

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO DEL EMERITA ANALOGA A ESCALA PILOTO

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITIN AND
CHITOSAN
THE EMERITA ANALOGA TO PILOT SCALE

Nino Castro Mandujano¹
Clotilde Clelia Vidal Caldas²

Fecha de recepción: 10 junio 2015
Fecha de aceptación: 15 octubre 2015

Resumen

Nuestra investigación fue sobre los caparazones residuales del "muy muy" (Emerita análoga), que se encuentra a lo largo del litoral peruano. En primer lugar se obtuvo a la quitina a partir de estos exoesqueletos residuales, para ello se realizó la desmineralización con HCl y la desproteínización con NaOH. Luego se realizó la desacetilación para obtener el quitosano. Para cada parámetro de cada proceso se ha realizado una curva y así determinar las condiciones óptimas del proceso.

La materia prima contiene: % de humedad (4,38%), % de cenizas (29,03%), % de nitrógeno (2,41%), % de quitina (12,5%). El rendimiento de quitosano obtenido es de 9,5%. Por ejemplo, para un proceso de 4,000 gramos de materia prima,

1 Adscrito a Pontificia Universidad Católica del Perú, Fac. de Ciencias, Sección Química, Lima Perú, ocastro@puccp.pe <http://orcid.org/0000-0002-6592-6934>

2 Adscrita a Universidad Nacional del Callao, Callao-Perú, vidalcaldas@gmail.com

se obtuvo 510 gramos de quitina y 386 gramos de quitosano, y 1350 gramos del subproducto (proteína-sales). Este subproducto se obtuvo cuando se floculó-precipitó los residuos básicos (residuos proteicos) con el residuo ácidos (sales de calcio y magnesio en medio ácido) hasta su punto isoeléctrico, luego se filtra y se seca. El proceso general de obtención de quitina y quitosano es ecoeficiente y ecológico, ya que no genera residuo.

Se caracterizó a la quitina, obteniéndose el % de humedad (9,63%), % de cenizas (2,38%), % de nitrógeno (2,28%) y % de desacetilación se realizó por espectroscopia infrarroja la cual dió 52,8%. Para el caso del quitosano se determinó % de humedad (6,75%), % de cenizas (1,29%), % nitrógeno (0,83%), % de desacetilación por RMN-H (83,7%) y UV-visible; la viscosidad es 420 cP y el peso molecular es 294 KDa.

Palabras clave: Desacetilación por IR, emerita análoga, quitina, quitosano, UV-visible y RMN-H.

Abstract

Our research was on the residual shells "muy muy" (Emerita analoga), located along the Peruvian coast. Firstly chitin was obtained from these exoskeletons waste was carried out for this demineralisation with HCl and deproteinization with NaOH. Then, the deacetylation is performed to obtain the chitosan. For each parameter of each process has been a curve and determine the optimal process conditions.

The raw material contains: % moisture (4,38%), % ash (29,03%), % nitrogen (2,41%), % of chitin (12,5%). The yield obtained chitosan is 9,5%. For example, to a process 4000 grams of raw material, was obtained 510 grams and 386 grams of chitin chitosan, and 1350 grams of the product (protein-salts). This product was obtained when flocculated, precipitated basic residues (residues protein) with the acid residue (calcium and magnesium salts in acid medium) to its isoelectric point, then filtered and dried. The general process for obtaining chitin and chitosan is eco-efficient and environmentally friendly as it does not generate waste.

The chitin obtained was characterized % moisture (9,63%), % ash (2,38%), % nitrogen (2,28%) and % deacetylation was performed by IR spectroscopy the which gave 52,8%. For the case of chitosan was determined % moisture (6,75%), % ash (1,29%), % nitrogen (0,83%), % degree deacetylation by H NMR (83,7%) and UV-visible, the viscosity is 420 cP and the molecular weight is 294 kDa.

Keywords: Deacetylation by IR, emerita analoga, chitin, chitosan, UV-visible and NMR-H.

1. Introducción

El “muy muy” cuyo nombre científico es *Emerita* análoga, se encuentra a lo largo del litoral peruano, en zonas de oleaje. Algunos lo consumen como alimento (pobladores del norte), en otros casos es utilizado por las aves depredadoras las cuales retiran las carnes magra de los mismos dejando desecho de exoesqueleto; todo ello genera grandes cantidades de residuos de caparazones de la *Emerita* analoga (ver figura 1), en las playas de nuestro litoral marino. (Montes, R. 2008).

Estos exoesqueletos residuales no solo son el resultado de la depredación de las aves marinas sino también son el producto de las mudas o ecdisis propias de las especies; este material que resulta ser desagradable para el turista que visita estos balnearios, se convierte además en un foco de contaminación, pues muchos organismos patógenos para el ser humano y animales domésticos, los utilizan como medio de cultivo. (Paz, I., Chávez, M. y Velásquez, J. 2001).

