

Modificaciones físicas, químicas y enzimáticas y sus efectos sobre las propiedades de las películas de quitosano.

Physical, chemical and enzymatic modifications and their effects on the properties of chitosan films.

Valderrama, N.¹, Albarracín, W.²

¹Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 No. 45-03. Bogotá, Colombia. e-mail: nvalderramab@unal.edu.co

²Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño. Cllé 18 Cr 50. San Juan de Pasto, Colombia. e-mail: walbarracinh@udenar.edu.co

RESUMEN

Las recientes investigaciones en el campo de biopolímeros han intentado brindar soluciones tecnológicas a los retos en el campo de la ciencia y la tecnología de los materiales. En los últimos años, se han llevado a cabo investigaciones con el objetivo de modificar las propiedades de películas empleando tratamientos enzimáticos y físicos, tales como la aplicación de radiaciones, pulsos eléctricos, plasma, tratamientos térmicos, uso de fluidos supercríticos, así como la conformación de películas en multicapas. Estas modificaciones cambian las propiedades antimicrobianas, físicas y químicas de las películas de quitosano y permiten desarrollar una extensa cantidad de aplicaciones en los campos de biomedicina, farmacología, biotecnología y en la industria de cosméticos y de alimentos. El objetivo del presente artículo de revisión es dar a conocer los nuevos avances en el campo de modificaciones físicas y enzimáticas de películas de quitosano explicando diferentes técnicas empleadas en los últimos años.

Palabras clave: quitosano, polímeros, películas modificadas, aditivos alimenticios.

ABSTRACT

Recent research on biopolymer has focused its efforts to provide technological solutions to current and future challenges in the field of science and technology of materials. The properties of chitosan films have been modified by enzymatic and physical treatments such as the application of radiation, electric pulses, plasma, heat treatments, use of supercritical fluids as well as the formation of multilayer films. These modifications change antimicrobial, physical and chemical properties of chitosan films, and allow developing a wide range of applications in the fields of biomedicine, pharmacology, biotechnology, cosmetic and food industries. The purpose of this review is to present new developments in the field of physical and enzymatic modifications of chitosan films describing the different techniques carried out on the last years.

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

1. INTRODUCCIÓN

El quitosano es un copolímero de glucosamina y N-acetil glucosamina obtenido a partir de la des acetilación de quitina bajo condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática (**Figura 1**). La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza presente en insectos y crustáceos terrestres, hongos, microorganismos y en exoesqueletos de organismos marinos tales como cangrejos, camarones y langostas, entre otros [1, 2]

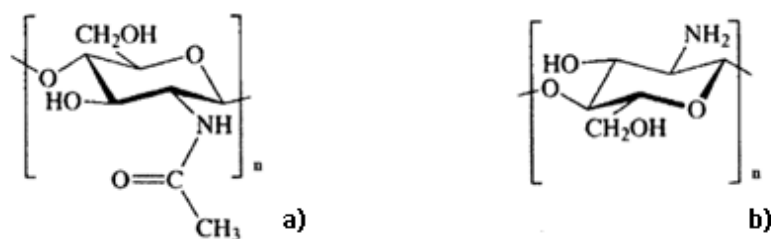


Figura 1: Estructura química (a) quitina y (b) quitosano [3].

El quitosano se caracteriza por ser biodegradable y no tóxico, así como por ser capaz de formar películas y por sus propiedades antimicrobianas [4]. Estas propiedades han permitido que se hayan desarrollado aplicaciones industriales, entre ellas se encuentran desarrollos en la industria biomédica, farmacológica, oftalmológica, de cosméticos y de alimentos, así como las aplicaciones en el campo de la electrónica, la fotografía, la biotecnología y para el tratamiento de aguas contaminadas, entre otras aplicaciones [2, 5]. En la industria alimentaria, se ha empleado para la formación de películas biodegradables, la inmovilización de enzimas, la preservación de alimentos, como aditivo y en suplementos dietarios [6]. En la industria biomédica se ha utilizado en desarrollos ortopédicos, periodontales y en el área de la otorrinolaringología. En el campo de la ingeniería de tejidos se emplea para la regeneración de huesos, cartílago, nervios, cicatrización de heridas, liberación controlada de biocompuestos, entre otros [7-12].

