

## OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO ELABORADO A PARTIR DE LOS DESECHOS DE LA INDUSTRIA CANGREJERA

Adrián Chávez Huerta<sup>a</sup>, Marinela Colina Rincón<sup>a,b,\*</sup>, Ana C. Valbuena Inciarte<sup>a</sup>, Adriana Lòpez<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>) Laboratorio de Química Ambiental. Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo 4001, Venezuela.

<sup>b</sup>) Empresa Mixta Innovación Ambiental Quitosano CA. (INNOVAQUITO CA), Av. 4 San Francisco Sector El Bajo No 29-25. Correo electrónico: colinamarinela@gmail.com

*Recibido: Diciembre 2011; Aceptado: Mayo 2012*

### RESUMEN

En esta investigación, se elaboraron películas de quitosano y películas de un derivado de quitosano del tipo base de *Schiff*. El proceso para la obtención de quitosano se realizó a partir de desechos de la industria cangrejera, este requiere de varios pasos como son; la desproteinización de las conchas con NaOH, la desmineralización con HCl, la despigmentación o decoloración con CH<sub>3</sub>OH, la desacetilación de la quitina con NaOH y posterior purificación del quitosano con CH<sub>3</sub>COOH. El procedimiento para la obtención de quitosano fue modificado disminuyendo el tiempo del proceso, se eliminó el paso de purificación al emplear Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> en la desacetilación. El quitosano obtenido y las películas fueron caracterizadas mediante FTIR y se observaron las bandas correspondientes al quitosano que son la tensión N-H a 1.528 cm<sup>-1</sup> del grupo amino y 1.628 cm<sup>-1</sup> del grupo acetamido, el porcentaje de desacetilación calculado fue de 80-95%. También se obtuvo un espectro *Raman* del papel de quitosano el cual presenta una banda doble a 1.600 cm correspondiente a los grupos amino y acetamido. Se observó la morfología de las películas a través de la microscopía electrónica de barrido en modo ambiental (ESEM).

**Palabras claves:** Películas, quitosano, caracterización, cangrejos.

### ABSTRACT

In this research, chitosan films and chitosan *Schiff's* type base derivative films were obtained. The chitosan obtention process used crab industry wastes, this required several steps such as: the deproteinization of the shells with NaOH, the demineralization with HCl, the discoloration with CH<sub>3</sub>OH, the deacetylation of the chitin with NaOH and later a purification with CH<sub>3</sub>COOH. The procedure for chitosan obtaining was modified reducing the time of the process because the step of purification was eliminated using Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> during the deacetylation. The chitosan obtained and the films were characterized by means of FTIR and the chitosan bands were observed which are the bands to N-H tension at 1,528 cm<sup>-1</sup> corresponding to an amine group and 1,628 cm<sup>-1</sup> band corresponding to acetamide group, the percentage of deacetylation calculated was 80-95%. The chitosan paper *Raman* Spectrum presented a double band at 1600 cm corresponding to amine and acetamide groups. The morphology of films was observed using scanning electronic microscopy in environmental mode (ESEM).

**Keywords:** films, chitosan, characterization, crabs.

### 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 camaronesa.

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].

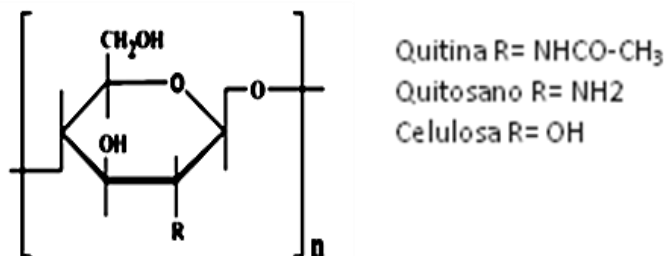


Figura. 1 Estructuras de quitina, quitosano y celulosa.

