

CHAPTER 12.4 EFECTIVIDAD DE LAS MICRO/NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO OBTENIDAS DE RESIDUOS PESQUEROS EN LA ADSORCIÓN DE CROMO HEXAVALENTE

J. B. Dima (1,2) and N. Zaritzky *(1,3)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA -CONICET- UNLP). Calle 47 y 116 La Plata (1900) Argentina

(2) Centro Nacional Patagónico (CECIMAR- CENPAT -CONICET). Puerto Madryn, Chubut, Argentina

(3) Depto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de La Plata. Argentina

RESUMEN

El procesamiento de crustáceos en la ciudad de Puerto Madryn genera residuos sólidos, exoesqueletos, que son descartados en basurales constituyendo un contaminante ambiental para la región. El quitosano (QS) es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación parcial de la quitina, componente principal de estos exoesqueletos. Por sus propiedades funcionales y fisicoquímicas, el quitosano presenta aplicaciones muy variadas, entre ellas la capacidad de adsorber metales. En una primera etapa se obtuvo quitina a partir de desechos de exoesqueletos de langostinos los cuales fueron despigmentados, descalcificados y desproteinizados. Para la obtención de quitosano, la quitina fue desacetilada con NaOH al 50%, determinándose su peso molecular y el grado de desacetilación (método potenciométrico y FTIR). El rendimiento en quitina fue de 24.1%; el grado de desacetilación del quitosano obtenido fue del 90.2% y su peso molecular de 2×10^5 Da. Debido a la baja estabilidad del quitosano a bajos pH, se sintetizaron micro/nano partículas de quitosano (MQS) por gelificación iónica utilizando tripolifosfato de sodio como agente reticulante. Se determinó el efecto de las concentraciones relativas de los reactivos empleados en el potencial Z y en el tamaño de las partículas. Para una relación de QS-TPP de 1,25mg/ml y 1,50mg/ml se observaron tamaños de partículas menores a 140nm.

Las partículas de quitosano y las micro/nanopartículas se aplicaron para la remoción de Cr(VI), altamente tóxico y cancerígeno. La concentración de cromo total se determinó por espectroscopía de absorción atómica. Se obtuvieron experimentalmente las isotermas de adsorción de Cr(VI) en QS y MQS y las cinéticas correspondientes. Se analizaron los efectos del pH, el tiempo de contacto. Además, se determinó el estado de oxidación del metal adsorbido. Tanto QS como MQS mostraron una buena eficiencia en la adsorción de Cr (VI), la cual varió significativamente en función del pH del medio; el equilibrio se alcanzó después de 1h de contacto para el QS y 3h para las MQS. Al igual que en la adsorción, el porcentaje de desorción varió con el pH del medio y el tiempo de contacto; el mismo fue mayor para QS que para MQS, sin embargo, los análisis de oxidación mostraron que el 66% cromo desorbido por las MQS fue cromo trivalente. El quitosano y las micropartículas de quitosano fueron efectivas para la remoción del C(VI), las MQS mejoraron la adsorción del metal a bajos pH y

*Author for correspondence: zaritzkyoemi@gmail.com

disminuyeron el grado de toxicidad del mismo. El aprovechamiento de los desechos de exoesqueletos de crustáceos patagónicos constituye un tema importante en la revalorización económica de residuos para la región. Por otro lado, el desarrollo de nuevos sistemas permitirá realizar aportes originales en la obtención de productos que contribuyan al desarrollo de tecnologías ligadas al medio ambiente.

Palabras claves: micro/nanopartículas de quitosano, remoción Cr (VI), residuos pesqueros

INTRODUCCIÓN

Los desembarcos de crustáceos en Argentina representan varios miles de toneladas anuales siendo la ciudad de Puerto Madryn (Patagonia-Argentina) uno de los principales puertos de desembarco¹. La mayor captura corresponde a langostinos, seguido por centolla, camarón y cangrejos. Durante su procesamiento, para el aprovechamiento del músculo comestible, se generan residuos sólidos de difícil disposición (exoesqueletos), que se acumulan en basurales constituyendo un contaminante ambiental. El exosqueleto descartado depende de la especie; en la industrialización de la carne del langostino, éste representa entre un 35% y 50% de su peso total. Esta biomasa desechable tiene una composición rica en quitina, de la que se obtienen derivados de gran interés como el quitosano, polisacárido catiónico natural, biodegradable y biocompatible de variadas aplicaciones industriales. El quitosano (QS) puede prepararse en escamas, en polvo, disuelto en líquido o formando micropartículas (MQS), en función de su utilización. En los últimos años las MQS están siendo investigadas en diferentes áreas científico-tecnológicas: como portadoras de agroquímicos, fármacos, etc^{2,3}, como agente antibacteriano⁴ o como adsorbente de metales⁵, etc.

