

BIODEGRADACIÓN EN SUELO DE PELÍCULAS DE QITOSANO INJERTADAS CON POLI(HEMA)

A.J. Avila^{1*}, G. Pucci¹, M. C Strumia²

1) Facultad de ingeniería, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (U.N.P.S.J.B), 9000 Comodoro Rivadavia, Argentina. Correo electrónico: aavila@unpata.edu.ar

2) Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (U.N.C), 5000 Córdoba, Argentina.

Recibido: Mayo 2014; Aceptado: Junio 2014

RESUMEN

Se preparó a través de una reacción de copolimerización por injerto via radicales libres, una película de quitosano:HEMA 1:1 (CH-g-HEMA 1:1). Esta película presentó mejores propiedades mecánicas que el quitosano (CH) sin modificar. En una etapa posterior, se estudió su degradación en suelo, con el objetivo de conocer cómo afectaba la modificación química de injerto en el proceso de biodegradabilidad de la película. Esta propiedad es importante para su potencial aplicación en la industria del envase ecológico.

Se encontró que la película CH-g-HEMA 1:1 presentó un proceso más lento de degradación comparada con la de quitosano. Con las películas de quitosano se obtuvo un porcentaje de biodegradación de 85% en 20 días, y con las de CH-g-HEMA 1:1 este valor se modificó a 45%.

Palabras claves: Plantilla, quitosano, HEMA, injerto, película.

ABSTRACT

In this work, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) were graft copolymerized onto the chitosan backbone using radical initiation under experimental conditions and a film was prepared. This grafted films (CH-g-HEMA) showed better mechanical behavior than chitosan films. At a later stage, its degradation in soil was studied, in order to check if the material retained its inherent biodegradability despite the grafting reactions, which would allow its potential application in ecological packaging industry.

It was found that grafted film CH-g-HEMA 1:1 showed a slower process compared to chitosan film degradation. Chitosan films degraded 85% in only 20 days while CH-g-HEMA films showed 45% of biodegradation during the same time.

Key words: network, chitosan, HEMA, grafting, film.

INTRODUCCIÓN

El término *biodegradación* indica un proceso de degradación química de sustratos complejos por parte de microorganismos siguiendo vías metabólicas catalizadas por enzimas segregadas por estos últimos, para obtener sustancias sencillas, básicamente agua, dióxido de carbono y biomasa, fácilmente asimilables por el medio ambiente [1]. Las reacciones que tienen lugar pueden ser de oxidación o de hidrólisis y generalmente comportan una disminución del grado de polimerización del material.

La biodegradación puede ser parcial o total. Es parcial cuando se produce la alteración en la estructura química y la pérdida de propiedades específicas del material. La biodegradabilidad total se asocia generalmente a una mineralización completa con producción de CO₂ (en condiciones aerobias), metano (en condiciones anaerobias), agua, sales minerales y biomasa [1]; en algunos casos pueden quedar fragmentos de bajo peso molecular resistentes a la degradación.

La utilización de un polímero puede ser estudiada midiendo el CO₂ producido como resultado de la mineralización de la fuente carbonada. Dicha determinación resulta además, en una medición

indirecta del crecimiento bacteriano. Esta determinación puede realizarse en medio sólido o en medio líquido y aplicarse tanto a muestras de suelo como a cultivos bacterianos.

El uso de polímeros sintéticos no degradables y materiales plásticos como envases de alimentos producidos de la industria petroquímica ha traído serios problemas ambientales debido a la dificultad de asegurar la quema en incineradores y al marcado crecimiento de los residuos poliméricos sintéticos en los residuos sólidos totales [2]. Una respuesta a este problema es el uso de polímeros biodegradables y por ello es necesario conocer su biodegradabilidad en ambientes naturales para considerar la posibilidad de su uso.

El quitosano (CH) es un polímero catiónico preparado por la desacetilación de la quitina; segundo polisacárido más importante después de la celulosa, encontrado comúnmente en el caparazón de crustáceos y puede ser un material alternativo para reemplazar a los productos basados en el petróleo. Sin embargo, por sus pobres propiedades mecánicas y su hidrofiliidad debe ser procesado con algún polímero sintético para obtener un material apto para ser usado como envase de alimentos.

Los polímeros que presentan buenas propiedades para la mayoría de sus aplicaciones pero exhiben deficiencias en algunas otras, se intentan mejorar; mediante su copolimerización o mezclado con otros polímeros o componentes, de modo tal que se optimice dicha propiedad con la menor alteración del resto de las propiedades mecánicas.