En general, los pasos para la obtención de quitosano a partir de los desechos de la industria cangrejera son: la desproteización, la desmineralización, la decoloración y la desacetilación de la quitina. La caracterización de quitosano se puede realizar a través de UV, viscosimetría, difracción de rayos X, valoración conductimétrica, RMN, análisis elemental y espectroscopia infrarroja con transformada de *Fourier* (FTIR). Esta última brinda información cualitativa acerca de grupos funcionales y cuantificación del grado de desacetilación (DD) [2,3].

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 [4]. El quitosano también es susceptible a modificaciones químicas debido al grupo hidroxilo [5]. 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. 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 [6], cadmio [7], cobre [8-11], cromo [12],

hierro[13], cinc [6], mercurio[6], paladio [14].y níquel [6], 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 [15]. En vista de estos planteamientos el objetivo de esta investigación es obtener películas de quitosano y quitosano modificado, a partir de la quitina extraída de desechos de la industria cangrejera.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Materiales.** Entre los reactivos se empleó agua desionizada, HCl (*Riedel de Häen*) para la desmineralización, CH<sub>3</sub>COOH (*Merck*) para formar las películas, CH<sub>3</sub>OH (*Merck*) para la despigmentación y para disolver el p-dimetilaminobenzaldehído, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (*Merck*) para la despigmentación, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (*Merck*) como antioxidante, NaOH (*Merck*) para la desproteización y para la desacetilación, 4-dimetilaminobenzaldehído (*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.** Previo al proceso, los desechos de la industria cangrejera son lavados, limpiados y secados durante una hora a 100°C, luego son triturados y pesados. La desproteización de los desechos se realizó calentando (100 g) en una solución de NaOH al 10% y Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0,1% durante una hora. Se desmineralizó agregando una solución 6 M de HCl a temperatura ambiente (para evitar la degradación del polímero) hasta desaparición de la efervescencia. Se despigmentó con lavados continuos de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>3</sub>OH puro (el alcohol se destila para ser reutilizado y se separan los pigmentos). La desacetilación de la quitina se realizó con una solución acuosa de NaOH al 30% y Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0,1% a la temperaturas de 110–120°C durante 4 horas, repitiendo dos veces el procedimiento ó 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 desionizada, se filtra y se seca a temperatura ambiente.

**Formación de películas de quitosano.** Se pesan 5 g de hojuelas de quitosano seco, se mezclan con 100 mL de H<sub>2</sub>O y se rompen en una mezcladora aproximadamente 5 minutos y a una velocidad de 200 rpm hasta la formación de una pasta. A 5 g de la pasta de quitosano se le agregan 100 mL de una solución de ácido acético en agua al 5% (v/v) formándose un gel transparente y viscoso. Este gel es colocado en moldes plásticos con un área de 150 cm<sup>2</sup> y luego secados a temperatura ambiente y en ausencia de luz hasta la obtención de la película.

**Formación de la película de quitosano modificado del Tipo Base de Schiff.** Se mezclan 5 g de quitosano con 90 mL de solución de CH<sub>3</sub>COOH acuoso al 5% (v/v) esta es mezclada con 10 mL de p-dimetilaminobenzaldehído al (2% w/v, disuelto en metanol), y calentado a una de las siguientes temperaturas 40, 60 y 80°C, hasta la formación de una solución amarilla, esta solución se deja secar en un molde durante 1 día hasta obtener la película.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Purificación de la quitina.** El primer paso de obtención de quitosano es la desproteización de los desechos de cangrejo, en este se tratan las conchas de los crustáceos en medio alcalino a altas temperaturas (aproximadamente 115°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 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 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 desproteización 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 desmineralización de los desechos de cangrejo el tiempo de exposición al ácido es de 1 hora aproximadamente, la cantidad de ácido necesario para la desmineralización equivalente a la cantidad de minerales presentes en los desechos 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.

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 una hora, mientras que con metanol son necesarias más de 12 horas, esto sin agitación. 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 disolventes etanol, metanol y agua.

