

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO Y PELÍCULAS QUITOSANO-GLICEROL

Castelló María Emilia* ^a, Amalvy Javier I. ^b, Anbinder Pablo S. ^c, Peruzzo Pablo J. ^b

^a UIDET Ingeniería Aplicada en Mecánica y Electromecánica (IAME), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, 48 y 117, La Plata, Buenos Aires, Argentina

^b Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CONICET, Diagonal 113 y 64, La Plata, Buenos Aires, Argentina

^c Instituto de Física de Materiales Tandil – IFIMAT (UNCPBA) y CIFICEN (UNCPBA-CICPBA-CONICET), Pinto 399, Tandil, Buenos Aires, Argentina

*emilia.castello@ing.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El campo de los materiales poliméricos ha crecido considerablemente en los últimos treinta años debido a un aumento significativo en el consumo. Este sector ha sido afectado por la crisis mundial del petróleo, porque los hidrocarburos derivados de esta industria se han vuelto escasos y, con ellos, las materias primas para la producción de polímeros tradicionales. Por lo tanto, ha habido propuestas con respecto al futuro de las materias primas y sus fuentes para continuar con la producción de polímeros generando un creciente interés en los polímeros derivados de fuentes renovables. Teniendo esto en cuenta, se han propuesto compuestos naturales como materia prima para la preparación de materiales poliméricos, como carbohidratos (almidón o celulosa), o el uso de aceites naturales^{1,2}. La producción de polímeros a partir de recursos renovables alternativos contribuye a resolver algunas de las preocupaciones causadas por el agotamiento de los recursos petroquímicos convencionales y se suma a las áreas que buscan reducir el impacto ambiental y están utilizando procedimientos de producción verde^{3,4}. Dentro de los biopolímeros que combinan ambas características, se encuentran la quitina y el quitosano (Q).

Por su amplia distribución en la naturaleza la quitina ($\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa), después de la celulosa, es el segundo polisacárido en abundancia. A pesar de que la quitina está ampliamente distribuida en la naturaleza (hongos, algas, moluscos crustáceos, insectos, etc.), los exoesqueletos de diversos tipos de crustáceos acuáticos (camarones, langostas, cangrejos y krill) son las fuentes más accesibles de quitina por ser materiales de desecho de plantas procesadoras de la industria pesquera. Así, el aprovechamiento de estos desechos constituye una oportunidad de desarrollo industrial, y a la vez, una solución inteligente para el problema ambiental que los mismos generan. Sin embargo, la quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido, lo cual dificulta su empleo en muchas de las aplicaciones prácticas. La desacetilación de la quitina conduce a un material totalmente soluble en medio ácido, denominado quitosano ($\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa) cuyas propiedades dependen de las condiciones de reacción. La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del Q uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para diversas aplicaciones. Sin embargo, como otros biopolímeros, los materiales en base a Q presentan propiedades mecánicas inadecuadas, baja resistencia térmica y altas permeabilidades al vapor de agua (WVP), lo que ha limitado su empleo⁴.

Para modificar esto, varios aditivos pueden ser incorporados dentro de las películas de Q. Uno de los más comúnmente empleados son los plastificantes, en particular el glicerol (G), los que se utilizan con el fin de disminuir la atracción intermolecular entre cadenas poliméricas aumentando la flexibilidad de la película y favoreciendo su maleabilidad⁵. Diversos trabajos en la literatura han abordado el estudio de sistemas Quitosano-Glicerol⁶⁻⁸ (Q-G). De ellos se desprende que las propiedades de estas películas dependen tanto del Q empleado (origen de la materia prima, peso molecular (PM)) como de la metodología empleada para la preparación de las películas^{6,9}. En este sentido, otros factores importantes son el ácido utilizado para la

preparación de las soluciones de Q, y la aplicación de una etapa de neutralización durante la remoción de las películas. Recientemente, se ha demostrado los efectos del tratamiento de neutralización sobre las propiedades de las películas de nanocompuestos basadas en Q, en particular sobre las propiedades mecánicas¹⁰. En general, este efecto no se tiene en cuenta en la mayoría de los trabajos donde las propiedades de las películas basadas en Q podrían verse afectadas (comportamiento mecánico y WVP). Esto puede explicar en parte las diferencias encontradas en la literatura para la variación de las propiedades y composiciones óptimas reportadas para estos sistemas. Dado que los procesos empleados en la producción de Q y de películas de Q-G afectan las propiedades de ambos materiales, en este trabajo se presenta tanto el estudio del procedimiento de obtención de Q a partir de residuos de langostino patagónico, como la morfología y las propiedades de las películas de Q plastificado con G empleando una etapa de neutralización durante el desmolde de las mismas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