Se han sintetizado y evaluado una gran variedad de copolímeros injertados de quitosano y monómeros vinílicos, incluyendo floculantes, resinas de intercambio iónico, liberación de drogas, matrices de afinidad [3 – 8]. La combinación química de polímeros naturales y sintéticos produce nuevos materiales, con el beneficio de que la biodegradabilidad y bioactividad de los polímeros naturales se mantienen inalteradas. Se han encontrado trabajos de polimerización de injerto usando metacrilato de metilo, acrilonitrilo, acrilamida, metacrilato de glicidilo, ácido acrílico o acetato de vinilo utilizando diferentes tipos de iniciadores como el reactivo de *Fenton*, fotoreacción con o sin fotosensitizador o método radical bajo condiciones homogéneas o heterogéneas [9 – 16]. En todos los casos se encontraron nuevas propiedades, incluyendo estabilidad física y térmica, óptima capacidad de hinchamiento, buenas propiedades de barrera o mejora en las propiedades mecánicas.

En este trabajo se prepararon por polimerización de injerto (grafting), usando persulfato de amonio como iniciador; películas de quitosano (polímero natural) de bajo peso molecular sumadas a las ventajas de un polímero sintético como poli(HEMA), con el objetivo de mejorar la resistencia mecánica con respecto al quitosano. El poli(HEMA) es un polímero atóxico, biocompatible e higroscópico de buenas propiedades mecánicas [10, 11].

El nuevo material biocompuesto, ofrece además, la presencia de grupos reactivos, como

hidroxilos y aminos, los cuales pueden ser usados como sitios de anclaje para la unión covalente o iónica de una gran variedad de moléculas orgánicas, que le conferirán al revestimiento, propiedades específicas de aplicación (antifúngico, antimicrobiano, etc).

Las películas obtenidas fueron caracterizadas por espectroscopia ATR en donde se observó la formación de una cadena injertada del polímero sintético entre las cadenas del quitosano. Las películas polimerizadas con HEMA (CH-g-HEMA 1:1) presentaron un comportamiento flexible, ya que soportan mayores valores de esfuerzos de tracción ante la mínima deformación y durante tiempos más prolongados comparadas con las películas de quitosano [17].

Habiéndose comprobado que el CH-g-HEMA 1:1 cumple con los objetivos de mejorar las propiedades mecánicas del CH [17], se consideró necesario analizar la degradación en suelo de la película CH-g-HEMA 1:1, con el objetivo verificar si el material pese a las reacciones de injerto conservaba su biodegradabilidad intrínseca, lo cual permitiría su potencial aplicación en la industria del envase ecológico.

Sobre la base de la pérdida de peso, se ha encontrado que las películas de quitosano (CH) degradan más rápido que el celofán expuesto a las mismas condiciones medioambientales [18]. Laham y col. [19] trabajaron con películas de quitina-polietileno y quitosano-polietileno con 90% de polietileno y encontraron una sustancial pérdida de peso del quitosano (73%) y quitina (85%) luego de 6 meses de enterrados en suelo. También se ha demostrado que el quitosano es degradado por la quitosanasas producida por microbios generados como *Streptomices*, *Aspergillius* y *Penicillium*, los cuales pueden hallarse en varios ecosistemas [18].

Esto fue observado también en otros casos [18, 20]. Estos autores indicaron que las películas injertadas de quitosano-poli(metacrilato de metilo) presentaron una menor biodegradabilidad que las de quitosano. Yamamoto y col. [21] encontraron que cuando el quitosano fue entrecruzado con glutaraldehído la biodegradación por *P. caseicolum* fue más lenta.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos y equipos. Los materiales y drogas utilizados fueron: hidróxido de sodio (NaOH, Merck); quitosano (CH, Aldrich, con 15,5% grado de acetilación, FW: 345.000 g·mol⁻¹ peso bajo (LW)); ácido clorhídrico (HCl, Merck), 2-metacrilato de hidroxietilo (HEMA, Sigma). Todos los reactivos fueron usados sin previa purificación.

Reacciones de injerto. Se solubilizaron 0,90 g de quitosano (CH) de bajo peso molecular (LW) en una solución de ácido acético (AcOH 2% m/v) para obtener una solución 2% m/v, la misma fue llevada a pH 4,5 con buffer fosfato (pH 7,4). Se agregaron, gota a gota, 2 mL del iniciador persulfato de amonio (PSA 7,4 mM). Esta mezcla fue agitada, para posteriormente

agregar, gota a gota, la cantidad necesaria de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) para obtener la mezcla en relaciones molares de quitosano:polímero sintético 1:1.

Se homogeneizó por agitación la mezcla. Se burbujeó N₂ durante 10 minutos y la mezcla fue llevada a baño termostático durante 3 horas, a 65°C. Se dejó enfriar, luego se precipitó con NH₄OH al 5% y se lavó abundantemente con agua hasta pH neutro y con etanol para eliminar los restos de homopolímero formado. Se dejó secar el sólido obtenido hasta peso constante, se obtuvieron las muestras CH-g-HEMA 1:1 (quitosano- HEMA).

Preparación de las películas

Películas de quitosano (blancos, CH). Se solubilizó CH en AcOH (2% m/v) para obtener una solución 1% m/v, la cual fue centrifugada para remover impurezas y colocada en una caja de Petri. Posteriormente se llevó a estufa a 30°C por 24 horas. Las películas obtenidas fueron mantenidas a temperatura ambiente (20°C, 30% HR) hasta su utilización.

