

VISCOSIMETRÍA DE SOLUCIONES DE QUITOSANO Y EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA CON LA TÉCNICA DE IMPEDANCIA

VISCOSIMETRY OF CHITOSAN SOLUTIONS AND ELECTROCHEMICAL EVALUATION WITH THE IMPEDANCE TECHNIQUE

Ramírez-Reyes J. L.^{1*}, Gaytán-Macías D.E.², Galicia-Aguilar G.¹

¹ Instituto de Ingeniería-Universidad Veracruzana. SS Juan Pablo II s/n, Zona Universitaria, Boca del Río, Veracruz, CP 94294.

² Facultad de Ciencias Químicas Campus Veracruz, Universidad Veracruzana, Boca del Río, Veracruz

* luiiramirez@uv.mx

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es relacionar las propiedades viscosimétricas con la respuesta electroquímica en soluciones de quitosano de diferente peso molecular. La viscosimetría es un método para determinar el peso molecular de polímeros en solución como el quitosano y que está relacionado con las propiedades reológicas y viscoelásticas. Mark–Houwink–Sakurada propusieron un modelo para relacionar la viscosidad y el peso molecular de polímeros en soluciones diluidas. En el quitosano el peso molecular también está relacionado con el grado de de-acetilación y se han reportado valores de 10^5 a 5×10^5 g/mol. Aquí se busca correlacionar las mediciones electroquímicas de la capacitancia en soluciones de quitosano, aplicando un circuito equivalente sobre los resultados de la impedancia electroquímica. Con los parámetros del ajuste se determinaron los valores de capacitancia utilizando el método de Brug y se ajustó con una correlación lineal entre la viscosidad vs capacitancia. Utilizando la ley de la potencia se pudo recalculer los valores de viscosidad de las soluciones de quitosano con diferente peso molecular. Las mediciones con viscosímetro presentaron una alta oscilación de valores dependiendo de la aguja utilizada. Sin embargo al aplicar las metodologías propuestas para recalculer la viscosidad intrínseca por medio de los

parámetros electroquímicos e incluso por los de conductividad, no resultaron tan desfasado como se podría esperar aunque las metodologías aplicadas tienen que involucrar las propiedades termodinámicas para que se pueda mejorar el nivel de correlación, sobre todo al estudiar el efecto de la temperatura.

Palabras clave: Capacitancia; electroquímica; peso molecular; polímeros; viscosidad.

ABSTRACT

The main objective of this work is to relate the viscosimetric properties with the electrochemical response in chitosan solutions of different molecular weight. Viscosimetry is a method to determine the molecular weight of polymers in solution such as chitosan, which is related to the rheological and viscoelastic properties. Using the Mark-Houwink-Sakurada model to relate the viscosity with the molecular weight of polymers in diluted solutions. In chitosan the molecular weight is also related to the degree of de-acetylation, and values from 10^5 to 5×10^5 g / mol have been reported. Here it is sought to correlate the electrochemical measurements of the capacitance in chitosan solutions, applying an equivalent circuit to the results of the electrochemical impedance. With the adjustment of parameters, the capacitance values were determined using the Brug method and it was evaluated with a linear correlation between the viscosity vs capacitance. Using the power law it was possible to recalculate the viscosity of chitosan solutions with different molecular weight. The measurements with a viscosimeter showed a high oscillation of values depending on the needle used. However when applying the proposed methodologies to recalculate the intrinsic viscosity by means of the electrochemical parameters and even by the conductivity parameters, they were not as outdated as it could be expected although the applied methodologies

have to involve thermodynamic properties so that the level of correlation can be improved, especially when studying the effect of temperature.

Keywords: Capacitance; electrochemistry; molecular weight; polymerization; viscometer.