Los metales pueden provenir de efluentes urbanos o industriales. El uso de cromato y dicromato tiene muchas aplicaciones industriales, tales como la industria textil, la galvanoplastia, curtido de cuero, pinturas, pigmentos y metalurgia⁶. El Cr(VI) es un metal tóxico para los seres humanos, ya que es cancerígeno y se debe remover de las aguas residuales antes de ser descargadas. En Argentina las normas de descarga de aguas residuales establecen un límite máximo permisible de 0,2mg/L en los cursos de agua superficiales. El proceso de adsorción es considerado una de las técnicas más adecuadas para su eliminación, debido a sus ventajas como la alta eficiencia y menor costo⁷. Es así, que se ha estudiado la adsorción en biopolímeros entre los que se encuentra el quitosano, que se obtiene del residuo generado por la industria procesadora de crustáceos. El mismo ha demostrado remover eficazmente metales como cobre, mercurio y plomo, entre otros. Sin embargo, el QS resulta inestable a bajos pH⁵; las modificaciones químicas son adecuadas para evitar su disolución en medios ácidos; de esta manera, las cadenas de quitosano pueden ser químicamente reticuladas con tripolisfosfato de sodio (TPP) y conducir a matrices estables⁸.

El objetivo del presente trabajo fue: a) desarrollar micropartículas de quitosano, utilizando la técnica de gelificación iónica, a partir del quitosano extraído de residuos de exoesqueletos de langostinos y caracterizarlo fisicoquímicamente; b) determinar el

tamaño y distribución de las partículas obtenidas; c) evaluar la eficacia de las MQS en la adsorción de Cr(VI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y caracterización de quitosano de exoesqueleto de langostino. Se recolectaron exoesqueletos de las plantas elaboradoras de langostino patagónico (*P.mulleri*) en Puerto Madryn (Chubut, Argentina). Los mismos se secaron y molieron, luego se descalcificaron con HCl 1,5M y por último, se desproteinizaron con NaOH al 4,5%. El producto obtenido se lavó con abundante agua destilada, se secó en estufa por 24h obteniéndose quitina. Posteriormente, la quitina fue tratada con NaOH al 50% a 120°C, luego filtrada y lavada con abundante agua destilada, se secó en estufa por 24h y se obtuvo quitosano (QS)⁹. El QS obtenido se caracterizó según su grado de desacetilación y peso molecular viscosimétrico. El grado de desacetilación se determinó por valoración potenciométrica utilizando la técnica original descrita por Broussignac¹⁰ y por espectroscopía infrarroja (FTIR)(Equipo Bruker IFS 66); en este último se usó el método de correlación propuesto por Brugnerotto et al¹¹ de acuerdo a la ecuación 1:

$$DD(\%) = 100 - [31,92 * (A(1320\text{cm}^{-1})/A(1420\text{cm}^{-1})) - 12,20] \quad (1)$$

donde $A(1320\text{cm}^{-1})$ y $A(1420\text{cm}^{-1})$ son las absorbancias de los picos del espectro IR.

La evaluación del peso molecular viscosimétrico (Mv) del QS se llevó a cabo mediante la técnica de viscosimetría capilar utilizando un viscosímetro de Ostwald y la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y k, a parámetros de la ecuación.

$$[\eta] = k Mv^a \quad (2)$$

Producción de micro/nanopartículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato. Debido a la toxicidad del glutaraldehído y otras moléculas orgánicas utilizadas en la síntesis de geles con uniones covalentes, se propuso la utilización de la técnica de gelificación iónica que utiliza TPP como agente reticulante. Las MQS se prepararon tomando como base el procedimiento reportado por Calvo et al⁸. En primer lugar, se realizaron diversas pruebas con el fin de obtener el tamaño deseado de las partículas en suspensión, variando la concentración y volúmenes relativos de las soluciones de QS y TPP bajo agitación magnética constante y a temperatura ambiente. Las micropartículas se recolectaron por centrifugación a 10000rpm durante 20m. El tamaño de la partícula se determinó por espectroscopía de correlación de fotones utilizando un equipo Delsa™ NanoC Instrument (BeckmanCoulter) y por observación en un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips X-L 30.

Aplicación de QS y MQS en la remoción de cromo hexavalente. Se estudió la capacidad de adsorción del QS y las MQS para eliminar el Cr(VI) de aguas residuales. Los experimentos de adsorción se realizaron bajo diferentes condiciones de: concentración inicial de Cr(VI) (50 a 400mg/L), tiempos de contacto (30min, 1h, 2h, 3h),

y pH (2-6). Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo utilizando 80mg de QS y 40mg de MQS en 50ml de volumen de Cr(VI). Los experimentos se llevaron a cabo en ensayos batch a 25°C, bajo agitación constante. Las concentraciones finales de Cr(VI) se determinaron por espectrometría de absorción atómica de llama (Instrumental Laboratorio IL457). La capacidad de adsorción de Cr(VI) en condiciones de equilibrio se calculó según la siguiente ecuación:

$$Q_e = \frac{(C_i - C_{eq})V}{w} \quad (3)$$

donde: Q_e (mg/g) es la cantidad de iones metálicos adsorbidos, C_i y C_{eq} son las concentraciones de metal(mg/l) en la solución a tiempo cero y después del equilibrio, V (L) es el volumen de la solución y w es la masa(g) del adsorbente.