Películas de quitosano:HEMA 1:1 (CH-g-HEMA 1:1). Las muestras CH-g-HEMA 1:1 fueron solubilizadas en AcOH (2% m/v) hasta obtener una solución transparente. Luego se continúa con el mismo procedimiento que con los blancos.

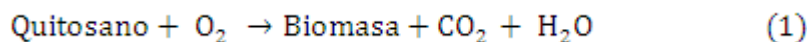
Medida de la producción de dióxido de carbono. El test de biodegradabilidad por compostaje a escala laboratorio fue llevado a cabo bajo la base de ISO 14855 (1999): “*Determination of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of plastic under controlled composting conditions: Method by analysis of evolved carbon dioxide*”.

En este test, compost maduro fue usado como inóculo, el cual fue obtenido de la fracción orgánica de suelo de jardín, el cual fue incubado bajo las condiciones óptimas de oxígeno, 25°C, 60% de humedad y pH 6,92.

Se trabajó con tres reactores de ensayo en paralelo, se realizaron por triplicado los ensayos en cada reactor. Uno de los reactores de ensayo era el blanco, que contenía sólo suelo de jardín. En los reactores de prueba, la película fue enterrada en el suelo de jardín a no más de 2 cm de profundidad.

Los experimentos fueron realizados con dos tipos de residuos municipales: el suelo de jardín fue primeramente usado y en los ensayos posteriores se utilizaron los residuos anteriores, que ya habían sido enriquecidos con la bacteria de degradación de las películas biocompuestas estudiadas.

La biodegradabilidad de las películas se determinó midiendo la cantidad de CO₂ producido cada dos días y referido los resultados a la cantidad teórica máxima de producción de CO₂ (ecuación 1) sobre la base del peso teórico del material de investigación. Los valores obtenidos de producción de CO₂ fueron graficados en función del tiempo para analizar comparativamente el proceso de biodegradación.



El CO₂ liberado del sistema fue fijado en NaOH y el carbonato formado fue titulado con HCl.

La reacción de producción de CO₂ fue seguida por una reacción de dos etapas [22]. Para determinar la cantidad de CO₂ producido, la solución alcalina fue titulada con HCl 0,085 N con dos puntos finales seguidos por dos indicadores: fenolftaleína y heliantina.

La cantidad de CO₂ producido por la biodegradación fue calculado con la siguiente fórmula:

$$m_{CO_2} (g) = 2V_2 \cdot C_{HCl} \cdot \frac{44}{2.000} \cdot \frac{2,0mL}{0,5mL} \quad (2)$$

en la cual V₂ es el volumen de ácido gastado en la valoración, usando heliantina como indicador, C_{HCl} la concentración de la solución estándar de HCl y 44 es la masa molar del CO₂

El porcentaje de biodegradación fue calculado de acuerdo a la ecuación

$$\% \text{ biodegradacion} = \frac{(CO_2)_T - (CO_2)_B}{CO_{2teor}} \cdot 100 \quad (3)$$

donde (CO₂)_T (g) es la cantidad de CO₂ liberado acumulado por cada muestra, (CO₂)_B (g) es la cantidad de CO₂ acumulado por el experimento en blanco y (CO₂)_{teor} es la cantidad teórica de CO₂ producido por la película.

Biodegradación en suelo. El experimento de biodegradación en suelo se realizó colocando muestras de las películas de CH y CH-g-HEMA 1:1 en bandejas de poliestireno de 15·10·2 cm que contenían suelo de jardín húmedo (30% de humedad). El suelo utilizado en las experiencias no fue enriquecido con ninguna bacteria, se utilizó suelo común de jardín. Se utilizaron 10 muestras por triplicado de cada serie cortando discos de 4,5 cm de diámetro de las películas. Se calculó el porcentaje de pérdida de peso de las muestras (W_p, ecuación 4), pesándolas previo al ser enterradas en las bandejas y al ser sacadas. Se prepararon muestras de películas de quitosano con fines comparativos.

Una vez extraídas las muestras fue necesario limpiarlas con un cepillo suave antes de pesarlas. Las bandejas conteniendo las muestras de películas y suelo de jardín fueron humedecidas un 30% de su peso una vez por semana

$$W_p = \left(\frac{W_t - W_o}{W_o} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

siendo W_t el peso de las membranas a tiempo t y W_o el peso inicial de las membranas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis. Los grupos amino C-2 reactivos en el quitosano reaccionan fácilmente en la copolimerización vía radicales libres. Por lo tanto, están implicados en la formación macrorradical. Sin embargo, proponemos que la formación del poli(HEMA) injertado en las cadenas del quitosano tuvo lugar a través del grupo NH_2 con formación parcial de una red interpenetrada y un reticulado entre las diferentes cadenas. La Figura 1 muestra el esquema de la formación de la red [17].