**Caracterización de la quitina.** Después 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  $\text{-OH}$  a  $3.600\text{--}3.500\text{ cm}^{-1}$ , las bandas correspondientes a la tensión de vibración  $\text{-NH}$  secundaria a  $1.636\text{ cm}^{-1}$  que se solapa con la banda de tensión  $\text{C}=\text{O}$  a  $1.670\text{ cm}^{-1}$  del grupo acetamido. Se observa a a una pequeña banda a  $1.528\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a una mínima cantidad de grupos aminos presentes en la quitina luego del proceso de desproteización con  $\text{NaOH}$ .

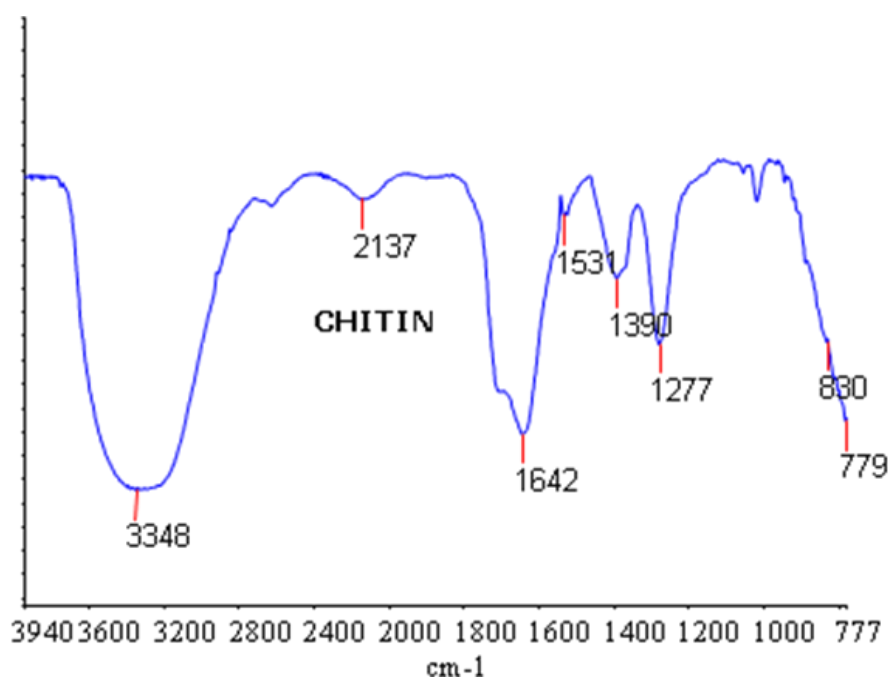


Figura 2. Espectro FTIR de la quitina

**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  $\text{NH}_3^+$  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  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  evita que el  $\text{NaOH}$  reaccione con los grupos hemiacetálicos (formados durante la desmineralización) oxidándolos y formando grupos carboxilos.

Experimentalmente se logró comprobar a través del FTIR 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 solución 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.

**Películas de quitosano.** Las películas se forman por el reordenamiento de las moléculas durante el secado del quitosano en gel o en solución. Se observó que las películas no se pueden exponer a elevadas temperaturas debido a que se fracturan, esto es debido a que se rompen los enlaces de hidrogeno que mantienen unidas las películas. En la Figura 3 se observa una película de quitosano.



Figura 3. Película de quitosano

En la Figura 4 se observa una película de quitosano obtenida empleando ESEM. En las micrografías se puede observar que las películas son totalmente lisas, no se evidencian poros o

fracturas y en el corte se observan las capas que forman la película.

Las películas solo se pueden desprender de moldes de plástico o teflón, al utilizar moldes de vidrio quedan adheridas completamente siendo muy difícil su desprendimiento. Esto se debe a que la superficie del vidrio contiene silicatos con carga negativa ( $-$ ), en las terminaciones  $\text{Si-O}^-$  los cuales tienen unas interacciones muy fuertes con los grupos aminos protonados ( $+$ ) del quitosano. En cambio los polímeros tienen grupos funcionales olefínicos  $\text{C}=\text{C}$  y no tienen afinidad con el quitosano.