La quitina es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, del resistente exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, e insectos) y algunos órganos de otros animales (anélidos, cnidarios, etc.).

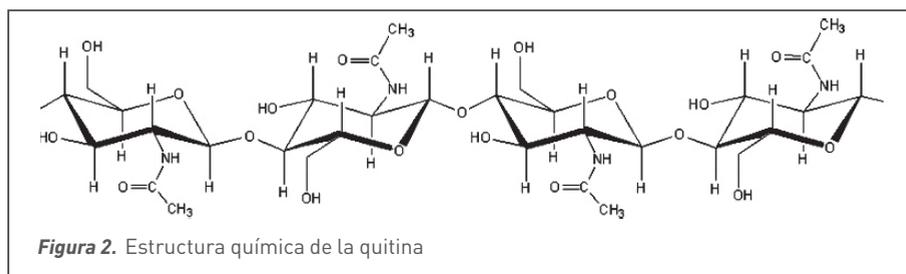


Figura 1. *Emerita* analoga “muy-muy”

La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetil-D-glucos-2-amina. Éstas están unidas entre sí con enlaces β -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. Esto permite un incremento de los enlaces de hidrogeno con los polímeros adyacentes, dándole al material una mayor resistencia. Es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa. Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta. La quitina se vuelve soluble en ácidos inorgánicos diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosano. (Pastor, A. 2004 y Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzzarrelly, C. Sashiwa, H. y Domb, A. 2004).

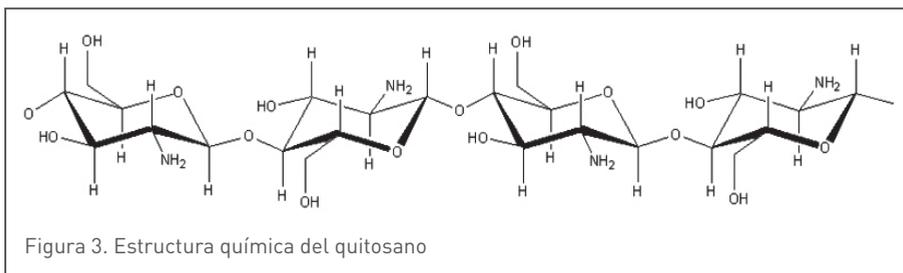
La quitina se caracteriza determinando su % de humedad, % de cenizas, % de nitrógeno, grado de acetilación, etc. Sus aplicaciones son muchas sobre todo del tipo de absorción de metales, colorantes, etc.; también en el tratamiento de heridas; etc. Existen tres tipos de quitina: alfa, beta y gamma; la forma más abundante y la más extensamente investigada es la α -quitina que se encuentra en la cutícula de los artrópodos y en ciertos hongos. La β -quitina se encuentra en el calamar y existe como un hidrato cristalino de baja estabilidad ya que el agua puede penetrar entre las cadenas de las capas. La γ -quitina se encuentra en los capullos de los escarabajos. (Pastor, A. 2004).

La quitina se obtiene comercialmente del exoesqueleto de langostinos y camarones. El exoesqueleto tiene como componentes principales quitina, carbonato de calcio y proteínas. También contiene pigmentos y grasa en pequeñas cantidades. La quitina es muy estable a los ácidos y álcalis y no es soluble en disolventes ordinarios. Por lo tanto, se puede aislar cuando a la cutícula se trata con ácidos inorgánicos para quitar los carbonatos y luego se trata con álcali para la extracción de las proteínas, así se obtiene la quitina. (Pastor, A. 2004).



El **Quitosano** es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de β -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa [D-glucosamina y β -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (N-acetil - D- glucosamina) (Figura 2). El quitosano se obtiene por deacetilación de la quitina, la cual se encuentra presente en los exoesqueletos de los crustáceos, moluscos, cutículas de insectos y como constituyente de las paredes de muchos hongos. (Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzzarrelly, C. Sashiwa, H. y Domb, A. 2004).

El quitosano se caracteriza midiendo su grado de desacetilación, peso molecular, solubilidad, cristalinidad, % de humedad, % de cenizas, % de nitrógeno, viscosidad, etc.



Aplicaciones del quitosano.- Las propiedades del quitosano, justifican la aplicabilidad de este biopolímero en diversos campos. Los grupos aminos e hidroxilos presente en su estructura le confiere la capacidad de derivatización, obteniéndose una variedad de sustancias con propiedades específicas y valiosas en sus respectivos campos de aplicación. Las diversas aplicaciones son: aplicaciones biomédicas, aplicaciones farmacéuticas, aplicaciones en alimentos, aplicaciones en agricultura, aplicaciones en tratamiento de aguas, aplicaciones en cosmética, aplicaciones en papeles y envases, aplicaciones en fibras y reactivos para la industria textil, etc. (Pastor, A. 2004 y Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzzarrelly, C. Sashiwa, H. y Domb, A. 2004).

