

INCLUSIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN MATRICES POLIMÉRICAS DE QUITOSANO Y SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES DE PELÍCULA

CHEMICAL COMPOUNDS INCLUSION IN CHITOSAN POLYMERIC MATRICES AND THEIR EFFECT ON FILM PROPERTIES

William ALBARRACÍN-HERNÁNDEZ, PhD.^{1*}, Nathalia VALDERRAMA BOHÓRQUEZ, Ing.^{2,3}

Recibido: Mayo 23 de 2013 Aceptado: Enero 30 de 2014

RESUMEN

Antecedentes: El quitosano es un polisacárido biodegradable producido a partir de la quitina que se extrae de residuos provenientes de la industria pesquera. Actualmente, los esfuerzos de las investigaciones apuntan hacia la obtención y modificación de películas de quitosano empleadas en una amplia cantidad de aplicaciones industriales, con el objetivo de brindar soluciones tecnológicas para los actuales requerimientos. Entre las modificaciones se puede resaltar la inclusión de diferentes compuestos químicos, buscando modificar las propiedades antimicrobianas, físicas y químicas de las películas de quitosano. Entre los compuestos químicos incluidos se encuentran diferentes solventes, plastificantes, emulsificantes y antioxidantes, además de otras sustancias como carbohidratos, proteínas, lípidos, polímeros, minerales y antibióticos. **Objetivos:** El objetivo del presente artículo de revisión fue sistematizar los nuevos avances en el campo de inclusión de sustancias químicas en las matrices poliméricas de quitosano. **Métodos:** Revisión bibliográfica de las investigaciones desarrolladas en los últimos 10 años. Inicialmente, se identificaron y se seleccionaron los estudios más representativos relacionados con el campo de la ciencia y tecnología de alimentos, específicamente sobre el efecto de la inclusión de sustancias químicas en películas de quitosano. Posteriormente, se compiló la información y se presentó de forma organizada y resumida para brindar al lector un escrito claro y conciso sobre las investigaciones desarrolladas y los resultados obtenidos en estos estudios. **Resultados:** Se presenta una descripción general sobre los aspectos fundamentales involucrados en la inclusión de los compuestos químicos y las interacciones que ocurren entre la matriz polimérica de quitosano y las sustancias químicas incluidas, de acuerdo a su función y a su composición. **Conclusiones:** Las últimas investigaciones han demostrado que la inclusión de compuestos químicos modifican las propiedades físicas, químicas y antimicrobianas de las películas de quitosano, debido a las interacciones moleculares entre estos compuestos y la matriz polimérica, así como otros factores involucrados. Por tanto, los desafíos actuales se basan en proponer métodos innovadores para la inclusión de compuestos químicos que mejoren las propiedades de las películas de quitosano.

Palabras clave: Quitosano, polímeros, películas modificadas, aditivos alimentarios.

¹ Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño. Cll 18 Cr 50. San Juan de Pasto, Colombia.

² Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 No. 45-03. Bogotá, Colombia.

³ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: walbarracinh@udenar.edu.co

ABSTRACT

Rationale: Chitosan is a biodegradable polysaccharide produced from fishing industrial waste derived chitin. Nowadays, research efforts are focused on the production of chitosan films used in a large quantity for industrial applications in order to provide technological solutions to the current industrial requirements. Different chemical compounds can be included in polymer matrices for the modification of antimicrobial, physical and chemical properties of chitosan films. The most common chemical compounds included are solvents, plasticizers, antioxidants and emulsifiers, as well as other substances such as carbohydrates, proteins, lipids, polymers, minerals and antibiotics. **Aims:** The purpose of this work is to present novel developments for the inclusion of chemical compounds into chitosan polymeric matrices. **Methods:** This review discusses the scientific work on chitosan published in the last 10 years. Initially, the most representative studies related to include chemical compounds in chitosan polymeric matrices were identified and selected. Subsequently, this information was compiled, organized and summarized in order to provide a clear and concise written about the developments and main findings in the field. **Results:** A general approach of the main aspects for the study is obtained. This research presents an overview of the aspects involved in the inclusion of chemical compounds and the interactions between the polymer matrix of chitosan and the chemicals included, according to their function and composition. **Conclusions:** The inclusion of chemicals modifies the physical, chemical and antimicrobial properties of the chitosan films due to the molecular interactions between these compounds and the polymer matrix, the structural changes and the modification of the physical, chemical and antimicrobial properties of the films, as well as other factors involved. For this reason, the current challenges are based on innovative methods to propose the inclusion of chemical compounds that improve the chitosan films properties.

Keywords: Chitosan, polymers, modified films, food additives.

INTRODUCCIÓN

El quitosano (poli-(1,4)-2-amino-2-deoxi-P-D-glucosa) se obtiene a partir de un proceso de desacetilación de la quitina (poli-(1,4)-2-acetamida-2-deoxi-P-D-glucosa) por métodos enzimáticos o químicos. La reacción se produce cuando el ion hidróxido del alcali hidroliza los grupos acetamida de la quitina mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica. La quitina es uno de los polímero más abundantes que se extrae de crustáceos, insectos, hongos y microorganismos (1, 2). El quitosano se utiliza para formar películas que se emplean en la industria biomédica, farmacológica, oftalmológica, cosmética y alimenticia (2, 3).

Las últimas investigaciones han enfocado sus esfuerzos en fabricar películas amigables con el medio ambiente, a bajo costo y con mejores propiedades antimicrobianas (4-7) y de transporte (8, 9), mejor capacidad para inmovilizar enzimas (10) y para micro-encapsular sustancias como extractos naturales, carbohidratos, enzimas, antibióticos, entre otras sustancias farmacológicas (11), así como nuevas aplicaciones en el campo de la nanotecnología en ingeniería de tejidos, liberación controlada

de fármacos y nanosensores (12-18). Para alcanzar estos objetivos se han desarrollado investigaciones donde diferentes compuestos químicos han sido incluidos en matrices poliméricas para mejorar las propiedades físicas, químicas y antimicrobianas de las películas de quitosano (4-7, 10, 11).

El objetivo de este trabajo de revisión fue sistematizar los nuevos avances en el campo de inclusión de sustancias químicas en las matrices poliméricas de quitosano y su efecto en las propiedades de película.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica de las investigaciones relacionadas con quitosano. Inicialmente, se empleó la herramienta bibliográfica ISI Web of KnowledgeSM disponible como recurso bibliográfico de la Universidad Nacional de Colombia. La búsqueda se realizó en inglés y los términos empleados fueron “chitosan film”, “chemical modifications” y “food”. La investigación se limitó a identificar los artículos científicos que empleaban estos términos en el campo del resumen.

