

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE QUITINA Y QUITOSANO DE***Brachystola magna* (Girard)**EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF PHYSICO-CHEMICAL, MORPHOLOGICAL, AND STRUCTURAL PROPERTIES OF CHITIN AND CHITOSAN FROM *Brachystola magna* (Girard)**J.G. Monter-Miranda<sup>1</sup>, J.M. Tirado-Gallegos<sup>1</sup>, P.B. Zamudio-Flores<sup>1\*</sup>, C. Rios-Velasco<sup>1</sup>, J. de J. Ornelas-Paz<sup>1</sup>, R. Salgado-Delgado<sup>2</sup>, V. Espinosa-Solis<sup>3</sup>, F. Hernández-Centeno<sup>4</sup><sup>1</sup> *Fisiología y Tecnología de Alimentos de la Zona Templada, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. -Unidad Cuauhtémoc. Avenida Río Conchos s/n, Parque Industrial, Apartado postal 781, C.P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México.*<sup>2</sup> *Departamento de Posgrado en Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Zacatepec, Calzada Tecnológico 27, Zacatepec, Morelos, México.*<sup>3</sup> *Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Coordinación Académica Región Huasteca Sur de la UASLP, km 5, carretera Tamazunchale-San Martín, 79960, Tamazunchale, S.L.P. México*<sup>4</sup> *Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista,*

Recibido 18 de mayo de 2016; Aceptado 15 de septiembre 2016

**Resumen**

Se aisló quitina del insecto *Brachystola magna* mediante un tratamiento ácido-alcalino (1 M de HCl y NaOH) con temperatura elevada (97 °C), y posteriormente se desacetiló hasta quitosano (NaOH 40 %/110 °C/5.5 h). Los rendimientos de quitina y el quitosano fueron de 10.4 y 8.1% en peso seco, respectivamente. La quitina y el quitosano se caracterizaron por espectroscopia de infrarroja con transformada de Fourier, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, titulación potenciométrica, cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño y se compararon con quitina y quitosano comerciales. Los resultados mostraron que la quitina y el quitosano presentaron estructuras químicas comparables a los comerciales con propiedades fisicoquímicas similares; obteniendo un quitosano con un grado de desacetilación de 87% y con peso molecular elevado (25.8 kDa). *Brachystolla magna* Girard podría ser considerado como un insecto potencial para la obtención de quitina y quitosano en cantidades significativas y a bajo costo.

**Palabras clave:** insecto, grado de desacetilación, caracterización molecular, quitina, quitosano.

**Abstract**

Chitin was isolated from the insect *Brachystola magna* using an acid-alkali treatment (1 M of HCl and NaOH) at high temperature (97 °C); it was then deacetylated to chitosan (NaOH 40 % /110 °C/ 5.5 h). The dry weight yields of chitin and chitosan were 10.4 and 8.1% respectively. Chitin and chitosan were characterized by infrared spectroscopy with Fourier transform, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, potentiometric titration and high-performance size-exclusion chromatography; they were compared with commercial chitin and chitosan. The results showed that the obtained chitin and chitosan had chemical structures comparable to commercial polymers, with similar physicochemical properties; the obtained chitosan had a deacetylation degree of 87 % and high molecular weight (25.8 kDa). *Brachystolla magna* Girard could be considered as a potential source for obtaining chitin and chitosan in significant quantities and at low cost.

**Keywords:** insect, degree of deacetylation, molecular characterization, chitin, chitosan.

## 1 Introducción

La quitina es el principal componente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos (Liu y col., 2012; Sotelo-Boyás y col., 2015), también se le

puede encontrar conformando las paredes celulares de hongos (Pérez-Martínez y col., 2014; Yen y col., 2009). En base a la cantidad de quitina producida

\* Autor para la correspondencia. E-mail: pzamudio@ciad.mx

anualmente en el mundo, este es el biopolímero más abundante después de la celulosa (Rinaudo, 2006; Wu y Meredith, 2014). Estructuralmente, la quitina es un polisacárido compuesto por poli [ $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4) N-acetil-D-glucosamina] y se encuentra unida covalentemente a otros compuestos como son proteínas (fibras de esclerotina) y catecoles, por lo que es necesario la aplicación de métodos de separación para su obtención y purificación (Majtán y col., 2007). Se podría decir que se trata de un derivado de la celulosa en la que el grupo hidroxilo en el C2 se sustituye por un grupo acetamido y se estabiliza por las uniones intermoleculares de hidrógeno C3-OH...C5, NH...O=C y C6-OH...O=C, lo que le otorga la misma estabilidad estructural que presenta la celulosa (Zhang y col., 2000). En la naturaleza se presenta en tres formas cristalinas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - con diferentes orientaciones de fibrillas, dentro de los cuales, la forma  $\alpha$ -cristalina es la más abundante (Sajomsang y Gonil, 2010; Zhang y col., 2000). El interés por el biopolímero de quitina comenzó en la década de 1950, a pesar de ser un material descubierto hace más de 100 años. Actualmente se buscan aplicaciones potenciales para dichos materiales biopoliméricos (Khor, 2014). Generalmente, para la obtención de la quitina purificada se emplean dos etapas, comenzando por una hidrólisis ácida para la separación de minerales como el carbonato de calcio, seguida por una desnaturalización en un medio alcalino para la eliminación de las fibras proteicas. Ambas etapas se realizan a altas temperaturas por un determinado tiempo para desestabilizar los enlaces covalentes y componentes que interactúan con la quitina (Khor, 2014; Majtán y col., 2007). La desacetilación de la quitina da lugar a uno de sus derivados más importantes, el quitosano. Esta desacetilación generalmente se realiza mediante un tratamiento alcalino (considerablemente mayor que en la des-proteinización) a altas concentraciones de solución ( $\approx$  40-50%). Esto favorece la eliminación de los grupos acetil unidos en el C3 (Lamarque y col., 2007; Qi y col., 2004). El quitosano es un copolímero catiónico que se caracteriza por su elevado número de grupos amino y, a diferencia de la quitina, es soluble en medio ácido (Beil y col., 2012; Pérez-Escobedo y col., 2016; Salazar-Leyva y col., 2014). Ambos bio-materiales (quitina y quitosano) son comúnmente utilizados en diferentes sectores, incluyendo el alimenticio, químico, biotecnológico, agrícola, veterinario, cosmético, además de la medicina, la odontología, la protección del medio ambiente, textil, fabricación de papel y envases. También son una

alternativa a bactericidas y fungicidas químicos, por su bajo riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Kucukgulmez y col., 2011; Kumar y col., 2013; Pillai y col., 2009; Salazar-Leyva y col., 2014; Sotelo-Boyás y col., 2015). El quitosano se produce en escala industrial a partir de los residuos biológicos de los organismos acuáticos, principalmente de desechos de camarones, langostinos, cangrejos y langostas (Kaya y col., 2015a; Salazar-Leyva y col., 2014; Song y col., 2013), los cuales se obtienen solo por temporada (Song y col., 2013).