Para la descripción matemática de las relaciones de equilibrio de los iones de Cr(VI) en QS y MQS se utilizaron las isothermas de Langmuir, Freundlich y Temkin. Los análisis cinéticos se determinaron usando los modelos de pseudo primer y segundo orden y la ecuación de Elovich. Los parámetros de operación fueron: $T=25^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4$ y $\text{pH}=2$, tiempo=3h.

Estudios de desorción para determinar el estado de oxidación de las especies de cromo adsorbido. Con el fin de determinar el estado de oxidación de los iones de cromo adsorbidos en QS y MQS se llevaron a cabo experimentos de desorción a temperatura ambiente según lo propuesto por Baneshwari et al¹². La concentración de Cr(VI) resultante en la solución desorbentese determinó mediante análisis espectrofotométrico por la reacción del Cr(VI) con 1,5-difenilcarbazida en solución fuertemente ácida¹³. El complejo coloreado se midió a 540 nm usando un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP 8452a. La concentración de Cr(III) se calculó a partir de la diferencia entre las concentraciones de Cr(VI) y Cr total. Para determinar la concentración total de Cr [Cr (III) + Cr (VI)], la solución de desorción se oxidó primero a Cr(VI) con persulfato de amonio 98%, en condición ácida a 100°C, utilizando AgNO_3 como catalizador. Las concentraciones totales de cromo también se determinaron por espectroscopia de absorción atómica de llama para verificar los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del quitosano obtenido. El rendimiento y propiedades del quitosano varían de acuerdo a la materia prima (exoesqueleto de origen) y al tratamiento empleado para su obtención. El rendimiento en quitina en función del peso del material triturado fue de 24,9%. El quitosano representó el 76,8% de la quitina inicial. El grado de desacetilación fue de 90,2% (por la técnica potenciométrica) y de 88,6% (por FTIR) (**Figura 1**). El peso molecular viscosimétrico se determinó a partir de la Ec. (2) de MKHS utilizando los parámetros hallados por Rinaudo¹⁴; $K=0,074$ y $a=0,80$ donde M_v resultó de $2,39 \times 10^5$ Da.