Posteriormente, se utilizaron diferentes bases de datos, así como el servicio de obtención de documentos de la Universidad Nacional de Colombia para acceder al texto completo de los artículos referenciados. Las principales bases de datos consultadas fueron Scielo, Science Direct, Springer Journal, Wiley Online Library, Scopus, entre otras. Adicionalmente, la herramienta bibliográfica empleada para administrar las referencias fue EndNote versión X7.0.2.

Los criterios de inclusión de los artículos se basaron en la contribución de las investigaciones en el campo de la inclusión de sustancias químicas en las matrices poliméricas de quitosano. Por otra parte, los criterios de exclusión fueron los artículos que se desviaban del objetivo principal del artículo de revisión, de los cuales se pueden nombrar las investigaciones sobre encapsulamiento de compuestos químicos, así como la evaluación de las propiedades de respuesta de las películas aplicadas a nanosensores, inmunología y otros campos fuera del objeto de estudio.

Las referencias bibliográficas fueron organizadas según los temas propuestos en la estructura del artículo de revisión “Interacción de otros compuestos en la matriz polimérica de quitosano” e “Interacción de compuestos en la matriz polimérica de quitosano de acuerdo a su función”, así como sus correspondientes subtemas: solventes acuosos, plastificantes, emulsificantes, antioxidantes y antimicrobianos, inclusión de carbohidratos, polímeros, lípidos, aceites esenciales y proteínas.

La búsqueda que inició en el mes de Enero 2012, finalizó en el mes de marzo de 2013. Ésta se desarrolló principalmente en el idioma inglés; sin embargo, solo algunos pocos artículos científicos se encontraban disponibles en español y portugués.

RESULTADOS

Se identificaron más de 200 artículos relacionados con el criterio de búsqueda. Sin embargo, se seleccionaron solo 116 artículos, los cuales fueron referenciados en la presentación de los avances de investigación. A continuación, en la figura 1 se ilustra el proceso de búsqueda, así como los resultados obtenidos de la investigación.

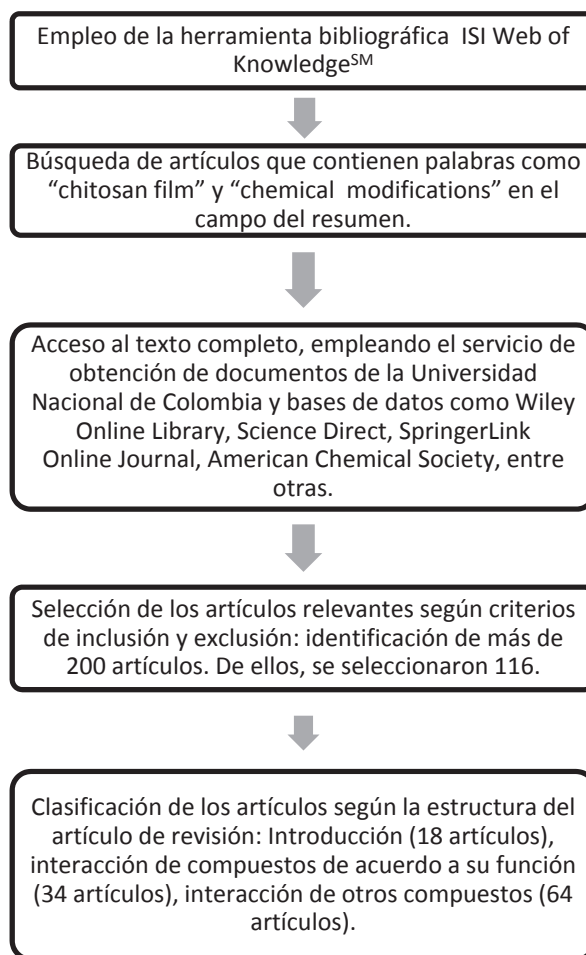


Figura 1. Flujo de búsqueda.

Interacción de compuestos en la matriz polimérica de quitosano de acuerdo a su función.

Solventes acuosos

Estudios recientes han demostrado que factores como tipo de ácido orgánico, concentración y pH de las soluciones afectan las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, antimicrobianas y de barrera de las películas de quitosano (19).

El quitosano es un biopolímero soluble en medio ácido a pH menor de 6 y los valores de pH óptimos se encuentran en un rango entre 4,0 y 5,0 (20). En condiciones ácidas, los grupos aminos del quitosano pueden protonizarse causando una repulsión entre las macro cadenas de carga positiva y permitiendo la difusión de las moléculas de agua y la solvatación de las moléculas de quitosano, mientras que a pH básico, el biopolímero tiende a precipitar (21-23).

El tipo de ácido también afecta las propiedades de las películas de quitosano. Este fenómeno se le atribuye a las diferencias de tamaño y estructura de cada ácido, las cuales influyen en las interacciones intra e intermoleculares. Como resultado podría favorecerse el equilibrio del complejo de electrolitos entre el grupo amino del quitosano y el disolvente, o en su defecto podría generarse inestabilidad en el complejo de las soluciones formadoras de película, y en consecuencia alterar desfavorablemente las propiedades de las películas de quitosano. Entre los ácidos orgánicos usados como solventes se nombra al ácido fórmico, propiónico, láctico, acético, oxálico, succínico, málico, adípico, entre otros. Las películas de quitosano con ácido fórmico presentan la mayor permeabilidad al vapor de agua, al igual que las películas con ácido acético. Por otra parte, las películas con ácido propiónico presentan una menor capacidad para inhibir el crecimiento microbiano y las mejores propiedades mecánicas, al igual que las películas con ácido acético, mientras que las películas con ácido láctico presentan las mejores propiedades antimicrobianas (24). Se ha demostrado que las películas con ácido acético y propiónico poseen menor permeabilidad al vapor de agua, menor solubilidad en agua y mayor resistencia a la tensión comparado con las películas con ácido láctico, mientras que las películas con ácido láctico tienen mayor elasticidad y menor resistencia a la tensión (20). Resultados similares fueron obtenidos por Park *et al.*, 2002 (25); esta investigación demostró que la resistencia de las películas obtenidas fue mayor para las películas obtenidas a partir de ácido acético, seguidas por las películas con ácido málico, láctico y cítrico y la permeabilidad al oxígeno fue menor para las películas con ácido málico, seguidas por las películas con ácido acético, láctico y cítrico. Las investigaciones aplicadas al campo de alimentos han prestado especial atención al ácido láctico en solución como solvente, ya que las películas de quitosano presentan mayor homogeneidad (20, 26), así como mejores características sensoriales en tanto que el ácido láctico le imparte un sabor menos ácido (27). Las soluciones de ácido láctico producen los más bajos valores de permeabilidad al oxígeno comparado con los valores obtenidos usando ácido fórmico, acético y fórmico.