2. Material y métodos

Parte experimental

La muestra, residuos de caparazón de la ***Emerita analoga***, empleada para esta investigación ha sido recolectado en las playas del distrito de Ancón (Lima – Perú), en febrero y mayo de 2011, un peso total de 15 Kg.

Los materiales y reactivos para la caracterización de quitina y quitosano son de grado reactivo y/o analítico dependiendo de su aplicación, adquiridos de Merck.

Los equipos empleados para la caracterización de la quitina y quitosano es un espectrómetro infrarrojo, FT - IR, Serie 1600, Perkin Elmer; un espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear RMN BRUKER AC-300.

Obtención de quitina.- Para obtener la quitina a partir de los residuos de la *Emerita analoga* “muy muy” (caparazones), siguiendo a Percot, A., Viton, C. y Domard, A. (2003), se realizó los dos procesos siguientes:

a. Proceso de desproteínización (DP), los exoesqueletos (previamente se limpio de algunos partículas extrañas), fueron tratados con soluciones de

NaOH (4%, 8%, 12% y 16%); se realizaron pruebas a temperatura ambiente, 40°C y 60°C, para el tiempo se realizaron pruebas de 0,5, 1, 2 y 3 horas. Después de estas pruebas se determinaron las condiciones óptimas. Después del proceso, la solución fue filtrada y el material sólido se lavó con agua sucesivamente hasta alcanzar pH neutro. Todas las soluciones básicas se guardan.

b. Proceso de desmineralización (DM), se lleva a cabo a temperatura ambiente, con HCl a diferentes concentraciones (2%, 4%, 8%, 10%) y en el tiempo de reacción se realizaron pruebas de 30, 45, 60 y 75 minutos. Después de cada proceso, la solución se filtra y se lava con agua hasta obtener una solución pH igual que del agua.

Obtención de quitosano.- El producto obtenido después de realizar la DP y DM se llama quitina, luego se realizó el proceso llamado desacetilación el cual consistió en tratar con soluciones de NaOH (se hizo pruebas con 45%, 48% y 50%) el tiempo de reacción se ha variado de 1 hasta 4 horas, la temperatura de igual forma se ha variado de 90 hasta 100°C. Después de cada proceso, la solución fue filtrada y el material sólido se lavó con agua sucesivamente hasta alcanzar pH neutro, obteniéndose quitosano de color blanco. La solución básica se ha guardado para otros procesos.

Caracterización de quitina y quitosano.- Para ello se realizaron los siguientes análisis:

a. Determinación de nitrógeno.- La determinación del contenido de nitrógeno se realizó por el Método Kjeldahl. (ASTM. 1987 y AOAC. 1990).

b. Determinación del porcentaje de humedad.- Se determina normalmente por gravimetría; para ello, se lleva a peso constante una muestra calentada en una estufa a 105 °C, por 4 horas⁷.

c. Determinación de cenizas.- Esta determinación permite conocer el contenido de materiales inorgánicos presentes en la muestra. Es un parámetro muy importante al momento de evaluar las aplicaciones de un determinado quitosano o quitina. El contenido de cenizas se determina gravimétricamente partir del residuo obtenido tras la combustión de la muestra durante al menos 6 horas a 800 °C⁷.

d. Determinación del grado de desacetilación.- Muchas de las aplicaciones de los quitosanos están estrechamente relacionadas al grado de deacetilación. Existen varios métodos para determinar el grado de

Deacetilación del quitosano. Algunos de ellos son: espectroscopía UV, espectroscopía IR, RMN y los métodos electroquímicos. (Pastor, A. 2004).

d.1. Espectroscopía IR. Debido a su simplicidad es uno de los métodos más empleados. Este método se aplica especialmente cuando se tiene muestras que no se pueden preparar soluciones acuosas acidas, como es el caso de las quitinas, para ello se preparara una solución solido al 2%, 100 mg con KBr. Este método consiste en correlacionar la relación de absorbencias entre dos bandas de absorción determinadas, con el % de acetilación de la quitina o quitosano. La selección de las bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación (normalmente, una de las bandas amida) y otra que sirve de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración en las pastillas de KBr. Brugeneroto y col. Nosotros aplicaremos esta metodología para la quitina y el quitosano. (Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles, W., Desbrieres, J. y Rinaudo, M. 2001), para ello se ha tomado como banda característica a la localizada a 1320 cm⁻¹, y como referencia la banda a 1420 cm⁻¹, en donde la correlación lineal viene expresada por la siguiente relación:

$$GD (\%) = 87,8 - 31,92 \times (A_{1320} / A_{1420})$$

En todas las determinaciones por IR, es muy importante la selección adecuada de las líneas base en el cálculo de la absorbencia para alcanzar buenos resultados.