Recientemente se ha comenzado a explorar la extracción y caracterización de quitina y quitosano a partir de insectos (Kaya y col., 2015a; Song y col., 2013). Aunque existen aproximadamente dos millones de especies de insectos en el mundo, existen pocos estudios sobre la preparación y caracterización de sus quitinas y derivados (Kaya y col., 2015a). Al respecto, Wu (2011) obtuvo quitosano con alto nivel de desacetilación a partir de la cutícula de larvas de *Clanis bilineata* utilizando métodos enzimáticos. Posteriormente, Song y col. (2013) determinaron las propiedades físico-químicas y la actividad antioxidante de quitosano de la larva *Megacephala chrysonya* obteniendo dicho polímero con características similares a las reportadas en fuentes comerciales. Recientemente Kaya y col. (2015b) aislaron, caracterizaron y compararon quitina de diversas especies de chapulín, con el inconveniente de haber obtenido dicho recurso con rendimientos y pesos moleculares relativamente bajos en comparación con lo reportado en otros insectos. El orden orthoptera, entre los cuales se encuentran los chapulines, cuenta con más de 25,000 especies diferentes en todo el mundo (Kaya y col., 2015b). Los chapulines o saltamones causan anualmente cuantiosas pérdidas económicas ya que dañan las hojas, las flores y brotes de los cultivos (Kaya y col., 2015b). Debido a que los chapulines se alimentan de una gran variedad de plantas, sus infestaciones pueden llegar a competir por el alimento con el ganado de pastoreo (vacas, cabras, borregos, etc.) (Sun y col., 2016). Dentro de los chapulines, se encuentra *Brachystola magna* (Girard), el cual al ser un insecto polífago representa un problema de importancia prioritaria para la agricultura en nuestro país, generando costos adicionales en la producción de alimentos debido a las pérdidas que ocasiona y por el uso de plaguicidas que se utilizan en su control, esto último con potenciales efectos nocivos a la población humana y fauna (Lozano-Gutierrez, 2006; Mena-Covarrubias, 2009). Sus infestaciones pueden llegar a ser de 30 chapulines/m<sup>2</sup> o más (Rios

y col., 2014), por lo que es posible su recolección para ser aprovechada como posible fuente de quitina y quitosano con propiedades específicas, contribuyendo así a su control y aprovechamiento. Por tal razón el objetivo de este estudio fue extraer y caracterizar, por primera vez, las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano aislados a partir del insecto *Brachystola magna* Girard.

## 2 Metodología

### 2.1 Materiales

Todos los chapulines *Brachystola magna* se colectaron de los campos y agostaderos del municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Todos los reactivos utilizados para la extracción y purificación de quitina y quitosano del chapulín fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma-Aldrich (Toluca, Estado de México, México). Para fines de comparación se utilizó  $\alpha$ -quitina de caparazón de cangrejo a la cual denominamos como “quitina referencia” (CAS: 1398-61-4, clave de producto en Sigma: C9213-500G), quitosano de camarón de peso molecular bajo (denominado por las siglas “QPMB”, CAS: 9012-76-4, clave de producto en sigma: 448869-250G), y quitosano de camarón de peso molecular medio (denominado por las siglas “QPMM”, CAS: 9012-76-4, clave de producto en sigma: 448877-250G), adquiridos de Sigma-Aldrich, Co. (Toluca, Estado de México, México).

### 2.2 Obtención de quitina y quitosano a partir de *Brachystola magna*

#### 2.2.1. Obtención de la harina de chapulín

Los chapulines (*Brachystola magna* Girard) se lavaron previamente con agua potable varias veces hasta que el agua dejó de verse turbia y finalmente se lavaron con agua destilada. Una vez limpios, se ultracongelaron a  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se liofilizaron (temperatura =  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y vacío =  $-133\text{ mBar}$ ) con una liofilizadora (Labconco 77540-00, MO, USA.). Una vez liofilizada la muestra, se molió en un mortero y pistilo y se pulverizaron a un tamaño de partícula menor a  $0.841\text{ mm}$  con un molino IKA (modelo M 20, IKA Works, Inc., NC, USA). Finalmente la harina se almacenó en bolsas herméticas medianas de  $18 \times 20\text{ cm}$  (Ziploc, Johnson y Sons, Inc., Racine, WI, USA) protegiéndola de la humedad y la luz hasta su posterior uso.

#### 2.2.2. Quitina

La quitina se extrajo a partir de la harina liofilizada obtenida del insecto completo. La extracción de la quitina se realizó de acuerdo al método reportado por Liu y col. (2012) con algunas modificaciones, para lo cual primero se realizó una desmineralización y posteriormente una desproteínización: a) Desmineralización. En un matraz Erlenmeyer (1 L) se mezclaron 10 g de polvo liofilizado y tamizado (malla 80) con 500 mL de HCl 1 M. La mezcla se calentó a  $97\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min para descartar minerales y catecoles de la reacción. Una vez terminado el proceso, se filtró para la remoción del HCl. Posteriormente se lavó con 500 mL de agua destilada (la misma cantidad relativa a la que se agregó HCl para quitar el reactivo aun presente en la muestra). b) Desproteínización. Una vez desmineralizada, la harina de chapulín se desproteínizó mediante tratamiento alcalino con 500 mL de solución de NaOH 1 M a  $82\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$  durante 24 h en un matraz de Erlenmeyer de 1 L. El producto se lavó con agua destilada tres veces (con 500 mL en cada ocasión), después se adicionó HCl hasta que el pH se neutralizó. Por último, la quitina (coloración ligeramente café) se liofilizó ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/-133\text{ mBar}$ ) con una liofilizadora (Labconco 77540-00, MO, USA).

#### 2.2.3. Quitosano

Para la obtención del quitosano se utilizó la metodología descrita por Zhang y col. (2000), con algunas modificaciones. La quitina extraída se disolvió con 300 mL de solución acuosa de NaOH al 40% que contenía  $\text{NaBH}_4$  (0.25 g). Esta mezcla se colocó en un matraz Erlenmeyer cerrado y se calentó a  $105\text{-}110\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una placa de calentamiento (Corning 6795-220 PC-220 de  $4'' \times 5''$  Corning Mexicana, S.A.-Life Sciences, Monterrey, México) con agitación constante durante 5.5 h. Posteriormente el producto se filtró utilizando filtros comunes para cafetera (Mr. Coffee, modelo UF100 Sunbeam Products, Winsconsin, USA) aplicando varios lavados con agua destilada para remover los residuos adheridos al filtro. El retenido se disolvió en solución acuosa de ácido acético al 2% con agitación durante 1 h. Esta mezcla se filtró nuevamente y el sobrenadante se ajustó a pH 9 con NaOH 1 N para sedimentar el quitosano. El quitosano así obtenido se lavó dos veces con agua desionizada para remover las sales formadas durante el proceso y se sometió a liofilización bajo las condiciones descritas para la quitina.