Plastificantes

Los plastificantes son aditivos usados para incrementar la flexibilidad o plasticidad de los po-

límeros, tales como agua, oligosacáridos, polioles y lípidos, entre otros. Los plastificantes afectan las propiedades mecánicas y de permeabilidad, dando como resultado películas más flexibles, elásticas, permeables, húmedas (28, 29) y homogéneas (26). Los mecanismos de acción de los plastificantes pueden ser explicados por diferentes teorías, entre las cuales se resaltan la acción de lubricación para reducir las fuerzas de fricción entre las cadenas de polímeros, la teoría del gel que postula que los plastificantes afectan la rigidez de la estructura tridimensional del polímero interactuando con las moléculas (fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno), el fenómeno del incremento del volumen libre del polímero y cómo el plastificante decrece la temperatura de transición vítrea (T_g) (30).

Algunos estudios han determinado que el glicerol posee un efecto más intenso (31) y permanente (30), y que a diferencia de otros plastificantes estos actúan en las posiciones internas de la matriz polimérica (32). Se estableció que la concentración óptima de éste es 25% (p/p) en relación con la concentración de quitosano. Sin embargo, se ha determinado que su uso como plastificante en una cantidad de 20% (p/p) es suficiente para obtener una película con buena flexibilidad, aun cuando el tiempo de secado requerido aumenta con el aumento de la concentración de éste plastificante (33). Adicionalmente, se identificó un efecto sinérgico entre el glicerol y sustancias surfactantes como el Polisorbato 80, ya que las películas obtenidas se comportan como películas con una gran cantidad de plastificante, mostrando una baja resistencia a la tensión, mayor elasticidad y mayor permeabilidad al vapor de agua (28).

Emulsificantes

Los emulsificantes son sustancias surfactantes que al ser incorporadas durante la elaboración de las películas de quitosano reducen la tensión superficial de las soluciones, mejorando la humectabilidad y la adhesión de las películas, mientras que disminuye los valores de permeabilidad al vapor de agua por sus características hidrófobas (28). La adición de sustancias como glicerol, ácido oléico, ácido linoléico, Polisorbato 20 y Polisorbato 80 modifican la morfología y la rugosidad de las películas de quitosano, dando como resultado películas más homogéneas y menos rugosas (26). Se ha estudiado la adición de otros compuestos, tales como monolaurato, monooleato y trioleato de sorbitán, los

cuales afectan la longitud, el grado de saturación y estructura química de las cadenas hidrocarbonadas de estos ésteres de sorbitán, generando un impacto significativo en las matrices poliméricas formadas (34). En películas compuestas de almidón de maíz y quitosano la adición de alquil poliglucósido cambia las propiedades mecánicas de la película, disminuyendo la resistencia a la tensión y el porcentaje de elongación (35).

Antioxidantes y antimicrobianos.

El creciente interés por la adición de extractos naturales ha incrementado el número de publicaciones sobre la inclusión de extractos y aceites esenciales de plantas aromáticas en películas comestibles de quitosano. Se ha demostrado que la inclusión de extractos funcionales de comino y clavo mejora la capacidad inhibitoria de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (36). Adicionalmente, el uso de oleorresinas de romero, orégano, oliva, ají, ajo, cebolla y mora mejoran la capacidad de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* y la capacidad antioxidante de las películas de quitosano (37). Por otra parte, se comprobó que el extracto de jengibre azul inhibe el crecimiento de *S. aureus* (38) y el extracto de orégano inhibe el crecimiento de *Salmonella* entérica (39).

La inclusión de estos compuestos puede alterar las propiedades de las películas de quitosano. El extracto de té mejora las propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua y las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano (40). Por otra parte, el extracto de vainillina incrementa la fuerza de tensión, pero disminuye la flexibilidad, mejora la capacidad de barrera al oxígeno pero no al vapor de agua, reduce la cristalización y aumenta la apariencia amarilla de las películas de quitosano (41). Finalmente, la inclusión de extracto de menta aumenta la capacidad de protección a los rayos UV, la resistencia a la tensión, así como la capacidad para inhibir el crecimiento microbiano de *B. cereus* y *S. aureus*, sin alterar significativamente la resistencia a la punción y las propiedades de permeabilidad (42). Por otra parte, al incluir alfa tocoferol (compuesto precursor de la vitamina E) en películas de quitosano se puede modificar los enlaces químicos del polímero y propiciar fenómenos como la reducción de la cristalinidad, el contenido de agua, la resistencia a la tensión y la elongación, y el aumento de la opacidad, así como mejora la capacidad antioxidante

y la permeabilidad al vapor de agua de las películas de quitosano (43).

Algunos estudios han demostrado que las películas de quitosano pueden transportar y liberar antibióticos naturales y productos farmacéuticos para mejorar sus propiedades antimicrobianas. Los antibióticos naturales aislados de microorganismos como Divergicin M35 (44), nisina (45-47), levomitetina (48, 49), daptomicina (50), y antimicóticos como la natamicina (51), mejoran la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano cuando son aplicados en películas comestibles de quitosano contra microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus niger*, *Kocuria rhizophila*, hongos, entre otros. Por otra parte, existen otras sustancias farmacéuticas como clorhexidina, fluconazol, entre otras, que de igual manera potencializan la acción antimicrobiana de las películas de quitosano (52).

Interacción de otros compuestos en la matriz polimérica de quitosano

Inclusión de carbohidratos

La inclusión de carbohidratos como glucosa, celulosa y hemicelulosa en películas de quitosano generan cambios en la estructura y consecuentemente cambios en las propiedades de las películas. La inclusión de glucosa produce un efecto de pardeamiento no enzimático inducido por calor, o también llamado reacción de Maillard (53-55), que aumenta la capacidad antioxidante (55) y mejora las propiedades de adhesión de las películas de quitosano (54), y cuando es usado como recubrimiento comestible en hongos *shiitake* puede aumentar la calidad del alimento, manteniendo su firmeza, inhibiendo el incremento en la tasa de respiración, así como el crecimiento microbiano, aumentando así la vida útil del alimento (53). Por otra parte, la interacción favorable entre el quitosano y la celulosa da lugar a películas homogéneas sin una aparente separación de los polímeros (56). Sin embargo, resultados contradictorios fueron presentados por Wu *et al.*, 2004 (57), el cual sugiere que el quitosano y la celulosa son poco miscibles. Adicionalmente, la inclusión de hemicelulosa en matrices poliméricas de quitosano aumentan la cristalinidad y la capacidad de retención de agua especialmente a pH bajos (58), el primer fenómeno ocurre puesto que la hemicelulosa es capaz de interactuar con los enlaces formados por las moléculas de quitosano y el segundo fenómeno se presenta porque al aumentar

la concentración de hemicelulosa se incrementa la cantidad de puentes de hidrógeno, lo cual facilita la absorción de agua (59).