El objetivo de este trabajo de revisión es presentar las diferentes modificaciones físicas y enzimáticas que se han desarrollado específicamente en películas de quitosano para dar a conocer los nuevos avances en este campo.

3.1. MODIFICACIONES FÍSICAS

3.1.1. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Las propiedades de los materiales pueden ser alteradas y mejoradas cuando diferentes procesos y transformaciones son aplicados. Los tratamientos térmicos pueden alterar la estructura interna y las interacciones de las moléculas, modificando la velocidad de difusión de materiales como cerámicas y polímeros [13]. Dentro de estas modificaciones se ha evaluado el efecto de las condiciones de secado sobre las propiedades de las películas de quitosano cuando estas son obtenidas por la técnica de evaporación del solvente. Entre las investigaciones se encuentran el secado a condiciones ambientales, con aire caliente, al vacío, empleado microondas, infrarrojo, entre otros [14, 15].

El método más utilizado es el secado con aire caliente. Sin embargo, una de las condiciones más influyentes es la temperatura. Por esta razón, se han desarrollado diversas investigaciones que comparan los efectos de diferentes temperaturas. En el estudio realizado POR FERNANDEZ-PAN *et al.* [16] se concluyó que usar una temperatura de secado más alta (80°C) da lugar a películas con menor elasticidad y resistencia a la tensión y menor permeabilidad al vapor de agua y se determinó que la temperatura es un parámetro más influyente sobre las propiedades mecánicas y de barrera que la humedad. Adicionalmente, los resultados obtenidos a partir de la investigación llevada a cabo por FERNANDEZ-SAIZ *et al.* [17] demuestran que la capacidad antimicrobiana de las películas se afecta con la temperatura de secado, cuando esta es de 120°C se disminuye la capacidad microbiana inhibitoria comparado con temperaturas de 37°C y 80°C.

Otras condiciones de secado como humedad y presión, también son considerados parámetros críticos que afectan las propiedades físicas y microbiológicas de las películas de quitosano. La investigación desarrollada por MAYACHIEW Y DEVAHASTIN [14], determinó que las aplicación de vacío es el tratamiento más rápido, seguido por la aplicación de vapor sobrecalentado a bajas presiones y finalmente, el empleo de aire caliente (40°C). Sin embargo, basado en las propiedades de las películas, se estableció que el tratamiento más recomendado es usando vapor sobrecalentado a bajas presiones, ya que las películas obtenidas se caracterizan por poseer un menor color amarillo, una mayor resistencia a la tensión y una mayor elongación.

Resultados similares fueron presentados por THAKHIEW *et al.* [18], cuyo estudio estableció que no existen diferencias significativas entre el espesor, color y contenido de humedad de las muestras secadas con las técnicas descritas anteriormente cuando se utilizan concentraciones bajas de glicerol en la formulación. Sin embargo, el secado a vacío y usando vapor sobrecalentado a bajas presiones son técnicas más rápidas que dan lugar a películas más compactas y uniformes.

En los últimos años se han investigado otros métodos como la aplicación de infrarrojo, microondas, y el uso de prensa caliente y liofilización. La investigación realizada por SRINIVASA *et al.* [19] evaluó tres

diferentes métodos de secado, empleando horno de convección, luz infrarroja (80, 90 y 100°C) y a temperatura ambiente (27°C), y se concluyó que el método más rápido y eficiente fue el método de luz infrarroja. También se ha identificado que el uso de microondas es rápido y efectivo y da lugar a películas con una mayor uniformidad superficial y mejores propiedades de barrera a la luz ultravioleta [15]. Por otra parte, el empleo de prensa caliente (120°C y 20 MPa) permite la obtención de películas compuestas de quitosano, sulfato de condroitina, heparina y ácido hialurónico, sin necesidad de emplear agentes ligantes ni modificaciones químicas y estas se caracterizan por ser homogéneas, no porosas e insolubles en agua [20]. Esta última técnica permite obtener películas en multicapa de nanotubos de carbono y quitosano con mejores características, películas más homogéneas, traslúcidas y con poros distribuidos ordenadamente cuando la técnica es comparada con métodos de secado como liofilización y por convección de aire [21].