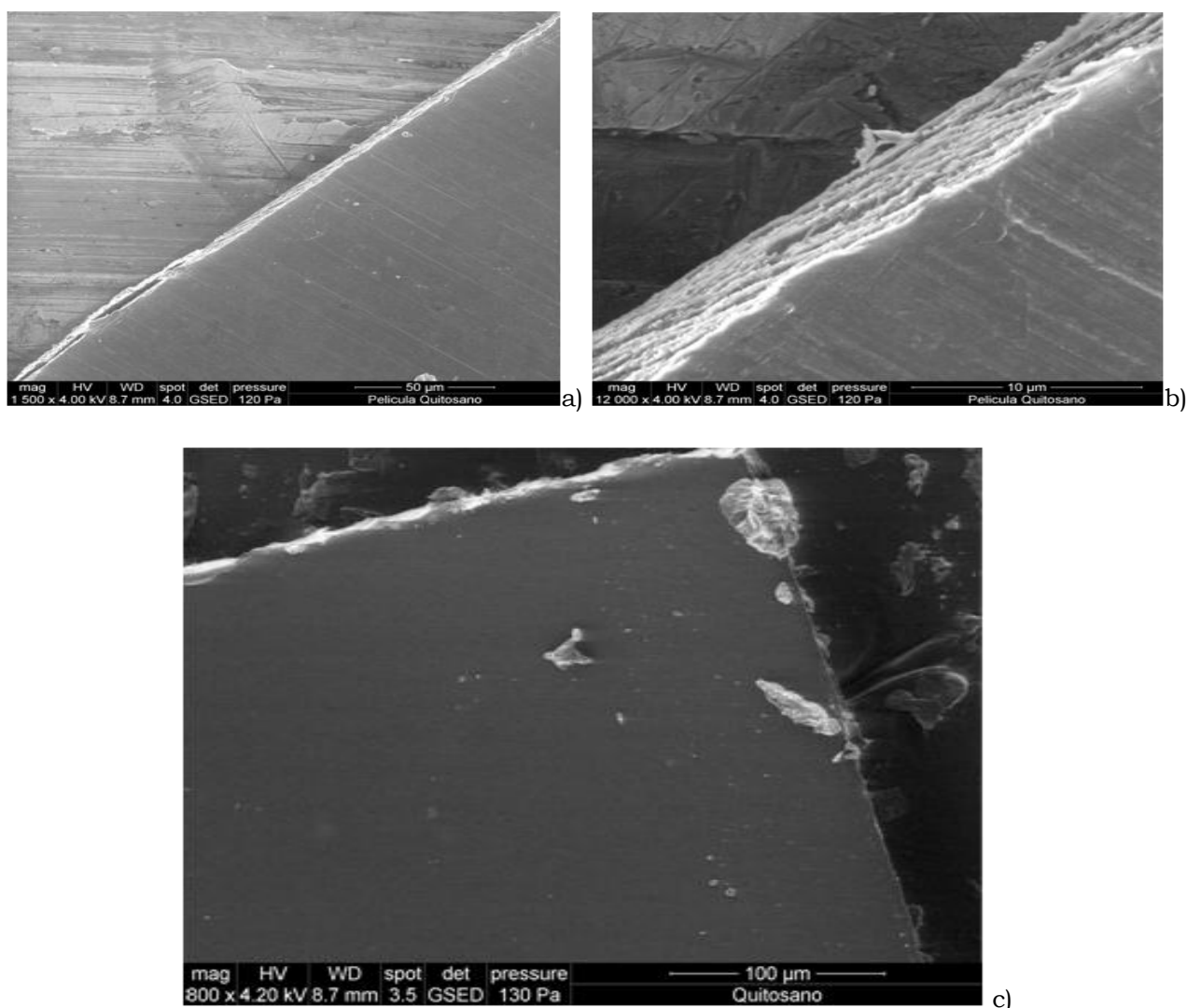


Figura 4. Micrografías ESEM de película de quitosano a distintos aumentos: a) 1.500x, b) 12.000x y de una película de quitosano comercial *Biopiel*® c) 800x.