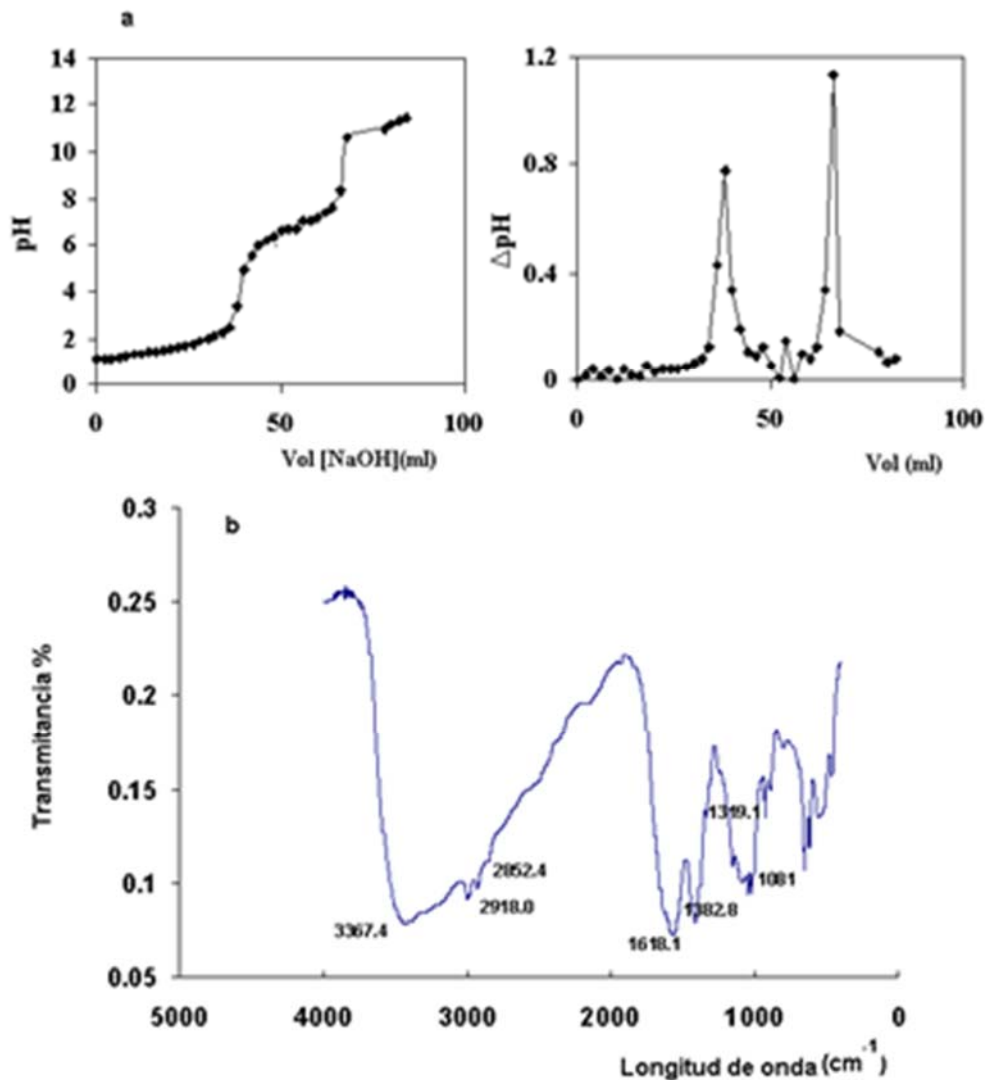


FIGURA 1. Determinación del grado de desacetilación del quitosano obtenido por: a) técnica potenciométrica b) FTIR

Resultados de la obtención y caracterización de las MQS reticuladas con TPP. Se identificaron visualmente cuatro sistemas diferentes: solución clara, suspensión opalescente clara, suspensión opalescente y agregados. Las suspensiones opalescentes corresponden a la presencia de micropartículas (**Figura 2**). Las MQS se formaron espontáneamente, en una suspensión estable, tras la incorporación de una solución de TPP de concentración 1-1.5g/L a una solución ácida 1.25g/L de QS, en proporción volumétrica 1:3

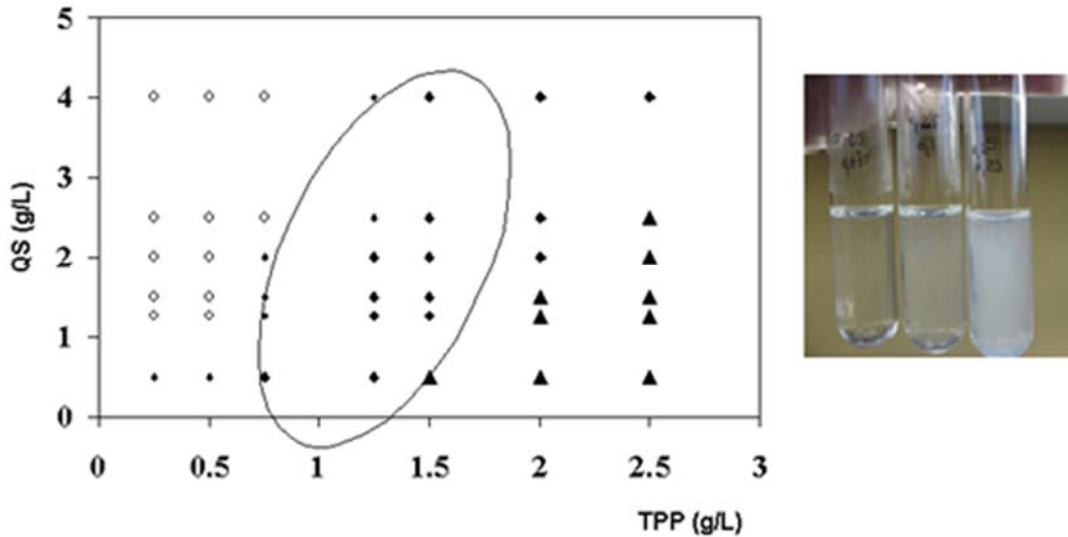


FIGURA 2. (◇) Solución clara, (●) Solución levemente opalescente, (◆) Solución opalescente y (▲) Agregados

El tamaño medio de las MQS obtenidas para ese rango de concentraciones relativas fue de 101nm ($P_{10}=88\text{nm}$; $P_{90}=145\text{nm}$) y con una distribución de tamaño estrecha (polidispersidad <1). El tamaño de las MQS determinado por el equipo Coulter Beckman (Figura 3a) coincidió con el observado por microscopía SEM (Figura 3b) encontrándose en el rango de las nanopartículas¹⁵.