d.2. Espectroscopía RMN de alta resolución es un método no invasivo muy útil para el estudio de las estructuras químicas y estéricas de los polisacáridos. La caracterización por RMN es simple y rápida para análisis de rutina en el laboratorio. En la parte experimental se pesa 2 mg de muestra y se disuelve en una solución acida (HCl en D₂O), luego se pasa por el equipo a 70°C . El método de determinación del grado de acetilación del quitosano ha sido descrito por Lavertu, et al. (2003) y Fernandez, E., Novoa, R., Quiñoa, E. y Riguera, R. (2007), para el cálculo se usa la fórmula:

$$\% GD = 100 \left(\frac{H-CH_3/3}{H-1 + H-'1} \right) - x 100$$

En donde:

H-CH₃ = Valor del área bajo la curva de la señal del protón metílico

H-1 = Valor del área bajo la curva del protón con desplazamiento alrededor de 5,2ppm

H-01 = Valor del área bajo la curva del protón con desplazamiento alrededor de 5,4ppm

d.3. Espectroscopía UV - primera derivada.- Este método fue propuesto en 1985 por Muzzarelli y Rochetti y hace uso de la primera derivada de los espectro UV de la N-acetil-D-glucosamina (NAG), del quitosano y de disoluciones de ácido acético. El grado de acetilación se calcula haciendo uso de la ecuación siguiente, que relaciona la concentración de NAG determinada por medio de la curva patrón y la concentración de quitosano empleada en el ensayo. (Muzarelli, R. A. y Rochetti, R. 1985).

$$\%GA = \frac{[NAG]}{[Quitosano]} \times 100\%$$

e.- Determinación del peso molecular.- El método viscosimétrico es uno de los más empleados en las determinaciones de pesos moleculares de polímeros por su exactitud y sencillez, y puede ser aplicado a todo el rango de masas macromoleculares, exceptuando el caso de macromoléculas esféricas o muy ramificadas, ya que en ellas la viscosidad es independiente del peso molecular. Primero se determina las viscosidad empleando la formula: $n = K \rho t$ donde : n es viscosidad, K es una constante, ρ es la densidad y t es el tiempo en segundos. Luego se calcula la viscosidad intrínseca para finalmente determinar del tamaño molecular de los polímeros, que se relaciona con el peso molecular mediante la ecuación de Mark-Houwink. (Roberts, G. A. y Domszy, J. G. 1982).

3. Resultados y discusión

La caracterización de la muestra "muy muy" Emerita analoga, se realizó determinando su % de humedad, % de cenizas, % de nitrógeno, % de quitina obtenida y % de quitosano obtenido; estos resultados se muestran en la tabla1. Además, en esta tabla se observa los % de quitina y quitosano obtenidos estos significa los rendimientos de quitina y quitosano,

Tabla 1
Características del "muy muy"

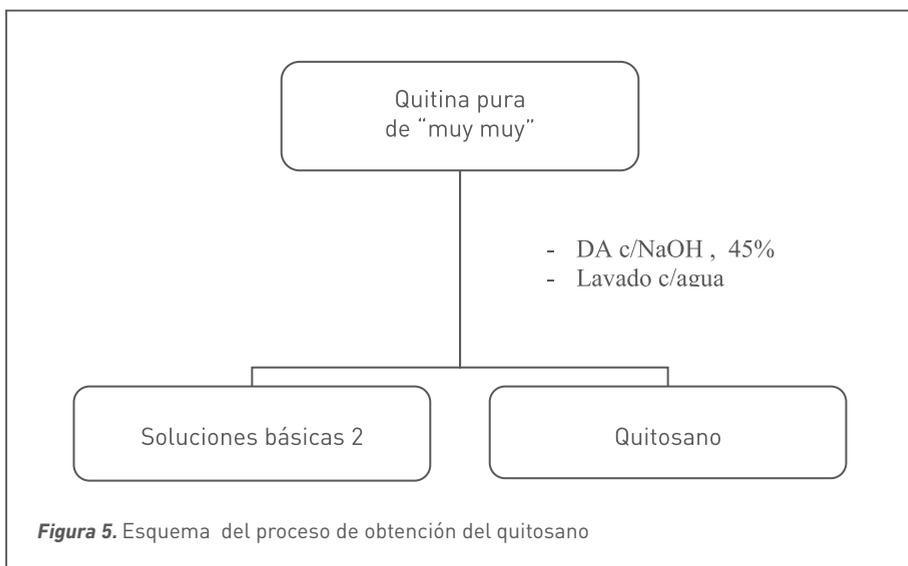
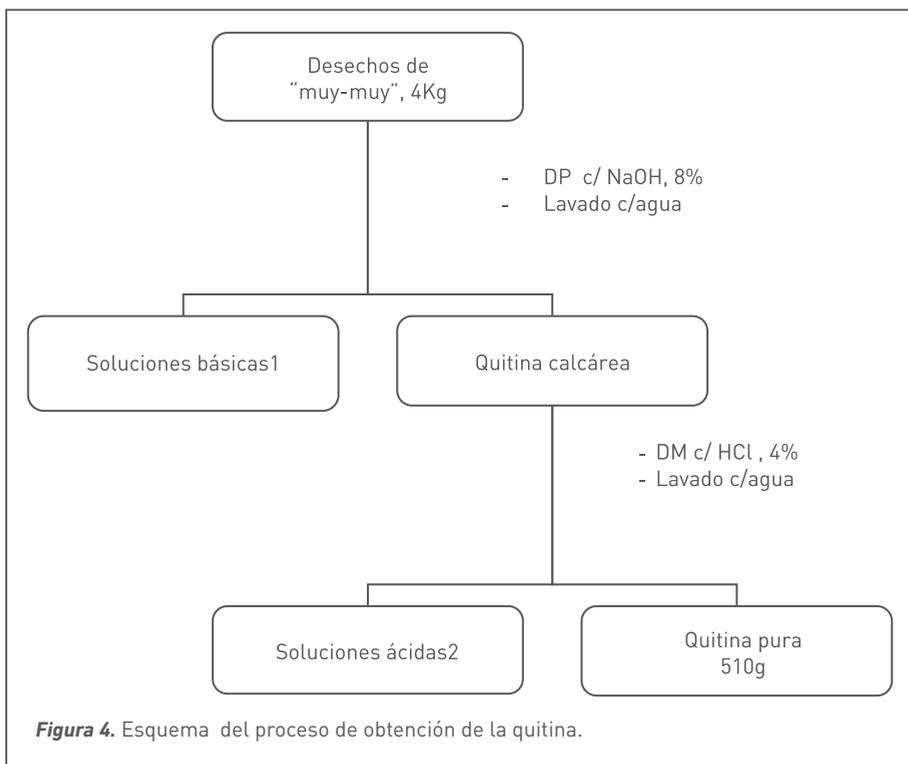
Parámetro	Valores obtenidos
% Humedad	4,38%
% Cenizas	29,03%
% Nitrógeno	2,41%
% Quitina	12,5%
% Quitosano	9,5%

