

Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos.

Optimization protocol for chitin and chitosan extraction from crustacean shells.

Diana Marcela Escobar Sierra^{1*}, Claudia Patricia Ossa Orozco¹, Marco Antonio Quintana², Wilton Alexander Ospina²

¹Docente del Programa de Bioingeniería, Universidad de Antioquia

²Bioingeniero, Universidad de Antioquia

Grupo de Investigación en Biomateriales y Biomecánica,
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

*descobar@udea.edu.co

Resumen—En este trabajo se extrajeron quitina y quitosano de caparazones de crustáceos, principalmente de cangrejos, langostas y mejillones, variando algunos parámetros respecto a los protocolos reportados en la literatura. El procedimiento propuesto para la extracción desde los caparazones de crustáceos involucró procesos de desmineralización, desproteínización y desacetilación a las cuales se les ha adicionado una etapa de purificación. Los polímeros obtenidos fueron caracterizados por Microscopía Óptica (MO), Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y Análisis Termo Gravimétrico (TGA). Los productos obtenidos mostraron características comparables con los biopolímeros reportados en la literatura

Palabras clave— Caparazón de crustáceos, Extracción, Quitina, Quitosano.

Abstract— In this work chitin and chitosan were extracted from crustacean shells such as crabs, lobsters and mussels, varying some parameters from the literature protocols. The extraction procedure from crustacean shells involved demineralization, deproteinization and deacetylation processes, to which they have been added a purification step. The polymers obtained were characterized by Optic Microscopy (OM), X Ray Diffraction (XRD), Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermo Gravimetric Analysis (TGA). The products obtained showed characteristics similar with those reported in the literature biopolymer.

Key Word — Chitin, Chitosan, Crustacean shells, Extraction.

I. INTRODUCCIÓN.

Después de la celulosa, la quitina y el quitosano son el segundo suministro más grande de biopolímeros naturales que se ha encontrado, estando presentes en hongos, algas, insectos y crisálidas del gusano de seda [1]. También se han encontrado en mayores cantidades en el exoesqueleto de

crustáceos, como los calamares [2], cangrejos [3, 4] y langostas [5].

La actividad industrial de procesado de productos de mar, especialmente crustáceos, genera una gran cantidad de residuos que generan un problema medioambiental, como consecuencia de su lenta descomposición. Dado que estos desechos contienen entre 14 y 35% de quitina, asociada con 30-40% de proteínas y 30-40% de depósitos de calcio [6]. La tarea de extraer de ellos la quitina y su derivado el quitosano, puede convertirse no sólo en una alternativa de solución al problema medioambiental, sino que puede también dar apoyo en las diversas aplicaciones con que cuentan estos biopolímeros.

Entre las áreas de aplicación de estos polímeros está el campo biotecnológico [7] y biomédico [4], debido a que la quitina puede emplearse como material bioestable y el quitosano como material biodegradable. Es por ello, que algunos investigadores probaron su actividad antimicrobiana en la industria alimenticia [6, 8], mientras que otros evaluaron su biodistribución [9] y los tiempos de retención en la industria farmacéutica [10].

En áreas como la ortopedia y odontología, se ha evaluado la capacidad osteointegradora que potencializa a estos polímeros para la fabricación y evaluación de plataformas para crecimiento celular [11-14] y, cirugías periodontales al evaluarse en forma de geles e hidrogeles inyectables [15, 16], como componente de compuestos en cementos para rellenos óseos [17-20] y recubrimientos bioactivos que mejoran el comportamiento de los implantes [21].

Los protocolos reportados para extraer quitina y quitosano de caparazón de crustáceos, constan de al menos cuatro etapas que incluyen la preparación de la muestra como; desproteínización, desmineralización, y desacetilación,

usando reactivos a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos de reacción.