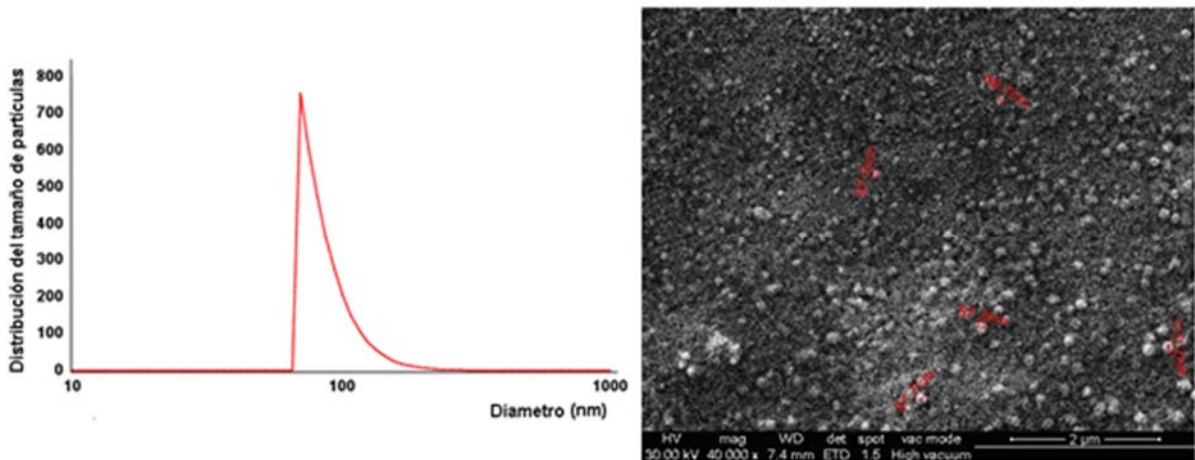


FIGURA 3. Distribución del tamaño de las micropartículas de quitosano y micrografía SEM para una relación QS-TPP 1.25-1.5g/L, pH=4

La potencial zeta (PZ) la distribución y tamaño de partícula en función de la concentración de TPP añadido, se observa en la Figura 4. En la Figura 4c, la línea llena representa el PZ para QS en AcH (0,125%) versus el agregado de diferentes concentraciones de TPP. Por otro lado, la línea punteada muestra el PZ de las partículas obtenidas con diferentes concentraciones de TPP, centrifugadas y re-suspendidas en agua, para eliminar exceso de QS o TPP que pudiera tener la

suspensión original. La potencial zeta de las MQS disminuyó con la cantidad de TPP añadido. Cuando el TPP aniónico se utiliza como agente reticulante del QS con carga positiva, el PZ de las MQS dispersas en solución acuosa disminuye. Por lo tanto, cuanto menor es la fracción de TPP presente en las partículas mayor es el PZ¹⁶. La interacción entre el TPP y el QS da lugar a partículas cuyo comportamiento electrocinético puede modularse tanto a través de las condiciones propias de la formación de las MQS (como el agregado de TPP) como modificando las condiciones del medio de síntesis (presencia o ausencia de ácido o QS en exceso). Es importante notar que el proceso de lavado de las MQS es esencial a la hora de diseñar un sistema para aplicaciones basadas en estas partículas. Por ejemplo, si se pretende utilizar a las MQS como adsorbentes de contaminantes, las especies remanentes de la síntesis deben eliminarse cuidadosamente previo a la preparación de sistemas batch o columnas.