Se han estudiado algunos tratamientos térmicos realizados una vez que las películas de quitosano han sido obtenidas. El estudio desarrollado por FERNANDEZ-SAIZ *et al.* [17] analizó el efecto de la esterilización seca y húmeda de películas de quitosano y concluyó que las películas esterilizadas perdieron propiedades biocidas debido a que los grupos carboxilados disminuyeron comparado con los grupos de las películas sin esterilizar, adicionalmente las películas esterilizadas presentaron un incremento en la coloración amarilla debido a la formación de insaturaciones o compuestos coloreados. Por otra parte, en el artículo presentado por RITTHIDEJ *et al.* [22], se analizó el efecto del tratamiento térmico en húmedo al someter las películas de quitosano a condiciones de 60 °C y HR 75% y se concluyó que este tratamiento disminuyó la solubilidad acuosa de las películas, ya que se presentó un cambio en la interacción iónica, un mayor número de grupos alquilo y una menor cantidad de grupos carboxilo e hidroxilo que favoreció la formación de amidas homogéneas entre el quitosano y los ácidos orgánicos.

Los tratamientos de curado pueden mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas de quitosano tratadas, mientras se disminuye la capacidad de retención de agua, la permeabilidad al vapor de agua y se intensifica el color amarillo [23]. Resultados similares fueron obtenidos durante la investigación llevada a cabo por MUDARISOVA *et al.* [24], que evaluó el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades de transferencia de masa de las películas de quitosano. Se comprobó que al someter las películas a una temperatura de 120°C, se modificaba la estructura de la matriz polimérica ocasionando una disminución de la solubilidad acuosa y una disminución en la velocidad de liberación de los antibióticos cefazolina y cefotaxima contenidos en la película polimérica.

Estos tratamientos pueden ser aplicados para obtener polímeros con nuevas propiedades ópticas, como se demostró en la investigación de KUMAR *et al.* [25], el cual aplicó microondas para obtener un nuevo material óptico para aplicaciones biomédicas a partir de fenotiazina-quitosano. Este estudio concluyó que las películas obtenidas tienen un buen comportamiento morfológico superficial y térmico, así como propiedades ópticas de fotoluminiscencia

3.1.2. APLICACIÓN DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Solo algunas investigaciones han empleado fluidos supercríticos como solventes durante la obtención de películas de quitosano. Estos estudios han demostrado que el uso de fluidos supercríticos en comparación con el uso de solventes convencionales da lugar a películas más homogéneas y uniformes. Esto se debe a que los fluidos supercríticos penetran libremente en la matriz del polímero debido a la ausencia de fuerzas capilares que favorece la permeabilidad en la matriz [26, 27]. Adicionalmente, esta técnica se puede utilizar para fijar compuestos inorgánicos en matrices poliméricas al ser asegurar una homogénea deposición de carbonato de calcio en películas de quitosano y celulosa como método de mineralización [28].