Los procesos de obtención de quitina y quitosano se realizaron en un reactor, el cual es un tanque cilíndrico de acero inoxidable de 75 L de capacidad que cuenta con un sistema electrónico de control de temperatura, paletas de agitación y selector de velocidad.

En el proceso de desmineralización con el HCl, se debe tener en cuenta la liberación de dióxido de carbono a partir de la reacción ácida del carbonato de calcio o magnesio contenido en el caparazón del "muy muy", además de la liberación de dióxido de carbono, este último hace que el sistema se expanda y crea un problema durante el proceso experimental, el cual se soluciona con agitación suave.

En el proceso de desproteínización, se observa que es exotérmico, la temperatura llega a hasta 42 °C, durante el proceso se puede ir sacando muestras para ver cualitativamente si ya desproteínizó o no, en todo caso, analizarlo con un análisis de proteína usando el reactivo de Biuret y aplicar la espectroscopia ultravioleta visible. Las condiciones óptimas que se trabajó para la Emerita analoga están en la figura 4. En la figura 5 se muestran las condiciones óptimas a las que se trabajó, para obtener el quitosano.

Todos los procesos obtenidos de la quitina y el quitosano son ecológicos y ecoeficientes ya que no genera residuos, los residuos siempre se guardan ya sea para reutilizarlos (como los residuos de desacetilación); o se reúnen para formar otros subproductos (como los residuos de la desmineralización y desproteínización), en este caso se lleva al punto isoeléctrico; el subproducto formado se puede usar en alimentos balanceados para aves.



La caracterización de la quitina y del quitosano se realizó determinando su % de humedad, % de cenizas, % de nitrógeno, % desacetilación, viscosidad, masa molecular; todos estos resultados en forma resumida están en la tabla 2.