En este trabajo se emplearon caparazones de langostino patagónico (*Pleoticus muelleri*) provenientes de los desechos de una pescadería comercial. El hidróxido de sodio (NaOH, Anedra, Argentina), el ácido acético (CH₃COOH, Anedra, Argentina), el ácido clorhídrico (HCl, Cicarelli, Argentina) y el glicerol (CH₂OHCHOHCH₂OH, Anedra, Argentina) empleados fueron todos de calidad analítica. Los Q comerciales empleados fueron un quitosano provisto por Parafarm, Argentina (QP, M_v: 273kDa – GD: 95,2%) y un quitosano provisto por Sigma-Aldrich, U.S.A. (QSA, M_v: 350 - GD: 70,9%).

Obtención de quitosano

Aislamiento de quitina

Los caparazones de langostino patagónico provenientes de la pescadería comercial fueron acondicionados mediante su limpieza manual en agua corriente para eliminar los restos de tejido del animal, y posteriormente fueron lavados con agua destilada, secados a temperatura ambiente (T_{amb}) durante 48 horas y por último a 60°C durante 24 horas. Sobre los caparazones finamente divididos se adicionó una solución de HCl 0,25M hasta llegar a una relación masa (g):volumen (ml)=1:40, y la mezcla se agitó durante 3 horas a T_{amb} con el objeto de llevar adelante su desmineralización. Posteriormente, la dispersión se filtró por succión y el sólido obtenido se lavó con agua destilada hasta verificar pH neutro en el agua de lavado. El sólido obtenido se dejó secar a 60°C durante 24 horas. El producto de la desmineralización fue sometido a un proceso de desproteínización, por tratamiento con una solución acuosa de NaOH 1M en una relación masa (g): volumen (ml) de 1:15 durante 24 horas con agitación magnética constante a una temperatura de 50°C¹¹. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la dispersión se filtró por succión y el sólido remanente se lavó con agua destilada hasta verificar pH neutro del agua de lavado y se secó a 60°C hasta peso constante. El producto obtenido en esta etapa es la quitina.

Desacetilación de quitina

La quitina obtenida del proceso anterior fue tratada con solución de NaOH al 50%_{p/v} en una relación masa (g): volumen (ml) = 1:50 a diferentes temperaturas y tiempos de reacción T(°C)-t(d): 65-1, 100-1, 65-3, 90-3, 100-3 y 120-3. Los productos obtenidos fueron aislados mediante filtración por succión seguida de sucesivos lavados con agua destilada hasta neutralidad del agua de lavado. Para determinar si los productos obtenidos correspondían a Q, se evaluó cualitativamente si los mismos se disolvían en una solución de ácido acético al 1%_{v/v}.

Preparación de las películas

Se obtuvieron películas a partir de los Q obtenidos y los Q comerciales. En todos los casos, se preparó una solución de Q al 2%_{p/v} en solución acuosa de ácido acético al 1%_{v/v}. Para la obtención de las películas, a 25ml de la solución anterior se adicionaron 10ml de solución acuosa de ácido acético al 1%_{v/v}. La solución obtenida fue desgasada para eliminar

burbujas (baño de ultrasonido, 15 minutos, T_{amb}) y se castearon sobre una cápsula de Petri de vidrio de 10cm de diámetro. Las cápsulas se mantuvieron durante 2 horas a T_{amb} y posteriormente se colocaron en estufa a 60°C durante 24 horas. Las películas secas fueron removidas de la cápsula de vidrio mediante su tratamiento con solución acuosa de NaOH 1M (10ml), durante 2 horas. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se las colocó extendidas sobre una superficie de Teflón® a T_{amb} para su secado. En el caso de las películas conteniendo G, se utilizó el procedimiento indicado anteriormente, pero adicionando 10ml de solución acuosa de ácido acético al 1% v/v conteniendo la cantidad adecuada de G para preparar películas conteniendo 5, 10 y 20% p/p del aditivo.

