

# Extracción de quitina de *Aspergillus niger* asistida por ondas de choque: caracterización fisicoquímica y eléctrica<sup>◇</sup>

## Shock wave-assisted extraction of chitin from *Aspergillus niger*: physicochemical and electrical characterization

Blanca E. Millán-Chiu,<sup>\*,†</sup> Eduardo A. Alarcón-Flores,<sup>\*\*</sup> Eduardo Ortiz-Olan,<sup>\*\*\*</sup> Francisco Fernández,<sup>\*</sup> Achim M. Loske<sup>\*</sup>

**ABSTRACT:** Chitin is a linear polysaccharide produced by animal and fungal species. One of its sources is the fungus *Aspergillus niger*, which is culturable in industrial bioreactors. Chitin is a neutral biopolymer that modifies the electrical properties of composite materials. These are useful features in some electronic devices. This study aimed to carry out physicochemical characterizations of chitin films obtained from the above-mentioned fungus, using a chemical method enhanced with exposure to heat and shock waves, and to determine their electrical resistivity at high voltages (between 10 and 20 kV). Shock waves were used in this study because they are known to induce pores into cells and could promote alkali entry into the hypha, allowing better removal of residual cellular components. Chitin was neutralized, dried, and films were produced. Residual protein values were quantified by bicinchoninic acid assay (BCA). The films obtained had low amounts of protein. The characterization of the specific morphotype extracted was done by FTIR and XRD. An especially designed circuit revealed significant variations of the resistivity as the voltage was varied. This behavior is typical of a non-linear varistor and, to the best of our knowledge, has not been reported for chitin.

**KEYWORDS:** *Aspergillus niger*, shock waves, chitin films, electrical resistivity.

**RESUMEN:** La quitina es un polisacárido lineal producido por especies animales y fúngicas. Una de sus principales fuentes de obtención es el hongo *Aspergillus niger*, cultivado en biorreactores industriales. Es un biopolímero neutro que modifica las propiedades eléctricas de los materiales compuestos, una característica muy útil para algunos dispositivos electrónicos. Nuestro objetivo en este trabajo fue la caracterización fisicoquímica de películas de quitina, extraída de dicho

Recibido: 19 de enero, 2023.

Aceptado: 17 de abril, 2023.

Publicado: 23 de mayo, 2023.

<sup>◇</sup> Los autores agradecen a Paula Bernardino, Beatriz Millán, René Preza y Guillermo Vázquez por su asistencia técnica. Al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales, al Laboratorio de Espectroscopía Óptica del CFATA de la UNAM. Este proyecto fue financiado por el Conacyt (proyecto A1-S-21130 de Ciencia Básica, 2018-2019). Eduardo Ortiz agradece al Conacyt por la beca, en el marco del mismo proyecto.

<sup>\*</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Querétaro, Qro., México.

<sup>\*\*</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Querétaro, Qro., México.

<sup>\*\*\*</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, licenciatura en Tecnología, Querétaro, Qro., México.

<sup>†</sup> Autora de correspondencia: blanca.millan@fata.unam.mx



hongo por un método químico asistido por ondas de choque y calor, así como también determinar su resistividad eléctrica al aplicarle altos voltajes (entre 10 y 20 kV). Las ondas de choque se utilizaron en este estudio porque se sabe que inducen poros en las células y podrían promover la entrada de álcali en la hifa, permitiendo una mejor eliminación de los componentes celulares residuales. La quitina fue neutralizada, secada y se formaron películas. Los valores de proteína residual se cuantificaron con la técnica de ácido bicinonínico (BCA), obteniendo películas con bajas cantidades de proteína. La caracterización del morfotipo específico extraído se estimó mediante infrarrojo transformado de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD). Para evaluar la resistividad ante voltajes elevados, se diseñó un circuito especial que permitió detectar variaciones significativas de esta con respecto al voltaje aplicado, es decir, la quitina mostró un comportamiento coincidente con un varistor no lineal y, hasta donde sabemos, este es el primer informe de dicho comportamiento para la quitina.

**PALABRAS CLAVE:** *Aspergillus niger*, ondas de choque, películas de quitina, resistividad eléctrica.

## Introducción

Después de la celulosa, la quitina es el segundo biopolímero más abundante en el mundo. Se produce por varias especies de hongos, crustáceos, insectos, poríferos, cnidarios y tardígrados (Chen *et al.*, 2021). Es un polisacárido lineal conformado por unidades repetidas de  $\beta$ -(1-4)-N-acetilglucosamina (Song *et al.*, 2012), reportado por primera vez en el año 1811 por el químico francés Henri Braconnot, quien observó una fracción del hongo *Agaricus volvaceus* insoluble en álcali, a la cual denominó “fungina”. El término quitina se debe al químico francés Auguste Odier, quien, en 1823, la obtuvo a partir de élitros de insectos. La quitina y el quitosano (derivado desacetilado de la quitina) poseen propiedades de adsorción, biodegradabilidad, baja toxicidad y buena biocompatibilidad (Crini, 2019). Ambos polímeros son de gran interés para aplicaciones en áreas biomédicas, en el tratamiento de aguas, en el procesamiento y embalaje de alimentos, en la industria cosmética, en el desarrollo de baterías de estado sólido y en la fotografía, entre otras (Hirano, 1996; Song *et al.*, 2012).

Se han descrito múltiples ventajas del uso de la quitina fúngica, como tener el menor contenido de sustancias alergénicas (Jones *et al.*, 2020), ser fuentes de producción continuas y homogéneas (a diferencia de las fuentes animales que son estacionales y heterogéneas); su extracción es más amigable con el ambiente debido a una menor generación de productos de desecho durante la extracción, entre otras (Philibert *et al.*, 2017). El contenido de quitina puede variar desde 2 y hasta 42% y depende de la especie de hongo, de las condiciones ambientales de crecimiento, así como de la edad y la estructura fúngica utilizada en la extracción (Nawawi *et al.*, 2020).

*Aspergillus niger* es un hongo muy utilizado en la industria, pues es productor de ácido cítrico y otros ácidos orgánicos. También produce una gran cantidad de enzimas como amilasas, fitasas y proteasas (Shahlaei y Pourhossein, 2013). Este hongo microscópico, se usa actualmente como plataforma para la producción de proteínas heterólogas recombinantes (Ntana *et al.*, 2020). Es cultivado a gran escala en biorreactores, pudiéndose usar como fuente para la

extracción de quitina fúngica (Posch *et al.*, 2013). Se ha reportado que sus paredes celulares poseen un contenido de quitina de aproximadamente 23% (Wu *et al.*, 2005).

El objetivo general de este estudio comprendió la extracción de quitina del hongo *A. niger* por un método químico asistido por ondas de choque concentradas y calor, formando películas a las que se les determinó su resistividad eléctrica ante voltajes relativamente elevados (entre 10 y 20 kV). Así, uno de los objetivos particulares fue probar dichas ondas de choque como posible adyuvante de la extracción, mientras que el otro fue dirigido al análisis de las propiedades eléctricas de la quitina en condiciones extremas, donde su utilidad como dieléctrico —entre otras— no ha sido explorada a la fecha.