En la Figura 5 se muestran los espectros infrarrojo de las películas de quitosano en a) experimental y b) comercial (*Biopiel*®), en ambos se observa la aparición de un pico a  $1.530\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión N-H de la amina primaria formada mediante la desacetilación. Estas

películas poseen la misma apariencia, son transparentes y se adhieren fácilmente en la piel, por lo que tienen como utilidad la cicatrización de la piel cuando se sufre de una quemadura fuerte.

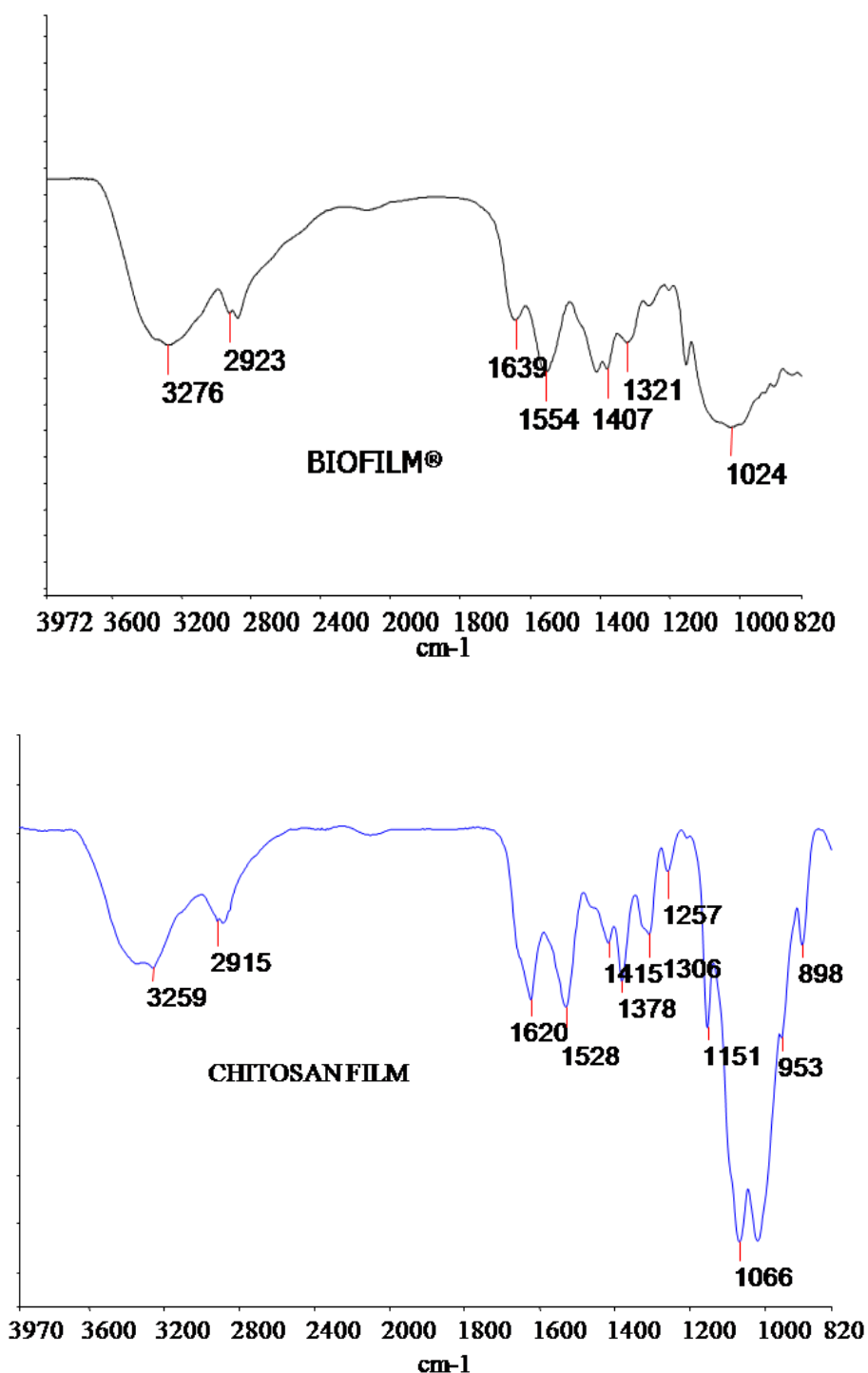


Figura 5. Espectro FTIR de película de quitosano a) comercial (*Biopiel*), y b) experimental.

Brugnerotto et al. [18] ha estudiado la cuantificación del porcentaje de acetilación (DA) tomando en cuenta la banda de absorción en el infrarrojo a  $1.320\text{ cm}^{-1}$  considerada como la contribución de la amida III (ecuación 1), calculándola a partir del cociente  $A_{1.320}/A_{1.420}$ .



La correlación entre el valor experimental DA y el cociente  $A_{1.320}/A_{1.420}$  se ha expresado mediante la siguiente relación:

$$\frac{A_{1.320}}{A_{1.420}} = 0,3822 + 0,03133 \cdot DA \quad (R^2 = 0,99) \quad (1)$$

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