### 2.3 Difracción de rayos X

Se utilizó el análisis de difracción por rayos X para determinar la cristalinidad de la quitina y quitosano aislados del chapulín. Para lo cual las muestras se molieron en un mortero de ágata y posteriormente se registraron sus difractogramas en un difractómetro de rayos X (Analytical X'pert PRO X' Celerator, Texas, USA). Los patrones se registraron utilizando una radiación de CuK ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) operando a un voltaje de 40 kV. Los datos se recolectaron a una velocidad de barrido de  $1^\circ/\text{min}$  con el ángulo de exploración  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ .

### 2.4 Microscopía electrónica de barrido con detector de energía dispersiva (MEB)

La morfología superficial de las muestras se examinó con un microscopio electrónico de barrido marca HITACHI (SU3500, Tokio, Japón). Las condiciones de operación fueron 15 kV como voltaje de aceleración, 80 Pa de presión y la señal de electrones secundarios (UVD-UltraVariable-PressureDetector). Las muestras se ampliaron en aumentos de 100X, 250X, 500X, 1000X y 1500X.

### 2.5 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (EITF)

Las muestras se caracterizaron utilizando un espectrómetro marca Perkin Elmer (Spectrum GX FTIR System, Massachusetts, USA). El espectro se obtuvo por reflectancia con ayuda de un accesorio de RTA (Reflectancia Total Atenuada) marca Smiths, modelo Quest, con ventana de diamante de un rebote. Los espectros se obtuvieron con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , y con un barrido de número de onda ( $1/\lambda$ ) de  $4000$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$ . Los polvos se colocaron en el portamuestras para RTA, se ejerció una presión de 60 unidades y se realizó el análisis utilizando el software spectrum two (versión 10.4).

### 2.6 Peso molecular por cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño (HPSEC)

Las muestras de quitina se disolvieron en una solución de DMAc/LiCl (5% p/v). Para esto, 5 mg de quitina se disolvieron con 2 mL de DMAc/LiCl (5% p/v) bajo agitación magnética a  $60^\circ\text{C}$  en un baño de aceite por al menos 48 h. Posteriormente, la solución se filtró a

temperatura ambiente a través de un filtro de fibra de vidrio de  $0.3 \mu\text{m}$  (Whatman) y se transfirió en viales para HPLC por análisis SEC (HPLC-SEC). El análisis SEC se realizó utilizando el reactivo DMAc/LiCl como la fase móvil y un conjunto de dos columnas no lineales en serie PLgel ( $7.5 \times 300 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ \AA}$ ) y PLgel ( $7.5 \times 300 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$ ,  $500 \text{ \AA}$ ). Este conjunto de columnas analíticas se protegió con un guardacolumna ( $50 \times 7.5 \text{ mm}$ ). El análisis SEC se realizó a una velocidad de flujo de  $0.5 \text{ mL/min}$ , a  $50^\circ\text{C}$ , equipado con un detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, US). Para la determinación del peso molecular de los quitosanos se utilizó la técnica SEC, con algunas modificaciones. Para lo cual, una muestra de quitosano se solubilizó en ácido acético (0.25 M) a una concentración final de  $4 \text{ g/L}$ . Esta solución se inyectó en un equipo de HPLC-SEC, equipado con una columna 500 ultrahydrogel ( $7.8 \times 300 \text{ mm}$ ) y un detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, US). La separación se realizó con ácido acético al 0.25 M como la fase móvil, a una velocidad de flujo de  $0.3 \text{ mL/min}$  mediante una bomba isocrática HP Series 1100.

### 2.7 Determinación del grado de desacetilación por valoración potenciométrica

El grado de desacetilación se determinó siguiendo la metodología propuesta por Broussignac (1968). Se disolvieron 0.4 g de cada una de las muestras de quitosano en 25 mL de una solución de HCl al 0.1 N y posteriormente se aforó a 100 mL. La mezcla se colocó en un vaso de precipitado y se midió el pH con ayuda de un potenciómetro equipado de un electrodo de vidrio para su valoración con NaOH al 0.1 M. Se registró el pH cada 0.5 mL de NaOH agregado, se obtuvo una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido (esta curva presentó dos picos de inflexión). La diferencia de volumen entre los dos puntos de inflexión correspondió con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permitió la determinación del grado de acetilación del quitosano. Una vez obtenido los resultados se procedió a su corrección conforme al valor del peso seco de las muestras.

### 2.8 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Para cada determinación se utilizó un tamaño mínimo de tres repeticiones ( $n \geq 3$ ) en todas

las muestras. Para el análisis de los resultados, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA,  $P \leq 0.05$ ) utilizando el programa estadístico MiniTab, versión 17 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA). Se determinaron las diferencias entre tratamientos/muestras por medio de la prueba de Tukey.

### 3 Resultados y discusión

#### 3.1 Rendimiento y peso molecular de quitina y quitosano

El rendimiento de quitina obtenido a partir de *B. magna* fue de 10.4 % en base seca (2.7% en base húmeda) con un peso molecular aproximado de 127 kDa (Tabla 1). Para el quitosano, el rendimiento fue de  $8.4 \pm 0.08\%$  en base seca (2.2% base húmeda), con un peso molecular de 25.8 kDa y una desacetilación de  $57.01 \pm 1.69\%$  (Tabla 2). Por otra parte, los pesos moleculares de la quitina y quitosanos comerciales (utilizados como referencia) fueron de  $300 \pm 30$  kDa para la  $\alpha$ -quitina de cangrejo,  $38.4 \pm 10.3$  kDa para el quitosano de camarón de bajo peso molecular, y  $80 \pm 17.5$  kDa para el quitosano de peso molecular medio. Los porcentajes de desacetilación de las muestras de quitosanos fueron de  $72.99 \pm 0.65\%$  y  $68.09 \pm 0.81\%$ , para las muestras de quitosano de

peso molecular bajo y medio, respectivamente. Los rendimientos de quitina a partir de de *B. magna* resultaron similares a los reportados en otros insectos (Tabla 1). Liu y col. (2012) reportaron un contenido de quitina de 15 % en escarabajos y Zhang y col. (2000) determinaron un contenido promedio de 20% en *B. mori*. Los rendimientos de quitina reportados en diversas fuentes comerciales (cangrejos) extraídas a nivel de laboratorio se han reportado alrededor de un 30% (Mena-Covarrubias, 2009; Yen y col., 2009), casi tres veces a lo que se obtuvo a partir de *B. magna*. Por otra parte, el rendimiento y peso molecular de la quitina de *B. magna* obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Kaya y col. (2015b), quienes obtuvieron de 5.3 a 8.9% de quitina con un peso molecular de 5.2 a 6.8 kDa a partir de siete especies de chapulín (*A. simularix*, *A. strepens*, *D. fracta*, *D. laticornis*, *O. miniata*, *O. caerulea*, *P. cognata*). Estas diferencias en rendimiento y peso molecular de quitina podrían deberse a las diferencias entre las especies de chapulín, aunque sean de la misma familia; sin embargo, esto no necesariamente indicaría que *B. magna* posea un mayor contenido de quitina dentro de su exoesqueleto, sino que es necesario considerar que el tratamiento para la extracción de este biopolímero utilizado en este trabajo fue menos agresivo al reportado por Kaya y col. (2015b).