Las ondas de choque reportadas en este trabajo son del tipo utilizado en aplicaciones clínicas y biotecnológicas (Lohrer y Gerdesmeyer, 2014; Loske, 2017; Molina *et al.*, 2020; Larrañaga-Ordaz *et al.*, 2022). Se trata de pulsos de presión con una duración de 0.5 a 3  $\mu$ s y presiones entre 10 y 150 MPa, seguidos de un pulso de rarefacción de aproximadamente 2 a 20  $\mu$ s, cuya amplitud (considerada negativa con respecto a la presión de equilibrio) puede superar 20 MPa. Se producen en un fluido, generalmente agua, y se concentran con reflectores, lentes o, como en el caso descrito aquí, con generadores de forma semiesférica. El número de veces (dosis), la presión y la frecuencia con la cual se emiten estos pulsos depende de la aplicación específica. Una característica importante es que el tiempo en el que la presión aumenta desde su valor de equilibrio (presión hidrostática) hasta el valor máximo ( $P^+$ ) es extremadamente corto (menor a 500 ns).

Al hacer pasar este tipo de perturbaciones a través de un fluido como el agua o una suspensión de hongos microscópicos, se produce cavitación acústica, es decir, el crecimiento y colapso violento de microburbujas (Choi *et al.* 1993; Ohl e Ikink, 2003; Cleveland y McAteer, 2007; Johnsen y Colonius, 2008). El incremento súbito de presión comprime las microburbujas de aire contenidas en el fluido, aumentando su presión interna significativamente. A este fenómeno, conocido como colapso forzado, le sigue una expansión súbita, con duración de decenas de microsegundos, debida a la elevada presión dentro de la burbuja y a la influencia de la presión negativa de la onda de choque. Después de aproximadamente 100 a 600  $\mu$ s, las burbujas sufren un colapso inercial sumamente violento, durante el cual se generan ondas de choque secundarias y microchorros de fluido, denominados microjets, cuyas velocidades pueden llegar hasta 700 m/s (Philipp *et al.*, 1993).

Los efectos físicos, biológicos y terapéuticos de las ondas de choque dependen en gran medida de la cavitación acústica, es decir, de los esfuerzos producidos por las ondas de choque secundarias y los microjets emitidos por el colapso de las microburbujas. La formación de burbujas también es propiciada por núcleos de cavitación, que son sitios en los que la fuerza de adhesión entre el fluido y alguna superficie es relativamente baja.

La emisión de los microjets puede ser potenciada haciendo incidir una segunda onda de choque justo durante el colapso de las burbujas generadas por

la onda de choque precedente, lo cual es un proceso denominado generación de ondas de choque tándem (Lukes *et al.*, 2016). La elección del intervalo de tiempo óptimo entre la primera y la segunda onda de choque (también llamado *retraso*) para cierta aplicación es complicada, debido a que la cavitación depende de muchas variables como la viscosidad, la temperatura, la densidad de microburbujas, así como de la cantidad y tamaños de los núcleos de cavitación en la suspensión.

Las ondas de choque tándem se han usado como método de permeabilización celular para aumentar la eficiencia de transformación genética de *A. niger* (Loske *et al.*, 2014). En el ensayo reportado aquí, se recurrió a su uso con la finalidad de promover el ingreso de álcali al interior de las hifas, permitiendo una mayor eliminación de componentes celulares residuales que podrían considerarse como contaminantes en el producto final.

La quitina y el quitosano poseen propiedades eléctricas como la capacidad de carga y descarga, capacidad de actuación, dielectricidad y triboelectricidad. La quitina es un biopolímero neutro mientras que el quitosano es un biopolímero catiónico (Ponnamma *et al.*, 2017). Su uso potencial en la electrónica se contempla como una alternativa para enfrentar el problema de los desperdicios electrónicos y el desarrollo de materiales de nueva generación, renovables y amigables con el ambiente (Wang *et al.*, 2021; Ponnamma *et al.*, 2017). Autores diversos han reportado que la presencia de quitina como componente en algunos materiales compuestos modifica las propiedades dieléctricas y triboeléctricas originales, resultando de utilidad en la propuesta de dispositivos electrónicos como capacitores, biosensores y nanogeneradores triboeléctricos. Zhang y Olin (2020) y Salaberría *et al.* (2018) han encontrado que el refuerzo de materiales de quitosano con nanocristales de quitina redujo la conductividad eléctrica y disminuyó su tendencia a absorber agua. Por otro lado, Wang *et al.* (2020) al utilizar nanoláminas de nitruro de boro con una fuerza dieléctrica alta y pérdida electrónica baja, embebidas en una matriz de quitina, observaron que esta última impactó el comportamiento en ambas variables. Kamalov *et al.* (2020) demostraron que el uso de nanofibras de quitina en matrices de cultivo para fibroblastos permitió modular e incrementar la conductividad eléctrica de la matriz.

Existe gran interés en conocer las propiedades eléctricas de biopolímeros que puedan integrarse en el desarrollo y el mejoramiento de dispositivos electrónicos biodegradables. De entre la variedad de biopolímeros existentes, la quitina es uno de los más abundantes y sus propiedades eléctricas han sido analizadas principalmente como parte de materiales compuestos.

## Material y métodos

### Preparación de muestras

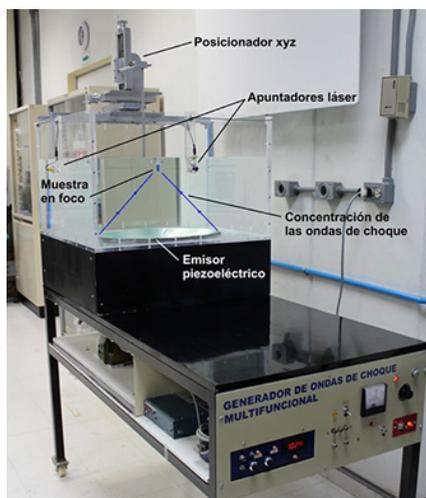
Se elaboraron suspensiones de la masa fúngica a una concentración de 25 mg/mL (m/v) en hidróxido de sodio (NaOH 1M), las cuales fueron homoge-

neizadas en vórtex (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, NJ, EUA). Para todos los tratamientos se utilizaron 3 mL por muestra, colectados completamente en 16 pipetas de transferencia de polietileno con capacidad de 4 mL (SEDI-PET, SAMCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), sellando su tallo con calor a 20 mm del bulbo. Cuatro de las suspensiones se incubaron durante 1 h y el resto (12 pipetas) se dejaron a temperatura ambiente (T.A.) durante 24 h previas a cualquier otro tratamiento. Tres pipetas de cada lote fueron sometidas a ondas de choque como método adyuvante en la extracción y una se dejó como control de tratamiento.

### Aplicación de ondas de choque

La aplicación de ondas de choque se llevó a cabo con el equipo experimental mostrado en la figura 1, el cual fue diseñado para generar ondas de choque tándem con retrasos seleccionables en los intervalos de 10 a 100  $\mu\text{s}$  ( $\pm 2 \mu\text{s}$ ) y de 100 a 900  $\mu\text{s}$  ( $\pm 5 \mu\text{s}$ ). Básicamente consiste en un emisor de ondas de choque piezoeléctrico Piezolith 2501 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania), montado en el fondo de una tina de acrílico de 675  $\times$  675 mm de base y 450 mm de altura, que produce ondas de presión por la súbita expansión de 3000 cristales piezoeléctricos montados sobre la parte cóncava de una superficie semiesférica de aluminio al ser expuestos a una descarga de alto voltaje de 2 a 6 kV. Una superficie polimérica aísla los cristales y sus contactos eléctricos del agua. Debido a efectos no lineales y a la superposición de la contribución del pulso de presión de todos los cristales se produce una onda de choque en torno al centro del arreglo, denominado foco (*F*).