Caracterización

Para la determinación de humedad, una masa de caparazones limpios (m_h) se colocó en estufa a 105°C durante 24 horas. Al retirarlos se los colocó en un desecador en presencia de pentóxido de fósforo hasta alcanzar T_{amb} , y se pesaron nuevamente (m_s). La humedad porcentual se calculó como: $H(\%) = \frac{m_h - m_s}{m_h} \times 100$ (1)

En el caso del contenido de cenizas, una masa (m_o) de caparazones molidos y secos (105°C, 24 horas) y se colocó en un en un crisol de porcelana previamente tarado. La cápsula se introdujo en una mufla (550-600°C, 12 horas). Posteriormente se dejó enfriar en un desecador hasta T_{amb} y se determinó su masa nuevamente (m_c). El contenido de cenizas se determinó como: $cenizas(\%) = \frac{m_c}{m_o} \times 100$ (2)

El PM se determinó mediante viscosimetría, mediante la determinación del tiempo de escurrimiento a 25°C de soluciones diluidas de Q en solución acuosa de ácido acético 0,1M / NaCl 0,2M. A partir de los datos obtenidos se determinó la viscosidad intrínseca para cada polímero y posteriormente, en base a la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada se determinaron los PM de los Q empleando como constantes $a=0,93$ y $k=1,81 \times 10^{-3}$, reportados por otros autores para el intervalo de grado de desacetilación correspondiente al de la muestra analizada^{12,13}. Los espectros FTIR (equipo Nicolet 380) de caparazones, quitina y Q fueron adquiridos en el modo de transmisión empleando pastillas de KBr. Los espectros de las películas de Q y Q-G se adquirieron en el modo de ATR (accesorio de monoreflexión, cristal de ZnSe). En ambos casos, se adquirieron 64 barridos, con una resolución de 4 cm^{-1} . El grado de desacetilación (DD%) de los Q obtenidos se determinó mediante espectroscopia FTIR, según el método descrito por Brugnerotto y col.¹⁴, donde se utiliza la absorbancia de las bandas presentes a 1420 cm^{-1} (deformación angular de CH₂) y 1320 cm^{-1} (estiramiento C-N).

El DD% se determinó como: $DD\% = 100 - \frac{A_{1320} - 0.3822}{A_{1420} \cdot 0.03133}$ (3)

Los espectros UV-Visible de las películas (de aproximadamente 50 μm de espesor) fueron obtenidos en el rango de longitud de onda de 200 a 800nm con un espectrofotómetro Genesys10S (Thermo Scientific). El ángulo de contacto de las películas se determinó utilizando un goniómetro ramé-hart a T_{amb} empleando agua como líquido de prueba (volumen de gota: 10 μl). Las propiedades mecánicas de tracción se determinaron sobre probetas rectangulares siguiendo el método ASTM D638-77a (Tensile Properties of Plastic), a una velocidad de 0,1 mm/s sobre probetas de 25mm de largo por 5 mm de ancho. Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) fueron obtenidas empleando un microscopio FEI – Quanta 200 (Holanda), aplicando un voltaje de aceleración de 15 y 20kV. Se registraron imágenes del corte transversal y de la superficie de las películas con varios aumentos. Las muestras fueron previamente metalizadas con una capa de oro (aprox. 10nm). Para la absorción de agua películas de 20mm de diámetro (masa m_o) se sumergieron en 15ml de agua destilada. Luego de su inmersión, las muestras se retiraron del recipiente, se secaron superficialmente y se pesaron (m_t) antes de ser colocadas nuevamente en agua. Las determinaciones se realizaron periódicamente hasta llegar al valor de equilibrio. El valor de absorción final se tomó a las 24 horas de inmersión. El porcentaje de absorción relativo de agua se calculó en base a la ecuación: $AA\% = \frac{m_t - m_o}{m_o} \times 100$ (4)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de quitosano