El almidón ha sido empleado para la producción de empaques biodegradables (60, 61). La inclusión de almidón de arroz, de maíz o sus derivados en películas de quitosano mejora la capacidad de retención de agua, las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua, debido a la interacción molecular entre los grupos hidroxilos del almidón y los grupos aminos del quitosano (60, 62-64). Sin embargo, resultados diferentes fueron presentados por Pelissari et al., 2012 (65) y por Xu et al., 2005 (64), quienes concluyeron que la inclusión de almidón de yuca y almidón de maíz, respectivamente, aumentaba la permeabilidad al vapor de agua debido al incremento de los grupos hidroxilos, los cuales incrementaban la higroscopicidad. Por otra parte, se demostró que existe un efecto antimicrobiano antagonico cuando interactúan en la misma película quitosano, almidón de yuca y/o sorbato de potasio, ya que se produce un efecto inhibitorio debido a las uniones entre de los grupos aminos del quitosano y la membrana celular de los microorganismos (66).

Actualmente, los esfuerzos de la comunidad científica están siendo enfocados en determinar una concentración favorable de los polímeros para evitar fenómenos como la agregación cuando la concentración de almidón supera los límites recomendados. En películas formadas con 2% de mezcla de polímeros de quitosano y amilosa nativa de maíz, la proporción de polímeros influye sobre las propiedades de las películas. Cuando la proporción de amilosa nativa de maíz respecto al quitosano se acerca a un 50%, las películas se tornan suaves, débiles y quebradizas, caso contrario cuando la concentración de amilosa nativa de maíz es menor al 20%, los valores de resistencia a la tensión aumentan y no se afecta el porcentaje de elongación de las películas (67). Resultados similares fueron reportados por Duan et al., 2011 (68), donde se determinó que la concentración crítica fue 30% de nanocristales de almidón de maíz en matrices poliméricas de carboximetil quitosano.

Inclusión de Polímeros

Nuevas investigaciones han sido desarrolladas para evaluar las interacciones moleculares entre el quitosano y diferentes polímeros, así como las propiedades de estos empaques compuestos (69-71). El polietileno oxidado (PEO) posee una buena

compatibilidad con el quitosano debido a los puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de sus macromoléculas (72). La adición de PEO redujo la coloración amarilla de las películas de quitosano y la permeabilidad al vapor de agua. Sin embargo, el proceso resultó desfavorable para las propiedades mecánicas y antimicrobianas (73). Adicionalmente, se estableció que la combinación de estos polímeros resulta ser más económica al reducir la cantidad de quitosano empleado (73, 74). Por otra parte, el polivinil alcohol (PVA) posee excelentes propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad debido a los puentes de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilos del PVA y los grupos NH_2 del quitosano (75-78), por lo que se ha utilizado para producir nuevos empaques poliméricos usando procesos de mezclado (69, 72, 79-83). Adicionalmente, a pesar que las interacciones moleculares entre el quitosano y el polietilenglicol (PEG) no involucran la formación de enlaces químicos entre las moléculas, el uso de agentes ligantes como la genipina, durante la mezcla de quitosano con PEG, mejora la interacción molecular y aumenta la capacidad de retención de agua de las películas (84).

Inclusión de Lípidos

Las ceras de candelilla, carnauba y abejas han sido incluidas en películas de quitosano con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera a la transmisión de vapor de agua y otros gases como el oxígeno debido a que estas ceras son altamente hidrofóbicas (85, 86). Sin embargo, la adición de ceras en la matriz polimérica puede generar una estructura heterogénea con imperfecciones que desfavorece las propiedades mecánicas, ópticas y de permeabilidad. Por esta razón, es indispensable determinar el protocolo de producción donde parámetros como concentración de las ceras, uso de sustancias emulsificantes y técnicas de homogenización de la fase dispersa en el polímero deben permitir una efectiva dispersión de las ceras en la solución de quitosano (87).

Las películas de quitosano con la incorporación de ácidos grasos como el ácido esteárico u oléico poseen una menor sensibilidad al agua, ya que las propiedades de solubilidad en agua, capacidad de humectación y permeabilidad al vapor de agua son reducidas. Este fenómeno se presenta por la presencia de uniones covalentes entre los grupos aminos del quitosano y los grupos hidroxilos libres del ácido graso que disminuyen la disponibilidad

del polímero para interactuar con el agua. Sin embargo, este mismo fenómeno reduce la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano por la reducción de la disponibilidad de grupos aminos que interactúan con la membrana citoplasmática de los microorganismos y evitan su proliferación. Por otra parte, la incorporación de ácido esteárico reduce la resistencia mecánica de las películas porque este lípido reemplaza al polímero en algunos lugares de la matriz, generando una discontinuidad en la estructura interna del polímero (88, 89).

Inclusión de aceites esenciales

Los aceites esenciales han reemplazado a los antioxidantes sintéticos, que a pesar de ser muy estables, económicos y efectivos, en algunas ocasiones pueden llegar a ser tóxicos (90). Estos han sido incluidos en matrices poliméricas de quitosano ya que poseen un eficaz efecto antimicrobiano y antioxidante (91, 92). Cuando los aceites son incluidos a bajas concentraciones (100 $\mu\text{l/g}$), no se alteran significativamente las propiedades mecánicas, físicas y sensoriales (46). Sin embargo, a concentraciones más altas estas propiedades pueden ser afectadas, incluso pueden ser capaces de precipitar proteínas (93).

A pesar de que las películas de quitosano poseen un efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias, la inclusión de aceites esenciales mejora las propiedades antimicrobianas de las películas para patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium digitatum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (36, 46, 92, 94, 95), incluso durante el almacenamiento (96, 97). Este fenómeno se debe a la acción de compuestos fenólicos como pineno, acetato de bornilo, alcanfor, 1,8-cineol, timol, carvacrol, tepineno, cimeno, diterpenos, carnosol y ácido ursólico, los cuales en contacto con el microorganismo degradan e incrementan la permeabilidad de la pared celular, inhiben la actividad de ATPasa, liberan el ATP intracelular, generan un daño en las proteínas y en la membrana citoplasmática, causan la migración de componentes de la célula, la coagulación del citoplasma y disminuyen de la fuerza motora de los microorganismos (93, 98).