INTRODUCCIÓN

El uso de quitosano se ha propuesto en varias aplicaciones dentro de la Ciencia y Tecnología de alimentos; sin embargo, debido a sus características químico-estructurales, que le imparten importantes propiedades mecánicas, una aplicación de amplio potencial es en la formulación de películas y recubrimientos [1]. También, hay estudios de aplicación de películas y recubrimientos de quitosano [2], debido a su carácter antimicrobiano como agente de bio-control pos-cosecha en frutas y verduras [3]. También se ha aplicado específicamente para evaluar el uso de películas de quitosano de diferente peso molecular sobre las características fisicoquímicas,

bioquímicas y microbiológicas de frutas como la papaya, aumentando sus posibilidades de comercialización [4]. La mayoría de las aplicaciones del quitosano se basan en su naturaleza polielectrolítica y su habilidad quelante del grupo amino de la macromolécula [5]. En otras aplicaciones en alimentos líquidos lácteos como en la producción de yogurt sometido a diferentes procesos de deshidratación, hace posible conservar los productos con altos contenidos de humedad sin que el agua tome parte en las reacciones de degradación [6]. Otro aspecto importante sobre el quitosano, son sus aplicaciones en la nanociencia y los nano-recubrimientos, recientemente también se ha estudiado la

incorporación de nanopartículas de diferentes materiales (montmorillonita, nano-plata y plata-zeolita), en una matriz de quitosano, obteniendo películas con mejores propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas que el quitosano tradicional [7].

La técnica de impedancia electroquímica (EIS), ha demostrado ser de mucha utilidad en el estudio de fenómenos de interfase tanto en el estado sólido como en soluciones, debido a que es imprescindible la conductividad del medio electrolítico y la conformación de una celda electroquímica, donde se encuentren los elementos básicos de ánodo, cátodo, conexión eléctrica y conexión iónica a través del medio electrolítico y su interpretación por medio de circuitos equivalentes [8]. También se han realizado estudios en la producción de yogurt aplicando la técnica de EIS como parámetro de control de calidad en las

principales etapas de crecimiento de los lactobacilos [9].

La principal característica de la técnica de impedancia radica en que es de corriente alterna (ac) y por lo tanto puede ejercer mediciones de corriente y voltaje en el dominio de la frecuencia, aplicados a muestras metálicas y/o poliméricas conductoras que están en contacto con una solución electrolítica. En general la técnica EIS permite la determinación de parámetros como la velocidad de corrosión a través de la resistencia de transferencia de carga (R_{tc}), la capacitancia de la doble capa (C_{dl}) y el transporte de masa a través del coeficiente de difusión de Warburg (σ_w). Por lo regular las mediciones electroquímicas se realizan en el potencial de circuito abierto (E_{op}) y se grafica la respuesta en diagramas de Nyquist (Z' vs Z''), Bode ($|Z|$ vs frecuencia y Ángulo de fase vs frecuencia). Posteriormente se analiza

la respuesta electroquímica con modelos de circuitos equivalentes, para valorar el error de ajuste con respecto a los datos reales. El principal circuito que se ha aplicado para simular las interfases metal/solución es el tipo Randles de la **Figura 1** y representa a sistemas con un semicírculo o con una sola constante de tiempo definida por el producto de la $\tau=(R_{tc} \cdot C_{dl})$.

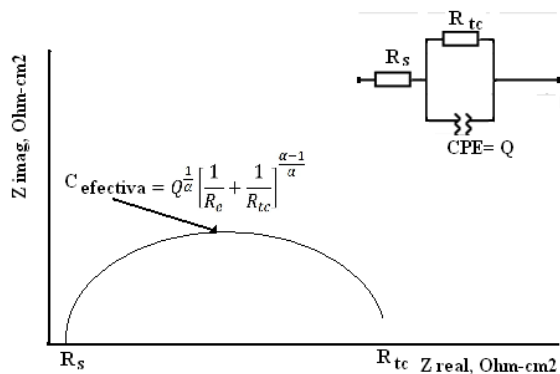


Figura 1. Diagrama de Nyquist del circuito equivalente R(RQ) aplicado al modelo de Brug.

En la realidad la respuesta electroquímica no es puramente capacitiva debido a parámetros como la rugosidad en la superficie de los electrodos, entonces se hace necesario el uso de un elemento de fase constante

(CPE), el cual es una función empírica de la admitancia $Y_{CPE} = Q_o \cdot (j\omega)^\alpha$, donde Q_o es una constante real e independiente de la frecuencia y α es un coeficiente adimensional con valores entre $(-1 \leq \alpha \leq 1)$. Con el método de Brug [10], se propuso una correlación entre los parámetros electroquímicos del circuito Randles de la Figura 1 para la capacitancia efectiva, como se expresa en la ecuación (1).