Tabla 2

Características fisicoquímicas de la quitina y del quitosano

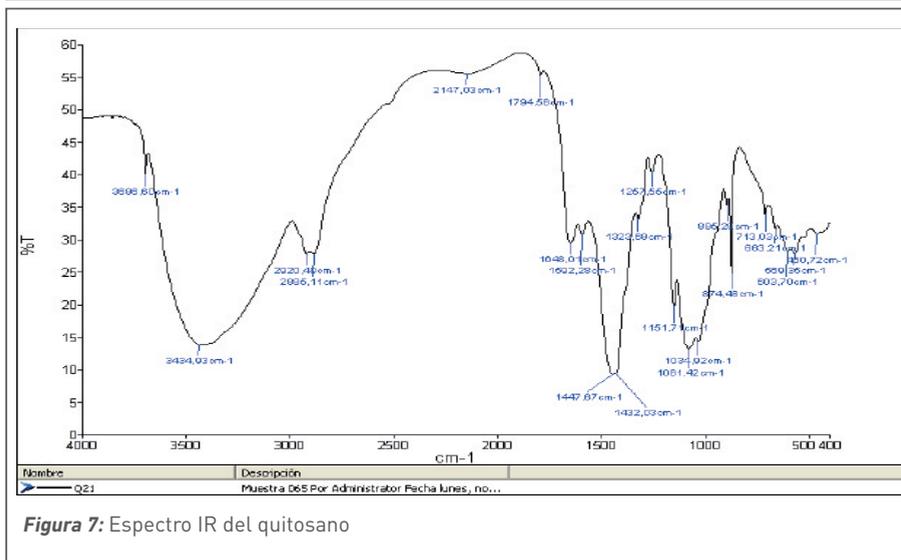
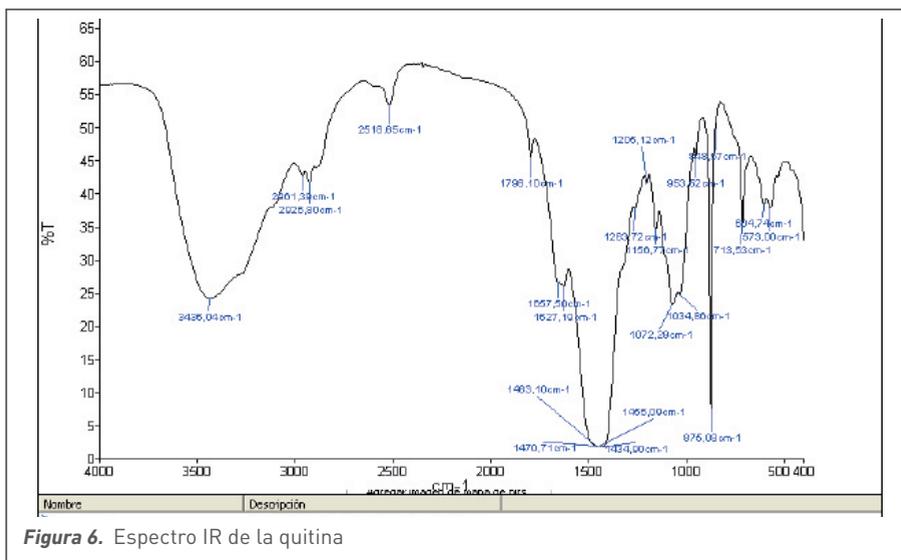
Muestra	% humedad	% Cenizas	% nitrógeno	% DA	Viscosidad	Peso molecular
Quitina	9,63%	25,38%	2,28%	52,8%	No se aplica	No se aplica
Quitosano	6,75%	16,29%	0,83%	83,7%	420 cP	294KDa

Para el caso de la determinación del % de humedad, % de ceniza y nitrógeno se ha realizado según la bibliografía mencionada; para la determinación de %DA hay 3 métodos:

En el caso de espectroscopia IR

Las muestras de quitina y quitosano se molieron y tamizaron hasta tener un tamaño de partícula menor a 0,5 mm. Se añadió KBr en una relación de 2:98 p/p, la mezcla fue prensada hasta obtener una pastilla muy delgada y translúcida, que fue usada para obtener el espectro de las muestras

Analizando las bandas en el espectro de la quitina (figura 6), se tiene las siguientes características: banda del O-H a 3434 cm^{-1} , N-H alrededor de 3200 cm^{-1} , C-H a 2920 cm^{-1} banda de la amida I a 1657 y 1627 cm^{-1} , banda N-H a 1434 cm^{-1} , C-O-C a 1072 cm^{-1} y a 848 cm^{-1} bandas de la tensión de los grupos anoméricos. Mientras que para el quitosano (analizamos la figura 7), se tiene las siguientes características: banda del O-H a 3434 cm^{-1} , N-H alrededor de 3200 cm^{-1} , C-H a 2926 cm^{-1} banda de la amida I a 1648 cm^{-1} , un banda del grupo NH₂ a 1592 cm^{-1} , banda N-H a 1447 - 1432 cm^{-1} , C-O-C a 1081 y 1034 cm^{-1} y a 874 cm^{-1} bandas de la tensión de los grupos anoméricos. Es bueno resaltar que comparando los dos espectros IR, en el espectro del quitosano aparece la banda a 1592 cm^{-1} , lo cual indica que tiene grupos NH₂, este grupo tiene la estructura del quitosano, y en el espectro de la quitina no aparece lo cual confirma que se trata de quitina.



La metodología de determinar el %DA por el de RMN-H tiene las siguientes características buenas como precisión, especificidad, estabilidad y exactitud; por ello esta técnica 1H-RMN hacen que los valores obtenidos para el grado de acetilación sean los tomados en cuenta para la determinación de los pesos moleculares por viscosimetría. En el método 1H-RMN, no necesita conocerse la cantidad de muestra, puesto que esto no interfiere con las señales relevantes del quitosano. Las señales usadas para la determinación del grado

de acetilación están bien resueltas y por tanto esta técnica es precisa y exacta, aún cuando se usen diferentes combinaciones de señales, ver figura 8.