**Figura 1.** Fotografía del generador de ondas de choque utilizado, con líneas y leyendas sobrepuestas para facilitar su comprensión.



Fuente: Elaboración de los autores.

Para el voltaje usado (6 kV), el volumen dentro del cual  $P^+$  tiene un valor igual o mayor al 50% de su máximo, denominado zona focal de -6 dB, tiene la forma de un elipsoide vertical, centrado en  $F$ , con ejes de aproximadamente 6.6 y 1.8 mm. La densidad de energía en el foco es de 0.895 mJ/mm<sup>2</sup>. Un posicionador xyz (UniSlide Assemblies Velmex, Inc., Bloomfield, NY, EUA) y dos láseres situados en dos paredes (perpendiculares una a la otra) de la tina, a la altura de  $F$  (plano focal), permiten colocar las muestras dentro de la tina con una precisión de  $\pm 0.05$  mm.

El nivel de agua dentro de la tina se mantuvo fijo a 40 mm arriba de  $F$  y la frecuencia de generación de eventos tándem se ajustó en 0.5 Hz, es decir, cada dos segundos se emitió una pareja de ondas de choque. Cada pipeta fue colocada dentro de la tina del generador de ondas de choque de tal manera que el centro de la suspensión coincidiera con  $F$ , y sometida a 2000 eventos tándem con tres retrasos diferentes, distribuidos de la siguiente manera: 200 eventos tándem (400 ondas de choque) con retraso de 210  $\mu$ s, 700 eventos (1400 ondas de choque) con retraso de 170  $\mu$ s y finalmente 1100 eventos (2200 ondas de choque) con retraso de 120  $\mu$ s. Los viales control se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales, sin tratamiento de ondas de choque. Las dosis de ondas de choque y los retrasos correspondientes fueron seleccionados con base en experimentos previos (no reportados aquí). Información más detallada sobre el generador de ondas de choque puede encontrarse en la bibliografía citada.

### Tratamiento con calor

Las muestras de 3 lotes (tanto las que recibieron ondas de choque como las que se reservaron como controles) fueron sometidas a un tratamiento con calor por 3 h en baño de agua a 65 °C (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, NJ, EUA). La diferencia entre lotes fue el tiempo (1 y 24 h) que estuvieron en contacto con el solvente (NaOH 1 M), previo a recibir ondas de choque.

### Neutralización

Las suspensiones fueron recuperadas en tubos cónicos de 50 mL. Se hicieron lavados para eliminar restos celulares y neutralizar el pH, agregando 20 mL agua destilada estéril en cada lavado. La recuperación de masa se realizó por centrifugación a 10,000  $\times g$  (Heraeus, Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) durante 5 min y el sobrenadante fue descartado. En cada ocasión el botón fúngico se resuspendió agitando con vórtex. El pH fue medido después de cada lavado, hasta alcanzar un valor cercano al neutro (pH 7 – 7.4).

### Determinación de la masa final recuperada

Una vez neutralizada, la masa fúngica se suspendió en un volumen final de 10 mL y se procedió con la documentación fotográfica de una fracción, utilizando un microscopio óptico (BX40F, Olympus Scientific Solutions, Waltham, MA, EUA) con un objetivo 10  $\times$  para evidenciar el efecto de cada tratamiento

en el tamaño de la colonia del hongo. A partir de la suspensión final se tomaron 3 mL de cada muestra y se colocaron en moldes de teflón, dejando secar a 50 °C durante la noche. El producto fue recuperado en forma de película tanto circular como rectangular, mismos que fueron pesados y almacenados.

### **Cuantificación del porcentaje de proteína residual**

A partir de las muestras tratadas conservadas en líquido y en forma de película, se evaluó el porcentaje de proteína utilizando el *kit* para determinación por reacción con ácido bicinonínico (ABP Biosciences, Beltsville, MD, EUA) en microplaca de 96 pozos, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se utilizó albúmina de suero bovino incluida en el *kit* para la elaboración de una curva de referencia de concentraciones conocidas de proteína (1, 0.5, 0.25, 0.12, 5, 0.0625 y 0 mg/mL). Para la cuantificación se colocaron 200 µL de solución de trabajo del kit y 20 µL de muestra líquida; mientras que para las muestras que formaron películas se cortaron fragmentos de 2 × 2 mm y se pusieron en contacto directo con 200 µL de la solución de trabajo. La placa se incubó a 37 °C por 30 min en oscuridad, se dejó enfriar a T.A. y se leyó a 562 nm utilizando el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) en modo espectrofotómetro. Las muestras se analizaron por triplicado.

### **Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier**

Los datos se obtuvieron utilizando un espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Nicolet, Madison, WI, EUA) con un cristal de reflectancia atenuada. Las mediciones se realizaron sobre fragmentos de 5 × 5 mm obtenidos a partir de las muestras que formaron películas. El espectro fue registrado en el rango de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>.

### **Difracción de rayos X**

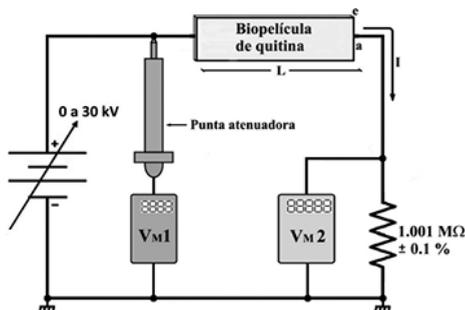
El análisis estructural de la quitina obtenida se llevó a cabo mediante difracción de rayos X sobre las películas, utilizando un difractor Rigaku Ultima IV (Wilmington, MA, EUA). Estas fueron colocadas en un portamuestras *zero background* para evitar lecturas que provinieran del mismo. El voltaje y la corriente de la fuente de rayos X fueron preestablecidos en 40 kV y 30 mA, respectivamente. El rango de escaneo de las muestras fue de 5° a 80° en 2θ, con un incremento de paso de 0.02°, a una velocidad de 2 °/min en una configuración Bragg-Brentano.

### **Evaluación de la resistencia longitudinal de las películas rectangulares de quitina**

Las películas rectangulares de quitina obtenidas de la muestra que recibió 2000 ondas de choque y se calentó a 65 °C durante 3 h, se evaluaron eléctricamente mediante el arreglo mostrado en la figura 2, donde es notable que la muestra fue intercalada en el circuito de manera longitudinal, a fin de evitar su posible rotura dieléctrica con los voltajes de interés en este análisis (entre

10 y 20 kV), suministrados por una fuente de alto voltaje marca Gamma High Voltage Research, mod. HVR RR30-20R (Ormond Beach, FL, USA). Tal fuente es regulada con disponibilidad de hasta 30 mA de corriente y su voltaje es variable en el intervalo de 0 a 30 kV mediante un *helipot* de 10 vueltas con vernier, permitiendo establecer valores con resolución de 0.2% y linealidad de 99.999% en todo el intervalo de voltajes.

**Figura 2.** Esquema del montaje para la aplicación de altos voltajes a la biopelícula de quitina y la medición de corrientes con resolución de centésimas de nA.



Fuente: Elaboración de los autores.