$$C_{eff} = Q^{\frac{1}{\alpha}} \left[\frac{1}{R_e} + \frac{1}{R_{tc}} \right]^{\frac{\alpha-1}{\alpha}} \quad (1)$$

Por lo que respecta a la viscosidad, existen suficientes evidencias de su aplicación en la práctica como un parámetro de control de calidad en la industria alimenticia como la miel [11], el yogurt [12] y también de hidro soluciones de quitosano [1], y de polímeros en solución [13], donde es considerado un parámetro importante para estimar el peso molecular en la

formulación de polímeros [14 y 15], para lo cual se requiere de la estimación de una serie de conceptos de viscosidad como la viscosidad relativa ($\eta_r = \eta/\eta_0$) donde η es la viscosidad de la muestra medida en un viscosímetro y η_0 es la viscosidad del solvente utilizado. La viscosidad específica ($\eta_{sp} = \eta_r - 1$), la viscosidad reducida ($\eta_{red} = \eta_{sp}/C$), donde la C es la concentración del soluto en el solvente, la viscosidad inherente ($\eta_{inh} = \ln(\eta_r)/C$). La viscosidad intrínseca $[\eta]$ se obtiene en el punto en que la η_{inh} y la η_{red} se aproximan a $C \rightarrow 0$. El método de Mark-Howink-Sakurada [16], propone una correlación que sigue el modelo de la ley de la potencia entre la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y el peso molecular por viscosidad M_v de polímeros en solución, con la expresión de la ecuación (2).

$$[\eta] = K^* [M_v]^\alpha \quad (2)$$

Donde K es una constante de proporcionalidad y α es un coeficiente, ambos dependientes del tipo de solvente y la temperatura, y se tienen que determinar para cada sistema polímero-solvente.

Para los propósitos de este trabajo, se ha buscado correlacionar la viscosidad intrínseca con las mediciones de la capacitancia medidas experimentalmente al aplicar la técnica de impedancia electroquímica (EIS) a muestras de quitosano de diferente peso molecular, utilizando las metodologías descritas anteriormente y aplicando un razonamiento similar al utilizado para determinar la viscosidad de la sangre con la técnica EIS [15].

METODOLOGÍA

Preparación de las Soluciones de Quitosano.

Se prepararon soluciones de quitosano de bajo, medio y alto peso molecular, a partir de quitosano grado reactivo de la marca SIGMA-ALDRICH®. Las muestras de quitosano (1%) se disolvieron en ácido cítrico (2%) en una relación de 1:2, a una temperatura de 60 ° C y mantenidas en agitación por 6 hr hasta disolución total. También se prepare otra serie de soluciones de quitosano agregando Grenetina grado reactivo en una proporción de 1:1 en 2% de ácido cítrico y siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente [17 y 18].

Experimentación Electroquímica Sistema de Electrodo Utilizado.

Se utilizó una sonda de electrodos impresos de la marca DropSnes® modelo DS 1100, conteniendo un electrodo de trabajo de pasta de carbono, un electrodo de referencia de

Ag/AgCl y un contraelectrodo de grafito, distribuidos en la forma que se muestra en la **Figura 2**.

Técnica Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.

Para la aplicación de las mediciones electroquímicas, se utilizó la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), por medio de un Potenciostato de la marca Ivium® modelo pocketstat. Para la técnica EIS se utiliza un voltaje ac en forma sinusoidal de ± 10 mV en el dominio de la frecuencia con un barrido de 10^4 a 0,01 Hertz. Las mediciones de impedancia se realizaron a 25 y a 37°C para cada solución de quitosano de diferente peso molecular. El análisis de la respuesta electroquímica se realizó con el software que provee el fabricante del potenciostato y aplicando el circuito equivalente descrito en la Figura 1.

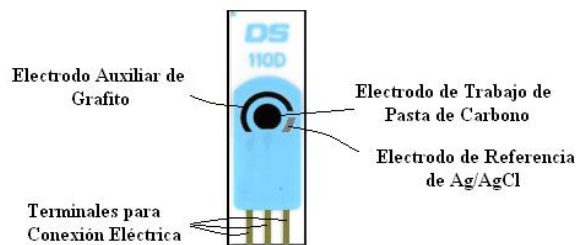


Figura 2. Sonda de electrodos impresos utilizados.