Para la etapa de desproteización se reporta el uso de diferentes reactivos, variaciones en tiempo y concentración a fin de remover las proteínas existentes. Es así como Yamaguchi *et al* [4], utilizaron hidróxido de sodio (NaOH) al 4% a 100°C por 4 horas. Igualmente Tomihata e Ikada [22] utilizaron hidróxido de sodio (NaOH) al 3% a 70°C por 5 horas. Por otro lado, Vongchan et al [5] usaron a ácido acético (CH₃COOH) al 2% a 120°C por 50 minutos, mientras que Matienzo y Winnacker [23] y Zhang y Neau [24] mezclaron ácido acético (CH₃COOH) al 0,3M y acetato de sodio (CH₃COONa) al 0,2M a 25°C empleando tiempos mayores.

Para las etapas de desmineralización y desacetilación, se reporta el uso de HCl y NaOH respectivamente, variando también los tiempos de inmersión y las concentraciones. Sin embargo, ninguno de ellos realiza etapa de purificación para eliminar residuos de carbonatos.

El objetivo de este trabajo es optimizar el protocolo de extracción de la quitina y el quitosano presentes en los caparazones de crustáceos, variando la concentración de los reactivos y los tiempos de reacción en los protocolos reportados en la literatura. Adicionalmente, emplear una etapa adicional de purificación con el fin de eliminar completamente los residuos de carbonatos de calcio presentes a fin de obtener biopolímeros con buenas características.

II. METODOLOGÍA.

A. Obtención de los biopolímeros.

1. Preparación de la materia prima.

Se partió de caparazones de crustáceos, especialmente de langosta, cangrejo y mejillón recolectados en industrias procesadoras de productos marinos y en restaurantes. Cada caparazón se lavó con agua potable para retirar la materia orgánica adherida, se secó en 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.

2. Desproteización.

Las proteínas existentes fueron removidas tratando la muestra con solución de hidróxido de sodio (NaOH, grado analítico), a concentraciones de 3%, 3,5% y 4%, en una relación sólido: líquido 1:10, manteniendo la temperatura a 95°C, bajo agitación constante durante tiempos de 1, 2 y 3 horas. Posteriormente se filtró al vacío y neutralizó con agua desionizada.

3. Desmineralización.

La remoción de los carbonatos de calcio de los caparazones se logró mediante inmersión de la muestra en solución de HCl, para concentración de 0,5N, 1N y 2N en una relación sólido: líquido 1:5 a temperatura ambiente, bajo agitación constante, por tiempos de 1 y 2 horas. Posteriormente la muestra se filtró y lavó.

4. Purificación

Con el fin de obtener una quitina completamente libre de residuo de carbonato de calcio, se realizó una etapa adicional a las existentes, que consistió en la inmersión de las muestras desmineralizadas en una solución de hidróxido de sodio (NaOH grado analítico) a concentraciones de 3% y 3,5%, en una relación sólido: líquido 1:5, a una temperatura de 100°C por 1 hora. Seguidamente las muestras se filtraron, lavaron y secaron a 80°C por 30 minutos. Terminada esta etapa se obtuvo la quitina.

5. Desacetilación

Mediante la desacetilación se obtiene el quitosano como derivado de la quitina. Una vez se ha retirado el grupo acetil de la estructura. El proceso realizado a la muestra de quitina que mejor resultado mostró (para las variaciones mencionadas), consistió en tratar la muestra de quitina con solución de hidróxido de sodio (NaOH) a diferentes concentraciones (40, 50 y 60%), en relación sólido: líquido 1:10, a 100°C bajo agitación constante por 1 hora. Posteriormente la muestra obtenida fue filtrada, lavada y secada a 80°C por 30 minutos.

B. Caracterización de los biopolímeros obtenidos.

Todos los ensayos y pruebas de caracterización fueron realizados a las muestras de quitina y de quitosano que presentaron las mejores características, luego de realizar las variaciones en el protocolo establecido y finalmente optimizarlo.

1. Difracción de Rayos X (XRD).

La cristalinidad de los biopolímeros obtenidos, al igual que la presencia de fases contaminantes provenientes de las fuentes de extracción, se analizó por XRD. Para ello se utilizó un difractómetro de rayos X marca Siemens D 501 con radiación de ánodo de cobre monocromático, con filtro de níquel y detector proporcional (CuK_α, λ= 1,5406Å), empleando un rango de 2θ entre 5° y 50°, con un paso de 2°/ min.

2. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

Los grupos funcionales característicos de los biopolímeros obtenidos fueron evaluados en un Espectrofotómetro de Infrarrojo marca MATTSON 5000, calibrado con una

pastilla de bromuro de potasio (KBr), trabajado para un rango de longitud de onda entre 450 y 4.000 cm^{-1} .

3. Análisis Térmico Diferencial (DTA).

La estabilidad térmica de los biopolímeros obtenidos se evaluó por Análisis Termo Gravimétrico (TGA) en un equipo Universal V45A TA Instruments, utilizando atmósfera de aire y una tasa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ entre un rango de temperatura de 0 a 900°C .

4. Porcentaje de N-Acetilación.

Para analizar el grado de acetilación de los biopolímeros obtenidos se realizó un estudio cuantitativo a partir del área bajo las curvas de los espectros de infrarrojo obtenidos, siguiendo el procedimiento que presenta la literatura [25, 26].

III. RESULTADOS.

A. Caracterización de los biopolímeros obtenidos.

La quitina que mejor resultado presentó para el protocolo planteado fue la obtenida por una desproteínización con solución de NaOH al 3.5% por 2 horas; una desmineralización con solución de HCl 2N por 90 minutos y por purificación mediante solución de NaOH al 2% por 1 hora.

Para el caso del quitosano, la muestra que presentó las mejores características correspondió a la obtenida con el procedimiento de desacetilación con solución de NaOH al 60% por 1 hora.

Las imágenes 1 a 4 presentadas corresponden a las muestras de quitina y quitosano conseguidas con la optimización de parámetros en los procedimientos mencionados.

1. Morfología de los biopolímeros obtenidos.

En la Figura 1 se presenta la morfología de los biopolímeros de quitina y quitosano de mayor pureza y cristalinidad obtenidos con el protocolo optimizado.

En la microscopía estereoscópica se observan escamas de tamaño homogéneo y color perla claro para ambos polímeros, lo que sugiere que se logró un producto final homogéneo.

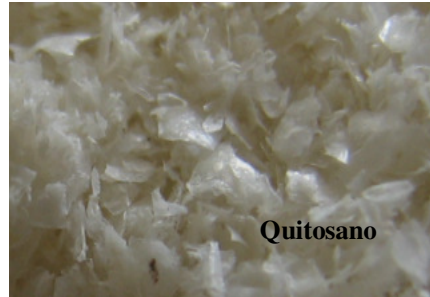
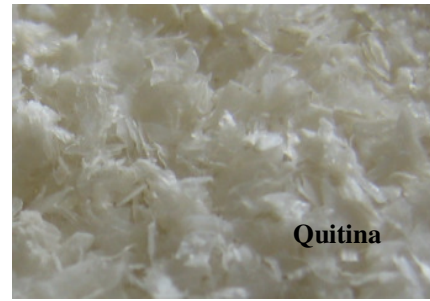


Figura 1. Morfología de las muestras de quitina y quitosano obtenidas (3X).

2. Difracción de Rayos X (XRD).

La Figura 2 presenta los difractogramas de la quitina y el quitosano extraídos de caparazón de crustáceos.

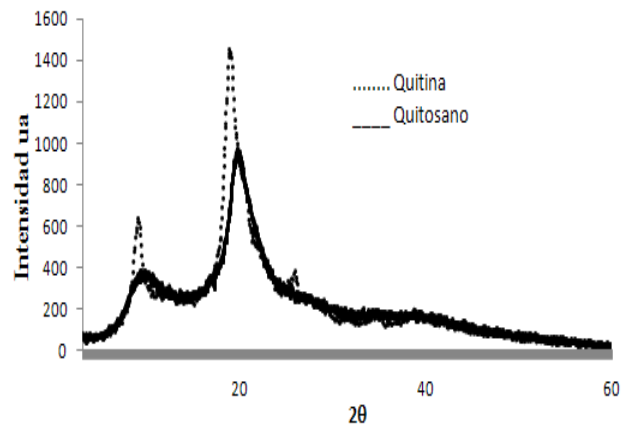


Figura 2. Difracción de rayos X para las muestras de quitina y quitosano obtenidas.