3.1.3. APLICACIÓN DE RADIACIONES IONIZANTES

Se han desarrollado estudios donde se analiza la eficiencia en los procesos de copolimerización usando radiación ionizante con el objetivo de combinar las propiedades físicas y químicas de dos o más polímeros o monómeros [29-31]. Según CAI *et al.* [29], cuando las soluciones de quitosano y N-isopropil acrilamida fueron irradiadas, el porcentaje y eficiencia de integración incrementó con el aumento de la concentración de los polímeros empleados, así como con el aumento de la radiación gama suministrada durante la copolimerización. Adicionalmente, cuando soluciones de quitosano y almidón son sometidas a un proceso de radiación con rayos de electrones a 30 kGy, se aumenta la capacidad antimicrobiana de las películas, se disminuye la capacidad de absorción de agua y se favorece la dispersión de las microesferas de quitosano en la matriz de almidón debido a la degradación del quitosano. Sin embargo, no se reportan cambios en la cristalinidad después del tratamiento [30].

Por otra parte, al aplicar las radiaciones ionizantes sobre las películas copoliméricas se producen cam-

bios en sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y antimicrobianas debido a la alteración de las estructuras cristalinas de los polímeros y cambios en su microestructura [32]. Según KHAN *et al.* [33], se evidenció una pérdida de la viscoelasticidad y de la resistencia a la punción, así como una disminución de la permeabilidad al vapor de agua en las películas de quitosano y metilcelulosa irradiadas a 50 kGy. Por otra parte, cuando las radiaciones ionizantes son aplicadas sobre películas de quitosano y quitina carboximetilada, estas exhiben excelentes propiedades mecánicas, buena absorción de agua y una actividad antimicrobiana satisfactoria [34].

3.1.4. APLICACIÓN DE RADIACIONES NO IONIZANTES

Cuando las radiaciones no ionizantes son aplicadas sobre películas de quitosano se favorece la fotooxidación del quitosano y se induce al aumento en la polaridad por la formación de glutation o fenilalanina, especialmente en la superficie de las películas debido a la presencia de oxígeno [35-39].

La aplicación de radiaciones no ionizantes pueden inducir a cambios fotoquímicos en las soluciones de quitosano, ya que puede aumentar la estabilidad térmica y la solubilidad en agua de las macromoléculas, mientras alteran negativamente las propiedades mecánicas de las películas poliméricas, disminuyendo la resistencia a la tensión y porcentaje de elongación después del tratamiento [36, 37, 39]. Se ha comprobado que la radiación UV favorece la interacción del quitosano con fibras de celulosa y aumenta la estabilidad térmica del material [40].

Esta radiación puede ser empleada para disminuir la coloración de las soluciones de quitosano sin necesidad de emplear agentes químicos. El proceso da como resultado soluciones de viscosidad alta y de color blanco deseable, lo cual comparado con otros métodos reduce los tiempos y costos de producción y es un proceso más amigable con el medio ambiente y más continuo, ya que depende de una fuente de luz totalmente estable [41]. Por otra parte, se ha estudiado el efecto de la radiación con microondas durante el proceso de homogenización de soluciones de quitosano y se ha concluido que es una técnica que disminuye el tiempo de homogenización. Sin embargo, esta técnica induce a estados de agregación de las moléculas de quitosano y favorece la formación de redes poliméricas por puentes de hidrógeno que cambia el comportamiento térmico y morfológico del polímero en solución [42].

Adicionalmente, se ha evaluado el fenómeno de la fotodegradación sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano bajo la acción de la luz UV artificial y la radiación solar. El estudio comprobó que la radiación UV artificial comparada con la radiación solar tiene un efecto más significativo sobre las propiedades evaluadas debido a que el fenómeno de fotodegradaciones más marcado, siendo las películas de la mezcla de colágeno con quitosano y las películas de colágeno más sensibles [43].

3.1.5. APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS

Algunas investigaciones han evaluado el efecto de la aplicación de pulsos eléctricos sobre las propiedades de las películas de quitosano. Según GARCIA *et al.* [44], el carácter catiónico del quitosano permite emplear mecanismos para modificar las propiedades de película. Un tratamiento con pulsos eléctricos aplicados paralelamente a la superficie durante el secado de películas de quitosano y carboximetilcelulosa orientadas uniaxialmente, aumenta el orden estructural y puede llegar a ser una alternativa para mejorar su flexibilidad y sus propiedades de permeabilidad al vapor de agua, sin llegar a modificar su apariencia externa.