Se aplicaron siete valores distintos de alto voltaje ( $V$ ) a los extremos más distantes de la película de quitina, los cuales fueron confirmados con el voltímetro  $V_{M1}$  y la punta atenuadora esbozados en la figura 2, registrando también la corriente  $I$  a través de la quitina mediante un nano-amperímetro implementado con el voltímetro  $V_{M2}$  conectado en paralelo a la resistencia de precisión mostrada. Así, por ley de Ohm, fue posible determinar la resistencia longitudinal  $R$  de la película para cada voltaje aplicado ( $R = V/I$ ); y midiendo también las dimensiones geométricas de la película (largo  $L$ , ancho  $a$  y espesor  $e$ ), se determinó su resistividad eléctrica  $\rho$  en cada caso ( $\rho = Rae/L$ ).

Todas las mediciones se efectuaron en las condiciones ambientales recomendadas para dicha instrumentación (temperatura entre 18 y 22 °C, humedad relativa menor a 60%, etc.), además de tener en cuenta las incertidumbres sistemáticas involucradas y sus propagaciones conforme a la teoría de errores (Baird, 1994). A continuación, se describen las especificaciones de los instrumentos de medición utilizados y los criterios tomados al respecto.

El voltímetro  $V_{M1}$  es marca Fluke, mod. 8060A (Everett, WA, USA), con despliegue de  $4 \frac{1}{2}$  dígitos e incertidumbre de  $\pm 0.05\%$  de la lectura + 2 dígitos en el rango utilizado (20 V); y por su impedancia de entrada ( $10 \text{ M}\Omega$ ) es compatible con la punta atenuadora acoplada, de la marca Simpson, mod. 00168 (Elgin, IL, USA), con razón de atenuación nominal 1000:1 y 2% de tolerancia. Cabe mencionar que a esta última se le midió previamente su relación de atenuación con mayor precisión, encontrando la razón 985:1, con incertidumbre

de 0.1%, a fin de disminuir en lo posible las incertidumbres sistemáticas. Así, cada valor de alto voltaje  $V$  suministrado por la fuente fue determinado por la expresión  $V = m V_1$ , donde  $m$  es dicho factor de atenuación (985) y  $V_1$  es el voltaje registrado en el voltímetro ( $V_{M1}$ ), cuyas incertidumbres absolutas respectivas se denotaron como  $dm$  y  $dV_1$ , en las que se cumplen las expresiones:  $dm = (0.001) m = 0.985$  y  $dV_1 = (0.0005) V_1 + 0.002$ , según los datos antes mencionados. Con lo anterior, la incertidumbre absoluta propagada a  $V$  en cada medición se calculó con la ecuación:  $dV = |V_1 dm| + |m dV_1|$ , o bien de manera relativa con:  $dV/V = |dm/m| + |dV_1/V_1| = 0.001 + |dV_1/V_1|$ .

El segundo voltímetro ( $V_{M2}$ ) utilizado como nano-amperímetro es marca Schlumberger, modelo 7150 plus de 5½ dígitos (Farnborough, Hampshire, UK), con impedancia mayor a  $10 \text{ G}\Omega$  en el rango utilizado (0.2 V) e incertidumbre de 0.2% de la lectura + 3 dígitos. Al acoplarle la resistencia de precisión antes mencionada (de  $1.001 \text{ M}\Omega$ , con 0.1% de tolerancia, fabricada previamente para tal propósito), su impedancia quedó prácticamente de  $1 \text{ M}\Omega$ , ya que el arreglo en paralelo de al menos  $10,000 \text{ M}\Omega$  con  $1.001 \text{ M}\Omega$  resulta en tal valor y los voltajes  $V_2$  registrados entre 0 y  $0.19999 \text{ V}$  pueden ser interpretados como de corriente en  $\mu\text{A}$  (y resolución hasta centésimas de nA), ya que por simple análisis dimensional de la expresión de Ohm se deduce:  $[I] = [V_2] / (10^6 \Omega) = [V_2/\Omega] \times 10^{-6} = [\mu\text{A}]$ ; y en cuanto a la propagación de incertidumbres se cumple que  $dI = (dV_2 + 0.001V_2) [\mu\text{A}]$ , o bien en forma relativa:  $dI/I = dV_2/V_2 + 0.001$ , donde  $dV_2 = 0.002V_2 + 0.00003$ .

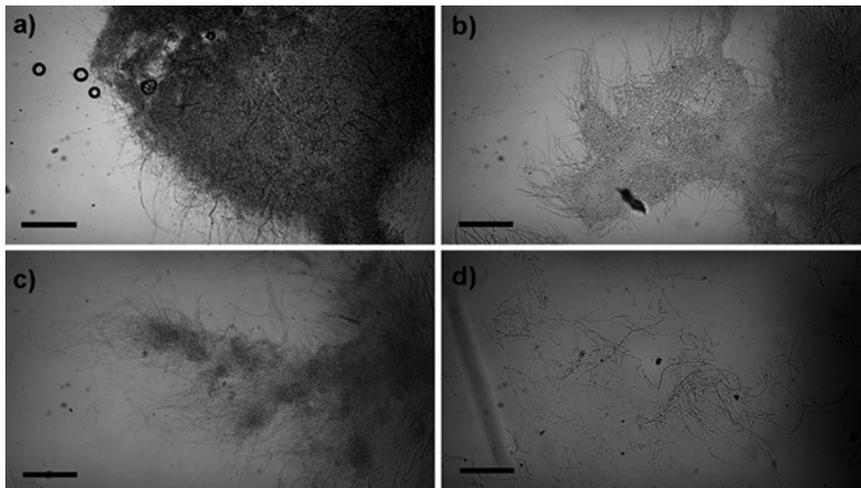
En los cálculos de la resistencia ( $R$ ) y resistividad ( $\rho$ ) de la película de quitina, las propagaciones de incertidumbres respectivas se determinaron en forma relativa mediante las expresiones:  $dR/R = |dV/V| + |dI/I|$  y  $d\rho/\rho = |dR/R| + |(a^{-1} + e^{-1} + L^{-1}) dx|$ , donde  $dx$  tuvo el valor de 0.01 mm en todos los casos, ya que para la medición del ancho ( $a$ ), espesor ( $e$ ) y longitud ( $L$ ) de la muestra se utilizó un vernier mecánico marca Mitutoyo, mod. 530-312, de 0.02 mm de resolución en toda su escala, es decir, dicha incertidumbre  $dx$  corresponde a  $\pm 1/2$  de la mínima división.

## Resultados

### Masa recuperada y proteína residual

El registro fotográfico de las muestras sometidas a tratamientos diferentes (figura 3) demuestra que el solvente por sí solo no fue capaz de disgregar las hifas organizadas de manera compacta, como se percibe en la imagen 3a, correspondiente a una colonia tomada directamente del cultivo. En 3b y 3c (24 y 48 horas en NaOH 1M, respectivamente) es notorio que, aunque los agregados son de menor tamaño, aún pueden observarse algunas zonas compactas. Finalmente, en la imagen 3d, perteneciente a una muestra sometida a ondas de choque, se distingue claramente que las hifas están separadas y presentan tamaños variados. Resulta importante contar con un método mecánico de dispersión del micelio que permita una mejor interacción entre el álcali y el micelio fúngico.