El difractograma de la quitina presenta un pico principal de gran intensidad a $2\theta = 19,5^\circ$ y un pico secundario en $2\theta = 10^\circ$, mientras que el quitosano presenta los mismos dos picos pero con una menor intensidad comparada con la presentada por la quitina, sin embargo, la intensidad de los picos mostrada en ambas muestras evidencia la cristalinidad de los biopolímeros obtenidos. Ambas muestras presentan espectros similares a los reportados en la literatura [5, 6, 27].

El pico ubicado en $2\theta = 26,2^\circ$ en el espectro de la quitina es atribuido a una pequeña impureza que no fue eliminado con la desproteínización y la desmineralización; sin embargo,

fue eliminada con el proceso de purificación con NaOH al 60%, como se evidencia en el espectro del quitosano.

Estos espectros no presentan ninguna fase que pueda ser atribuida a la presencia de calcio, lo que indica que las concentraciones utilizadas y los tiempos empleados en el proceso de desmineralización y purificación parecen ser adecuados.

3. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

La Figura 3 muestra los espectros de las muestras de quitina y quitosano obtenidas.

Dichos espectros revelan la presencia de los grupos hidroxilos que pertenecen a una banda ancha ubicada en 3440 cm^{-1} , acorde con lo reportado en la literatura [6, 27], siendo esta banda más pronunciada en la muestra de quitina que en el quitosano.

Las diferencias pueden deberse a residuos de agua en la muestra.

La banda a 3269 cm^{-1} para la quitina corresponde a la tensión del grupo N-H, la cual no se evidencia en el espectro del quitosano; dado el proceso de desacetilación, mientras que la banda en 2927 cm^{-1} corresponde a una vibración tensión del enlace C-H.

También se aprecia una banda de amida I a 1630 cm^{-1} en ambos espectros, aunque en menor proporción en el quitosano que en la quitina, resultado acorde con los reportes hechos por Brugnerotto *et al* [25] y Peniche [27], quienes además proponen utilizar estas bandas de vibración del grupo amida como base para determinar el grado de desacetilación de la quitina en el espectro infrarrojo.

El grado de desacetilación en una muestra de quitosano está asociado con el progresivo debilitamiento de las bandas correspondientes a los grupos NH (3269 cm^{-1}), los enlaces N-H de la amida secundaria (1561 cm^{-1}), la banda de la amida terciaria (1381 cm^{-1}) y los enlaces C=O de la amida primaria (1630 cm^{-1}).

La banda de absorción del grupo amida primaria prevalece sobre los grupos de amida secundaria, por la pérdida del grupo acetilo de los grupos amida del carbono 2, dando lugar a un grupo amino en esa posición, ya que los grupos acetilo se hidrolizan en medio básico, convirtiendo la quitina en quitosano, tal como lo reporta Khor [6].