Resultados similares han sido reportados por otros autores, quienes demostraron que la aplicación de campos eléctricos antes y durante del secado de soluciones de quitosano, usando una fuente de calentamiento óhmico a 60° C con intensidades de campo de 50 a 200 Vcm⁻¹ y con corriente alterna de 50 Hz, dieron como resultado películas más cristalinas y se registraron valores de permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono más bajos, lo cual sugiere que es un tratamiento efectivo para ser aplicado en empaques para alimentos reduciendo las pérdidas de agua, la oxidación lipídica y otras reacciones metabólicas que pueden experimentar los alimentos empacados [45, 46].

3.1.6. PLASMA

La aplicación de plasma como tratamiento es considerada como una técnica muy eficiente y amigable con el medio ambiente y se utiliza para modificar de forma controlada las propiedades de hidrofobicidad y de superficie, sin alterar las características de las películas [47-50].

La deposición de compuestos como hexametildisilazano sobre películas de quitosano usando un reactor de plasma de placas paralelas es considerada como una técnica que favorece la conformación de superficies hidrófobas sin cambios en las propiedades ópticas ni mecánicas debido a la polimerización del hexametil

disilazano a estructuras de tipo silicona no polar [49]. Según WANG *et al.* [51], el tratamiento con oxígeno plasma puede mejorar la hidrofobicidad superficial de las películas de quitosano debido a la incorporación de oxígeno en los grupos polares, fenómeno que no es permanente y desaparece después de un corto tiempo debido a la reorientación de los grupos funcionales. Resultados similares fueron reportados por THEAPSAK *et al.* [52], VARTIAINEN *et al.* [53], VARTIAINEN *et al.* [54] y DEMINA *et al.* [55], quienes recomiendan la aplicación de plasma como técnica efectiva para aumentar la integración de las moléculas de quitosano con otros polímeros como polietileno, polipropileno, polietileno de baja densidad, y ácido poli-láctico y gelatina, respectivamente, con el objetivo de fabricar empaques multicapas con mejores propiedades físicas, mecánicas y antimicrobianas.

3.1.7. CONFORMACIÓN DE PELÍCULAS EN MULTICAPAS

Los empaques compuestos por multicapas se han diseñado y fabricados con el objetivo de combinar las ventajas de cada componente y obtener películas con propiedades específicas [56]. Estas películas son elaboradas usando un protocolo de deposición alternada de polielectrolitos cargados opuestamente, fenómeno que se produce por la interacción entre los compuestos, específicamente entre el polication y el polianion que conforma la película [57, 58]. El quitosano al ser un polication puede interactuar con moléculas cargadas negativamente [59], por lo cual se han analizado las propiedades de películas de quitosano en combinación con películas de biopolímeros, polímeros, proteínas, entre otros. Estos estudios han analizado la interacción de los polímeros durante la formación de las películas, así como el efecto de la distribución e interacciones de los compuestos sobre las propiedades físicas, antimicrobianas, químicas, entre otras [59-74]. Muchas aplicaciones han sido desarrolladas en campos de la investigación como en el área de electrónica [75-85], la inmovilización de enzimas [86-89], el desarrollo de nuevos materiales con propiedades ópticas específicas [81, 90-92], la liberación de compuestos [93-95], entre otras.