De una masa inicial de 495g de residuos de caparazones, se obtuvieron 85g de caparazones secos. Los mismos presentaron un 23,5% de humedad y un contenido de cenizas de 55,5%. Por otra parte, el contenido de fracción mineral removido fue de 55%, lo cual está en acuerdo con el contenido de cenizas determinado anteriormente. Por otra parte, el contenido de material removido durante el proceso de desproteización fue de aproximadamente del orden del 12%, el cual está en acuerdo con lo reportado por diferentes autores para el contenido de material proteico en estos sistemas. Así, es posible afirmar que mediante el procedimiento llevado a cabo en este trabajo se puede obtener un rendimiento de quitina entre el 30-35% a partir de caparazones limpios y secos. Teniendo en cuenta el proceso global (partiendo de material de residuo) estos porcentajes se ven disminuidos drásticamente (aproximadamente a un 8%) debido a la cantidad de material que es necesario remover para obtener la materia prima en condiciones adecuadas.

Los diferentes productos fueron caracterizados mediante espectroscopia FTIR (Figura 1A). Se puede observar como las bandas correspondientes a los carbonatos inorgánicos en la muestra de caparazones, ubicadas a 1420 y 874cm^{-1} (estiramiento antisimétrico del ion CO_3^{2-} fuera del plano y a la deformación angular)¹⁵, se pierden luego de realizar el proceso de desmineralización. La desproteización se evidencia por la disminución de la intensidad de la señal localizada a 1654cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) y a los cambios en las regiones de los estiramientos C-H (entre 2900 y 2860cm^{-1}) y la deformación angular de los grupos CH_2 (720cm^{-1}) presentes en las proteínas.

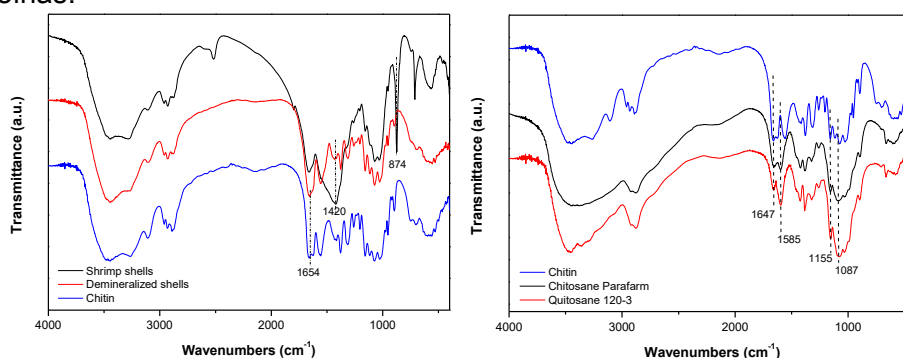


Figura 1. Espectros FTIR de: **A)** caparazones limpios, desmineralizados y desproteinizados (quitina) y **B)** la quitina, QP y Q 120-3

En la Tabla 1 se presentan los PM y DD% de los diferentes Q obtenidos y los comerciales QP y QSA. Se puede observar la influencia del tiempo y la temperatura en el DD%. Se necesitan 3 días y una temperatura mayor a 120°C para llevar a la quitina a un DD% adecuado para que se obtenga como resultado Q totalmente soluble en solución de ácido acético al 1% v/v , ya que a temperaturas menores o menores tiempo de reacción, se obtienen muestras que presentaron una disolución parcial en dicha solución. Se observa que la viscosidad intrínseca de las soluciones del Q obtenido en este trabajo (muestra 120-3) y por ende el PM, es mayor al valor del producto comercial de Parafarm con similar DD%.

Las principales señales observadas para las películas de Q en los espectros FTIR (Figura 1B) fueron 1647cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$; banda Amida I), y 1585cm^{-1} ($\nu\text{C-N}+\delta\text{N-H}$; banda Amida II). En adición, las bandas localizadas en la región $1200\text{-}970\text{cm}^{-1}$ se deben principalmente a los estiramientos C-C y C-O en el anillo piranósico (centrada a 1087cm^{-1}) y al estiramiento C-O-C del enlace glicosídico localizado a 1155cm^{-1} , mientras que la banda ancha ubicada por encima de los 3000cm^{-1} se debe principalmente a la superposición de las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H y N-H (νOH $3500\text{-}3250\text{cm}^{-1}$ y νNH $3400\text{-}3250\text{cm}^{-1}$, respectivamente)^{16,17}. Los espectros FTIR obtenidos indican una mayor similitud entre el Q obtenido en este trabajo con el QP comercial.