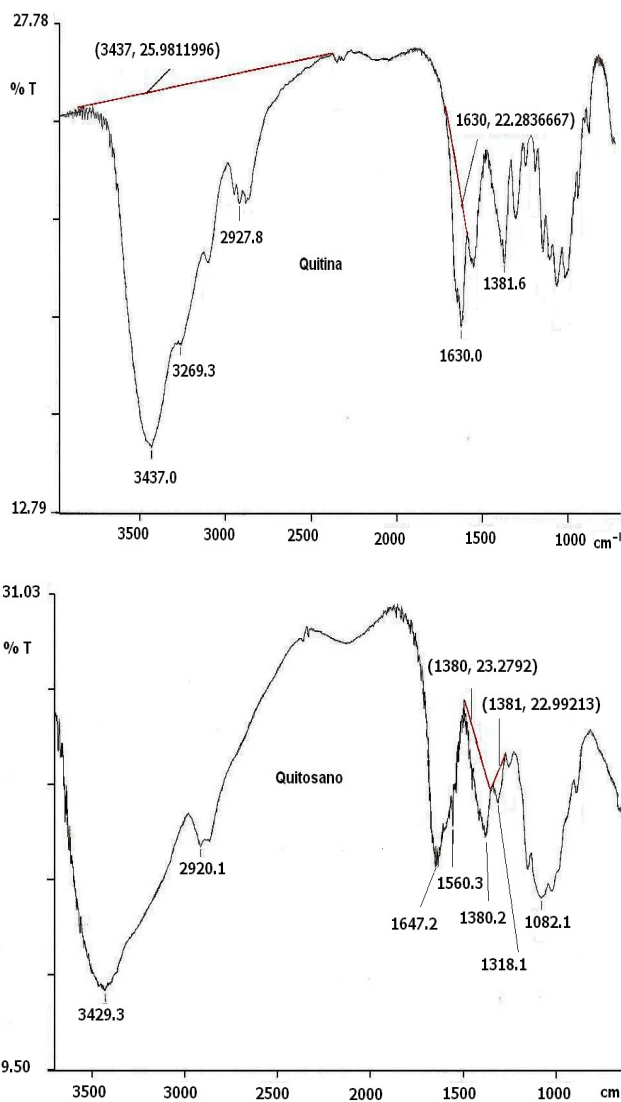


Figura 3. Espectros FTIR de las muestras de quitina y quitosano obtenidas.

4. Grado de N-acetilación.

El grado de N-acetilación corresponde al número de unidades de glucopiranos en la cadena del polímero que tienen el grupo N-acetil incorporado.

Según Brugnerotto *et al* [25], Peniche [27] y Sugimoto *et al* [28], la técnica de espectroscopía de infrarrojo permite determinar el porcentaje de N-acetilación mediante la correlación de algunas bandas de vibración, por ello, proponen las correlaciones expresadas en las ecuaciones (1) y (2) para quitina y quitosano respectivamente:

$$N\text{-acetilación}(\%) = \left(\frac{A_{1630}}{A_{3437}} \right) \times 115 \quad (1)$$

$$N\text{-acetilación}(\%) = 31,92x \left(\frac{A_{1318}}{A_{1380}} \right) - 12,20 \quad (2)$$

Estas correlaciones se toman entre una de las bandas de los grupos amida (I o III) y otra banda que sirva de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de la pastilla de bromuro de potasio utilizada, a la vez que presentan bandas características de la N-acetilación en 1630 cm^{-1} , bandas como la encontrada a 1318 cm^{-1} que corresponde a un grupo exento del N-acetil, bandas de referencia pertenecientes al grupo hidroxilo en 3437 cm^{-1} y bandas de estiramiento del C-H a $2878, 1430$ y 1070 cm^{-1} .

Según Yen *et al* [26], la determinación del grado de desacetilación logrado en una muestra de quitina relaciona algunas de estas bandas y está dado por la ecuación (3):

$$DA(\%) = 100 - \left(\frac{A_{1630}}{A_{3437}} \right) \times 115 \quad (3)$$

Para la determinación del porcentaje de N-acetilación conseguido para la quitina con la correlación lineal expresada en (1), se tomó la banda característica del grupo amida I ubicada a 1630 cm^{-1} y la banda de referencia del grupo hidroxilo a 3437 cm^{-1} , mientras que en la evaluación del porcentaje de N-acetilación del quitosano para correlación lineal expresada en (2) se tomó como banda característica la amida III localizada a 1318 cm^{-1} y como referencia la banda de grupos metilos a 1380 cm^{-1} (las bandas para las correlaciones son señaladas en la Figura 3).

El porcentaje de N-acetilación calculado desde la correlación (1) para la quitina es reportado en (4):

$$N\text{-acetilación } \% = \left(\frac{22,2836667}{25,9811996} \right) \times 115 = 98.63\% \quad (4)$$

Por lo tanto, el porcentaje de desacetilación logrado para la quitina según (3) es de 1.37%, que corresponde a una quitina con alto grado de pureza.