Experimentación de Viscosimetría.

Las mediciones de viscosidad se realizaron en un viscosímetro analógico marca Brookfield modelo DV-E, el cual utiliza un volumen mínimo de 20 ml de solución y realiza la medición con una serie de agujas (61, 62, 63 y 64), debido a la variabilidad en las lecturas de viscosidad al aplicar un esfuerzo de torque registrado en revoluciones por minuto para cada muestra de quitosano con diferente peso molecular sin y con grenetina y a las temperaturas de 25 y 37°C. Las lecturas de viscosidad se registran en centipoises (cP).

RESULTADOS

Mediciones de Viscosidad.

Tabla 1. Viscosidad Promedio de los tipos de Quitosano y el efecto de Temperatura.

Tipo de Quitosano	Viscosidad, cP a 25 °C	Viscosidad, cP a 37 °C
QBPM	74.108	25.3
QMPM	1230	118.5
QAPM	1624.11	326
QBPM+G	59	28.4
QMPM+G	3573.3	291.5
QAPM+G	4291.3	684.4

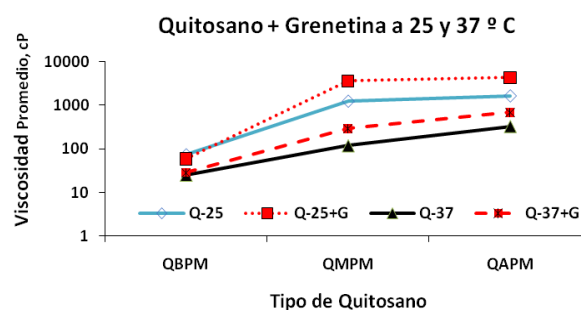


Figura 3. Comportamiento Viscosimétrico de las muestras de Quitosano a diferentes Temperaturas.

Mediciones Electroquímicas.

Tabla 2. Estimación de la Capacitancia para Quitosanos a 25°C.

Quitosano	R ₁	R ₂	Q ₁	n ₁	Capacitancia
QBPM	2.5E+02	8.5E+04	2.8E-05	8.9E-01	1.6E-05
QMPM	4.2E+02	5.6E+05	1.7E-05	8.9E-01	9.9E-06
QAPM	2.1E+02	1.6E+05	1.7E-05	8.4E-01	6.2E-06
QBPM+G	1.4E+02	2.9E+05	1.9E-05	8.8E-01	9.2E-06
QMPM+G	3.1E+02	6.7E+05	1.5E-05	9.3E-01	1.1E-05
QAPM+G	2.3E+02	8.7E+05	1.5E-05	9.1E-01	9.1E-06

Tabla 3. Estimación de la Capacitancia para Quitosanos a 37°C.

Quitosano	R ₁	R ₂	Q ₁	n ₁	Capacitancia
QBPM	3.1E+02	2.1E+05	1.6E-05	8.6E-01	7.2E-06
QMPM	5.1E+02	9.9E+05	2.5E-05	9.1E-01	1.6E-05
QAPM	3.7E+02	1.9E+05	2.8E-05	8.9E-01	1.6E-05
QBPM+G	3.2E+02	1.9E+05	2.2E-05	9.0E-01	1.3E-05
QMPM+G	2.5E+02	1.0E+06	2.9E-05	9.2E-01	2.0E-05
QAPM+G	1.9E+02	1.3E+06	2.4E-02	9.1E-01	2.8E-02

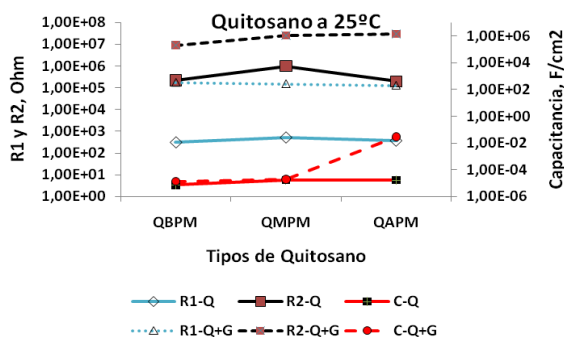


Figura 4. Parámetros Electroquímicos obtenidos de aplicar el circuito de la Figura 1 a las muestras de Quitosano y Quitosano + Grenetina a 25°C.