Tabla 1. Propiedades de los quitosanos comerciales y obtenidos en este trabajo

Muestra	Disolución Acético 1 % ^{v/v}	Fracción insoluble (%)	DD (%)		PM M _v (kDa)
			Fracción insoluble	Fracción soluble	
Parafarm	si	-	-	95,2	273,3
Sigma-Aldrich	si	-	-	70,9	450,1
65-1	no	100			
100-1	no	100			
65-3	no	100			
90-3	parcial	90	63,9	95,6	nd
100-3	parcial	10	76,0	77,9	549,8*
120-3	si	-	-	94,5	723,5

*fracción soluble; nd: no determinada

Películas quitosano-glicerol

Las películas Q-G obtenidas por moldeo resultaron ser sistemas de alta transparencia con espesores de aproximadamente 60µm. La película de Q puro presenta una alta transmitancia en la región visible del espectro (baja absorbancia), la cual se mantiene con la incorporación de G como plastificante⁶ (Figura 2B). A simple vista no se detectaron imperfecciones en la superficie, y presentaron una textura lisa. Las películas que fueron plastificadas con G exhibieron mayor flexibilidad.

Espectroscopia infrarroja (FTIR) y UV-Visible

Los espectros FTIR del Q, del G y de las muestras preparadas en este trabajo pueden observarse en la Figura 2. Se observó la contribución del G en los espectros en acuerdo con su contenido en las películas, mediante el incremento gradual de la intensidad de la banda νO-H, y en la región de 1000-1100cm⁻¹ debido al νC-O, sin observarse otros cambios significativos. Este resultado confirma la incorporación efectiva del plastificante en las películas. La película de Q puro presenta una alta transmitancia en la región visible del espectro (baja absorbancia), la cual se mantiene con la incorporación de G como plastificante⁶.

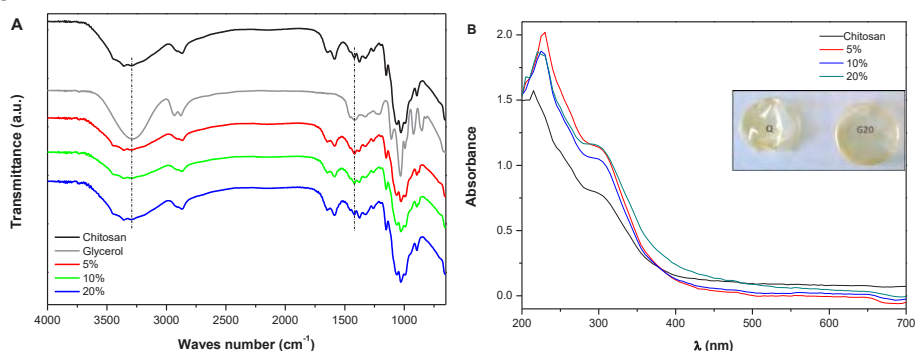


Figura 2. A) Espectros FTIR de Q, G y Q plastificado con 5, 10 y 20% de G. **B)** Espectros UV-visible de Q puro y con 5, 10 y 20%^{p/p} de G. En el gráfico se insertan fotografías de Q y Q plastificado con 20%^{p/p} de G (G20).

Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 3 se puede apreciar que las películas preparadas con 5 y 10%^{p/p} de G presentan una superficie de fractura homogénea, indicando que el agregado de G no afecta significativamente la continuidad de la matriz polimérica. Sin embargo, en la imagen de fractura de la película conteniendo 20%^{p/p} de G se observan dos secciones definidas: una parte superior similar a la superficie de fractura del Q puro, y un frente inferior similar a las superficies de fractura de las películas conteniendo plastificante. Esto sugiere que para contenidos del 20%^{p/p} de G se produce un material segregado en fases. Las imágenes SEM de la superficie mostraron que las mismas son lisas y uniformes, sin grietas ni perforaciones,

en las cuales no se observaron cambios morfológicos después de la incorporación de plastificante⁶.