Y el porcentaje de N-acetilación logrado para el quitosano según (2) es reportado en (5):

$$N\text{-acetilación } \% = 31,92x \left(\frac{22,99213}{23,2792} \right) - 12,20 = 19.33\% \quad (5)$$

Según la ecuación (3), los valores calculados arrojan un porcentaje de desacetilación del 80.67% para el quitosano, acorde con el porcentaje reportado por Paulino *et al* [2] y Peniche [27].

5. Análisis Térmico Diferencial (DTA).

En la Figura 4 se muestran las curvas termo gravimétricas y de análisis térmico diferencial de las muestras de quitina y quitosano obtenidas.

La curva termo gravimétrica de la quitina presenta tres etapas de descomposición del material, una primera etapa ocurrida alrededor de 57°C atribuida a la evaporación del agua. Una segunda etapa a una temperatura máxima de descomposición de $386,43^\circ\text{C}$, atribuida a la degradación de los sacáridos en la estructura molecular y de las unidades acetiladas y desacetiladas de la quitina, y una tercera etapa alrededor de 700°C que indica la descomposición final del biopolímero, acorde con lo reportado por Paulino *et al* [2] y Benavides *et al* [29].

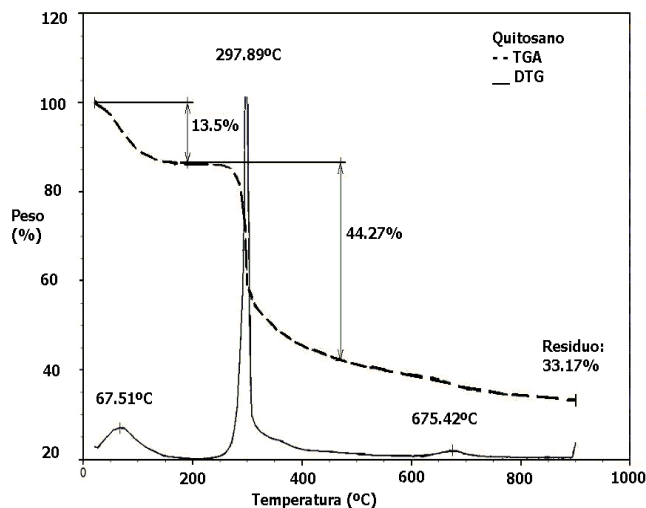
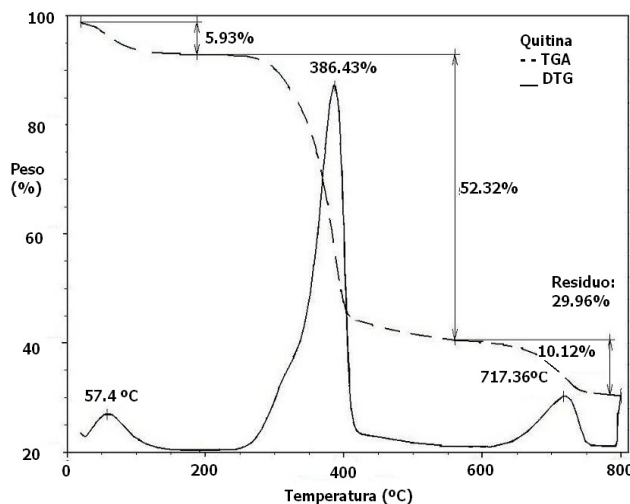


Figura 4. Curvas termo gravimétricas de las muestras de quitina y quitosano obtenidas.

La curva termo gravimétrica del quitosano presenta también tres etapas de descomposición; una primera etapa con un pico máximo de $67,5^\circ\text{C}$ que corresponde, igualmente que en la quitina a la evaporación de agua; una segunda etapa en un pico máximo a $297,89^\circ\text{C}$, asociado a la degradación de los sacáridos en la estructura molecular y una tercera etapa a

temperatura máxima de 675,42°C por descomposición final del biopolímero.