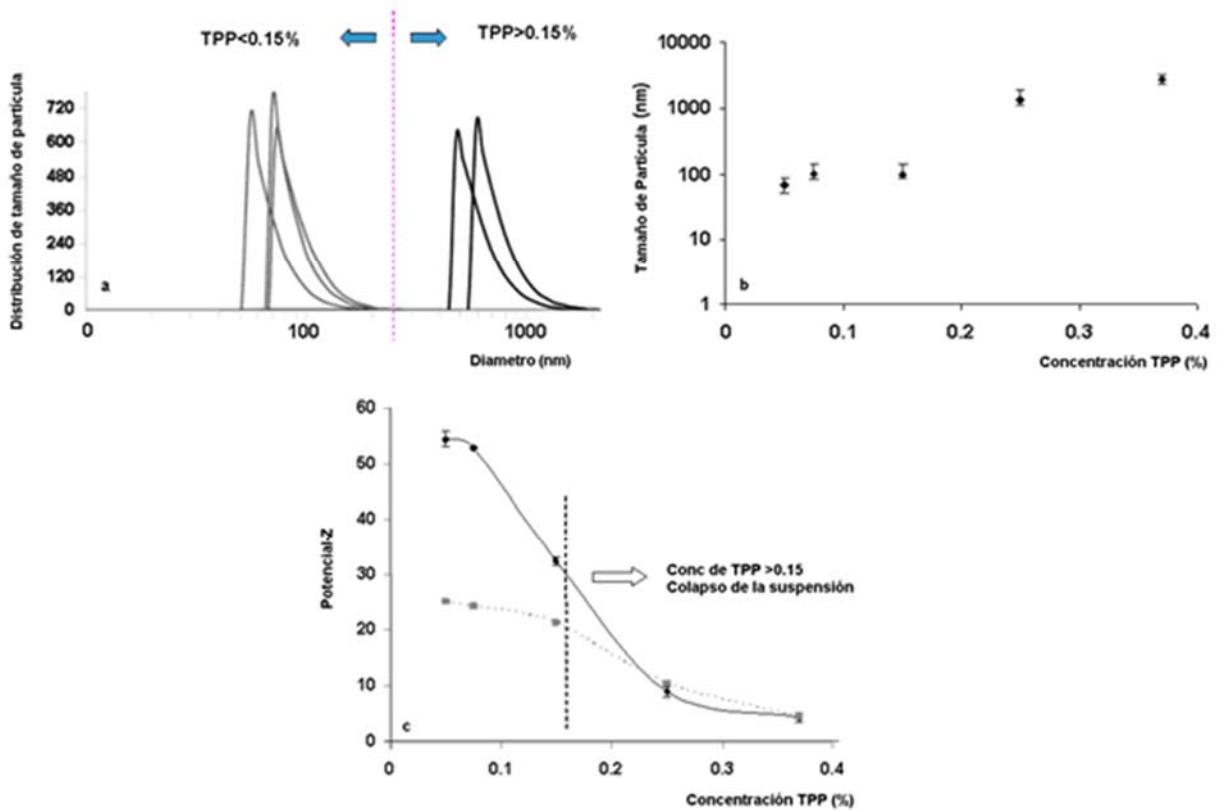


FIGURA 4. Efecto del porcentaje de TPP añadido en: a) Distribución de tamaños de partícula, b) tamaño medio de partícula y c) Potencial Z en solución original (línea llena) y en solución acuosa (línea punteada)

Resultados de la remoción de Cr(VI) sobre QS y MQS. La Figura 5 muestra el efecto simultáneo de la concentración de Cr(VI) inicial y el pH sobre el porcentaje de remoción de Cr(VI) para QS y MQS y el tiempo de adsorción de equilibrio para cada sistema. El pH del medio posee un efecto considerable en la remoción de Cr(VI); cuando el pH disminuyó de 4 a 2 la remoción se redujo en un 29% para QS(Fig.5a) y aumentó en un 80% para MQS(Fig. 5b). Los datos de equilibrio se analizaron utilizando las expresiones de las isothermas de Langmuir, Freundlich, y Temkin⁶.

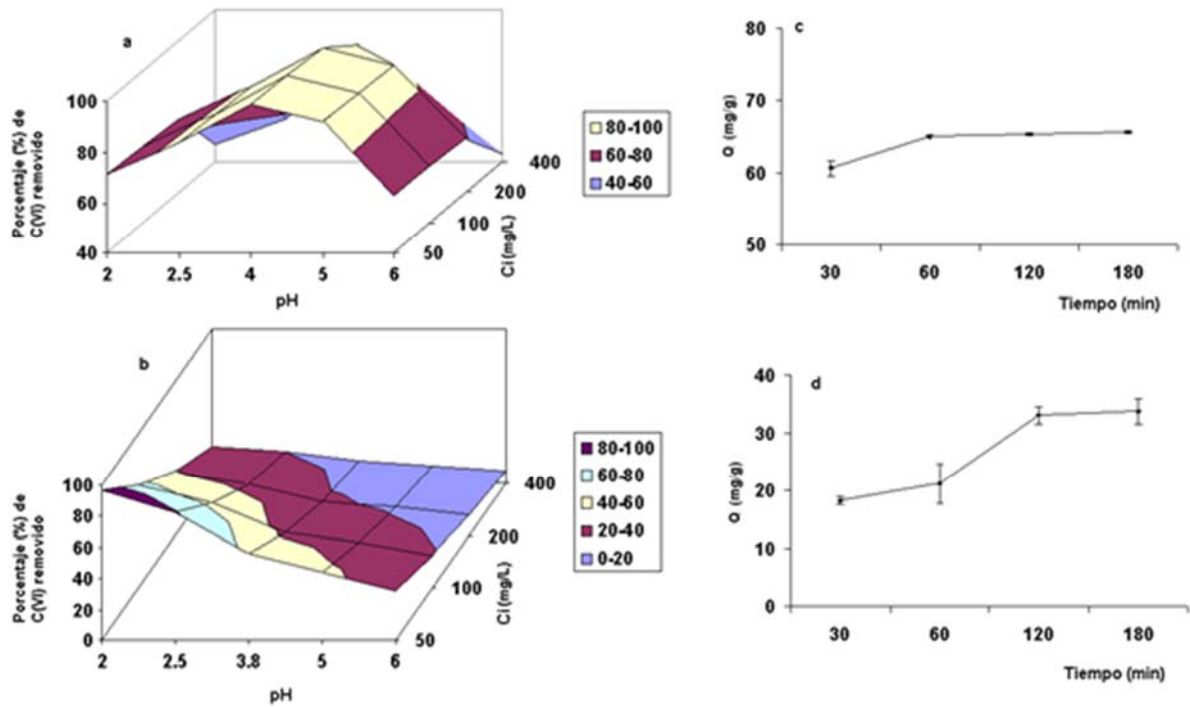


FIGURA 5. Efecto simultáneo de la concentración de Cr(VI) inicial y el pH sobre el porcentaje de remoción de Cr(VI) para QS(a) y MQS (b). Tiempo de contacto necesario para la remoción de Cr(VI) para QS(c) y MQS(d)