Tabla 1. Comparación del rendimiento en extracción de quitina en *Brachystola magna* Girard con lo reportado en otros insectos.

orden	Fuente (insecto)	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Equivalente <sup>b</sup> (%)	Peso molecular (kDa)	Referencia
Lepidoptera	Pupa del gusano de seda <i>Bombyx mori</i>	20.0	0.010	No reportado	Zhang et al. (2000)
Coleoptera	Escarabajo <i>Holotrichia parallela</i>	15.0	0.060	No reportado	Liu et al. (2012)
Orthoptera	Chapulín <i>Brachystola magna</i>	10.4	0.063	127	En este estudio
Orthoptera	Chapulín <i>Oedipoda caerulea</i>	8.9	0.056	6.2	Kaya et al. (2015)
Orthoptera	Chapulín <i>Oedipoda miniata</i>	8.1	0.054	5.8	Kaya et al. (2015)
Orthoptera	Chapulín <i>Aiolopus strepens</i>	7.4	0.052	5.2	Kaya et al. (2015)
Orthoptera	Chapulín <i>Pyrgomorpha cognata</i>	6.6	0.045	5.5	Kaya et al. (2015)
Orthoptera	Chapulín <i>Duroniella laticornis</i>	6.5	0.045	5.6	Kaya et al. (2015)
Orthoptera	Chapulín <i>Duroniella fracta</i>	5.7	0.043	5.9	Kaya et al. (2015)
Orthoptera	Chapulín <i>Aiolopus simulatrix</i>	5.3	0.042	5.3	Kaya et al. (2015)

<sup>a</sup>Porcentajes de rendimientos en base seca del insecto. <sup>b</sup>Equivalente de quitina por insecto (individuo).

Tabla 2. Comparativo del rendimiento en extracción de quitosano en *Brachystola magna* Girard con los obtenidos en otros insectos.

Orden	Fuente	Rendimiento* (%)	Equivalente (g)	Peso molecular (kDa)	Porcentaje de desacetilación (%)	Referencia
Lepidoptera	Larva y adulto del escarabajo colorado ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> )	20.0 y 7.0 (respectivamente)	0.050	2.676 y 2.722	76 y 82	Zhang <i>et al.</i> (2000)
Diptera	Larva de mosca ( <i>Chrysomya megacephala</i> )	15.0	0.023	501	87.9-89.6	Liu <i>et al.</i> (2012)
Orthoptera	Chapulín ( <i>Brachystola magna</i> )	8.4	0.054	25.8	57.01	En este estudio
Decápodo	Referencias de peso molecular medio y bajo	NA	NA	80 y 38.4	68.09 y 72.99	Kaya <i>et al.</i> (2015)

\*Porcentajes de rendimientos en base seca del insecto.

En este sentido, la variación en los pesos moleculares se encuentran influenciadas por las condiciones del proceso de desacetilación, por ejemplo, si se controlan los niveles de oxígeno y se mantienen bajos durante la reacción, se promueve la obtención de quitosanos con un mayor peso molecular y elevado grado de desacetilación (Zhang y *col.*, 2000). Algunos autores recomiendan el uso de reactores cerrados y la adición de NaBH<sub>4</sub> (borohidrato de sodio) para que este reactivo reaccione con el oxígeno e impida la oxidación y consecuente degradación del biopolímero (Ottey y *col.*, 1996; Zhang y *col.*, 2000). Otro factor a considerar, es el tiempo de reacción, ya que este afecta significativamente al peso molecular del quitosano; sin embargo, gracias a la estabilidad de los enlaces trans propios de la estructura de la quitina, es indispensable realizar el proceso de desacetilación por tiempos prolongados para que el medio alcalino, junto con altas temperaturas, actué en el rompimiento de los grupos COCH<sub>3</sub> (Chandumpai y *col.*, 2004). Indudablemente pueden existir otras fuentes de insectos con un mayor margen de productividad en cuanto a la obtención de ambos biopolímeros (quitina y quitosano), pero la densidad poblacional de *B. magna* puede llegar a ser de hasta 30 chapulines/m<sup>2</sup> en infestaciones severas (Rios y *col.*, 2014), convirtiéndola en una importante fuente de materia prima para la obtención de estos recursos. Además, se estaría combatiendo una plaga que causa grandes pérdidas económicas, generando costos

considerables para su control (CESAVECH, 2013; García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2009).

### 3.2 Difracción de rayos X

En la Fig. 1 y 2 se muestran los difractogramas de la quitina y quitosano de *B. magna*. Al igual que las muestras comerciales utilizadas como referencia, todas las muestras exhibieron los picos cristalinos característicos de estos biopolímeros en  $2\theta = 9.1^\circ$  y  $19.3^\circ$  (Yen y *col.*, 2009). Además de estos picos, se observaron cuatro picos menos agudos en la quitina de *B. magna* ( $13^\circ$ ,  $23^\circ$ ,  $26.3^\circ$  y  $38.7^\circ$ ) y quitina de referencia  $13^\circ$ ,  $23^\circ$ ,  $26.3^\circ$  y  $39^\circ$ . Los enlaces inter e intramoleculares por puente de hidrógeno entre las cadenas de quitina dan lugar a la existencia de tres formas cristalinas en la naturaleza:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  (Wang y *col.*, 2013). Al ser la más abundante, la  $\alpha$ -quitina ha sido ampliamente estudiada por difracción de rayos X (Zhang y *col.*, 2005). En los tres tipos de polimorfismo, los picos de cristalinidad más pronunciados se ubican próximos a  $2\theta = 9^\circ$  y  $19-20^\circ$ , siendo el segundo el de mayor intensidad, tanto para quitina como para quitosano (Focher y *col.*, 1992a; Kaya y *col.*, 2015a). Los patrones correspondientes a  $2\theta = 9.1^\circ$ ,  $19.3^\circ$  y  $23^\circ$  observados en ambas muestras de quitinas, describen la estructura típica de una conformación tipo ortorrómbica con los planos típicos de difracción (020), (110) y (101), característicos para  $\alpha$ -quitina, con una distribución

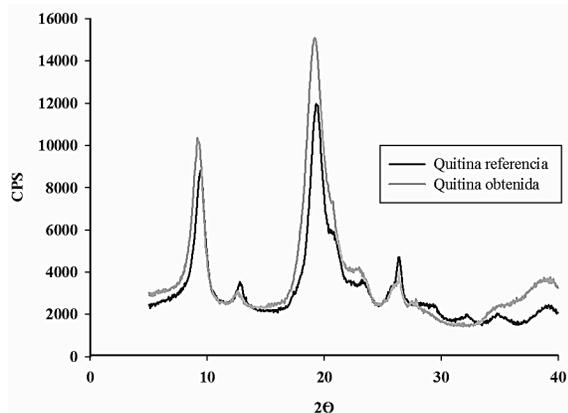


Fig. 1. Patrón de difracción de las muestras de quitinas (referencia y la obtenida de *B. magna*).