La temperatura de descomposición del quitosano (297°C) obtenida concuerda con los datos reportados por Paulino *et al* [2] y Peniche [27], indicando que el quitosano posee menor estabilidad térmica que la quitina, la cual empieza a descomponerse a temperaturas mayores, desapareciendo los grupos carbonilo.

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, evidenciada en la figura 2.

Debido a que la quitina posee una mayor cristalinidad, su estructura molecular es más rígida y por consiguiente es necesario aplicar más energía para que se lleve a cabo la descomposición del biopolímero, tal y como lo plantean Benavides *et al* [29].

Las temperaturas de degradación encontradas coinciden con lo que algunos autores reportaron para quitina extraída de fuentes diferentes a los crustáceos. Paulino *et al* [2] por ejemplo, extrajeron quitina de las crisálidas, y reportaron un pico de degradación a 400°C. Nogi *et al* [30] encontraron que la quitina extraída de caparazón de camarón tigre negro, presenta una alta estabilidad térmica, comenzando el proceso de degradación a 280°C y un pico máximo a 400°C, en cambio, Stolarek y Ledakowicz [31] extrajeron quitina de camarón antártico, y encontraron que la máxima temperatura de descomposición para esta fuente ocurre entre 350°C y 380°C.

El porcentaje residual de masa obtenido después de llevar los biopolímeros extraídos hasta 1000°C es del 29,96% para la quitina y del 33,17% para el quitosano. Dicho porcentaje depende del origen, propiedades y condiciones de obtención de la quitina y del quitosano, ya que para la alta concentración de la solución de NaOH utilizada (60%), la viscosidad se incrementa y sumado a esto, las características estructurales de ambos biopolímeros, facilitan la retención de impurezas y generan mayores productos de ignición, tal como lo establecen Hernández *et al* [32].

IV. CONCLUSIONES.

Se logró obtener biopolímeros de quitina y quitosano con características similares a los biopolímeros reportados en la literatura.

Los espectros de difracción de rayos X mostraron unos biopolímeros semicristalinos y libres de carbonatos de calcio en su estructura, lo que indica que los reactivos, las concentraciones y los tiempos utilizados fueron adecuados.

La quitina y el quitosano obtenidos presentaron una estabilidad térmica muy similar a los polímeros que se reportan en la literatura.

El quitosano obtenido alcanzó un 80.67% de desacetilación según las ecuaciones planteadas, este porcentaje es similar al reportado en las fichas técnicas del quitosano comercial.

REFERENCIAS

- [1] A. Paulino, J. Simionato, J. Garcia and J. Nozaki. "Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides". *Carbohydrate Polymers*, 64, 98–103, 2006.
- [2] A. Chandumpai, N. Singhpibulporn and Sornprasit, P. "Preparation and physicochemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*". *Carbohydrate Polymers*, 58, 467–474, 2004.
- [3] I. Yamaguchi, S. Itoh, M. Suzuki, M. Sakane, A. Osaka. "The chitosan prepared from crab tendon, characterization and mechanical properties". *Biomaterials*, 24, 2031–2036, 2003.
- [4] P. Vongchan, W. Sajomsang, D. Subyen and P. Kongtawelert. "Anticogulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab by semi heterogeneous conditions". *Science Asia*, 29, 115-120, 2003.
- [5] M. Fernández, J. Heinämäki, M. Räsänen, S. Maunu, M. Karjalainen, O. Nieto, A. Iraizoz. and J. Yliruusi. "Solid-state characterization of chitosan derived from lobster chitin". *Carbohydrate Polymers*, 58, 401–408, 2004.
- [6] E. Khor. *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*, Elsevier, 2001, p. 136.
- [7] S. Hirano. "Chitin and chitosan as novel biotechnological materials". *Polymer International*, 48, 732-734, 1999.
- [8] F. Shahidi, J. Kamil and Y. Jeon. "Food applications of chitin and chitosans". *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51, 1999.
- [9] Y. Kato, H. Onishi and Y. Machida. "N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates". *Biomaterials*, 25, 907–915, 2004.
- [10] S. Torrado, P. Prada and P. de la Torre. "Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention". *Biomaterials*, 25, 917–923, 2004.
- [11] I. Adekogbe and A. Ghanem. "Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering". *Biomaterials*, 26, 7241–7250, 2005.
- [12] S. Madihally and H. Matthew. "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering". *Biomaterials*, 20, 1133-1142, 1999.
- [13] E. Baran, K. Tuzlakoglu, A. Salgado and R. Reis. "Multichannel mould processing of 3D structures from