La isoterma de Langmuir está dada por la ecuación:

$$\frac{C_{eq}}{Q_e} = \frac{C_{eq}}{Q_m} + \frac{1}{K_L Q_m} \quad (4)$$

donde Q_e es la cantidad adsorbida por unidad de adsorbente en el equilibrio (mg/g); C_{eq} la concentración de equilibrio del adsorbato después de la adsorción (mg/L), K_L la cte de Langmuir(g/L) y Q_m la máxima capacidad de adsorción en la monocapa (mg/g).

La isoterma de Freundlich es una ecuación empírica que supone que el proceso de adsorción tiene lugar en superficies heterogéneas. Se puede definir como:

$$\ln Q_e = \ln K_f + (1/n) \ln C_{eq} \quad (5)$$

donde K_f es la cte de Freundlich (mg/g) y n el factor de heterogeneidad relacionado a la intensidad de adsorción.

La isoterma de Temkin en su forma lineal está dada por la ecuación:

$$Q_e = B_t \ln (K_t) + B_t \ln (C_{eq}) \quad (6)$$

La isoterma de Temkin asume que el calor de adsorción de las moléculas en la capa disminuye linealmente con la cobertura dada por las interacciones adsorbente-adsorbato. B_t , se relaciona con el calor de adsorción y K_t es la constante de unión de equilibrio.

ISEBE Advances 2016

Los parámetros obtenidos de las ecuaciones de adsorción se muestran en la Tabla 1. El modelo de Langmuir fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales, lo que indica la naturaleza homogénea del adsorbente.

TABLA 1. Parámetros de las isothermas de equilibrio para Cr (VI) adsorbido en quitosano (QS) y micro/nanopartículas de quitosano (MQS)

	Langmuir			Freundlich			Temkin		
	Qm (mg/g)	K _L (l/mg)	R ²	1/n	K _f (mg/g)	R ²	B _t	K _t (l/mg)	R ²
QS a pH=4	250	0.018	0.999	0.43	44.70	0.941	45.01	2.76	0.997
MQS a pH=4	68.9	0.014	0.990	0.36	7.02	0.983	13.95	1.76	0.989
MQS a pH=2	124	0.086	0.990	0.12	60.42	0.977	22.55	1.46	0.939

Por otro lado, se requiere de un análisis cinético para obtener la velocidad de adsorción y la etapa limitante del mecanismo de transporte, que se utiliza en el diseño del proceso. Las ecuaciones cinéticas de pseudo-primer orden, pseudo-segundo orden y la ecuación Elovich⁶ se ajustaron a los datos experimentales.

El modelo cinético de pseudo primer orden, conduce a la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{Q_e}{Q_e - Q}\right) = k_1 t \quad (7)$$

donde Q es la cantidad de metal adsorbido en el momento t(mg/g), Q_e es la cantidad de metal adsorbido en el t de equilibrio(mg/g) y K₁ es la constante de velocidad (min⁻¹):

La cinética de pseudo- segundo orden, se representa en forma integrada por:

$$\frac{t}{Q} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad (8)$$

donde k₂ es la constante de velocidad de pseudo segundo orden.

La ecuación de Elovich, se expresa como:

$$Q = \beta \ln(\alpha\beta) + \beta \ln t \quad (9)$$

donde Q es la cantidad de metal adsorbido en un tiempo t, α es la velocidad de adsorción inicial (mg g⁻¹h⁻¹), y β es la constante de Elovich.

Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 2. El modelo cinético de pseudo segundo orden fue el que mejor ajustó a los datos experimentales.

TABLA 2. Parámetros cinéticos para Cr(VI) adsorbido en quitosano y micropartículas de quitosano

	Pseudo-Primer Orden		Pseudo-Segundo Orden		Elovich		
	$k_1(\text{h}^{-1})$	R^2	$k_2(\text{g/mgh})$	R^2	$\beta(\text{g/mg})$	$\alpha(\text{mg/gh})$	R^2
QS	2.71	0.871	0.76	0.999	0.37	6.0×10^{10}	0.750
MQS	1.94	0.932	0.078	0.946	0.10	116.8	0.877

Resultados del estado de oxidación del cromo adsorbido. La medición del estado de oxidación de las especies de cromo adsorbidas indicó que cuando se utilizó QS como material adsorbente del Cr(VI), en el proceso de desorción no se detectó presencia de Cr (III), es decir el cromo adsorbido permanecía como Cr (VI). Por el contrario, utilizando quitosano reticulado (MQS), más del 60% del cromo adsorbido se redujo a Cr(III) que no es tóxico; por lo tanto las MQS reducen Cr(VI) a Cr(III). Estos resultados son muy importantes desde el punto de vista toxicológico. El estudio del mecanismo de reducción de las MQS debe ser estudiados en profundidad para futuras aplicaciones.