Se ha comprobado que la efectividad de los aceites para inhibir el crecimiento microbiano depende de factores como pH del medio, concentración y tipo de aceite, condiciones de almacenamiento, así

como del microorganismo estudiado. La eficacia de los aceites esenciales contra bacterias patógenas aumenta con la reducción del pH de los alimentos, produciendo un incremento de la hidrofobicidad de los aceites esenciales, lo cual permite una mejor difusión de estos compuestos bioactivos en la membrana celular (93). Adicionalmente, una mayor concentración de aceites esenciales aumenta la eficacia antimicrobiana; sin embargo, no es recomendable porque altera las propiedades sensoriales de los alimentos (93). Por otra parte, se ha establecido mejor capacidad antimicrobiana en algunos aceites esenciales, como el caso del aceite esencial de canela que presenta la mejor concentración mínima inhibitoria para microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium digitatum*, comparado con los aceites esenciales de clavo y anís estrella (99). Según Hosseini et al., 2009 (100), es el aceite de tomillo el que posee mejores propiedades antimicrobianas comparado con los aceites de clavo y limón, siendo la efectividad mayor para bacterias gram positivas. Según Sanchez-Gonzalez et al., 2011 (97), el aceite esencial de té posee una mayor capacidad inhibitoria comparado con los aceites esenciales de naranja variedad bergamot y limón para microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Cuando se desarrollan pruebas de almacenamiento, la temperatura de almacenamiento afecta la difusión celular, aumentando cuando la temperatura de almacenamiento es mayor (93). Sin embargo, a una menor temperatura los fosfolípidos de la membrana celular están estrechamente acoplados en una estructura rígida, lo cual impide la difusión de los aceites esenciales. Se ha comprobado que algunos microorganismos son más susceptibles que otros, esto puede ser atribuido a la membrana más externa y la película de lipopolisacáridos que restringen la difusión de los compuestos hidrofóbicos dentro de la membrana de los microorganismos Gram negativos (93).

La interacción entre los aceites esenciales también genera cambios en el tamaño y distribución de las partículas que producen una variación en las propiedades de las películas, debido al efecto plastificante de las gotas de aceite. La capacidad de absorción de agua, la permeabilidad al vapor de agua y la elasticidad de las películas decrecen con el incremento de la concentración de aceite esencial debido a la naturaleza no polar del lípido y las interacciones entre los componentes del aceite y la

matriz polimérica que genera una discontinuidad en la estructura interna (91, 101-105). Resultados diferentes fueron obtenidos por Hosseini *et al.*, 2009 (100), quienes aseguraron que la incorporación de aceites esenciales de tomillo y clavo en las películas de quitosano incrementa el contenido de humedad, la solubilidad en agua, así como la permeabilidad al vapor de agua. Adicionalmente, se presenta una disminución del brillo y la transparencia de las películas de quitosano debido a la rugosidad superficial que se presenta por fenómenos de floculación y cremado de las gotas de aceite durante el secado (103). En la publicación de Altiok *et al.*, 2010 (92), se estableció que el incremento de la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, así como la disminución de la resistencia de las películas se debe al colapso de la estructura interna, causado por la adición del aceite esencial, resultados que fueron similares a los obtenidos por Abdollahi *et al.*, 2012 (106), quienes concluyeron que esta inclusión generó un aumento en la transparencia de las películas y una menor transmisión a los rayos UV que las películas de referencia.

Inclusión de Proteínas

Entre las proteínas más utilizadas en películas de quitosano se encuentra la gelatina y las proteínas vegetales. Dependiendo del origen de la gelatina los efectos sobre las propiedades fisicoquímicas son más significativos. Así, cuando la gelatina de pescado es incluida en películas de quitosano la solubilidad en agua es menor y el porcentaje de deformación es mayor, comparado con las películas con y sin inclusión de gelatina de origen bovino. Sin embargo, las películas con inclusión de gelatina de origen bovino presentan una menor permeabilidad al vapor de agua, comparado con las películas con y sin gelatina de pescado, respectivamente (107). Se ha establecido que el quitosano y la gelatina son compuestos inmiscibles (108). Sin embargo, resultados contradictorios han sido reportados. Según Pereda *et al.*, 2011 (109), sí existen interacciones entre los cationes del quitosano y los aniones de la gelatina, lo que produce una reducción de la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua, así como un aumento en la flexibilidad de las películas de quitosano con la inclusión de gelatina, sin causar una alteración en sus propiedades ópticas. Es así como el uso de agentes ligantes, como la proantocianidina, mejoran las interacciones moleculares entre la gelatina y el quitosano, además de la estabilidad y

las propiedades fisicoquímicas de las películas (110). Según Kolodziejska *et al.*, 2007 (111), la adición de transglutaminasa y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida produce una disminución en la solubilidad de las películas y en las propiedades mecánicas de las películas modificadas, siendo más marcado el efecto de la transglutaminasa.

La adición de proteínas vegetales también altera las propiedades de las películas de quitosano. Las películas obtenidas a partir de quitosano y el extracto proteico de quinua poseen una mayor elasticidad, hidrofiliidad y permeabilidad al vapor de agua y espesor, así como una menor estabilidad térmica (112). Las películas obtenidas a partir de quitosano con la inclusión de proteína de maíz y soya no poseen una buena compatibilidad molecular, lo cual genera películas con menor resistencia mecánica y elasticidad (113, 114). Para solucionar este inconveniente, se han desarrollado diferentes investigaciones que utilizan agentes ligantes como trasglutaminasa y glutaraldehído, que mejoran las interacciones y las propiedades de las películas (115, 116).

CONCLUSIONES

Las investigaciones alrededor de la obtención de nuevos materiales con propiedades específicas se han enfocado en proponer métodos innovadores donde se incluyan compuestos químicos para mejorar las propiedades de las películas de quitosano y obtener materiales más económicos y amigables con el medio ambiente.

Los cambios mencionados están estrechamente relacionados con las interacciones moleculares entre los compuestos que participan durante la obtención de las películas de quitosano, lo cual genera un cambio estructural y altera las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de las películas. Por esta razón, el estudio del efecto de la inclusión de diferentes compuestos químicos en la matriz polimérica de quitosano permite comprender cómo suceden estos fenómenos y brinda soluciones científicas y tecnológicas claras para los actuales requerimientos de la industrial.