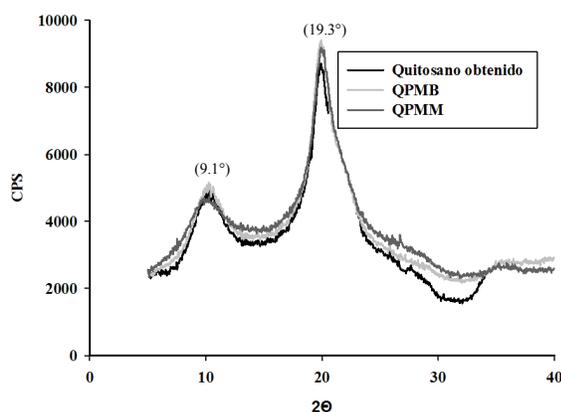


Fig. 2. Patrón de difracción de las muestras de quitosanos obtenido de *B. magna* y referencias (QPMB = Quitosano de peso molecular bajo; QPMM = Quitosano de peso molecular medio).

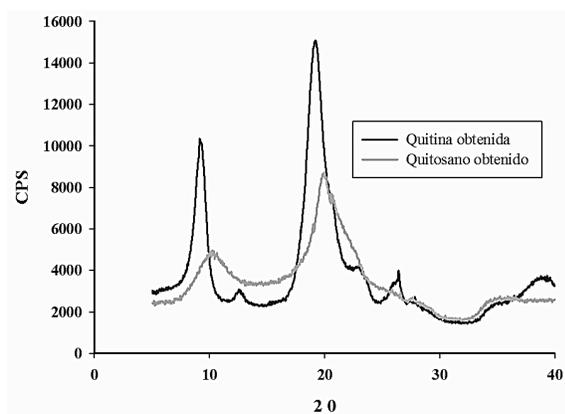


Fig. 3. Comparación de los patrones de difracción entre quitina y quitosano (obtenidos de *B. magna*).

de cadenas en sentido anti-paralelo (Sajomsang y Gonil, 2010; Zhang y col., 2000). Estos resultados fueron congruentes con estudios previos en  $\alpha$ -quitinas aisladas a partir de cangrejo (Yen, 2009), camarones y escarabajo ( $2\theta = 9.2$  y  $19.1^\circ$ ) (Liu y col., 2012) y en quitinas de cigarras de lodazales ( $2\theta = 9.2$  y  $20^\circ$ ) (Sajomsang y Gonil, 2010). Los difractogramas de quitina de *B. magna* y la quitina comercial fueron muy similares, sin embargo la quitina de *B. magna* presentó picos de cristalización más intensos que la muestra de quitina comercial, lo que supondría un mayor grado de cristalinidad. Esto puede deberse a una mayor densidad de la quitina comercial, ya que las cadenas de la estructura cristalina están más empaquetadas posiblemente porque desde el método de obtención no se alteró su estructura (considerando que se trata del mismo tipo de material). Por otra parte, como se observa en la Fig. 3, el pico en  $2\theta = 19.1^\circ$  disminuyó de intensidad al pasar de quitina a quitosano, lo cual se debió al proceso de desacetilación, repercutiendo a su vez en la disminución de la cristalinidad del compuesto como consecuencia del tratamiento aplicado (Abdou y col., 2008; Zhang y col., 2000). También se pudo apreciar, que después de la desacetilación, los cuatro picos de menor intensidad ( $2\theta = 13^\circ, 23^\circ, 26.3^\circ, 39^\circ$ ) desaparecieron del espectro (Fig. 3). Esto indicó que el carácter cristalino observado en los picos de las muestras de quitina no estuvo presente en las muestras de quitosano, debido a una mayor presencia de zonas amorfas en estas muestras. Estos patrones de difracción son el resultado de la reflectancia típica característica de la cristalinidad para este tipo de biopolímeros, en el caso de los picos más pronunciados de gran intensidad, y también para los picos de menor intensidad registrados; sin embargo, no siempre se pueden apreciar de la misma manera (aunque sean estudios en insectos de la misma especie) como recientemente reportaron Kaya y col. (2015b). Las diferencias en cristalinidad entre cada especie son distintas, y pueden deberse al método empleado en la separación de los compuestos que están en interacción con la quitina (Zhang y col., 2000). En general, la quitina obtenida a partir de *B. magna*, mostró picos con intensidades relativamente mayores a la muestra comercial y a otras fuentes de insectos como los reportados por Sajomsang y Gonil (2010) y Liu y col. (2012), posiblemente debido a un menor daño estructural a dicho polímero durante su extracción.

### 3.3 Microscopía electrónica de barrido con detector de energía dispersiva (MEB)

La morfología superficial de las muestras de quitina y quitosano extraídas de *B. magna* y las referencias comerciales se examinaron a una amplitud de 250X (solamente para el caso de la quitina de chapulín) y a 1500X (para las muestras de quitinas y quitosanos del chapulín y las comerciales) (Fig. 4). La quitina aislada de *B. magna* presentó una estructura fibrosa y definida en la superficie (Fig. 4A) con aspecto laminar y con la presencia de algunos espacios inter-laminares visibles en la microfotografía a una amplitud de 1500X (Fig. 4B), mientras que en la superficie de la quitina de referencia (Fig. 4C) se observó una estructura laminar completa y sin espacios inter-laminares posiblemente debido a la diferencia en el procesado de la fuente de extracción (Fig. 4C) (Wu y Meredith, 2014). Considerando la morfología superficial de las quitinas y los quitosanos analizados, se observaron las estructuras de microfibras de la conformación  $\alpha$ -cristalina con un entramado de fibras antiparalelas, mayormente notorias en la quitina y quitosano obtenidos (Gardner y Blackwell, 1975). La conformación fibrilar que presentan estos biopolímeros, son un indicativo de su potencial aplicación, como podría ser su empleo en la formación de textiles y películas biodegradables, tal y como lo sugieren en un estudio recientemente realizado por Kaya y col. (2015b). Estos resultados fueron similares a los reportados por Yen y col. (2009) en quitinas aisladas de crisálidas de *B. mori* e insectos del género *Brachystola* y en larva del escarabajo y cutículas del gusano de seda (Zhang y col., 2000), crisálidas del gusano de seda (Paulino y col., 2006), exoesqueletos de cangrejo (Yen, 2009), escarabajo *Holotrichia parallela* (Liu y col., 2012), larvas de mosca (Song y col., 2013) y en chapulines de diferentes especies (Kaya y col., 2015c). Resultados similares se reportaron por Yen y col. (2009) para el caso de la quitina, mediante un tratamiento de purificación aplicado a quitinas comerciales de cangrejo, y lograron obtener una estructura mejor definida en la micrografía del tipo fibrilar. En relación a las muestras de quitosanos comerciales, no se observaron las microfibras tan definidas como las muestras de las quitinas y del quitosano aislado de la misma quitina del chapulín. Las propiedades morfológicas de quitinas y quitosanos, además de ser influenciadas por la fuente, también pueden ser afectadas por el proceso de secado, tal y como lo reportaron Wu y Meredith (2014), quienes observaron que la congelación de estos materiales, previos a

su liofilización, influye a escala nanométrica en la morfología de estos biopolímeros. En términos generales y de acuerdo con el estudio MEB, los resultados observados en la presente investigación revelaron un daño mínimo a la microestructura de ambos biopolímeros obtenidos. Esto considerando que la estructura fibrilar de la quitina se conservó después de ser sometida a la desacetilación para la obtención del quitosano, además, como ha sido reportado, la estructura fibrilar es característica de este tipo de polímeros (Kucukgulmez y col., 2011).