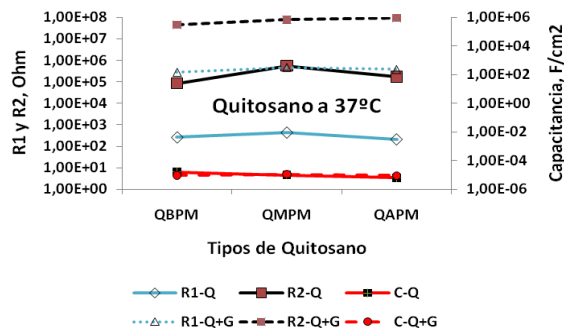


Figura 5. Parámetros Electroquímicos obtenidos de aplicar el circuito de la Figura 1 a las muestras de Quitosano y Quitosano + Grenetina a 37°C

Mediciones de Conductividad.

Tabla 4. Mediciones de Conductividad en Quitosanos a 25 y 37°C.

Tipo de Quitosano	Conductividad, Siemens a 25°C	Conductividad, Siemens a 37°C
QBPM	1916	2067
QMPM	1952	2085
QAPM	2034	2239
QBPM+G	2504	2875
QMPM+G	3137	3521
QAPM+G	3736	4238

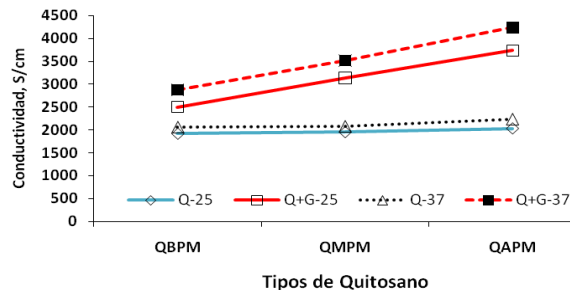


Figura 6. Comportamiento de la Conductividad de los Quitosanos a diferentes Temperaturas.

Correlación Viscosidad – Capacitancia.

Combinando los elementos del circuito randless de la Figura.1, con el modelo de la ley de la potencia, para relacionar la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y la capacitancia, se propone la siguiente correlación empírica:

$$[\eta] = (R_1 * T) [\tau]^{(R_1 * T) + R_2} \quad (3)$$

Donde R_1 es la resistencia del electrolito, T es la temperatura, τ es la constante de tiempo ($C * R_2$), R_2 es la resistencia de transferencia de carga y C es la capacitancia.

Ahora graficando $\ln(\tau)$ vs $\ln[\eta]$, se obtienen líneas de tendencia con no muy buena correlación de $R^2 = 0.7527$ para los quitosanos a 25 °C y de muy baja correlación de $R^2 = 0.2131$ para los 37 °C respectivamente.

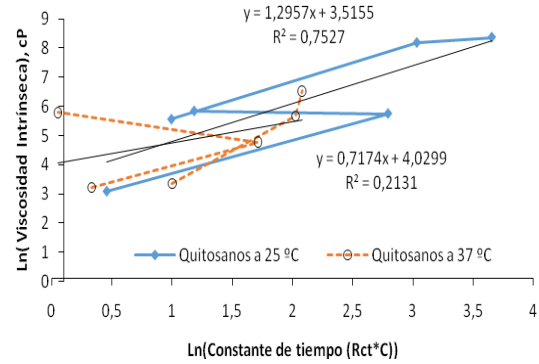


Figura 7. Correlación gráfica entre la Constante de tiempo τ y la Viscosidad Intrínseca $[\eta]$.

Tabla 5. Valores de Viscosidad medida y

Tipo de Quitosan	Viscosidad, cP a 25 °C		Viscosidad, cP a 37 °C	
o	Medida	Calculada	Medida	Calculada
QBPM	21,986	60,6	25,3	71,3
QMPM	314,6	1250	118,5	192,4
QAPM	343,6	155	323	58,3
QBPM+G	203,92	121	28,4	115,2
QMPM+G	3573,3	1710	291,5	240,36
QAPM+G	4291	3840	684,4	249,84

calculada con los datos Electroquímicos.

Correlación Viscosidad – Conductividad.