REFERENCIAS

1. Rinaudo M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int.* 2008; 57 (3): 397-430.
2. Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nut* 2003; 43 (1):61-87.
3. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct. Polym.* 2000; 46 (1): 1-27.

4. Dutta J, Tripathi S, Dutta PK. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Sci Technol Int* 2012; 18(1): 3-34.
5. Kenawy E-R, Worley SD, Broughton R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules*. 2007; 8 (5): 1359-1384.
6. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010; 144 (1): 51-63.
7. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 2003; 4 (6): 1457-1465.
8. Miller KS, Krochta JM. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci Technol*. 1997; 8 (7): 228-237.
9. Cunha AG, Gandini A. Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates. *Cellulose*. 2010; 17 (6): 1045-1065.
10. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*. 2004; 35 (2-3): 126-139.
11. Peniche C, Arguelles-Monal W, Peniche H, Acosta N. Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromol Biosci*. 2003; 3 (10): 511-520.
12. Fazilova SA, Yugai SM, Rashidova SS. Structural investigation of polysaccharides and nanocompositions based on them. *Russ J Bioorganic Chem*. 2011; 37 (7): 786-790.
13. Peniche H, Peniche C. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polym Int*. 2011; 60 (6): 883-889.
14. Sorrentino A, Gorrasi G, Vittoria V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends Food Sci Technol*. 2007; 18 (2): 84-95.
15. Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lwt-Food Sci Technol*. 2010; 43 (6): 837-842.
16. Cascone MG, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G, Lazzeri L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J Biomat Sci Polym Ed*. 2001; 12 (3): 267-281.
17. Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. In: Heinze T, editor. *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use*. Berlin: Springer-Verlag Berlin; 2005. p. 151-209.
18. Simkovic I. What could be greener than composites made from polysaccharides? *Carbohydr Polym*. 2008; 74 (4): 759-762.
19. Ritthidej CC, Phaechamud T, Koizumi T. Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *Int J Clin Pharm*. 2002; 232 (1-2): 11-22.
20. Kim KM, Son JH, Kim SK, Weller CL, Hanna MA. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *J Food Sci*. 2006; 71 (3): E119-E124.
21. Sogias IA, Khutoryanskiy VV, Williams AC. Exploring the Factors Affecting the Solubility of Chitosan in Water. *Macromol Chem Phys*. 2010; 211 (4): 426-433.
22. Gartner C, Lopez BL, Sierra L, Graf R, Spiess HW, Gaboricau M. Interplay between Structure and Dynamics in Chitosan Films Investigated with Solid-State NMR, Dynamic Mechanical Analysis, and X-ray Diffraction. *Biomacromolecules*. 2011; 12 (4): 1380-1386.
23. Meng ZJ, Zheng XJ, Tang KY, Liu J, Qin SF. Dissolution of natural polymers in ionic liquids: A review. *E-Polymers*. 2012; 56 (1): 33-38.
24. Chen JL, Zhao YY. Effect of Molecular Weight, Acid, and Plasticizer on the Physicochemical and Antibacterial Properties of beta-Chitosan Based Films. *J Food Sci*. 2012; 77 (5): E127-E136.
25. Park SY, Marsh KS, Rhim JW. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *J Food Sci*. 2002; 67 (1): 194-197.
26. Cardenas G, Anaya P, Del Rio R, Schreiber R, von Plessing C, Schneider M. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy of chitosan composite films. *J Chil Chem Soc*. 2010; 55 (3): 352-354.
27. Casariego A, Souza BWS, Vicente AA, Teixeira JA, Cruz L, Diaz R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocoll*. 2008; 22 (8): 1452-1459.
28. Ziani K, Oses J, Coma V, Mate JI. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Lwt-Food Sci Technol*. 2008; 41 (10): 2159-2165.
29. Arvanitoyannis IS, Nakayama A, Aiba S-i. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr Polym*. 1998; 37 (4): 371-382.
30. Suyatna NE, Tighzert L, Copinet A. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *J Agric Food Chem*. 2005; 53 (10): 3950-3957.
31. Bajdik J, Marciello M, Caramella C, Domjan A, Suvegh K, Marek T, et al. Evaluation of surface and microstructure of differently plasticized chitosan films. *J Pharm Biomed Anal*. 2009; 49 (3): 655-659.
32. Domjan A, Bajdik J, Pintye-Hodi K. Understanding of the Plasticizing Effects of Glycerol and PEG 400 on Chitosan Films Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Macromolecules*. 2009; 42 (13): 4667-4673.
33. Jagadish RS, Raj B, Parameswara P, Somashekar R. Effect of glycerol on structure - property relations in chitosan/poly(ethylene oxide) blended films investigated using wide-angle X-ray diffraction. *Polym Int*. 2010; 59 (7): 931-936.
34. Grant J, Cho J, Allen C. Self-assembly and physicochemical and rheological properties of a polysaccharide-surfactant system formed from the cationic biopolymer chitosan and nonionic sorbitan esters. *Langmuir*. 2006; 22 (9): 4327-4335.
35. Stanescu VN, Olteanu M, Florea-Spiroiu M, Pincu E, Meltzer V. Starch/chitosan film forming hydrogel. *Revue Roumaine De Chimie*. 2011; 56 (8): 827-832.
36. Hernandez-Ochoa L, Gonzales-Gonzales A, Gutierrez-Mendez N, Munoz-Castellanos LN, Quintero-Ramos A. Study of the antibacterial activity of chitosan-based films prepared with different molecular weights including spices essential oils and functional extracts as antimicrobial agents. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*. 2011; 10 (3): 455-463.
37. Ponce AG, Roura SI, del Valle CE, Moreira MR. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biol Technol*. 2008; 49 (2): 294-300.
38. Mayachiew P, Devahastin S, Mackey BM, Niranjan K. Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract. *Food Res Int*. 2010; 43 (1): 125-132.
39. Marques A, Encarnacao S, Pedro S, Nunes ML. In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008; 24 (10): 2357-2360.
40. Siripatrawan U, Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll*. 2010; 24 (8): 770-775.
41. Sangsuwan J, Rattanapanone N, Rachtananpun P. Effects of vanillin and plasticizer on properties of chitosan-methyl cellulose based. *J Appl Polym Sci*. 2008; 109 (6): 3540-3545.
42. Kanatt SR, Rao MS, Chawla SP, Sharma A. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocoll*. 2012; 29 (2): 290-297.
43. Martins JT, Cerqueira MA, Vicente AA. Influence of alpha-tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll*. 2012; 27 (1): 220-227.