### 3.4 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (EITF)

El análisis EITF es una técnica cualitativa y cuantitativa que determina los aspectos moleculares (elementos químicos, presencia de grupos funcionales, y tipos de enlaces químicos presentes) y estructurales (conformación cristalina y/o amorfa) presentes en diversos materiales como son la quitina y el quitosano (Kaya y col., 2015b). En base a su arreglo molecular, la quitina se encuentra presente en la naturaleza en tres formas cristalinas diferentes;  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Kaya y col., 2015a; Kaya y col., 2015c). En las Fig. 5 y 6 se muestran los resultados del análisis por EITF para las muestras de quitina y quitosano extraídos del chapulín *B. magna* y las muestras comerciales utilizadas como referencia. Para complementar estos resultados y con fines de comparación, se muestran las similitudes de las señales características a las diferentes longitudes de onda de todas las muestras analizadas (Tabla 3). Los espectros de infrarrojo de las quitinas y quitosanos mostraron en los números de onda ( $1/\lambda$ ) de entre 1000 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , tres bandas características de la huella dactilar de los grupos funcionales OH- para todos los polisacáridos. En las quitinas (Fig. 5) se observaron tres señales características del grupo funcional amida a 1554, 1614 y 1668. Se ha reportado que los espectros de las quitinas se caracterizan por tres bandas, que corresponden al doble enlace C=O (para la transmitancia localizada en el número de onda 1668  $\text{cm}^{-1}$ ). La señal ubicada a 1619  $\text{cm}^{-1}$  es generada por el estiramiento vibracional del enlace C-N del grupo C=O superpuesto, como un grupo OH- por un enlace puente de hidrógeno. La banda presente a 1554  $\text{cm}^{-1}$  es promovida por la flexión del enlace N-H en el grupo amida (Kaya y col., 2015a; Kaya y col., 2015c). Se debe indicar que la banda de 1668  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo amida I, la cual es característica para quitinas con conformación cristalina tipo  $\alpha$  (Focher y col., 1992b).

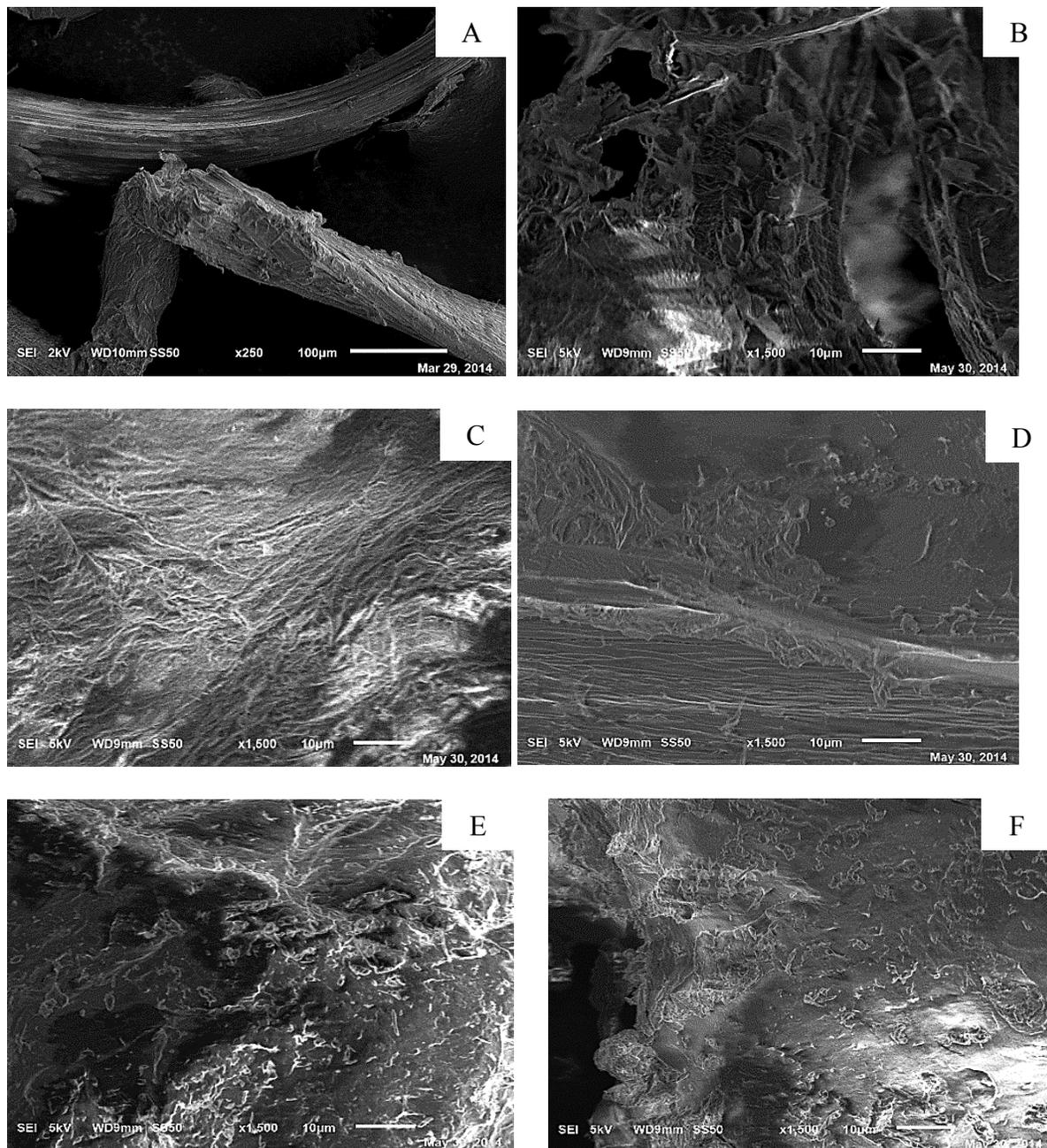


Fig. 4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de quitinas: A) Quitina de *B. magna* (250X); B) Quitina de *B. magna* (1500X); C) Quitina referencia (1500X). Quitosanos: D) Quitosano de *B. magna* (1500X); E) Quitosano QPMB (1500X); F) Quitosano QPMM (1500X).