- microporous coralline hydroxyapatite granules and chitosan support materials for guided tissue regeneration/engineering". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 161-165, 2004.
- [14] J. Weng and M. Wan. "Producing chitin scaffolds with controlled pore size and interconnectivity for tissue engineering". *Journal of Materials Science Letters* 20, 1401-1403, 2001.
- [15] A. Borzacchiello, L. Ambrosio, P. Netti, C. Peniche. "Chitosan-based hydrogels: synthesis and characterization". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12, 861-864, 2001.
- [16] P. Gérentes, L. Vachoud, J. Doury and A. Domard. "Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery". *Biomaterials*, 23, 1295-1302, 2002.
- [17] Q. Hu, B. Li, M. Wang and J. Shen. "Preparation and characterization of biodegradable chitosan-hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture". *Biomaterials*, 25, 779-785, 2004.
- [18] A. Yokoyama, S. Yamamoto, T. Kawasaki and M. Nakasu. "Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials". *Biomaterials*, 23, 1091-1101, 2002.
- [19] S. Kim, T. Yoon, S. Park and J. Shin. "The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA cement". *Biomaterials*, 25, 5715-5723, 2004.
- [20] E. Khor and L. Lim. "Implantable applications of chitin and chitosan". *Biomaterials*, 24, 2339-2349, 2003.
- [21] J. Bumgardner, R. Wiser, P. Gerard, P. Bergin, B. Chestnutt and M. Marini. "Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants". *Journal of Biomaterials Science Polymer*, 14, 423-438, 2003.
- [22] K. Tomihata and Y. Ikada. "In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives". *Biomaterials*, 18, 567-575, 1997.
- [23] L. Matienzo and S. Winnacker. "Dry Processes for Surface Modification of a Biopolymer: Chitosan". *Macromolecular Materials and Engineering*, 287, 871-880, 2002.
- [24] H. Zhang and S. Neau. "In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation". *Biomaterials*, 22, 1653-1658, 2001.
- [25] J. Brugnerotto, J. Lizardib, F. Goycoolea, W. Argüelles and J. Desbrières. "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization". *Polymer*, 42, 3569-3580, 2001.
- [26] M. Yen, J. Yang and J. Mau. "Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells". *Carbohydrate Polymers*, 75, 15-21, 2009.
- [27] C. Peniche. "Estudios sobre quitina y quitosana". Ph.D. Disertación, Universidad de la Habana, La Habana-Cuba, 2006, 89p.
- [28] M. Sugimoto, M. Morimoto, H. Sashiwa and H. Saimoto. "Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives". *Carbohydrate Polymers*, 36, 49-59, 1998.
- [29] L. Benavides, M. Sibaja, J. Vega, M. Camacho y S. Madrigal. "Estudio cinético de la degradación térmica de quitina y quitosano de camarón de la especie *"heterocarpus vicarius"* empleando la técnica termogravimétrica en modo dinámico". *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 11, 558-573, 2010.
- [30] M. Nogi, F. Kurosakib, H. Yanoa y M. Takano. "Preparation of nanofibrillar carbón from chitin nanofibers". *Carbohydrate Polymers*, 81, pp 919-924, 2010.
- [31] P. Stolarek and S. Ledakowicz. "Pyrolysis kinetics of chitin by non-isothermal thermogravimetry". *Thermochemica Acta*, 433, pp 200-208, 2005.
- [32] H. Hernández, E. Águila, O. Flores, E. Viveros y E. Ramos. "Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón". *Superficies y Vacío*. 22, 57-60, 2009.