44. Benabbou R, Zihler A, Desbiens M, Kheadr E, Subirade M, Fliss I. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a combination of chitosan and divergicin M35. *Can J Microbiol.* 2009; 55 (4): 347-355.
45. Brown CA, Wang BW, Oh JH. Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *J Food Prot.* 2008; 71 (2): 319-324.
46. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lwt-Food Sci Technol.* 2005; 38 (8): 859-865.
47. Sebti I, Chollet E, Degraeve P, Noel C, Peyrol E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *J Agric Food Chem.* 2007; 55 (3): 693-699.
48. Kulish EI, Kuzina LG, Chudin AG, Mudarisova RK, Kolesov SV, Monakov YB. Transport properties of chitosan films. *Russ J Appl Chem.* 2007; 80 (5): 810-812.
49. Mudarisova RK, Kulish EI, Zinatullin RM, Tamindarova NE, Kolesov SV, Khunafin SN, et al. Films of chitosan-based complexes with controlled release of levomycetin. *Russ J Appl Chem.* 2006; 79 (10): 1718-1720.
50. Smith JK, Bumgardner JD, Courtney HS, Smeltzer MS, Haggard WO. Antibiotic-loaded chitosan film for infection prevention: A preliminary in vitro characterization. *J Biomed Mater Res B App Biomater.* 2010; 94B (1): 203-211.
51. Da Silva MA, Bierhalz ACK, Kieckbusch TG. Modelling natamycin release from alginate/chitosan active films. *Int J Food Sci Technol.* 2012; 47 (4): 740-746.
52. Calamari SE, Bojanich MA, Barembaum SR, Berdicevski N, Azcurra AI. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16 (1): E23-E28.
53. Jiang TJ, Feng LF, Li JR. Changes in microbial and postharvest quality of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) treated with chitosan-glucose complex coating under cold storage. *Food Chem.* 2012; 131 (3): 780-786.
54. Umemura K, Mihara A, Kawai S. Development of new natural polymer-based wood adhesives III: effects of glucose addition on properties of chitosan. *J Wood Sci.* 2010; 56 (5): 387-394.
55. Kosaraju SL, Weerakkody R, Augustin MA. Chitosan-Glucose Conjugates: Influence of extent of maillard reaction on antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* 2010; 58 (23): 12449-12455.
56. Stefanescu C, Daly WH, Negulescu, II. Biocomposite films prepared from ionic liquid solutions of chitosan and cellulose. *Carbohydr Polym.* 2012; 87 (1): 435-443.
57. Wu YB, Yu SH, Mi FL, Wu CW, Shyu SS, Peng CK, et al. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends. *Carbohydr Polym.* 2004; 57 (4): 435-440.
58. Karaaslan AM, Tshabalala MA, Buschle-Diller G. Wood hemicellulose/chitosan-based semi-interpenetrating network hydrogels: mechanical, swelling and controlled drug release properties. *Bioresources.* 2010; 5 (2): 1036-1054.
59. Karaaslan MA, Tshabalala MA, Buschle-Diller G. Semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on aspen hemicellulose and chitosan: Effect of crosslinking sequence on hydrogel properties. *J Appl Polym Sci.* 2012; 124 (2): 1168-1177.
60. Bourtoom T, Chinnan MS. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *Lwt-Food Sci Technol.* 2008; 41 (9): 1633-1641.
61. Garcia MA, Pinotti A, Zaritzky NE. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *Starch.* 2006; 58 (9): 453-463.
62. Liu FJ, Qin B, He LH, Song R. Novel starch/chitosan blending membrane: Antibacterial, permeable and mechanical properties. *Carbohydr Polym.* 2009; 78 (1): 146-150.
63. Tang RP, Du YM, Fan LH. Dialdehyde starch-crosslinked chitosan films and their antimicrobial effects. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys.* 2003; 41 (9): 993-997.
64. Xu YX, Kim KM, Hanna MA, Nag D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Ind Crop Prod.* 2005; 21 (2): 185-192.
65. Pelissari FM, Yamashita F, Garcia MA, Martino MN, Zaritzky NE, Grossmann MVE. Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films. *J Food Eng.* 2012; 108 (2): 262-267.
66. Vasconez MB, Flores SK, Campos CA, Alvarado J, Gerschenson LN. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Res Int.* 2009; 42 (7): 762-769.
67. Cervera MF, Heinamaki J, Krogars K, Jorgensen AC, Karjalainen M, Colarte AI, et al. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *Aaps Pharmscitech.* 2004; 5 (1): 109-114.
68. Duan B, Sun PD, Wang XL, Yang C. Preparation and properties of starch nanocrystals/carboxymethyl chitosan nanocomposite films. *Starch-Starke.* 2011; 63 (9): 528-535.
69. Huang MF, Fang Y. Preparation, characterization, and properties of chitosan-g-poly(vinyl alcohol) copolymer. *Biopolymers.* 2006; 81 (3): 160-166.
70. Osugi N, Dong T, Hexig B, Inoue Y. Generation and characterization of compositional gradient structure in the biodegradable chitosan/poly(ethylene oxide) blend. *J Appl Polym Sci.* 2007; 104 (5): 2939-2946.
71. Pakravan M, Heuzey MC, Ajji A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer.* 2011; 52 (21): 4813-4824.
72. Sashina ES, Vnuchkin AV, Novoselov NP. A study of the thermodynamics of chitosan interaction with polyvinyl alcohol and polyethylene oxide by differential scanning calorimetry. *Russ J Appl Chem.* 2006; 79 (10): 1643-1646.
73. Li J, Zivanovic S, Davidson PM, Kit K. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. *Carbohydr Polym.* 2010; 79 (3): 786-791.
74. Li J, Zivanovic S, Davidson PM, Kit K. Production and characterization of thick, thin and ultra-thin chitosan/PEO films. *Carbohydr Polym.* 2011; 83 (2): 375-382.
75. Bahrami SB, Kordestani SS, Mirzadch H, Mansoori P. Poly(vinyl alcohol) - Chitosan blends: Preparation, mechanical and physical properties. *Iran Polym J.* 2003; 12 (2): 139-146.
76. Hexig B, Alata H, Inoue Y. Self-organization of functional gradient structure in the biodegradable chitosan/poly(vinyl alcohol) blend film. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys.* 2005; 43 (21): 3069-3076.
77. El-Hefian EA, Nasef MM, Yahaya AH. The Preparation and Characterization of Chitosan/Poly (Vinyl Alcohol) Blended Films. *E-J Chem.* 2010; 7 (4): 1212-1219.
78. Kulish EI, Kolesov SV. A study of structure formation in chitosan-polyvinyl alcohol blends by turbidity spectroscopy. *Russ J Appl Chem.* 2005; 78 (9): 1486-1488.
79. Kumar H, Prabhakar MN, Prasad CV, Rao KM, Reddy T, Rao KC, et al. Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30 degrees C. *Carbohydr Polym.* 2010; 82 (2): 251-255.
80. Lewandowska K. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochim Acta.* 2009; 493 (1-2): 42-48.
81. Radhakumary C, Nair PD, Mathew S, Nair CPR. Synthesis, characterization, and properties of poly(vinyl acetate)- and poly(vinyl alcohol)-grafted chitosan. *J Appl Polym Sci.* 2007; 104 (3): 1852-1859.
82. Rodrigues IR, Forte MMD, Azambuja DS, Castagno KRL. Synthesis and characterization of hybrid polymeric networks (HPN) based on polyvinyl alcohol/chitosan. *React Funct Polym.* 2007; 67 (8): 708-715.
83. Srinivasa PC, Ramesh MN, Kumar KR, Tharanathan RN. Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydr Polym.* 2003; 53 (4): 431-438.