Estos resultados revelaron que la quitina aislada de *B. magna* y las quitinas de referencia presentaron una conformación tipo  $\alpha$ , ya que en la conformación tipo  $\beta$ , los grupos amina I y II no son percibidos (Rinaudo, 2006). La mayoría de las quitinas que se

encuentran en la naturaleza, entre ellas las presentes en los artrópodos como el chapulin, presentan una conformación cristalina tipo  $\alpha$  (Kaya y col., 2015c). En los espectros EITF de los quitosanos (Fig. 6), al igual que en las quitinas, se observó similitud entre

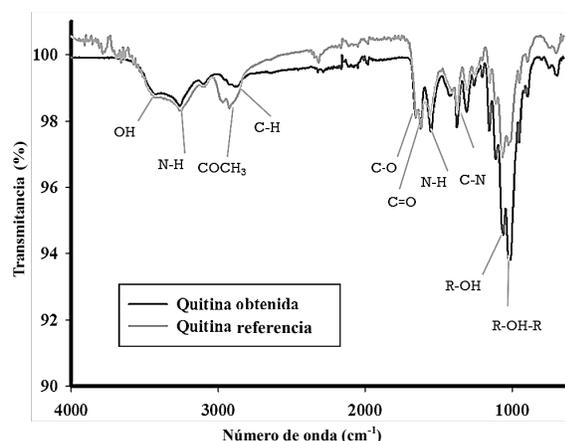


Fig. 5. Espectros de EITF para quitinas (para referencia y la obtenida del *B. magna*).

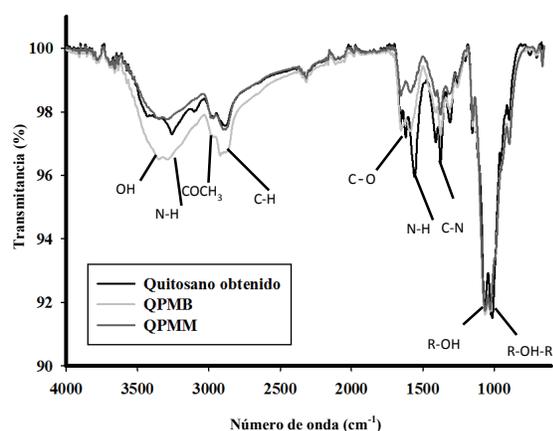


Fig. 6. Espectros de EITF para quitosanos (para obtenido del *B. magna* y referencias de bajo peso molecular = QPMB, y peso molecular medio = QPMM).

los espectros del quitosano de chapulín *B. magna* y las referencias. Sin embargo, la intensidad fue menor para las bandas a  $1668$  y  $1619$   $\text{cm}^{-1}$ , y de mayor intensidad para la banda ubicada en  $1554$   $\text{cm}^{-1}$ . En comparación con los espectros de las quitinas (Fig.5), los espectros del quitosano presentaron una señal más intensa a  $1554$   $\text{cm}^{-1}$ , lo cual indicó la desacetilación que sufrió la quitina al pasar a quitosano. Esto fue confirmado por la disminución de la intensidad en la banda ubicada a  $1626$   $\text{cm}^{-1}$  como consecuencia de una eliminación de los grupos acetilo ( $\text{COCH}_3$ ) en el polímero, dejando más grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) expuestos (Liu y col., 2012; Paulino y col., 2006). Las bandas presentes entre  $3500$  y  $2800$   $\text{cm}^{-1}$  en los espectros de quitina y quitosano son congruentes con los resultados reportados por Palpandi y col. (2009), quienes aislaron quitina a partir de conchas del gasterópodo *Nerita*. Estas bandas son el resultado de las tensiones vibracionales del grupo funcional OH- debido a la captación de moléculas de agua y la presencia de OH- de las estructuras de la quitina y quitosano. La banda observada a  $3440$   $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del estiramiento de los grupos OH- por moléculas de agua presentes en las muestras con una extensión en la banda ubicada a  $3263$   $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de los  $\text{NH}_2$  presentes en ambos polisacáridos. En cuanto a las bandas localizadas a  $2935$  y  $2986$   $\text{cm}^{-1}$ , estas se pueden atribuir a la presencia de grupos  $\text{COCH}_3$  y al estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces C-H (Liu y col., 2012; Song y col., 2013). Se debe señalar que los espectros de EITF en nuestro estudio se obtuvieron con un accesorio RTA, por lo cual las bandas anteriormente descritas fueron atenuadas.

Tabla 3. Asignación de las señales de bandas relevantes del espectro EITF-RTA de las quitinas y quitosano de chapulín y sus comparaciones con las muestras comerciales (referencias).

Asignación <sup>1</sup>	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )				
	Quitina <i>B. magna</i>	Quitina referencia	Quitosano <i>B. magna</i>	Quitosano QPMB <sup>2</sup>	Quitosano QPMM <sup>3</sup>
$\nu(\text{O-H})$	3440	3440	3440	3360	3390
$\nu(\text{COCH}_3)$	2935	2979	2986	2986	2986
$\nu(\text{C-H})$	2885	2921	2893	2906	2828
$\nu(\text{C-O})$	1668	1668	1626	atenuada	atenuada
$\nu(\text{C=O del grupo N-acetil})$	1619	1619	1655	1655	1654
$\delta(\text{N-H del grupo N-acetil})$	1554	1554	1554	1590	1590

<sup>1</sup>Señales debidas a:  $\nu$  (estiramiento) y  $\delta$  (flexión). <sup>2</sup>QPMB = Referencia comercial de quitosano de peso molecular bajo.

<sup>3</sup>QPMM = Referencia comercial de quitosano de peso molecular medio.

La intensidad de estas bandas depende mucho del contenido de agua presente en la muestra, lo cual puede afectar la absorción IR en las bandas de estiramiento CH- de la quitina y del quitosano en los grupos amida I y amida II, aun y para números de onda más pequeños de  $1500\text{ cm}^{-1}$  (Beil y col., 2012). La meseta entre  $2800$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$  indicó que las interacciones de hidrógeno están menos pronunciadas y evidenció la presencia de grupos hidroxilo libres. Mientras que la deformación de los grupos CO-NH y CH<sub>2</sub> (correspondientes al grupo funcional amida III), se debieron a la formación de un grupo CO-NH. Resultados similares fueron reportados en el insecto cigarra (Hemiptera: Cicadidae) (Sajomsang y Gonil (2010). La banda observada a  $1381\text{ cm}^{-1}$  correspondió a una deformación simétrica del grupo CH<sub>3</sub> del grupo acetil, y la banda ubicada en  $1424\text{ cm}^{-1}$  fue resultado del estiramiento de N-H y la deformación de la amina II (Duarte y col., 2001; Paulino y col., 2006; Qi y col., 2004; Song y col., 2013). También se observó una banda en el número de onda  $1071\text{ cm}^{-1}$ , el cual se debió al estiramiento producido por la vibración del C-O en el alcohol secundario y la banda a  $1014\text{ cm}^{-1}$ , se debió a la vibración del estiramiento del C-O en el alcohol primario. Finalmente, en los números de onda de  $897$  y  $665\text{ cm}^{-1}$  se mostraron los CH fuera del plano de vibración y la vibración de torsión de NH, respectivamente (Kucukgulmez y col., 2011; Song y col., 2013).