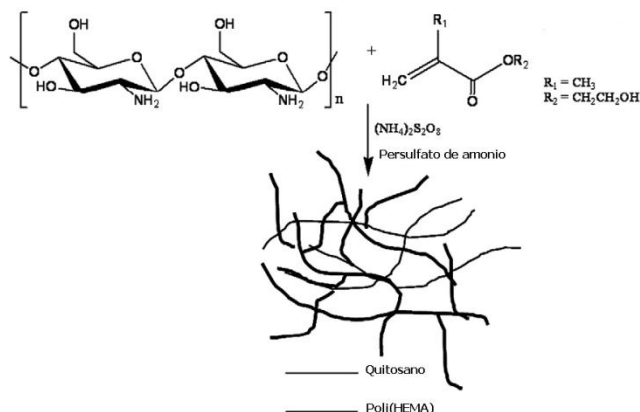


Figura 1: Esquema de quitosano injertado con HEMA

Medida de la producción de dióxido de carbono. En las Figuras 2 y 3 se muestran los mg CO_2 desprendido por kilogramo de suelo y el porcentaje de biodegradación en las membranas CH y CH-g-HEMA 1:1, respectivamente, en función de los días de exposición al medio degradativo. Se realizó primero la experiencia 1 y al finalizar dicha experiencia se retiraron las películas y en el mismo medio, se comenzó con la experiencia 2. Se denominó CH1 y CH2 a las muestras de películas quitosano de bajo peso molecular (LW) y CH-g-HEMA1 y CH-g-HEMA2 a las muestras de películas de quitosano:HEMA 1:1 usadas en las experiencias 1 y 2, respectivamente.

En la Figura 2 puede observarse dos fases o etapas en las curvas de biodegradación de las películas, la cual pueden definirse como la fase de biodegradación (parte lineal de la curva) y el *plateau*. En la fase de biodegradación la curva de casi todas las películas presentaron una gran pendiente y se observó en general en los primeros 10 días de la experiencia; luego el proceso degradativo se tornaría más lento produciéndose un *plateau* en la producción de CO_2 . También se observa en la Figura 2 que las películas de quitosano presentaron una mayor producción de CO_2 a lo largo de los días comparadas con las de CH-g-HEMA 1:1.

Dado que la muestra CH2 fue colocada para el ensayo de biodegradación en el mismo suelo en donde previamente se había realizado la experiencia de biodegradación con la muestra CH1, se podría suponer que el suelo en el cual colocamos la muestra CH2 estaría enriquecido con las

bacterias que habían degradado a la muestra CH1. Esta situación podría ayudar a explicar el hecho de que el gráfico de la producción de CO₂ en función del tiempo para la muestra CH2 presentó un aumento prácticamente lineal. Además, en sólo 20 días, la muestra se degradó en un porcentaje mayor que la muestra CH1.

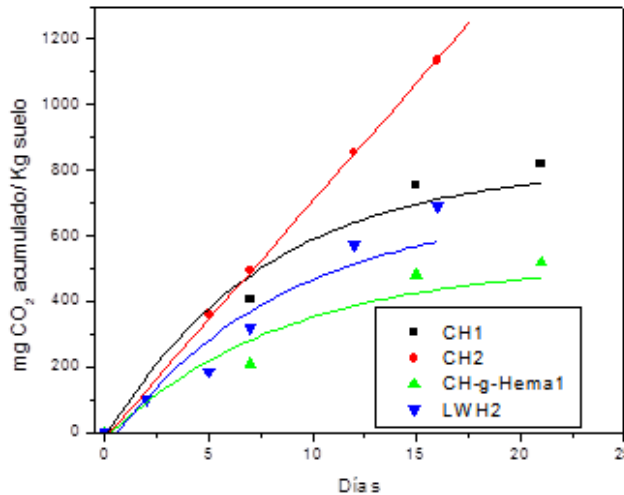


Figura 2. Gráfico que muestra los mg CO₂ desprendidos en función del tiempo para las películas de quitosano (CH) y de quitosano:HEMA (CH-g-HEMA 1:1).

Analizando la Figura 3 puede verse que el porcentaje de biodegradación aumenta rápidamente llegando la película CH2 a cerca de 85% luego de 20 días de exposición al medio degradativo y se torna más lento para las películas CH-g-HEMA, obteniéndose aproximadamente 45% para el mismo tiempo.