Algunas investigaciones han evaluado las propiedades de las películas de quitosano en multicapas. Se ha demostrado que la película bicapa de quitosano y gelatina posee mejores propiedades barrera al vapor de agua y mejores propiedades antimicrobianas, y se ha indicado que este fenómeno sucede debido a la interacción entre el quitosano catiónico y compuestos aniónicos de la gelatina [56, 59, 96]. Resultados similares fueron obtenidos por MEDEIROS *et al.* [97] y GALLSTEDT Y HEDENQVIST [98], quienes demostraron que el uso de películas de quitosano y pectina, o quitosano y polietileno/nitrocelulosa, respectivamente, pueden mejorar las propiedades de las películas, siendo el pH de la solución un factor que define las interacciones electrostáticas de las moléculas, así como su integración y estabilidad debido a una supresión de la carga de alguno de los poli-electrolitos [99]. La investigación realizada por PINHEIRO *et al.* [100], evaluó las características de la película formada de carragenina y concluyó que las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno y las uniones dipolo-dipolo entre los dos polisacáridos con cargas opuestas, produjeron películas con buenas propiedades mecánicas y de barrera a gases. Por otra parte, se estableció que las películas de quitosano y ácido hialurónico son más rugosas, rígidas y resistentes a la degradación enzimática que las películas de sus polímeros nativos, así como que sus propiedades de superficie promueven la adhesión y crecimiento celular [101].

Las películas de almidón de yuca y quitosano poseen una excelente interacción entre los componentes poliméricos, mejores propiedades superficiales y mecánicas, así como mayor capacidad para ser barrera al vapor de agua y un menor porcentaje de capacidad de retención de agua, comparado con las películas de almidón sin recubrir [102]. Adicionalmente, las películas de nitrocelulosa y polietileno con quitosano, presentan baja permeabilidad al oxígeno y excelentes propiedades de adhesión [98] y las películas compuestas por quitosano, monómero de silano y policaprolactato presentaron mayor resistencia a la tensión, menor permeabilidad al vapor de agua y una estructura más homogénea, densa y ordenada, debido principalmente a la presencia de silano en la matriz polimérica [103].

3.2. MODIFICACIONES ENZIMÁTICAS

La inmovilización de enzimas tiene como objetivo proveer una mayor estabilidad y capacidad de acción a la enzima. La inmovilización puede efectuarse por fenómenos de adsorción física, enlace iónico, enlace covalente, entrecruzamiento, microencapsulación, entre otros (104, 105, 106). En ocasiones, se emplea una fuerza mecánica de homogenización y agentes ligantes como el glutaraldehído para optimizar el proceso. Según LIAN *et al.* (2012), se determinó el método de inmovilización por enlace covalente fue más eficiente que el método de adsorción física y la condición óptima consistió en utilizar 2 mg/ml de la solución de lisozima, 5% (v/v) de glutaraldehído, durante un tiempo de ligación de 5 horas y un tiempo de inmovilización de 4 horas.

La inclusión de enzimas como lisozima y amilosa en la matriz polimérica, mejora las propiedades an-

timicrobianas de las películas de quitosano para *S. faecalis*, *S. aureus* y *E. coli*, ya que se presenta una actividad lítica de la pared celular de las bacterias y esta capacidad se conserva aún después de ocho días de almacenamiento [104, 105]. Este comportamiento puede atribuirse al rompimiento de la cadena del polímero y la consecuente exposición de los grupos amino, los cuales pueden interactuar más fácilmente con los microorganismos y mejorar las propiedades antimicrobianas de las películas [106].

El efecto antimicrobiano de las enzimas puede ser potencializado cuando se adiciona más de una enzima en la matriz polimérica y este es tan efectivo como el uso de conservantes artificiales como el EDTA. Este fenómeno se presenta debido al efecto sinérgico de compuestos como la lisozima y la lactoferrina [107].

A pesar que las enzimas se distribuyen homogéneamente en la matriz y que las propiedades de permeabilidad al vapor de agua no se alteran significativamente, sí se observa un incremento en la solubilidad en agua y en la pérdida de masa, así como una disminución de su resistencia y elongación de las películas de quitosano. Estos fenómenos se potencializan cuando la concentración del agente ligante, el tiempo y la temperatura de almacenamiento aumentan debido a que la acción de enzima para hidrolizar las moléculas de quitosano, se potencializa [104, 108, 109].