**Figura 3.** Fotografías de microscopía óptica del efecto del tratamiento sobre el micelio de *A. niger* (aumento 10×): a) fragmento de colonia crecida en cultivo sumergido en medio mínimo líquido; b) colonia incubada durante 24 h en NaOH 1 M; c) colonia incubada durante 48 h en NaOH 1 M, y, d) fragmentos de micelio observados después del tratamiento con ondas de choque, solvente NaOH 1M. Barra de escala: 200 µm.

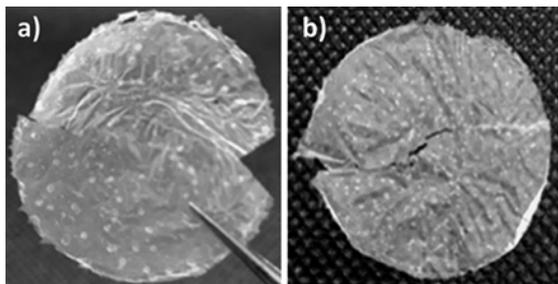


Fuente: Elaboración de los autores.

Una vez secas, las muestras de control y las tratadas formaron una película delgada como se observa en la figura 4. Se utilizó un molde circular de 31 mm de diámetro para el secado. Cada película fue pesada para evaluar el porcentaje de masa recuperada, así como la proteína presente en el producto final (tabla 1). Para el control sin ondas de choque del tratamiento 1, se aprecia que fue recuperada una cantidad pobre de masa fúngica con altos valores de proteínas alcanzando el 9.73% del total recuperado. Después de la aplicación de ondas de choque, los valores de proteína disminuyeron hasta casi un 2%, en una cantidad mayor de masa recuperada. Los valores registrados para las muestras sometidas a calentamiento indican que no hubo una diferencia en aquellas que permanecieron poco o nulo tiempo en incubación, previo a la acción de las ondas de choque. Aquellas muestras en las que se combinaron incubación previa de 24 horas en el solvente, ondas de choque y calor, registraron disminución en la cantidad de masa recuperada, similarmente a lo sucedido para el control.

De acuerdo con la tabla 1, es de notar que el tratamiento con calor a 65 °C por 3 h ayudó a reducir la cantidad de proteína residual en las películas; un resultado esperado, ya que por arriba de 50 °C se promueve la desnaturalización de las proteínas, lo cual ayuda a descartar material celular no deseado (Kaur y Dhillon, 2015). Las ondas de choque al disgregar el micelio en la colonia de *A. niger* y promover su ingreso al interior de la hifa permiten que el NaOH tenga una mayor área de contacto con las estructuras celulares,

**Figura 4.** Películas circulares de quitina con 31 mm de diámetro generadas a partir de a) muestra con la combinación: solvente 24 h - ondas de choque - solvente 24 h. En b) la película corresponde a la combinación: sin incubación previa en el solvente - ondas de choque - tratamiento con calor.



Fuente: Elaboración de los autores.

**Tabla 1.** Porcentaje de masa recuperada (quitina) para cada lote de 3 películas y su cuantificación de proteínas correspondiente.

Lote	Combinación de parámetros de tratamiento	% masa recuperada (quitina)	% de proteína en las películas
1	24 h T.A. 2000 OCH 24 h T.A. Control sin OCH	23.11 ± 2.67 14.20 ± 0.2	1.92 ± 0.08 9.73 ± 0.1
2	2000 OCH 65 °C 3 h Control sin OCH	19.41 ± 3.41 19.10 ± 0.25	1.1 ± 0.56 0.70 ± 0.9
3	1h T.A. 2000 OCH 65 °C 3 h Control sin OCH	20.44 ± 5.33 20.90 ± 0.22	0.92 ± 0.4 0.73 ± 0.7
4	24 h T.A. 2000 OCH - 65 °C - 3 h Control sin OCH	12.44 ± 5.33 14.20 ± 0.2	0.82 ± 0.67 4.10 ± 0.5

Fuente: Elaboración de los autores.

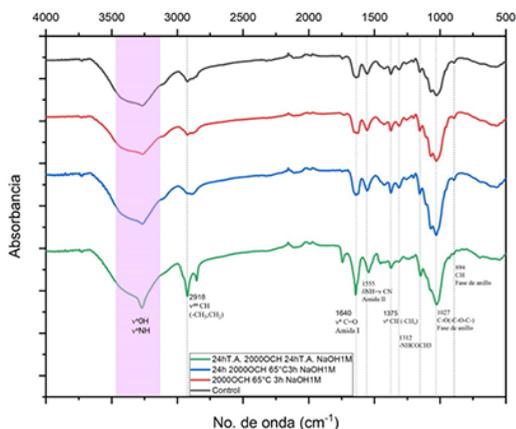
promoviendo, de esta manera, la acción química del álcali, dando como resultado la disminución del contenido proteico. Cabe mencionar que el porcentaje de proteína residual disminuyó con el tiempo de exposición de la masa fúngica en el solvente previo a las ondas de choque, como se observa en la tabla 1. Los rendimientos de quitina recuperada como masa insoluble en álcali obtenidos en este estudio (~12 a 23%) son similares a los reportados por Wu *et al.* en 2005 para la quitina cruda de *A. niger* (~24%), pero mayores a los rendimientos de quitina obtenida por otros tipos de hongos, tales como *Agaricus bisporus* (3-19%), *Lentinula edodes* (1-10%), *Pleurotus ostreatus* (2-15%), *P. eryngii* (3-9%), *Saccharomyces cerevisiae* (1-3%) y *Mucor rouxii* (8-9%) (Wan-Nawawi *et al.*, 2015).

### Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

El análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es muy utilizado para indicar el tipo de quitina obtenida (figura 5), sabiendo que esta presenta tres formas polimórficas diferentes:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Tsurkan *et al.*,

2021). La figura 5 muestra espectros de absorción de quitina obtenidos en la región de número de onda entre 4000 y 500  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada espectro se resaltan las bandas de absorción más intensas características para la quitina: 3269  $\text{cm}^{-1}$  (tensión del grupo N-H), 2918  $\text{cm}^{-1}$  (tensión de enlace C-H;  $\text{CH}_3$ ), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1555  $\text{cm}^{-1}$  (C-N, C-N, N-H amida II), 1375  $\text{cm}^{-1}$  (C-H,  $\text{CH}_3$ ), 1312  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{NHCOCH}_3$ ), 1154  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C), 1027  $\text{cm}^{-1}$  (C-O), 894  $\text{cm}^{-1}$  (C-H anillo), 682  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 573  $\text{cm}^{-1}$  (C-C). En la película sin calentamiento (24 h, T.A., 2000 OCH, 24 h, T.A., NaOH 1M), la región correspondiente al grupo amida presenta una sola banda intensa en 1642  $\text{cm}^{-1}$ , característica de la quitina  $\beta$ . En este polimorfo la banda de absorción cercana a 1650  $\text{cm}^{-1}$  es atribuida al enlace de hidrógeno entre el grupo (C=O) y los grupos amida (H-N) (Cárdenas *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2004; Aylanc *et al.*, 2020). En el resto de los tratamientos en la misma región se encuentran dos picos poco definidos y menos intensos a 1626 y 1640  $\text{cm}^{-1}$ , similares a los que presenta la quitina  $\gamma$ . La quitina  $\alpha$  y la quitina  $\gamma$  muestran bandas similares debido al arreglo de las cadenas poliméricas en antiparalelo, una banda cercana a 1660  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al enlace de hidrógeno entre los grupos carboxilo (C=O) y los grupos amida I y II (H-N) de la misma cadena y en 1620  $\text{cm}^{-1}$  causada por el enlace de hidrógeno entre grupos carbonilo, con los grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$  de las cadenas laterales (Cárdenas *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2004). La presencia de una banda pronunciada para todos los tratamientos en 3269  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a los grupos OH y NH y la ausencia del pico en 3479  $\text{cm}^{-1}$ , es una característica distinguible en la quitina  $\beta$  (Cárdenas *et al.*, 2004). Por las observaciones anteriores, es probable que se hayan obtenido películas de quitina con contribuciones de  $\beta$  y  $\gamma$ ; sin embargo, resulta interesante que las bandas asociadas con quitina de tipo  $\gamma$ , se hayan presentado en las muestras que recibieron tratamiento con calor.