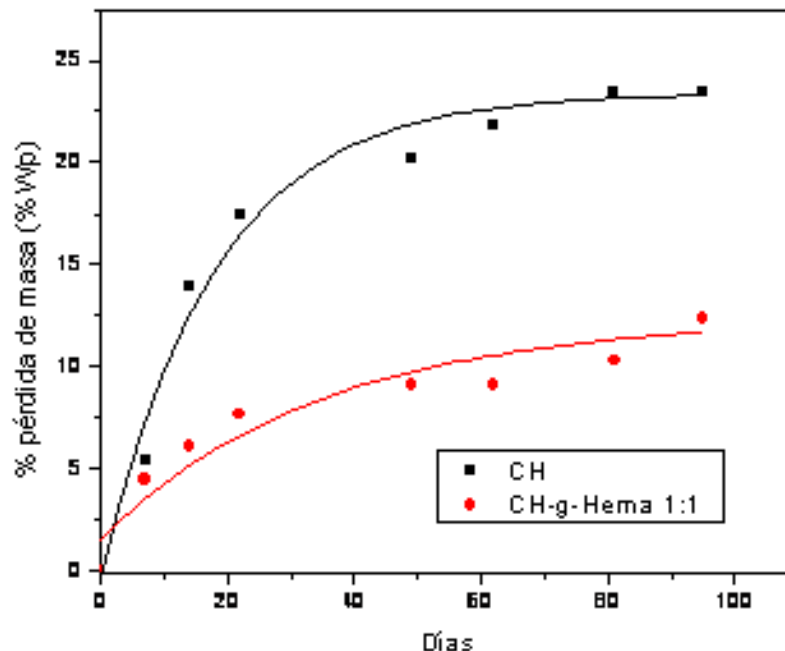


Figura 3. Gráfico que muestra el porcentaje de pérdida de peso en función del tiempo para las películas CH y CH-g-HEMA 1:1.

Biodegradación en suelo. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos del porcentaje de pérdida de masa (% W_p) calculados de acuerdo a la ecuación (3). En la figura se puede observar que se ha representado los valores para una muestra de película de quitosano (CH) y de quitosano:HEMA 1:1 (CH-g-HEMA 1:1). Las muestras se extrajeron cada dos días y se limpiaron cuidadosamente antes de pesarlas tratando de eliminar todo resto de suelo de las mismas.

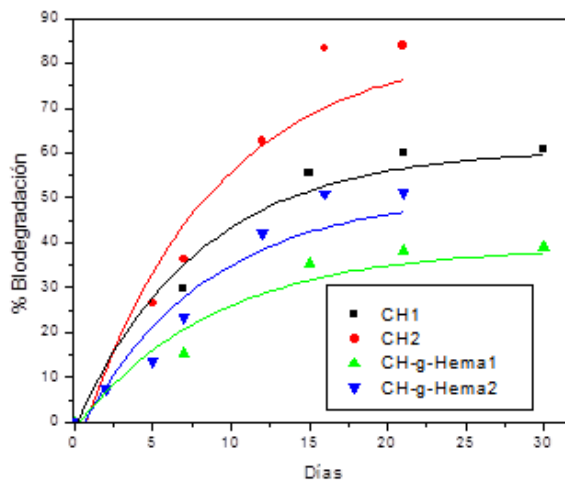


Figura 4. Gráfico que muestra el porcentaje de biodegradación en función del tiempo para las películas de quitosano (CH) y de quitosano:HEMA (CH-g-HEMA 1:1).

En algunas películas este proceso se dificultó porque el suelo se había adherido por zonas a las mismas. Por esta razón la determinación gravimétrica de la pérdida de masa no es el método más recomendado para evaluar cuantitativamente la degradación en suelo. Este problema fue más significativo en las últimas etapas del proceso porque las películas se tornaron muy finas y quebradizas [23] (Figura 6). Sin embargo, este análisis permitirá evaluar cualitativamente el proceso degradativo de las películas y la influencia que pueda presentar en las mismas el injerto con HEMA.

Por trabajos publicados anteriormente [24, 25] se puede atribuir la reducción en el porcentaje de pérdida de masa en las películas CH-g-HEMA a factores como la inhibición de la acción de la enzima por los productos acumulados, inactivación parcial enzimática o disminución de la accesibilidad de la enzima como la proporción de zonas cristalinas en el sustrato residual. También podría ser atribuida a una proporción creciente de la parte sintética a medida que se degrada el quitosano. Probablemente, el hecho de que la biodegradación sólo afecta a las cadenas de CH conduce a un debilitamiento mecánico de la integridad de la red.

Del análisis de la Figura 4, podemos ver que tanto la película de CH como la CH-g-HEMA 1:1 fueron biodegradadas cuando se expusieron al suelo (medio degradativo). El porcentaje de pérdida de masa fue mayor para la película de quitosano.

El proceso degradativo fue lento, podría ser debido al hecho de que la humedad del suelo no se mantuvo constante sino que se realizó la experiencia en condiciones parecidas al clima presente en la región patagónica (humedad relativa del suelo: 30%). De lo anterior se podría considerar que un factor importante en el proceso degradativo, es la humedad del suelo.

Cambio de las propiedades aparentes de las películas con el tiempo de degradación. Las Figuras 5 y 6 (fotos) muestran las películas de CH y CH-g-HEMA 1:1 antes de enterrarlas y luego de extraerlas del suelo después de 20, 40, y 150 días de permanecer enterradas.

En términos generales se observa que las películas CH y CH-g-HEMA 1:1 que originalmente eran transparentes y gruesas, se tornaron más brillantes y con un ligero tono marrón luego de estar enterradas en el suelo. También se pudo observar que las muestras perdieron su forma inicial, tornándose las películas más finas.