**Películas de quitosano modificado del tipo Base de Schiff.** Para esta síntesis se utilizó quitosano y el p-dimetilaminobenzaldehído, el resultado es un compuesto amarillo que contiene un grupo funcional imina  $C = N$  conocido como base de Schiff. Este grupo le confiere al quitosano la cualidad de ser un agente antifúngico. Comúnmente estos compuestos se emplean para preservar la madera, estos se rocían sobre la superficie y se forma una película protectora que evita la proliferación de hongos. En la Figura 6 se muestra una película del tipo quitosano base de Schiff.



Figura 6. Película de quitosano base de Schiff.

El mecanismo de formación de la base de Schiff es en dos etapas. La primera es la adición de la amina nucleófila del quitosano al carbono carbonílico del p-dimetilaminobenzaldehído, seguido por la pérdida de un protón del nitrógeno y la protonación del oxígeno. En esta reacción se mantiene el pH alrededor de 4 con la adición de  $CH_3COOH$ , esto es necesario ya que el carbono carbonílico del aldehído debe protonarse para activarse y ser susceptible al ataque nucleófilo, el pH no debe ser menor porque se protonarían los grupos aminos del quitosano y perderían su nucleofilia. La segunda etapa es la protonación del grupo OH formado en la primera etapa, el cual se pierde como

H<sub>2</sub>O en una reacción de eliminación formándose la imina. En la Figura 7 se muestra la reacción general.

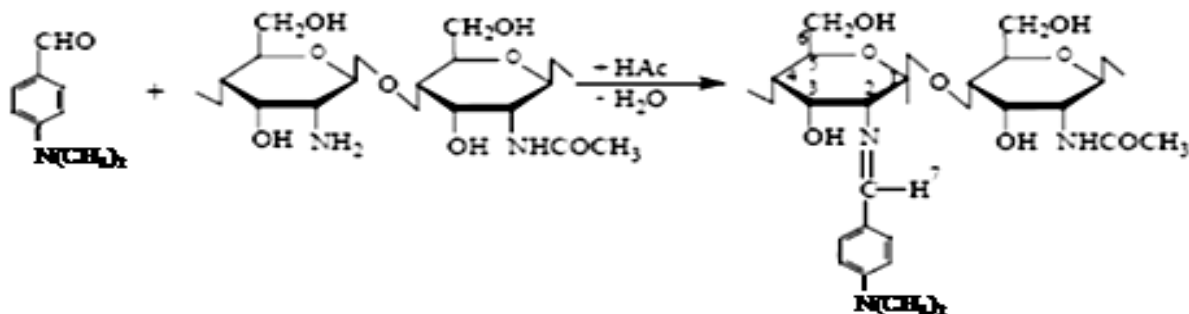


Figura 7. Reacción entre quitosano y el p-dimetilaminobenzaldehído.