Propiedades de las películas

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de las películas preparadas en este trabajo. En general, se observó una leve disminución del ángulo de contacto en las películas conteniendo 5%_{p/p} G. Sin embargo, los resultados sugieren que al aumentar el contenido de G este parámetro se vuelve similar al valor observado para el Q puro. Esto puede estar relacionado con lo observado por SEM, donde el aumento del contenido de G puede afectar la distribución del mismo en la matriz polimérica conduciendo a materiales heterogéneos en cuanto a la distribución del plastificante. El Q presentó valores de tensión y elongación máxima similares a los obtenidos por otros autores para Q de similar PM y DD%⁶. La elongación máxima aumentó con la incorporación de G, en acuerdo con el agregado de un material plastificante, disminuyendo en consecuencia el módulo de Young y tensión en el punto de ruptura¹⁸. En acuerdo con lo esperado para el agregado de un material de naturaleza hidrofílica, las muestras conteniendo G mostraron una tendencia a absorber una mayor cantidad de agua cuanto mayor es el contenido de plastificante.

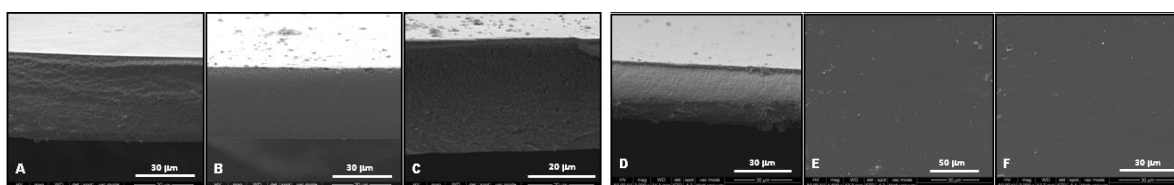


Figura 3. Imágenes SEM de cortes de películas de Q (a), conteniendo G: 5% (b), 10% (c) y 20% (d) y de las superficies de las películas de Q (e) y conteniendo 20% de G (f).

Tabla 2. Propiedades mecánicas de las muestras preparadas en este trabajo.

Muestra	Ángulo de contacto (°)	Propiedades mecánicas			Absorción de agua (%)
		Tensión a la rotura (Pa)	Alargamiento (%)	Módulo elástico (Pa)	
Q	90,592	77,63	17,38	12,41	57,142
G5	87,315	43,55	22,74	4,708	64,102
G10	88,415	54,85	*	8,993	73,437
G20	89,01	76,55	21,72	18,73	75,609

*El resultado del E% para la muestra conteniendo 10% de G no se informa debido a que no se pudieron obtener experimentalmente el número de medidas válidas exigidas para esta determinación.