En el caso de la espectroscopía UV - primera derivada se debe tener en cuenta que los resultados dependen de la exactitud en el peso de la muestra. Para conocer el %DA de las muestras se prepararon disoluciones de ácido acético 0,01 M, 0,02 M y 0,03 M y disoluciones patrón de N-acetil-glucosamina (NAG) de 10, 20, 30 y 40 ppm en ácido acético 0,01 M. Se registraron los espectros UV - primera derivada de estas soluciones (ver figura 9) y a partir de estos datos se construyó la curva de calibración (ver figura 10).

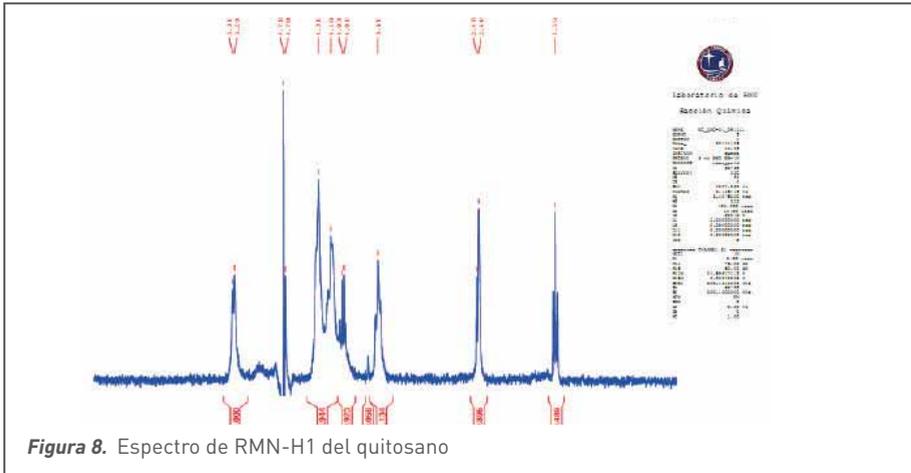


Figura 8. Espectro de RMN-H1 del quitosano

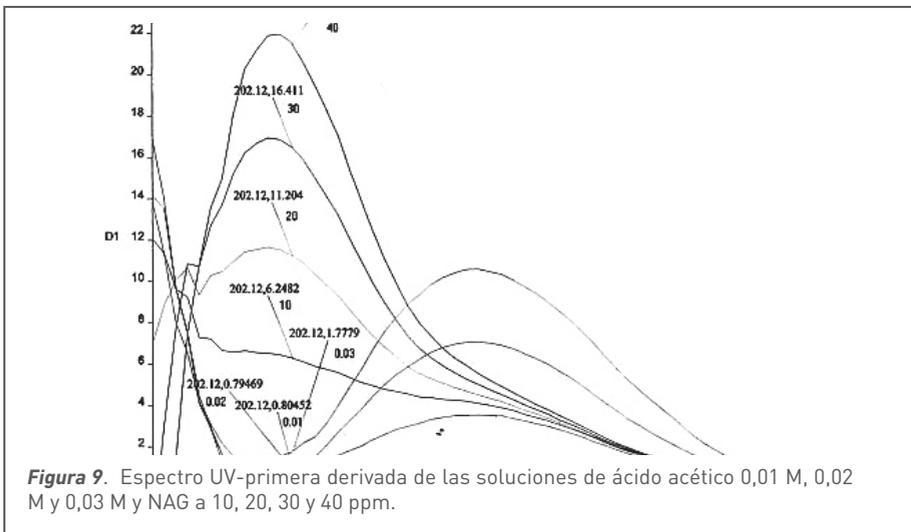
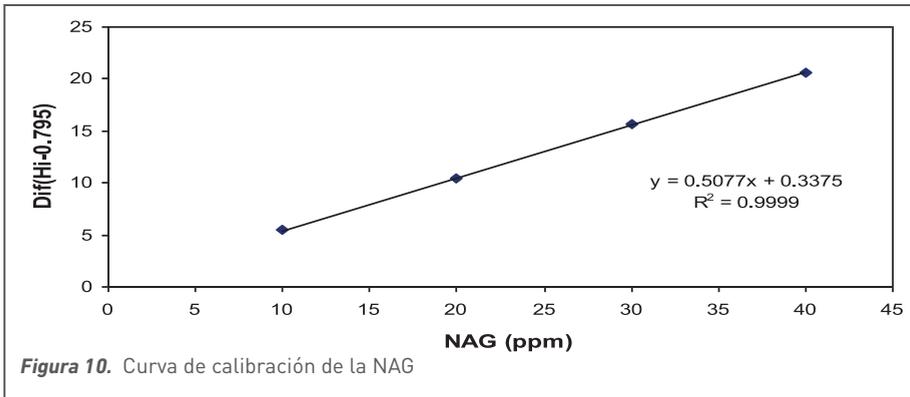
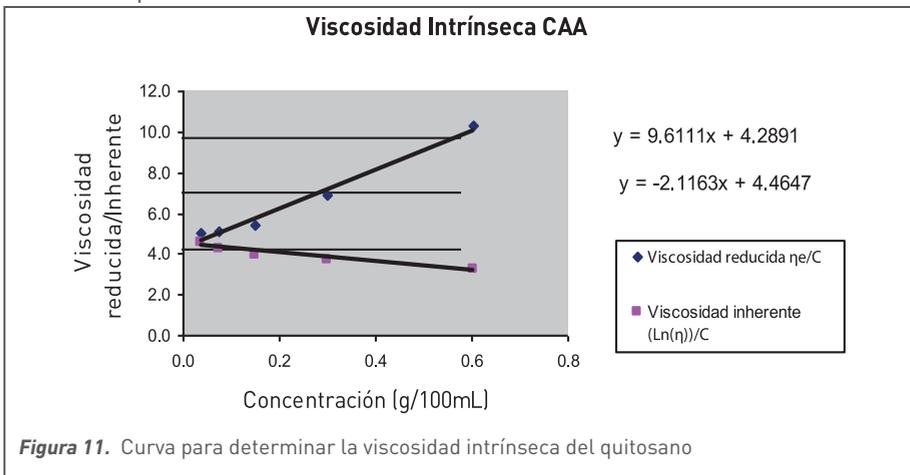