## Conclusiones

El contenido de quitina y quitosano del chapulín *Brachystola magna* fue de 10.4 y 8.1%, respectivamente, siendo una buena fuente de estos recursos considerando su amplia densidad poblacional durante infestaciones severas. La caracterización de la quitina y quitosano obtenidos del chapulín, evidenció una conformación estructural y molecular similar a la quitina y quitosano comerciales, a excepción de la banda de los grupos acetil la cual estuvo presente debido al bajo grado de desacetilación obtenido para el caso del quitosano. El insecto *Brachystola magna* es apto para ser considerado como una materia prima para la extracción de quitina y quitosano en abundancia y a bajo costo, además de que se estaría combatiendo una plaga que provoca grandes pérdidas a productores de frijol.

## Agradecimientos

El primer autor (JGMM) agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), la beca del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), y al grupo de trabajo conformado para la obtención de las muestras.

## Referencias

- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A. y Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99, 1359-1367.
- Beil, S., Schamberger, A., Naumann, W., Machill, S. y van Pée, K.-H. (2012). Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 87, 117-122.
- Broussignac, P. (1968). Chitosan, a natural polymer not well known by the industry. *Chimie Industrie Genie Chimie* 99, 1241-1247.
- CESAVECH. (2013). *Campaña contra el chapulín Chihuahua (tríptico)* [Online]. SAGARPA. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=26354&IdUrl=65888&down=true> [Accesado 27 Agosto 2015].
- Chandumpai, A., Singhpibulporn, N., Faroongsarng, D. y Sornprasit, P. (2004). Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers* 58, 467-474.
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvão, M. R. y Rocha, J. (2001). Determination of the degree of acetylation of chitin materials by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 28, 359-363.
- Focher, B., Naggi, A., Torri, G., Cosani, A. y Terbojevich, M. (1992a). Chitosans from *Euphausia superba*. 2: Characterization of solid state structure. *Carbohydrate Polymers* 18, 43-49.

- Focher, B., Naggi, A., Torri, G., Cosani, A. y Terbojevich, M. (1992b). Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions-evidence from CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 17, 97-102.
- García-Gutiérrez, C. y González-Maldonado, M. (2009). Control biológico de la plaga del chapulín (Orthoptera: Acrididae) en Durango, México. *Vedalia*.
- Gardner, K. H. y Blackwell, J. (1975). Refinement of the structure of  $\beta$ -chitin. *Biopolymers* 14, 1581-1595.
- Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Menten, A. y Sezen, G. (2015a). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan *Orthoptera species* (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20, 168-179.
- Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A. y Baran, T. (2015b). Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 797-805.
- Kaya, M., Lelešius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E. y Bitim, B. (2015c). Differentiations of Chitin Content and Surface Morphologies of Chitins Extracted from Male and Female Grasshopper Species. *PLoS ONE* 10, e0115531.
- Khor, E. (2014). 1 - Overview of Chitin and Chitosan Research. En: *Chitin* (Second Edition), (E. Khor ed.), Pp. 1-19. Elsevier, Oxford.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H. y Kadak, A. E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry* 126, 1144-1148.
- Kumar, S., Kumari, M., Dutta, P. K. y Koh, J. (2013). Chitosan Biopolymer Schiff Base: Preparation, Characterization, Optical, and Antibacterial Activity. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 63, 173-177.
- Lamarque, G., Chaussard, G. y Domard, A. (2007). Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of  $\beta$ -chitin: Reaction mechanisms. *Biomacromolecules* 8, 1942-1950.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. y Yang, Q. (2012). Extraction and Characterization of Chitin from the Beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules* 17, 4604-4611.
- Lozano-Gutierrez, J. y E. L., M.P. (2006). Enemigos naturales y control biológico de *Brachystola magna* (Girard) y *B. mexicana* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae) con *Beauveria Bassiana* en Zacatecas, México. *Vedalia* 13, 91-96.
- Majtán, J., Bíliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G. y Šimúth, J. (2007). Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 237-241.
- Mena-Covarrubias, J. (2009). Control biológico del chapulín *Brachystola* spp. (Orthoptera: Acrididae) con el uso del protozoario *Nosemia locustae* canning (*Microsporidia: Nosematidas*) en Zacatecas, México.
- Ottey, M. H., Vårum, K. M. y Smidsrød, O. (1996). Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymers* 29, 17-24.
- Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C. y Nozaki, J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers* 64, 98-103.
- Pérez-Escobedo, A., Díaz-Flores, P. E., Rangel-Méndez, J. R., Cerino-Cordoba, F. J., Ovando-Medina, V. M. y Alcalá-Jáuregui, J. A. (2016). Fluoride adsorption capacity of composites based on chitosan-zeolite-algae. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 139-17.
- Pérez-Martínez, A., de la Rosa, A. y De León-Rodríguez, A. (2014). Heterologous expression of *Trichoderma atroviride* endochitinase ech42 in *Pichia pastoris* at low and high dissolved oxygen tensions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 93-101.

- Pillai, C. K. S., Paul, W. y Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, 641-678.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. y Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339, 2693-2700.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
- Rios, V. C., Berlanga, R. D. I., Valdez, L. R., Romo, C. A., Acosta, M. C. H., Zamudio, F. P. B., Sepúlveda, A. D. R. y Jacobo, C. J. L. (2014). Caracterización y control microbial del chapulín gordinflón *Brachystola magna* Girard en frijol en el estado de Chihuahua (Folleto técnico). *Fundación Produce Chihuahua* [Online]. Available: [http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anales/anu\\_499-25-2014-05-4.pdf](http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anales/anu_499-25-2014-05-4.pdf).
- Sajomsang, W. y Gonil, P. (2010). Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs. *Materials Science and Engineering: C* 30, 357-363.
- Salazar-Leyva, J., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J., García-Sánchez, G., Ezquerra-Brauer, J., Valenzuela-Soto, E., Carvallo-Ruiz, M., Lugo-Sánchez, M. y Pacheco-Aguilar, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 129-150.
- Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y. y Zhang, G. (2013). Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 347-354.
- Sotelo-Boyás, M., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, M., Correa-Pacheco, Z., Jiménez-Aparicio, A., Solorza-Feria, J., Barrera-Necha, L. y Bautista-Baños, S. (2015). Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. *In vitro* effect on *Pectobacterium carotovorum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 589-599.
- Sun, T., Liu, X., Sun, G., Long, R. y Liu, Z. (2016). Grasshopper plague control in the alpine rangelands of the qilian mountains, China. A socio-economic and biological approach. *Land Degradation & Development*.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z. y Xue, C. (2013). Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydrate Polymers* 92, 90-97.
- Wu, J. y Meredith, J. C. (2014). Assembly of Chitin Nanofibers into Porous Biomimetic Structures via Freeze Drying. *ACS Macro Letters* 3, 185-190.
- Wu, S. (2011). Preparation of chitosan from *Clanis bilineata* larvae skin using enzymatic methods. *Carbohydrate Polymers* 83, 1008-1010.
- Yen, A. L. (2009). Edible insects: Traditional knowledge or western phobia? *Entomological Research* 39, 289-298.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H. y Mau, J.-L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 75, 15-21.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H. y Hirano, S. (2000). Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 99-105.
- Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R. y Zhang, X. (2005). Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research* 340, 1914-1917.