Al igual que en los experimentos previos se observó una mayor velocidad de degradación en las películas CH que en las CH-g-HEMA 1:1, lo cual puede asociarse a la presencia del polímero sintético que dificulta el ataque de los microorganismos en los primeros estadios de los procesos de degradación.

Se puede observar en la Figura 5 (b, c y d) que sobre las películas de quitosano se observa el crecimiento de microorganismos. Este resultado indicaría la acción de múltiples enzimas microbianas sobre la película de quitosano que conducirían a una endo-escisión (Figura 5c y 5d) de este polímero natural [20].

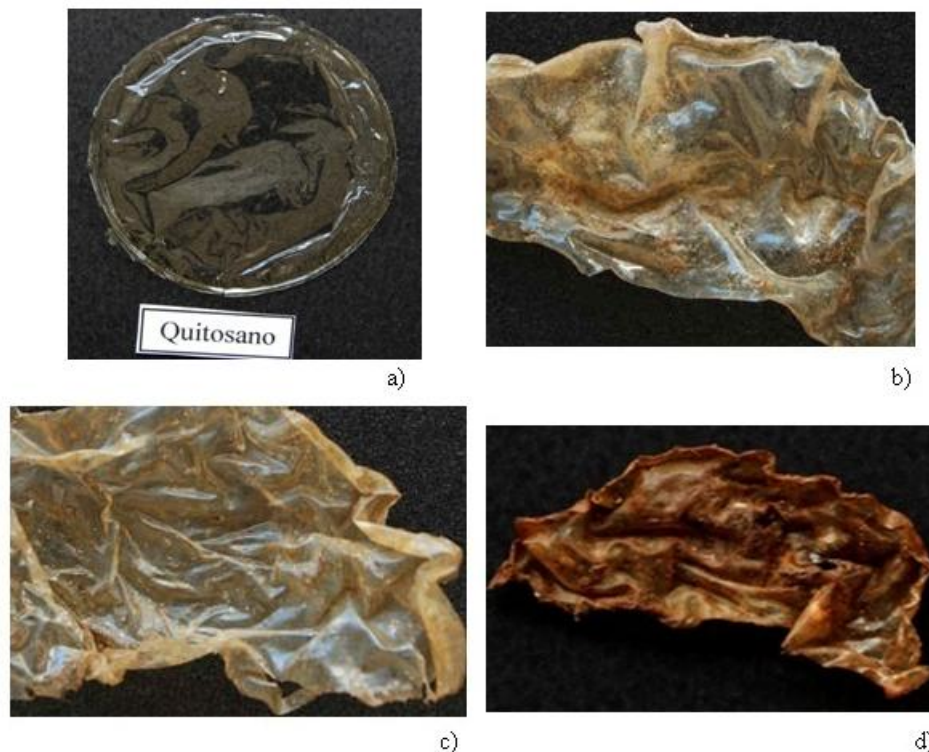


Figura 5. Imagen que muestra las películas de quitosano a) recién preparadas b) después de 20 días, c) 40 días y d) 150 días de estar expuestas al medio degradativo.

En trabajos anteriores se ha observado que en una película compuesta que contiene un alto contenido de glicerol y está totalmente hinchada, su cadena de polímero red sería tan floja que las enzimas invadirían fácilmente la película. Con respecto al efecto de la temperatura, se supone que un aumento en el número de puntos de extrapolación en la cadena del polímero impide el ataque de las enzimas. Esta es la misma situación que en el caso de carbonilo – y carboxilo – rica celulosa homogeneizada. Películas compuestas hechas de celulosa de alto contenido de carbonilo y carboxilo debe poseer gran cantidad de enlaces químicos, es decir, puntos de puente en las cadenas del polímero. Aunque el aumento de grupos carbonilo y carboxilo contenido de celulosa disminuyeron la resistencia de la película (como se ha mencionado en el apartado anterior), esto prolonga el período de biodegradación. Este hecho muestra que el cierre de puntos de enlaces químicos específicos se forman en la película, y que tales puentes impedirían un ataque por bacterias o enzimas sobre la película [26, 27].

La quitosanasa, la cual cataliza un tipo de endo–escisión de quitosano y sus derivados, es producida por un gran número de microorganismos, incluyendo bacterias [28, 29].

