el espectro *Raman* (Figura 6) se puede observar claramente alrededor de 1.600 cm^{-1} dos bandas correspondientes al grupo acetamido y al grupo amino del quitosano.

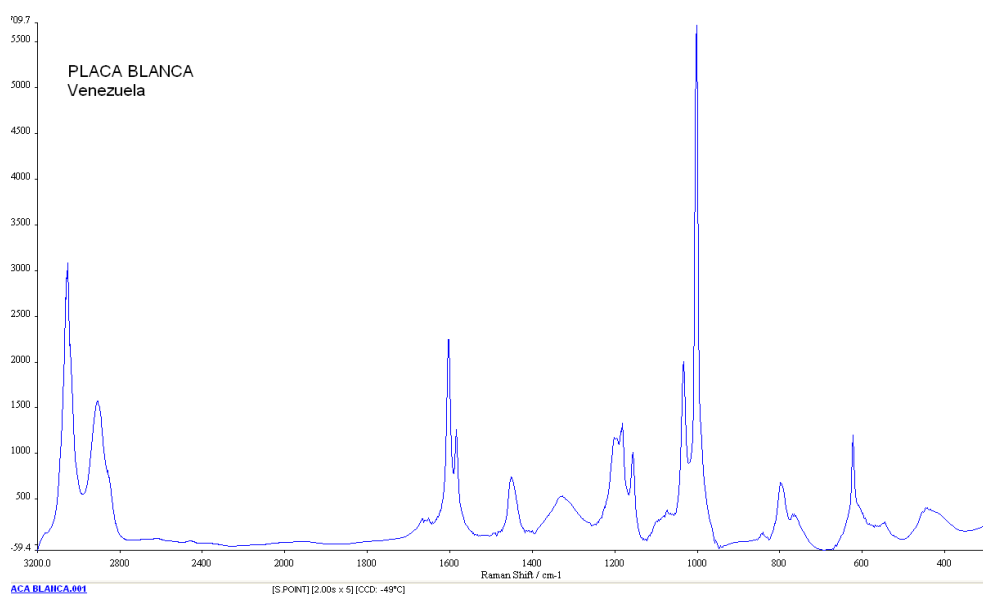


Figura 6. Espectro *Raman* de quitosano.

Los grupos aminos del quitosano no se protonan cuando este se encuentra en medio básico o neutro y al romperse mecánicamente en una mezcladora y en medio acuoso se dispersan en la solución y se obtiene una pasta la cual está formada de fibras de quitosano, estas fibras están formadas por cadenas del polímero el cual es estructuralmente parecido a la celulosa, solo se diferencia el grupo 2-amino del quitosano con el 2-hidroxi de la celulosa (véase la Figura 1). El potencial de dicho papel es la cantidad de grupos funcionales amino que posee el quitosano y la reactividad del mismo, además de la gran capacidad de absorción que posee el quitosano, siendo esta una ruta alternativa de formación de un tipo de papel que tiene potencialmente mayores aplicaciones. En la Figura 7 se observan las micrografías del papel de quitosano empleando ESEM, en estas se observan fibras, poros e imperfecciones a través de la superficie.