En la Figura 8 (a, b y c) se muestra la película quitosano modificado del tipo base de *Schiff* empleando el ESEM, en estas micrografías se puede observar que la película esta conformada por bloques del compuesto los cuales están dispuestos en distintos tamaños por toda de superficie, todos estos bloques poseen nanoporos de alrededor de 150–300 nm.

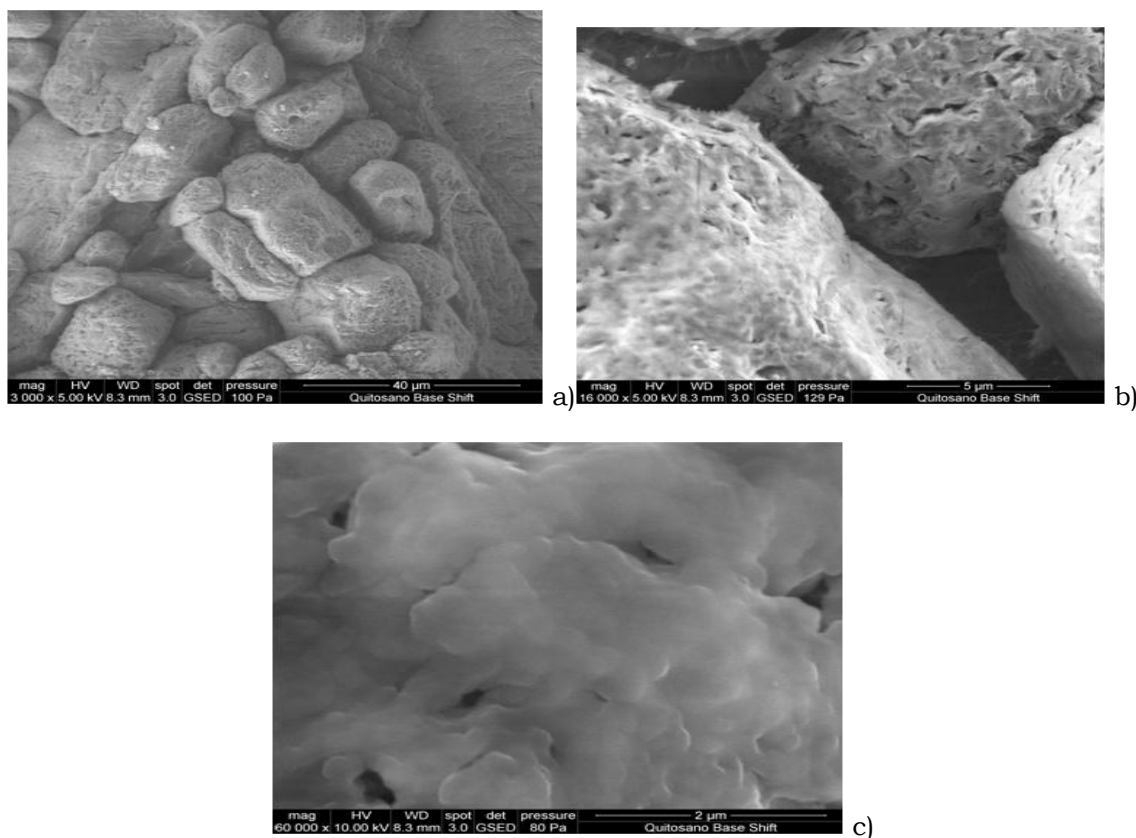


Figura 8(1). Micrografías ESEM de la película de quitosano del tipo base de *Schiff* a distintos aumentos: a) 3.000x, b) 16.000x, c) 60.000x.