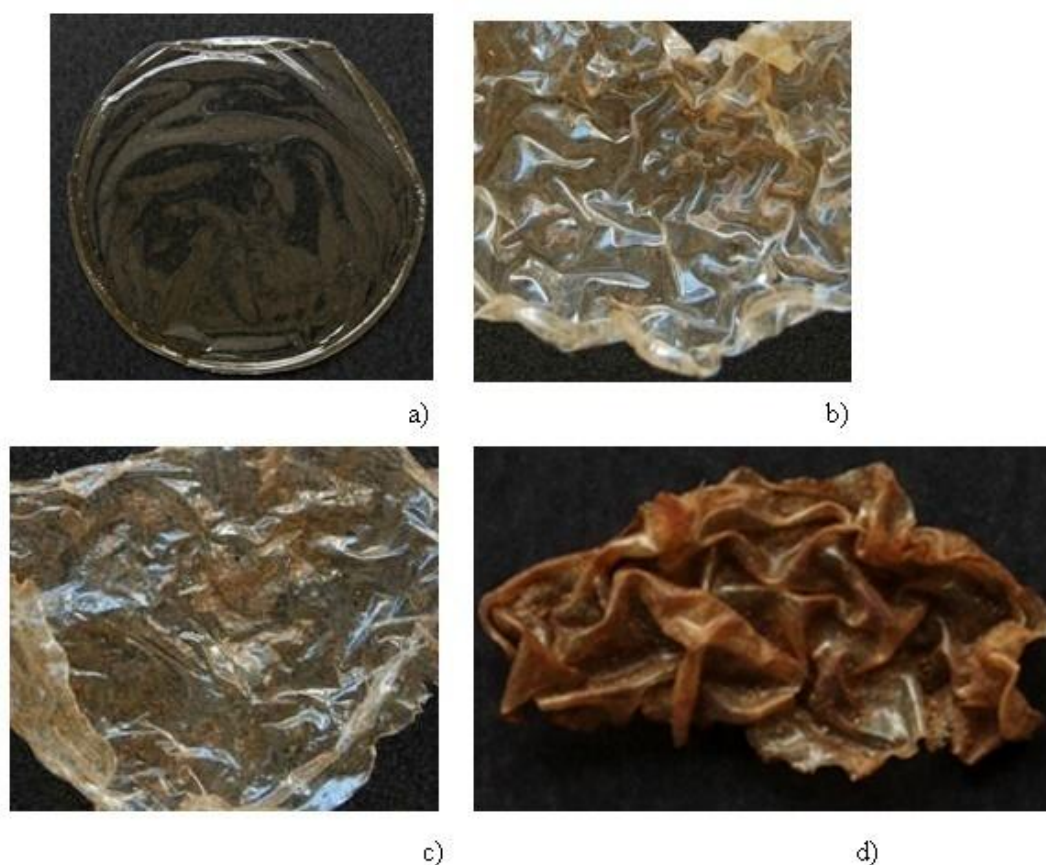


Figura 6. Imagen de las películas quitosano: HEMA (CH–g–HEMA 1:1) a) recién preparadas, b) después de 20 días, c) 40 días, y d) 150 días expuestas al medio degradativo.

En muchos casos, la quitosanasa bacteriana es inducida por el sustrato quitosano y juega un

papel importante en su degradación. En contraste, hay muy pocos trabajos [30] para quitosana fúngica y su papel fisiológico permanece poco claro. Zhang y col [30] lo explicaron considerando que la quitosana fúngica desempeñaría un papel en el proceso de división celular o autólisis a través de la degradación de la parte desacetilada de la quitina en la pared celular del hongo.

En la Figura 6 se muestra el proceso degradativo para las películas CH-g-HEMA 1:1. No se observó la endo-escisión que presentaron las películas de CH, pero si una ligera aparición de microorganismos sobre la misma.

CONCLUSIONES

Se analizó la biodegradación de las películas de CH y CH-g-HEMA 1:1. Se encontró que la película CH-g-HEMA presentó una menor degradación comparada con la de CH. Con las películas de CH se obtuvo un porcentaje de biodegradación de 85% en 20 días, y con las de CH-g-HEMA este valor se modificó a 45%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que la presencia del polímero sintético hizo más lenta la velocidad de biodegradación del nuevo material, ya que el agregado de este polímero dificulta o retarda el ataque microbiano a las películas. La biodegradación del quitosano produce el debilitamiento mecánico de la matriz injertada facilitando en una segunda etapa la ruptura de los enlaces de la cadena de poliHEMA a través de procesos de oxidación e hidrólisis.

La presencia de cadenas de poliHEMA injertadas en el quitosano, mejoran notablemente las propiedades mecánicas de las películas y por ende, potencian sus aplicaciones como envases, asegurando la degradación del material biocompuesto.

Una disminución de la velocidad de degradación aumentaría el tiempo de uso del envase, mientras que por otro lado, aseguraría su biodegradación en el momento de que los mismos sean descartados.

Agradecimientos. Agradecemos a la Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable del Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación por el subsidio otorgado al proyecto PNUD ARG 02/018

BIBLIOGRAFÍA

1. Gross R, Bhanu K “Biodegradable Polymers for the environment”, *Science* **297**, 803 (2002)
2. Zhao JH, Wang XQ, Zeng J, Yang G, Shi FH, Yan Q “Biodegradation of poly(butylene succinate) in compost”, *J. Appl. Polym Sci.*, **97**, 2273 (2005)
3. Casimiro M, Botelho M, Leal J, Gil M “Study on chemical, UV and gamma radiation-induced grafting of HEMA onto chitosan”, *Radiation Physics and Chemistry*, **72**, 731 (2005)
4. Dos Santos KS, Coelho JF, Ferreira P, Pinto I, Lorenzetti S, Ferreira E, Higa O, Gil M “Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan”, *Int. J. Pharm.*, **310**, 37 (2006)
5. Huang M, Jin X, Li Y, Fang Y “Syntheses and characterization of novel pHsensitive graft copolymers