84. Khurma JR, Nand AV. Temperature and pH sensitive hydrogels composed of chitosan and poly(ethylene glycol). *Polym Bull.* 2008; 59 (6): 805-812.
85. Gallstedt M, Hedenqvist MS. Oxygen and water barrier properties of coated whey protein and chitosan films. *J Polym Environ.* 2002; 10 (1-2): 1-4.
86. Ruiz-Ramos JO, Perez-Orozco JP, Baez-Gonzalez JG, Bosquez-Molina E, Perez-Alonso C, Vernon-Carter EJ. Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum-chitosan complexes. *Carbohydr Polym.* 2006; 64 (2): 355-363.
87. Yoshida CMP, Oliveira EN, Franco TT. Chitosan Tailor-Made Films: The Effects of Additives on Barrier and Mechanical Properties. *Packaging Technology and Science.* 2009; 22 (3): 161-170.
88. Moller H, Grelier SP, Pardon P, Coma W. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. *J Agric Food Chem.* 2004; 52 (21): 6585-6591.
89. Souza VC, Monte ML, Pinto LAA. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. *Int J Food Sci Technol.* 2011; 46 (9): 1856-1862.
90. Abdeen Z. Swelling and Reswelling Characteristics of Cross-Linked Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Hydrogel Film. *J Dispers Sci Technol.* 2011; 32 (9): 1337-1344.
91. Moradi M, Tajik H, Rohani SMR, Oromiehie AR, Malekinejad H, Aliakbarlu J, et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *Lwt-Food Sci Technol.* 2012; 46 (2): 477-484.
92. Altiok D, Altiok E, Tihminlioglu F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *J Mater Sci-Mater Med.* 2010; 21 (7): 2227-2236.
93. Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2009; 8 (3): 157-180.
94. Avila-Sosa R, Palou E, Munguia MTJ, Nevarez-Moorillon GV, Cruz ARN, Lopez-Malo A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Inte J Food Microbiol.* 2012; 153 (1-2): 66-72.
95. Gomez-Estaca J, De Lacey AL, Gomez-Guillien MC, Lopez-Caballero ME, Montero P. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *J Aquat Food Prod Technol.* 2009; 18 (1-2): 46-52.
96. Sanchez-Gonzalez L, Gonzalez-Martinez C, Chiralt A, Chafer M. Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *J Food Eng.* 2010; 98 (4): 443-452.
97. Sanchez-Gonzalez L, Chafer M, Hernandez M, Chiralt A, Gonzalez-Martinez C. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control.* 2011; 22 (8): 1302-1310.
98. Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot.* 2004; 67 (4): 833-848.
99. Wang LN, Liu F, Jiang YF, Chai Z, Li PL, Cheng YQ, et al. Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 (23): 12411-12419.
100. Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi MA. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J Food Process Preserv.* 2009; 33 (6): 727-743.
101. Pereda M, Amica G, Marcovich NE. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydr Polym.* 2012; 87 (2): 1318-1325.
102. Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem.* 2010; 122 (1): 161-166.
103. Sanchez-Gonzalez L, Chiralt A, Gonzalez-Martinez C, Chafer M. Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *J Food Eng.* 2011; 105 (2): 246-253.
104. Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *J Food Eng.* 2012; 111 (2): 343-350.
105. Krkić N, Lazić V, Petrović L, Gvozdenović J, Pejić D. The properties of chitosan-laminated collagen film. *Food Technol Biotechnol.* 2012; 50 (4): 483-489.
106. Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *Int J Food Sci Technol.* 2012; 47 (4): 847-853.
107. Gomez-Estaca J, Gomez-Guillen MC, Fernandez-Martin F, Montero P. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocoll.* 2011; 25 (6): 1461-1469.
108. Basavaraju KC, Damappa T, Rai SK. Preparation of chitosan and its miscibility studies with gelatin using viscosity, ultrasonic and refractive index. *Carbohydr Polym.* 2006; 66 (3): 357-362.
109. Pereda M, Ponce AG, Marcovich NE, Ruseckaite RA, Martucci JF. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocoll.* 2011; 25 (5): 1372-1381.
110. Kim S, Nimni ME, Yang Z, Han B. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 75B (2): 442-450.
111. Kolodziejaska I, Piotrowska B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chem.* 2007; 103 (2): 295-300.
112. Abugoch LE, Tapia C, Villaman MC, Yazdani-Pedram M, Diaz-Dosque M. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocoll.* 2011 Jul; 25 (5): 879-886.
113. Ferreira CO, Nunes CA, Delgadillo I, Lopes-da-Silva JA. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. *Food Res Int.* 2009; 42 (7): 807-813.
114. Silva SS, Goodfellow BJ, Benesch J, Rocha J, Mano JF, Reis RL. Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydr Polym.* 2007; 70 (1): 25-31.
115. Silva SS, Santos MI, Coutinho OP, Mano JF, Reis RL. Physical properties and biocompatibility of chitosan/soy blended membranes. *J Mater Sci-Mater Med.* 2005; 16 (6): 575-579.
116. Di Pierro P, Chico B, Villalonga R, Mariniello L, Damiao AE, Masi P, et al. Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules.* 2006; 7 (3): 744-749.