Figura 5. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de las películas de quitina.



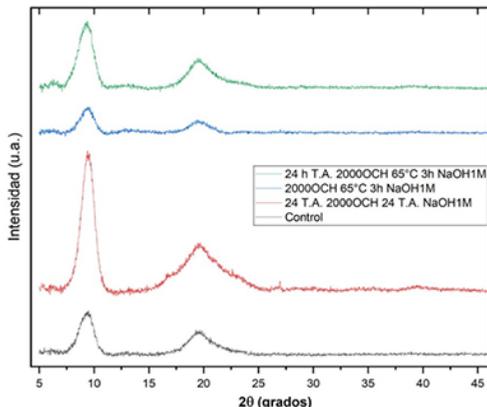
Fuente: Elaboración de los autores.

## Análisis cristalográfico mediante difracción de rayos X

El patrón de difracción de quitina típicamente tiene picos en el rango de  $5^\circ$  a  $35^\circ$  en  $2\theta$ . La diferencia en la posición de estos permite diferenciar entre los polimorfos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  quitina. En la quitina  $\alpha$  normalmente se distinguen cuatro picos principales alrededor de  $9.6^\circ$ ,  $19.6^\circ$ ,  $21.1^\circ$  y  $23.7^\circ$ . En la quitina  $\beta$  aparecen dos picos cerca de  $9^\circ$  y  $20^\circ$ , mientras que en la quitina  $\gamma$  los picos posicionados en  $9.6^\circ$  y  $19.8^\circ$  son similares a los de la quitina  $\alpha$  (Cárdenas *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2004).

Los patrones obtenidos para las muestras estudiadas se presentan en la figura 6, los cuales sumados a los resultados de FTIR indican que la quitina extraída a partir de *A. niger* podría ser del tipo polimorfo  $\beta$ . Así, el primer pico correspondería al plano (010) y el segundo a la contribución de los planos (110) y (020) pertenecientes a la celda unitaria monoclinica (Cárdenas *et al.*, 2004). Los ángulos máximos de difracción de los dos picos principales se describen en la tabla 2. Una distinción notable en los cuatro patrones de difracción obtenidos es que el primer pico es más intenso que el segundo en todos los casos, lo cual no se presenta en la mayoría de los análisis reportados de difracción de rayos X (Cárdenas *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2004; Farinha *et al.*, 2015), a excepción de la quitina  $\beta$  obtenida por Cuong *et al.* (2016), donde el primer pico se encuentra a  $8.1^\circ$  con mayor intensidad que el segundo pico ubicado en  $2\theta = 19.6^\circ$ . Dicha diferencia en intensidad podría estar asociada con una orientación preferencial en el plano cristalino (010), que se produce por el apilamiento para la formación de películas.

**Figura 6.** Patrones de difracción obtenidos por difracción de rayos X para las películas producidas mediante los tratamientos de extracción mencionados.



Fuente: Elaboración de los autores.

## Resistencia y resistividad eléctrica de las películas rectangulares de quitina

Las mediciones de voltaje y corriente registradas para películas obtenidas de la muestra que recibió 2000 OCH y se calentó durante 3 h a  $65^\circ\text{C}$ , se presen-

**Tabla 2.** Posiciones de los picos de difracción de rayos X más altos obtenidos en las películas de quitina.

Muestras	2θ	
	Primer pico	Segundo pico
Control	9.34°	19.52°
24 h T.A. 2000 OCH 24 h T.A.	9.4°	19.57°
2000 OCH 65 °C 3 h	9.33°	19.54°
24 h T.A. 2000 OCH 65 °C 3h	9.28°	19.5°

Fuente: Elaboración de los autores.

tan en la tabla 3. Se utilizó esta muestra debido a que fue la que presentó la menor cantidad de proteína y buena recuperación de masa fúngica. Se destaca que al aumentar el voltaje, la corriente en el material siguió un comportamiento óhmico, aunque no de forma lineal, esto es, la resistencia como constante de proporcionalidad paramétrica varió de acuerdo con la resistividad del material, al mantenerse las dimensiones de la película constantes en los valores:  $a = 2.40$  mm,  $e = 0.27$  mm y  $L = 36.57$  mm, todos ellos dentro de la incertidumbre mencionada ( $\pm 0.01$  mm).

**Tabla 3.** Mediciones del voltaje y la corriente aplicados a la película de quitina (sección izquierda) y valores obtenidos de su resistencia y resistividad (sección derecha).

$V_1^*$ [V]	$V^§$ [kV]	$(dV/V)^¥$ [%]	$I^†$ [nA]	$(dI/I)^‡$ [%]	$R^¶$ [TΩ]	$(dR/R)^£$ [%]	$\rho^¢$ [MΩ·m]	$(d\rho/\rho)^ψ$ [%]
10.260	10.106	0.17	1.01	3.27	10.01	3.44	177.3	7.59
11.420	11.249	0.17	1.98	1.82	5.68	1.98	100.7	6.13
12.409	12.223	0.17	3.00	1.30	4.07	1.47	72.2	5.61
14.161	13.949	0.16	5.03	0.90	2.77	1.06	49.1	5.21
15.820	15.583	0.16	7.96	0.68	1.96	0.84	34.7	4.99
17.331	17.071	0.16	11.09	0.57	1.54	0.73	27.3	4.88
18.039	17.768	0.16	12.97	0.53	1.37	0.69	24.3	4.84

\* Voltaje atenuado medido.

§ Alto voltaje calculado mediante el factor de atenuación (985).

¥ Incertidumbre relativa porcentual del alto voltaje.

† Corriente medida a través de la película.

‡ Incertidumbre relativa porcentual de la medición de corriente.

¶ Resistencia calculada.

£ Incertidumbre relativa porcentual de la resistencia.

¢ Resistividad calculada.

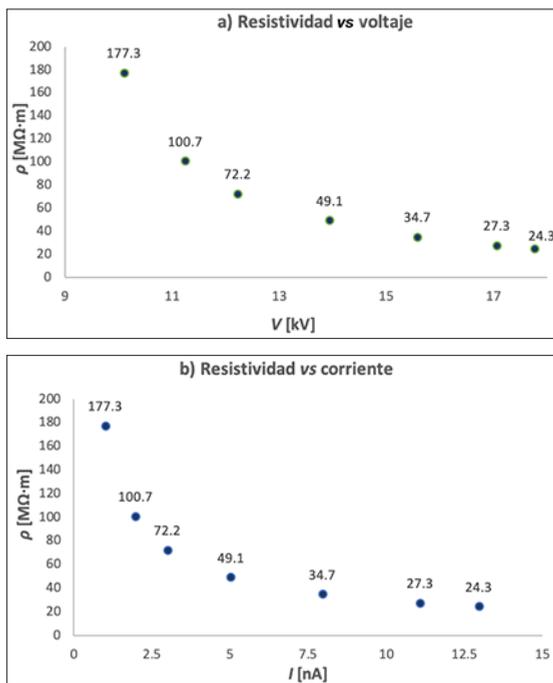
ψ Incertidumbre relativa porcentual de la resistividad.