- of maleoylchitosan and poly(acrylic acid)", *Reactive and Functional Polymers*, **66** (10), 1041 (2006)
6. Sánchez A, Sibaja M, Vega-Baudrit J, Rojas M "Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino (pleuroncodes planipes) para el crecimiento in vitro de fibroblastos humanos", *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **8** (5), 347 (2007)
 7. Sashiwa H, Aiba S "Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials", *Progress in Polymer Science*, **29**, 887 (2004)
 8. Trong-Ming D, Chia-Fong K, Wen-Yen C, Ching-An P "Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility", *Carbohydrate Polymers*, **63**, 331 (2006)
 9. Bakhshi H, Zohuriaan-Mehr MJ, Bouhendi H, Kabiri K. Spectral and chemical determination of copolymer composition of poly(butyl acrylate-coglycidyl methacrylate) from emulsion polymerization", *Polymer Testing* **28** (7), 730 (2009)
 10. Dergunov S, Nam I, Maimakov T, Nurkeeva Z, Shaikhutdinov E, Mun G "Study on radiation-induced grafting of hydrophilic monomers onto chitosan", *J. Appl. Polym. Sci.*, **110** (1), 558 (2008)
 11. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN "Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers", *Carbohydrate Polymers*, **54**, 343 (2003)
 12. Huang Y, Yu H, Xiao C "pH-sensitive cationic guar gum/poly(acrylic acid) polyelectrolyte hydrogels: swelling and in vitro drug release", *Carbohydrate Polymers*, **69** (4), 774 (2007)
 13. Jalal Zohuriaan-Mehr M "Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review", *Iranian Polymer J.*, **14** (3), 235 (2005)
 14. Liu Y, Zhang R, Zhang J, Zhou W, Li S "Graft copolymerization of sodium acrylate onto chitosan via redox polymerization", *Iranian Polymer J.*, **15** (12), 935 (2006)
 15. Lv, P., Bin, Y., Li, Y., Chen, R., Wang, X., Zhao, B. Studies on graft copolymerization of chitosan with acrylonitrile by the redox system. *Polymer* **50** (24), 5675-5680 (2009)
 16. Zhou, C., Wu, Q., A novel polyacrylamide nanocomposite hydrogel reinforced with natural chitosan nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84** (1), 155-162 (2011)
 17. Ávila A, Bierbrauer K, Pucci G, López-González M, Strumia M "Study of optimization on the synthesis and properties of biocomposite films based on grafted chitosan", *J. Food Engineering* **109**, 752 (2012).
 18. Xu J, McCarthy P, Gross R "Chitosan film acylation and effects on biodegradability", *Macromolecules* **29**, 3436 (1996).
 19. Laham M, Lee I, *J. Environ. Polym. Deg.*, **3**(1), 31 (1995)
 20. Harish Prashanth KV, Lakshman K, Shamala TR, Tharanathan RN "Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films," *International Biodeterioration & Biodegradation* **56**, 115 (2005)
 21. Yamamoto, H., Amaike, M., Biodegradation of cross-linked chitosan gels by a microorganism, *Macromolecules* **30**, 3936-3937 (1997).
 22. Kale, G., Auras, R., Singh, S.P., Narayan, R., Biodegradability of polylactide bottles in real and simulated composting conditions. *Polym Test* **26**, 1049-1061 (2007).
 23. Di Franco, C.R., Cyras, V.P., Busalmen, J.P., Ruseckaitea, R.A., Vásquez, A., Degradation of polycaprolactone/Storch blends and composites with sisal fibre. *Polym Deg Stabil* **86**, 95-103 (2004).
 24. Devries R, Visser J "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, 497 (2001)
 25. Coma V, Couturier Y, Pascat B, Bureace G, Curq JL, Gilbert S "Estimation of the biofragmentability of packaging material by an enzymatic method", *Enzyme Microbial Technology*, **17**, 524 (1995)
 26. Gällstedt, M., Hedenqvist, M. S., Packaging-related mechanical and barrier properties of pulp-fiber-chitosan sheets *Carbohydrate Polymers* **63** (1), 46-53 (2006)
 27. Caner C, Vergano PJ, Wiles JL "Chitosan Film Mechanical and Permeation Properties as Affected by Acid, Plasticizer and Storage", *J. Food Sci.*, **63** (6), 1049 (2006)
 28. Fukamizo T, Ohkawa T, Ikeda S, Goto S "Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1205**, 183 (1994)
 29. Cheng CY, Li YK "An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides", *Biotechnology and Applied Biochemistry* **32**, 197 (2000)
 30. Zhang XY, Dai AL, Zhang XK, Kuroiwa K, Kodaira R, Shimosaka M, Okazaki M "Purification and characterization of chitosanase and exo- β -D-glucosaminidase from *Koji* mold *Aspergillus oryzae* IAM 2660", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **64**, 1896 (2000)