CONCLUSION

Se estudió el uso de biopolímeros como el quitosano y quitosano reticulado (micro/nanopartículas) en la efectividad de remoción del cromo (VI) altamente tóxico y cancerígeno. Para ello, se obtuvo quitina y quitosano de exoesqueletos proveniente de desechos de la industria pesquera del langostino patagónico (*P. muelleri*). Se determinaron los rendimientos del proceso y se lo caracterizó según su grado de desacetilación y peso molecular. Los valores obtenidos se encontraron dentro de los reportados para ser considerado quitosano. Por otro lado, dada la inestabilidad del QS a bajo pH, se sintetizaron micropartículas de quitosano utilizando tripolifosfato de sodio como agente reticulante. El tamaño medio de partícula fue de 101nm para una relación de QS-TPP de 1,25g/L-1,5g/L.

Se realizaron estudios de adsorción de Cr(VI) en QS y MQS bajo diferentes condiciones de pH, tiempo de contacto, y concentración Cr(VI) inicial. Asimismo, se evaluó el estado de oxidación del cromo adsorbido. La cantidad de cromo adsorbido varió notablemente con el pH de la solución inicial. La isoterma de equilibrio de Langmuir y el modelo cinético de pseudo-segundo orden proporcionó la mejor correlación de los datos experimentales. El presente trabajo demostró el QS y las MQS fueron efectivas para la remoción del Cr(VI), aunque las nanopartículas mejoraron la adsorción del metal a bajos pH (<3), disminuyendo adicionalmente la toxicidad del sistema acuoso, ya que el cromo adsorbido sobre MQS era, en un porcentaje mayor al 60%, cromo (III). El aprovechamiento de los desechos de exoesqueletos de crustáceos patagónicos constituye un tema importante en la revalorización económica de residuos para la región. Por otro lado el desarrollo de nanopartículas permitirá realizar aportes originales

en la obtención de productos que contribuyan al desarrollo de tecnologías ligadas al medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Centro Nacional Patagónico (CENPAT- CONICET), Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET), Universidad Nacional de La Plata, Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), a la Universidad Nacional de Córdoba y la Empresa "Altamare" SA de Puerto Madryn.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Minagri 2014)
2. Rodríguez Hamamura, N., Valderrama Negrón, A., Alarcón Cavero, H., & López Milla, A. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), (2010) 336-354.
3. Hussain, M. R., Devi, R. R., & Maji, T. K. Controlled release of urea from chitosan microspheres prepared by emulsification and cross-linking method. *Iranian Polym Journal*, 21(8), (2012) 473-479.
4. Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y., & Ma, X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr Res*, 344(17), (2009) 2375-2382.
5. Laus, R., Costa, T. G., Szpoganicz, B., & Fávere, V. T. Adsorption and desorption of Cu (II), Cd (II) and Pb (II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. *J Hazard Mater*, 183(1), (2010) 233-241.
6. Hena, S. Removal of chromium hexavalent ion from aqueous solutions using biopolymer chitosan coated with poly 3-methyl thiophene polymer. *J Hazard Mater*, 181(1), (2010) 474-479.
7. Yu K., Ho J., McCandlish E., Buckley B., Patel R., Li Z., Shapley N.C. Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloid. Surface A*. (2013) 425: 31-41.
8. Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*, 63(1), (1997) 125-132.
9. Dima, J. B., Sequeiros, C., & Zaritzky, N. E. Hexavalent chromium removal in contaminated water using reticulated chitosan micro/nanoparticles from seafood processing wastes. *Chemosphere*, 141, (2015) 100-111.
10. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), (2001) 3569-3580.
11. Broussignac, P. Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chim. Ind. Genie Chim*, 99(9), (1968) 1241-1247.
12. Bhuvaneshwarl, S., Sruthi D., Sivasubramanian V., Kanthimathy K. Regeneration of chitosan after heavy metal sorption. *J. Scientific and Ind. Research, JSIR*, 71, (2012) 266-269.
13. Clescerl L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Method 3500 Chromium Colorimetric Method
14. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 31(7), (2006) 603-632.
15. Qu X., Alvarez P.J., Li Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Res*. 47(12), (2013) 3931-3946.
16. Qi L., Xu Z. Lead sorption from aqueous solutions on chitosan microparticles. *Colloid Surf A*. 251(1), (2004) 183-190.