Fuente: Elaboración de los autores.

En la figura 7 se muestran las gráficas de la resistividad calculada ( $\rho$ ) contra el voltaje ( $V$ ) y la corriente ( $I$ ) aplicados a la película. En ellas, es evi-

dente que la quitina presentó una resistividad variable con respecto a dichos parámetros. Este comportamiento coincide con el de un varistor no lineal.

**Figura 7.** Gráficas de la resistividad calculada versus a) el voltaje, y, b) la corriente para las películas de quitina obtenidas.



Fuente: Elaboración de los autores.

El efecto de varistor ocurre comúnmente en óxidos metálicos, de los cuales el ZnO es el más estudiado (He, 2019). En 2012 Rahman *et al.* reportaron que biopolímeros basados en almidón de sagú involucrados en la formación de bionanocompuestos, embebidos con nanorrodillos de ZnO como relleno, se comportan como varistores, mientras que, en biopolímeros sin refuerzo no se observó dicho fenómeno.

Es de notar que  $\rho$  mostró una tendencia a estabilizarse con el aumento del voltaje, acercándose a  $20 \text{ M}\Omega\cdot\text{m}$ ; mientras que la resistividad aumentó exponencialmente conforme el voltaje disminuyó. Esto último tiene relación con lo reportado por Kamalov *et al.* en 2020, quienes, con un voltaje constante de  $10 \text{ V}$ , obtuvieron valores de conductividad en el rango de  $1.2 \times 10^{-11} - 7.6 \times 10^{-11} \text{ S/m}$ , para películas compuestas de quitosano y nanofibras de quitina mediante la variación de la concentración de nanofibras de quitina del compuesto. Dichos valores de conductividad corresponden a resistividades de  $13.16 - 83.3 \text{ G}\Omega\cdot\text{m}$ , los cuales son tres órdenes de magnitud mayores a las resistividades

calculadas en este trabajo. Es posible que al efectuar mediciones con voltajes pequeños, también podrían alcanzarse valores de resistividad del orden de los  $G\Omega\cdot m$  en nuestras muestras, dada la tendencia exponencial que presentan los resultados obtenidos. Para corroborar esta tendencia, es necesario obtener más datos experimentales con un mejor control de variables como la ausencia o disminución de perturbaciones ambientales (usando una cámara de vacío) y con medidores de corriente más sensibles, como un pico-amperímetro. En cuanto a la comprobación del valor de estabilidad de  $\rho$  en voltajes altos, es importante determinar a corto plazo el valor del rompimiento eléctrico de las películas de quitina, con los métodos e instrumentos adecuados para ello, pues con el circuito usado en este análisis (figura 2) solo se pretendió investigar el comportamiento reportado y, a lo más, se limitó la corriente de salida de la fuente a su valor mínimo ( $300 \mu A$ ), a fin de proteger el nano-amperímetro implementado contra una sobrecarga abrupta de corriente.

## Conclusiones

Con todos los tratamientos usados en este estudio fue posible obtener películas delgadas de quitina. Las caracterizaciones realizadas demostraron que existen variaciones ligeras en el producto obtenido a partir de un mismo lote de masa fúngica. Dichas variaciones se asocian con el tratamiento realizado en el momento de la extracción. Aunque la proteína residual no se eliminó completamente, sí fue posible disminuir considerablemente estos valores, siendo la aplicación de calor una variable importante a considerar para la eliminación de estructuras celulares. Con el número de ondas de choque, la energía y los retardos de ondas tándem usados en este trabajo, no fue posible determinar su efecto sobre la eficiencia de desproteínización. Resulta necesario explorar otros parámetros para mejorar la eficacia del método, principalmente en la eliminación de restos celulares. Aunque la quitina se ha utilizado en pequeñas cantidades para la regulación de variables como corriente y voltaje, para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta un comportamiento de varistor de este biopolímero.

## Referencias

- Aylanc, Volkan, Seymanur Ertosun, Lalehan Akyuz, Behlul Koc Bilican, Semih Gokdag, Ismail Bilican, Yavuz Selim Cakmak, Bahar Akyuz Yilmaz y Murat Kaya. (2020). Natural  $\beta$ -chitin-protein complex film obtained from waste razor shells for transdermal capsaicin carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155: 508-515. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.232>.
- Baird, David C. (1994). *Experimentation: an introduction to measurement theory and experiment design*, 3a ed. rev. EUA: Addison-Wesley Professional.
- Cárdenas, Galo, Gustavo Cabrera, Edelio Taboaday S. y Patricia Miranda. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and 13C cross polarization/mass

- angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4): 1876-1885. <https://doi.org/10.1002/app.20647>.
- Crini, Grégorio. (2019). Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters*, 17: 1623-1643. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>.
- Cuong, Hoang Ngoc, Nguyen Cong Minh, Nguyen Van Hoa y Trang Si Trung. (2016). Preparation and characterization of high purity  $\beta$ -chitin from squid pens (*Loligo chensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(A): 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.085>.
- Chen, Yong-Ming, Sami Pekdemir, Ismail Bilican, Behlul Koc-Bilican, Betul Cakmak, Asad Ali, Lian-Sheng Zang, M. Serdar Onses y Murat Kaya. (2021). Production of natural chitin film from pupal shell of moth: Fabrication of plasmonic surface for SERS-based sensing applications. *Carbohydrate Polymers*, 262: 117909. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117909>.
- Choi, M. J., A. J. Coleman y J. E. Saunders. 1993. The influence of fluid properties and pulse amplitude on bubble dynamics in the field of a shock wave lithotripter. *Physics in Medicine and Biology*, 38: 1561-1573. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/38/11/002>.
- Cleveland, Robin O. y James A. McAteer. (2007). The physics of shock wave lithotripsy. En Arthur D. Smith, Gopal H. Badlani, Demetrius H. Bagley, R. V. Clayman, S. G. Docimo, Gerald H. Jordan, Louis R. Kavoussi, Benjamin R. Lee, James E. Lingeman, Glenn M. Preminger y J. W. Segura (eds.), *Smith's textbook on endourology*. Hamilton, Ontario, Canadá: BC Decker, Inc., 317-332.
- Farinha, Inês, Paulo Duarte, Ana Pimentel, Evgeniya Plotnikova, Bárbara Chagas, Luís Mafra, Christian Grandfils, Filomena Freitas, Elvira Fortunato y María A. M. Reis. (2015). Chitin-glucan complex production by *Komagataella pastoris*: Downstream optimization and product characterization. *Carbohydrate Polymers*, 130: 455-464. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.034>.
- He, Jinliang. (2019). Introduction of varistor ceramics. En Jinliang He (ed.), *Metal oxide varistors: From microstructure to macro-characteristics*, 1-22. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Hirano, Shigehiro. (1996). Chitin biotechnology applications. *Biotechnology Annual Review*, 2(C): 237-258. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(08\)70012-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(08)70012-7).
- Jang, Mi-Kyeong, Byeong-Gi Kong, Young-Il Jeong, Chang Hyung Lee y Jae-Woon Nah. (2004). Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 42(14): 3423-3432. <https://doi.org/10.1002/pola.20176>.
- Johnsen, Eric y Tim Colonius. (2008). Shock-induced collapse of a gas bubble in shock wave lithotripsy. *Journal of the Acoustical Society of America*, 124(4): 2011-020. <https://doi.org/10.1121/1.2973229>.
- Jones, Mitchell, Marina Kujundzic, Sabu John y Alexander Bismarck. (2020). Crab vs mushroom: a review of crustacean fungal chitin in wound treatment. *Marine Drugs*, 18(1): 64. <https://doi.org/10.3390/md18010064>.
- Kamalov, Almaz, Elena Dresvyanina, Margarita Borisova, Natalia Smirnova, Kon-