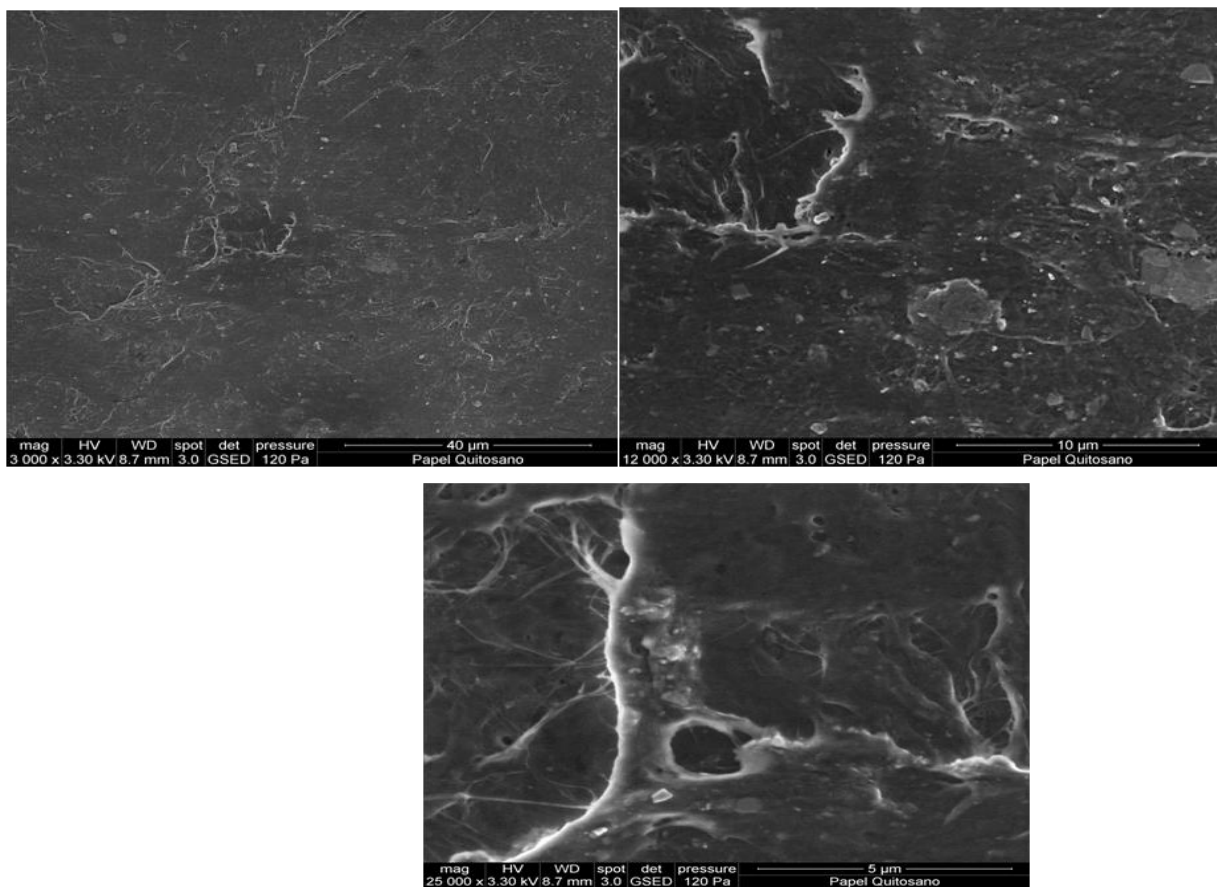


Figura 7. Micrografías ESEM del papel de quitosano puro a distintos aumentos: a) 3.000 x, b) 12.000 x, y c) 25.000 x.

CONCLUSIONES.

Se desarrolló la metodología adecuada para obtener quitosano y papel de quitosano. Se caracterizó quitosano mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de *Fourier* (FT-IR), y espectroscopía *Raman* para el papel. Se observó el papel a través del ESEM.

Agradecimientos. Los autores agradecen a *La Universidad del Zulia (LUZ)*, y al *FONACIT (Venezuela)* por el programa *Misión Ciencia* por la realización de este trabajo y el financiamiento del Doctorado en Química.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Katime I, Katime O, Katime D “*Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímeros*”, Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao 2004; Park T, Jeong J, Kim S “Current status of polymeric gene delivery systems”, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **58**, 467 (2006)
- [2] Heux L, Brugnerotto J, Desbrières X, Versali M, Rinaudo M “Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan”, *Biomacromol*, **1**, 746 (2000)
- [3] Osman Z, Arof A, “FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes”, *Electroch. Act.*, **48**, 993 (2003)
- [4] Larez C, Canelon F, Millan E, Katime I “Interpolymeric complexes of Poly(itaconic acid) and chitosan”, *Polymer Bull.*, **48(4-5)**, 361 (2002); Velásquez C “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **4(2)**, 91 (2003)
- [5] Rosane I, Oliveira W, Cadorn S, Cruz I “Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 366 (2006)
- [6] Mishra D, Tripathy J, Srivastava A, Mohan M, Behari M “Graft copolymer (chitosan-g-N-vinyl formamide): Synthesis and study of its properties like swelling, metal ion uptake and flocculation”, *Carb. Pol.*, 10.1016/j.carbpol.2008.04.015, 2008
- [7] Martins A, da Silva E. Carasek E. Goncalves N, Laranjeira M, Favere V “Chelating resin from functionalization of chitosan with complexing agent 8-hydroxyquinoline: application for metal ions on line preconcentration system”, *Anal. Chim. Act.*, **521**, 157 (2004)
- [8] Flores J, Navarro A, Ramos K, Chang L, Ale N, Ly M, Maldonado H “Adsorción de Cu (II) por quitosano en polvo y perlas de gel”, *Rev. Soc. Quím. Peru*, **71**, 17 (2005)
- [9] Lima I, Airoldi C “Interaction of copper with chitosan and succinic anhydride derivative — a factorial design evaluation of the chemisorption process”, *Coll. And Surf. A: Phys. Eng Asp*, **229**, 129 (2003)
- [10] Chang Y, Chen D “Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for removal of Cu (II) ions”, *J. Coll. & Interf. Sci.*, **283**, 446 (2005)
- [11] Monteiro O, Airoldi C “The influence of chitosans with defined degrees of acetylation on the thermodynamic data for copper coordination”, *J. Colloid & Interf. Sci.*, **282**, 32 (2005)
- [12] Schmuhl R, Krieg H, Keizer K “Adsorption of Cu (II) and Cr(VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies”, *Water SA*, **27(1)**, 1 (2001)
- [13] Burke A, Yilmaz E, Hasirci N “Evaluation of Chitosan As a Potential Medical Iron (III) Ion Adsorbent”, *Turk. J. Med. Sci.*, **30**, 341 (2000)
- [14] Sashiwa H, Kawasaki N, Nakayama A, Muraki E, Yamamoto N, Zhu H, Nagano H “Chemical Modification of Chitosan, 13.1 Synthesis of Organosoluble, Palladium Adsorbable, and Biodegradable Chitosan Derivatives toward the Chemical Plating on Plastics”, *Biomacromol*, **3**, 1120 (2002)
- [15] Sye W, Lu L, Tai J, Wang C “Applications of chitosan beads and porous crab shell powder combined with solid-phase microextraction for detection and the removal of colour from textile wastewater”, *Carboh. Pol.*, **72**, 550 (2008)
- [16] Pardo A, Salazar P, Colina M Salas R, Montilla B “Adsorción de cobre y cobalto utilizando Quitosano obtenido a partir de los desechos de la Industria camaronera y cangrejera”, *Lab Ciencia*, Diciembre, 2006
- [17] Skoog D, Holler F, Nieman T “*Principios de Análisis Instrumental*”. Mc Graw Hill, Madrid, España, 1980
- [18] Brugnerotto J, Lizardi J “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization”, *Polymer*, **42**, 3569 (2001)