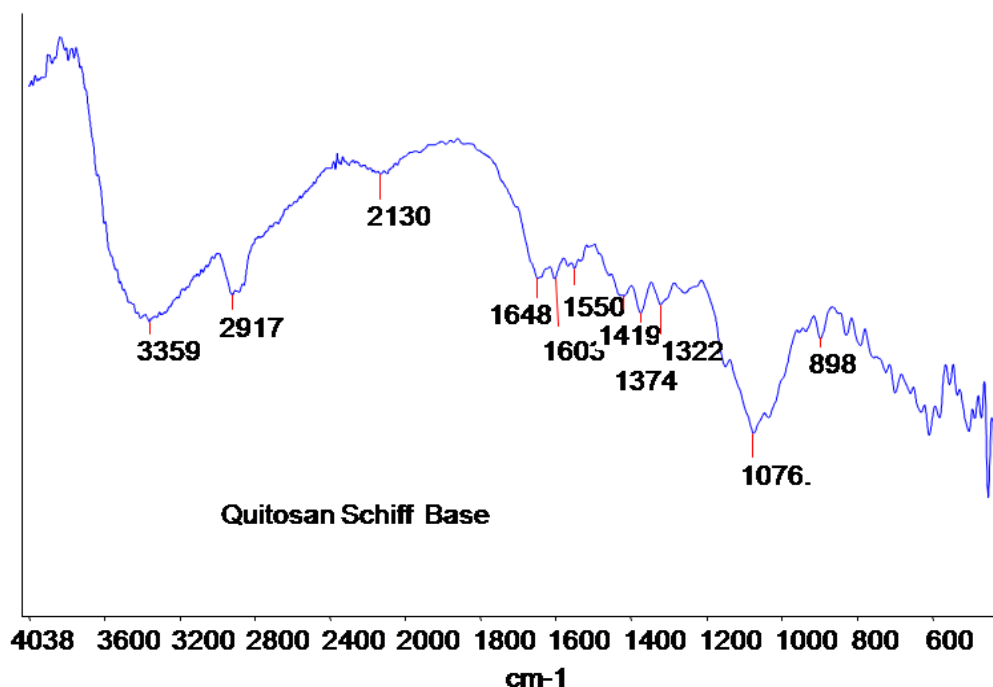


Figura 9. FTIR de película de quitosano modificado del tipo Base de Schiff.

En el espectro de quitosano modificado del tipo base de Schiff (véase la Figura 9) se observan tres bandas entre  $1.650$  y  $1.550\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos (C = O) de la amida, (C = N) de la imina y  $\text{-NH}_2$  de flexión de la amina, también se observa la disminución de las bandas de alargamiento C–N (entre  $1.100\text{--}1.020\text{ cm}^{-1}$ ), además se observan los cuatro bandas correspondientes al estiramiento C = C del anillo aromático entre ( $1.600\text{--}1.500\text{ cm}^{-1}$ ), los cuales solapan la banda N–H. Se observa una banda localizada entre  $700$  y  $900\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la flexión C–H del anillo aromático, se observa un pico a  $1.400\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión C–H del los metilos. Se observa un pico en  $1.160\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace glucosídico C–O–C, se observa la disminución de la absorción correspondiente a las bandas de la amina primaria que se encuentran entre  $1.100$  y  $950\text{ cm}^{-1}$ .

## CONCLUSIONES

Se logró la metodología adecuada para obtener películas de quitosano y películas de quitosano del tipo base de Schiff. Se caracterizaron las películas mediante la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Y se observaron las películas a través del ESEM.

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

### BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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, 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] Velásquez C “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **4**(2), 91 (2003)
- [5] Rosane I, Oliveira W, Cadorin 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, Airoidi 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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for removal of Cu (II) ions”, *J. Coll. & Interf. Sci.*, **283**, 446 (2005)
- [11] Monteiro O, Airoidi C “The influence of chitosans with defined degrees of acetylation on the thermodynamic data for copper coordination”, *J. Coll. & Interf. Sci.*, **1**, 282 (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*”. McGraw Hill, Madrid España 1980
- [18] Brugnerotto J, Lizardi J, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, **42**, 3569 (2001a)