Figura 9. Espectro UV-primer derivada de las soluciones de ácido acético 0,01 M, 0,02 M y 0,03 M y NAG a 10, 20, 30 y 40 ppm.

La longitud de onda donde se cruzan las curvas de ácido acético es aproximadamente la misma donde la absorbancia de la NAG es máxima (202,12 nm) y la interferencia del ácido acético es mínima. Con la recta de calibración, figura 10, obtenida al representar las concentraciones de NAG frente a la diferencia de alturas se determinó el %DA del quitosano usando la ecuación. Para nuestro caso se peso el % DA fue de 81,8%.



La viscosidad intrínseca se determinó a partir de una solución de 1 mg/mL de quitosano en una solución 0,1 M de ácido acético y 0,2 M de NaCl. Se empleó un viscosímetro capilar tipo Ostwald con baño de agua a temperatura constante de 25 °C. En todos los casos las medidas del tiempo se hicieron por triplicado, se usó el valor medio para determinar la viscosidad cinemática del solvente y de la solución de quitosano y de las soluciones diluidas del quitosano. De esta forma la viscosidad del quitosano es de 420cP y luego al calcular el peso molecular nos dio 294 KDa.



4. Conclusiones

- Se obtuvo quitina (510g) con un rendimiento de 12,5% a partir de 4 Kg de Emerita analoga; sus características son: 9,63 % de humedad, 2,38% de cenizas, 2,28% de nitrógeno y 52,8% de desacetilación (medido por espectroscopia IR).
- Se obtuvo quitosano (386g) con un rendimiento de 9,5% a partir de 4Kg de Emerita analoga; sus características son: 6,75% de humedad, 1,29% de cenizas, 0,83% nitrógeno, 83,7% DA por RMN-H, 81,8% por UV-visible, con una viscosidad de 420 cP y el peso molecular de 294 KDa.
- Se obtuvo 1350 g. de subproducto (proteína-sales de calcio y magnesio) a partir de los residuos ácidos y básicos.

5. Referencias

- ASTM. (1987). *Standard Test Method for Total Nitrogen in Organic Materials by Modified Kjeldahl Method. A.S.T.M.* Designation E 258 - 67.
- AOAC. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* (15th ed.)
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles, W., Desbrieres, J. y Rinaudo, M. (2001). An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer* 42, 3569-3580.
- Chang, K.L. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*; 303, 327-332.
- Fernández, E., Novoa, R., Quiñoa, E. y Riguera, R. (2007). Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by 1H-RMN. *Carbohydrate Polymers* 61, 155-161.
- Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzarelli, C., Sashiwa, H. y Domb, A. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem Rev.* 104,6017-6084.
- Lavertu, M., Xia, A., Serreqi, A., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Bushman, M. y Gupta A. A. (2003). Validated 1H NMR method for the determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan. *J Pharm Biom Research* 32, 1149-1158.

- Montes, R. (2008). Efecto ecotoxicológico del petróleo crudo sobre el primer estadio de *Emerita* análoga. *Biologist* 6(2): 101-111. Lima.
- Muzarelli, R. A. y Rochetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by First derivative Ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymer* 5, 461-472.
- Pastor, A. (2004). *Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones*. CYTED, Lima, Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Paz, I., Chávez, M. y Velásquez, J. (2001). *Efectos medio ambientales y sanitarios de los desechos del crustáceo Emerita análoga en la región Arequipa*. CIES-Universidad Católica Santa María. Arequipa.
- Percot, A., Viton, C. y Domard, A. (2003). Characterization of Shrimp Shell Desproteinization. *Biomacromolecules* 4, 1380-1385.
- Roberts, G. A. y Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscosimetry constants for chitosan. *Int J of Biol Macromol* 4, 374-377.