En la mayoría de los trabajos se estudiaron películas no neutralizadas. De esta manera, los cambios en las propiedades podrían estar relacionados con la presencia de ácido orgánico remanente que podría actuar como plastificante, además de protonar a los grupos amina presentes en la cadena de Q, lo que puede afectar las interacciones entre la matriz de polímero-aditivo. Por lo tanto, en esos trabajos, es posible encontrar valores de absorción de agua de hasta 400%¹⁹, valores de solubilidad en agua de las películas de biocompuestos entre 20 y 50% o un aumento de la WVP a medida que aumenta el contenido de CN²⁰. Youssef y col.¹⁰ observaron que el comportamiento de las películas de Q se vio notablemente afectado por diferentes parámetros de preparación, como el tipo de ácido para la solvatación del Q, y el uso de álcali concentrado para ayudar la remoción de la película. Llegaron a la conclusión de que se prefería el proceso de desmoldeo de las películas sin utilizar una solución de NaOH, ya que la remoción de las películas por neutralización sufre un encogimiento severo (no soluble en agua), mientras que las películas que contienen ácidos orgánicos presentan mejores propiedades mecánicas (pero solubles en agua)¹⁰. A diferencia de esto, y en base a la información reportada y nuestros resultados, creemos que el proceso de neutralización es una variable importante. De esta manera, el estudio de la optimización del proceso de neutralización es un tema central para obtener un equilibrio entre las propiedades, además de otras variables (PM del Q y DD%, y otras propiedades).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró abordar la obtención de Q a partir de residuos de langostino patagónico y su empleo en la preparación de películas. El tiempo y la temperatura de trabajo durante la obtención de Q son variables fundamentales del procedimiento, afectando el DD% y PM de los productos. Para la materia prima empleada en este trabajo, se observó que es necesario un tiempo de tres días de reacción a una temperatura de 120°C para obtener una muestra de Q totalmente soluble. Por otra parte, el procedimiento empleado condujo a un producto con un PM más alto que el hallado para muestras de Q comerciales. Las películas Q-G obtenidas resultaron ser sistemas de alta transparencia, y sus propiedades dependieron del contenido de plastificante. Las películas preparadas mostraron tener una superficie más hidrofílica que el material de referencia y exhibieron mayor absorción de agua a medida que aumentó el contenido de plastificante, en acuerdo con la naturaleza hidrofílica de este aditivo. El agregado de G produce sistemas más homogéneos cuando es empleado en concentraciones de hasta un 10%^{P/p} según las imágenes de SEM, y está en acuerdo con los resultados de propiedades mecánicas donde se observó la obtención de películas más flexibles para la misma concentración. Así, las propiedades de películas compuestas por Q-G dependen tanto del contenido del aditivo y de las características del Q empleado para su preparación, así como del protocolo empleado para su elaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Imre, B., Pukánszky, B. (2015). From natural resources to functional polymeric biomaterials. *European Polymer Journal* 68, 481-487.
- [2] Desroches, M., Escouvois, M., Auvergne, R., Caillol, S., Boutevin, B. (2012). From vegetable oils to polyurethanes: synthetic routes to polyols and main industrial products. *Polymer Reviews*, 52, 38–79.
- [3] Pereda M., Moreira M.R., Roura S.L., Marcovich N., Aranguren M.L. *Ciencia e Investigación* 2014, 64:35.
- [4] Sorrentino A., Gorrasi G., Vittoria V. *Trends in Food Science & Technology* 2007, 18:84.
- [5] *Handbook of Plasticizers*, 2nd Edition, G. Wypych. ChemTec Publishing, Toronto 2012.
- [6] Ziani K., Oses J., Coma V., Maté J.I. *LWR – Food Science and Technology* 2008, 41: 2159.
- [7] Cissé M., Montet D., Loiseau G, Ducamp-Collin M.N. *J Polym Environ* 2012, 20:830.
- [8] Epure V., Griffon M., Pollet E., Averous L. *Carbohydrate Polymers* 2011, 83:947.
- [9] Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. *Progress in Polymer Science* 2009, 34:641.
- [10] Youssef, A.M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S.M, Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32.
- [11] Percot A., Viton C., Domard A. *Biomacromolecules* 2003, 4:1380.
- [12] Parada L., Crespín G., Miranda R., Katime I. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 2004, 5:1.
- [13] Wang W., Bo S.Q., Li S.Q., Qin W. *International Journal of Biological Macromolecules* 1991, 13:281.
- [14] Brugnerotto J., Desbrières J., Heux L., Mazeau K., Rinaudo M. *Macromolecular Symposia* 2001, 168:1.
- [15] *Acta Chemica Scandinavica* 1991, 45:1018.
- [16] Berghoff C. F. (2011). Trabajo de Tesis Doctoral, FCE-UNLP.
- [17] Lagaron J. M., Fernandez-Saiz P., Ocio M.J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55:2554.
- [18] Rivero S., Damonte L., García M.A., Pinotti A. *Food Biophysics*. Springer Science+Business Media New York, 2016.
- [19] Khan A., Khan R.A., Salmieri S, Le Tien C, Riedl B, Bouchard J., Chauve G., Tan V., Kamal M.R., Lacroix M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 90:1601–1608.
- [20] Dehnad D., Emam-Djomeh Z., Mirzaei H., Jafari S-M., Dadashi S. (2014). Optimization of physical and mechanical properties for chitosan–nanocellulose biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 105:222–228.