- stantin Kolbe y Vladimir Yudin. (2020). The effect of electrical conductivity of films based on chitosan and chitin on the bioactivity of human dermal fibroblasts. *Materials Today: Proceedings*, 30(3): 798-801. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.346>.
- Kaur, Surinder y Gurpreet Singh Dhillon. 2015. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1): 44-61. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798256>.
- Larrañaga-Ordaz, Daniel, Miguel A. Martínez-Maldonado, Blanca E. Millán-Chiu, Francisco Fernández, Eduardo Castaño-Tostado, Miguel Ángel Gómez-Lim y Achim M. Loske. (2022). Effect of shock waves on the growth of *Aspergillus niger* conidia: Evaluation of germination and preliminary study on gene expression. *Journal of Fungi*, 8(11): 1117. <https://doi.org/10.3390/jof8111117>.
- Lohrer, Heinz y Ludger Gerdesmeyer. (2014). *Shock wave therapy in practice: Multidisciplinary medical applications*. Heilbronn, Alemania: Level 10.
- Loske, Achim M. (2017). *Medical and biomedical applications of shock waves*. Cham, Suiza: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47570-7>.
- Loske, Achim M., Francisco Fernández, Denis Magaña-Ortíz, Nancy Cocconi-Linares, Elizabeth Ortiz-Vázquez y Miguel A. Gómez-Lim. (2014). Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics*, 54(6): 1656-1662. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.03.003>.
- Lukes, P., F. Fernández, J. Gutiérrez-Aceves, E. Fernández, U. M. Álvarez, P. Sunka y A. M. Loske. (2016). Tandem shock waves in medicine and biology: a review of potential applications and successes. *Shock Waves*, 26(1): 1-23. <https://doi.org/10.1007/s00193-015-0577-0>.
- Molina, Gustavo A., Fanny González-Fuentes, Achim M. Loske, Francisco Fernández y Miriam Estevez. (2020). Shock wave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from *Eysenhardtia polystachya* heartwood: a novel method and its comparison with conventional methodologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 61(3): 104809. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104809>.
- Nawawi, Wan M. F. B. W., Mitchell Jones, Richard J. Murphy, Koon-Yang Lee, Eero Kontturi, y Alexander Bismarck. (2020). Nanomaterials derived from fungal sources-Is it the new hype? *Biomacromolecules*, 21(1): 30-55. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01141>.
- Ntana, Fani, Uffe Hasbro Mortensen, Catherine Sarazin y Rainer Figge. (2020). *Aspergillus*: a powerful protein production platform. *Catalysts*, 10: 1064. <https://doi.org/10.3390/catal10091064>.
- Ohl, C. D. y R. Ikink. (2003). Shock-wave-induced jetting of micron-size bubble. *Physical Review Letters*, 90(21): 214502 (1-4). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.90.214502>.
- Philibert, Tuyishime, Byong H. Lee y Nsanzabera Fabien. (2017). Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181: 1314-1337. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2286-2>.

- Philipp, A., M. Delius, C. Scheffczyk, A. Vogel y W. Lauterborn. (1993). Interaction of lithotripter generated shock waves with air bubbles. *Journal of the Acoustical Society of America*, 93:2496-2509. <https://doi.org/10.1121/1.406853>.
- Ponnamma, D., K. K. Sadasivuni y M. A. AlMaadeed. 2017. Introduction of biopolymer composites: What to do in electronics? En K. K. Sadasivuni, D. Ponnamma, J. Kim, J.-J. Cabibihan y M. A. AlMaadeed (eds.), *Biopolymer composites in electronics*. Elsevier, 1-12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00001-2>.
- Posch, Andreas E., Christoph Herwig y Oliver Spadiut. 2013. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 31(1): 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.008>.
- Rahman, M. Aizuddin Abdul, Shahrom Mahmud, Rabab Khalid Sendi y Abdul Karim Alias. (2012). Varistor-like effect in zinc oxide bionanocomposite. *Advanced Materials Research*, 626: 743-746. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.626.743>.
- Salaberria, A. M., R. Teruel-Juanes, J. D. Badia, S. C. M. Fernandes, V. Sáenz de Juano-Arbona, J. Labidi y A. Ribes-Greus. (2018). Influence of chitin nanocrystals on the dielectric behaviour and conductivity of chitosan-based bionanocomposites. *Composites Science and Technology*, 167: 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2018.08.019>.
- Shahlaei, Mohsen y Alireza Pourhossein. (2013). Biomass of *Aspergillus niger*: uses and applications. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 83-89.
- Song, E. H., J. Shang y D. M. Ratner. (2012). Polysaccharides en Krzysztof Matyjaszewski y Martin Möller (eds.), *Polymer science: a comprehensive reference*, 9: 137-155. Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6>.
- Tsurkan, Mikhail V., Alona Voronkina, Yuliya Khrunyk, Marcin Wysokowski, Iaroslav Petrenko y Hermann Ehrlich. (2021). Progress in chitin analytics. *Carbohydrate Polymers*, 252: 117204. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117204>.
- Wang, Jinyu, Huan Chen, Xueqian Li, Chenggang Zhang, Wenchao Yu, Liang Zhou, Quanling Yang, Zhuqun Shi y Chuanxi Xiong. (2020). Flexible dielectric film with high energy density based on chitin/boron nitride nanosheets. *Chemical Engineering Journal*, 383:123-147. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123147>.
- Wang, Ziyang, Zongtao Ma, Jingyao Sun, Yuhua Yan, Miaomiao Bu, Yanming Huo, Yun-Fei Li y Ning Hu. (2021). Recent advances in natural functional biopolymers and their applications of electronic skins and flexible strain sensors. *Polymers*, 13(5): 813. <https://doi.org/10.3390/polym13050813>.
- Wan-Nawawi, Wan Mohd Fazli, Koon-Yang Lee, Eero Kontturi y Alexander Bismarck. (2015). Strong and tough fungal based chitin-glucan thin film. *ICCM International Conferences on Composite Materials*, 20: 8.
- Wu, Tao, Svetlana Zivanovic, F. Ann Draughon, William S. Conway y Carl E. Sams. (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 3888-3894. <https://doi.org/10.1021/jf048202s>.
- Zhang, Renyun y Håkan Olin. (2020). Material choices for triboelectric nanogenerators: A critical review. *EcoMat*, 2(4): 1-13. <https://doi.org/10.1002/eom2.12062>.