La correlación entre la viscosidad Intrínseca $[\eta]$ y la Conductividad C , se realizó aplicando el modelo de la ley de la potencia, considerando la presencia de una constante K y un coeficiente α , de la forma descrita en la expresión (4).

$$[\eta] = (K * T) [C]^\alpha \quad (4)$$

Ahora graficando $\ln(C)$ vs $\ln[\eta]$, se obtienen líneas de tendencia con no muy buena correlación de $R^2=0.722$ para los quitosanos a 25 °C y muy baja de $R^2=0.32$ para los 37 °C respectivamente.

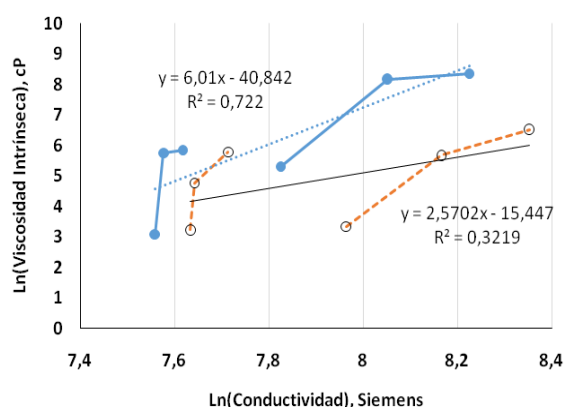


Figura 8. Correlación gráfica entre la Conductividad τ y la Viscosidad Intrínseca $[\eta]$.

Tabla 6. Valores de Viscosidad medida y calculada con los datos de Conductividad

Tipo de Quitosano	Viscosidad, cP a 25 °C		Viscosidad, cP a 37 °C	
	Medida	Calculada	Medida	Calculada
QBPM	21,986	97.66	25,3	154
QMPM	314,6	109.22	118,5	162.3
QAPM	343,6	139.87	323	249.1
QBPM+G	203,92	487.9	28,4	1119.3
QMPM+G	3573,3	1890	291,5	3784.5
QAPM+G	4291	5403.9	684,4	11528.7

DISCUSIÓN

Las propiedades funcionales de los recubrimientos formados de quitosano son determinadas por el peso molecular, el grado de desacetilación, el tipo de disolvente utilizado y el pH de la solución [19]. También hay factores como las propiedades reológicas, la temperatura y la humedad relativa ambiental que influyen en las características microestructurales y determinan las propiedades impermeables de tipo barrera cuando se usa como película.

El uso de la termodinámica como herramienta en la interpretación de las propiedades físicas y la conservación de los alimentos ha sido propuesto por diferentes grupos de investigación [20], considerando aspectos como el de conocer el nivel de humedad con una zona de mínima entropía integral de las moléculas de agua, puede tomarse como el punto de máximo orden de

moléculas de agua adsorbida por la superficie recubierta, pero en el caso del quitosano no necesariamente coincide con el valor de la monocapa o con la temperatura de transición vítrea (T_g).

Con respecto a los resultados para las soluciones de quitosano, se observó que las mediciones de la viscosidad con un viscosímetro presentaron una alta oscilación en sus valores dependiendo de la aguja utilizada, atribuible a las propiedades viscoelásticas del fluido, siendo necesario utilizar los valores promedio para cada tipo de quitosano, tanto en el peso molecular como con la utilización de un aditivo como la grenetina, valores que se reflejaron en la viscosidad intrínseca obtenida por cálculos viscosimétricos. Sin embargo al aplicar las mediciones electroquímicas y aplicar las metodologías propuestas para recalcular la viscosidad intrínseca por medio de los parámetros electroquímicos e incluso por los de

conductividad, no resultaron tan desfasado como se podría esperar, e incluso pueden seguir con más lógica las tendencias al incrementar el peso molecular y el uso del aditivo grenetina, observándose que para el parámetro de temperatura la metodología propuesta no mostró buena correlación, lo cual significa que la metodología todavía se considera incompleta porque sería recomendable considerar las propiedades termodinámicas [1,20]

CONCLUSIONES

1. Los usos y aplicaciones del quitosano en la ciencia y tecnología de alimentos, se debe principalmente a sus características químico- estructurales, que se reflejan en sus propiedades mecánicas en la formulación de películas y recubrimientos. También, debido a su carácter antimicrobiano en diversas aplicaciones en forma líquida.

2. Al estudiar soluciones de quitosano de diferente peso molecular sobre las propiedades viscosimétricas, electroquímicas y eléctricas, nos permitió aplicar metodologías de amplio uso en la bibliografía para correlacionar variables como la Viscosidad vs la Capacitancia y vs la Conductividad respectivamente.

3. Los resultados nos indican que las metodologías aplicadas tienen que involucrar las propiedades termodinámicas, para que se pueda mejorar el nivel de correlación, sobre todo al estudiar el efecto de la temperatura.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Medina-Sauza R. M., (2009) "Formulación y evaluación de propiedades físicas y termodinámicas de películas de quitosano y ácidos orgánicos", Tesis de Maestría en Ciencias Alimentarias, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver.
- [2] Suyatma N. E., Tilghzert L. y Copinet A., (2005), "Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:3950-3957.
- [3] Rojas-Graü M. A., Ávena-Bustillos R. J., Friedman M., Henlka R. J., Martián-Belloso O. y Mchugh T. H., (2006), "Mechanical, Barrier, and Antimicrobial Properties of Apple Puree Edible Films Containing Plant Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*", 54: 9262-9267.
- [4] González G. A., Monroy I. N., Goycoofea F., Díaz Iff. E. y Ayala J. F., (2005), "Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada", 61 Simposium: Nuevas Tecnologías de Conservación y envasado de frutas y hortalizas, Vegetales frescos cortados, La Habana, Cuba.
- [5] Park J. W., Choi K. H. y Park K. P., (1983), "Acid-base equilibria and related properties of chitosan", *Bull Korean Chem Soc*, 4:68-72.
- [6] Azuara E., Beristain C. I., (2006), "Enthalpic and entropic mechanisms related to water sorption of yogurt". *Drying Technology*, 24:1501 -1507.
- [7] Rhim J. W., Hong S. I., Park H. M., and Perry K. W. NG., (2006), "Preparation and characterization

- of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J. Agric., Food Chem.*, 54:5814-6822.
- [8] Piratoba-Morales U., Vera-López E., Ortiz-Otálora C., (2010), "Aspectos Básicos en la Interpretación de Diagramas de Impedancia Electroquímica", *Dyna*, año 77, 162:1319pp, Medellín.
- [9] Villa-García, M., Pedroza-Islas, R., San Martín-Martínez, E., Aguilar-Frutos M., (2013) "Espectroscopía de Impedancia: Un método rápido y eficiente para el monitoreo del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*", *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12:1:57-64, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- [10] Brug G. J., Van de Eeden A, Sluyters-Rehbach M., Sluyters J., (1984) "The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element", *J. Electroanal. Chem.*, 176:275-295.
- [11] Gómez-Díaz D., Navaza J. M., Quintáns-Riveiro L. C., (2004), "Estudio viscosimétrico preliminar de mieles de bosque denominación específica. Miel de Galicia", *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4:4:234-239., Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Reynosa, México.
- [12] Pop G., Hop W., Moraru L., Quak J., Dekkers D., Chang Z., Gijzen F., Duncker D., Slager C., (2003), "Applied Rheology", 13:305-312.
- [13] De la Paz N., Pérez D., Fernández M., Darío López O., Nogueira A., Rapado Paneque M., et al, (2013), "Evaluación Viscosimétrica del Quitosano derivado de la Quitina de Langosta", *Rev. Iberoam. Polim.*, 14:2:84-91.
- [14] Sánchez-Angulo J. L., (1994) "Caracterización Físicoquímica de Polímeros", Ed. Limusa.
- [15] Parada L, Crespín G, Miranda R, Katime I, (2004), *Rev. Iberoam. Polím.*, 5:1
- [16] Herman F. M., Sheldon A., (1977), "Introduction to Polymer Science", SPE Monographs.
- [17] Gijzen F., Allanic E., Van de Vosse F., Janssen J., (1999), "Journal of Biomechanics", 32:705-713.
- [18] Hill D., Thompson F., (1975), *Medical and Biological Engineering* 13:2:182-186.
- [19] Park S. Y., K. S. Marsh y J. W. Rhim., (2002), "Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents", *J Food Sci.* 67:194-7.
- [20] Beristain C. I., Azuara E., (1990), "Estabilidad máxima en productos deshidratados", *Ciencia*, 41:1:229-236