Por otra parte, las enzimas pueden ser utilizadas como agentes ligantes en películas compuestas por dos o más polímeros [110]. En películas de quitosano y proteína de suero, la adición de trasglutaminasa mejora las propiedades mecánicas, de permeabilidad al vapor de agua, al oxígeno y al dióxido de carbono y disminuye las interacciones con el agua al disminuir la solubilidad en agua y la capacidad de hinchamiento [111]. Adicionalmente, en películas de gelatina y quitosano, la inclusión de trasglutaminasa y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida retardan la degradación de las películas por la acción de la enzima pepsina y en menor medida para la tripsina, sin embargo no posee un efecto considerable para retardar la degradación por acción de la proteinasa N [112].

4. CONCLUSIONES

Existen diferentes tratamientos físicos y enzimáticos que se han aplicado en la obtención de películas de quitosano, los cuales modifican las propiedades físicas, químicas y antimicrobianas de las películas obtenidas. Estos avances han contribuido a aumentar los desarrollos en el campo de los materiales ya brindar nuevas soluciones para las aplicaciones que actualmente demandan las industrias.

Las principales modificaciones físicas llevadas a cabo en películas de quitosano han sido la aplicación de radiaciones, pulsos eléctricos, plasma, tratamientos térmicos, uso de fluidos supercríticos, así como la conformación de películas en multicapas y entre las modificaciones enzimáticas más relevantes se puede nombrar la inclusión de enzimas y coagentes enzimáticos en matrices poliméricas de quitosano.

La importancia del estudio es identificar los tipos y condiciones de los tratamientos que determinan las características específicas de las películas para aumentar la oferta de soluciones frente a los retos que afronta las aplicaciones en el campo de los materiales durante los últimos años.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Jóvenes Investigadores del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – *Colciencias* y a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia de la Sede Bogotá – *DIB*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] RINAUDO, M., "Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials", *Polymer International*, v. 57, pp. 397-430, Mar 2008.
- [2] THARANATHAN, R.N., KITTUR, F.S., "Chitin - The undisputed biomolecule of great potential", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, pp. 61-87, 2003.
- [3] RINAUDO M. "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Progress in Polymer Science*, v. 31, pp. 603-632, 2006.
- [4] CAMPOS, C.A., GERSCHENSON, L.N., FLORES, S.K., "Development of edible films and coatings with antimicrobial activity", *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, pp. 849-875, Aug 2011.
- [5] RAVI KUMAR, M.N.V., "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, pp. 1-27, 2000.
- [6] AGULLO, E., RODRIGUEZ, M.S., RAMOS, V., ALBERTENGO, L., "Present and future role of chitin and chitosan in food", *Macromolecular Bioscience*, v. 3, pp. 521-530, Oct 2003.

- [7] KHOR, E., LIM, L. Y., "Implantable applications of chitin and chitosan", *Biomaterials*, v. 24, pp. 2339-2349, 2003.
- [8] KIM, I.Y., SEO, S.J., MOON, H.S., et al., "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications", *Biotechnology Advances*, v. 26, pp. 1-21, 2008.
- [9] MUZZARELLI, R.A.A., MUZZARELLI, C., "Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences", In: HEINZE, T. (ed), *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use*, v. 186, Berlin, Alemania, Springer-Verlag Berlin, 2005, pp. 151-209.
- [10] PEPPAS, N.A., HILT, J.Z., KHADEMHOSEINI, A., et al., "Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology", *Advanced Materials*, v. 18, pp. 1345-1360, Jun 2006.
- [11] ŞENEL, S., MCCLURE, S.J., "Potential applications of chitosan in veterinary medicine", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, pp. 1467-1480, 2004.
- [12] YAMAZAKI, M., "The chemical modification of chitosan films for improved hemostatic and bioadhesive properties", Tesis de D.Sc., North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 2008.
- [13] CALLISTER, W.D., *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*, 1 ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- [14] MAYACHIEW, P., DEVAHASTIN, S., "Comparative evaluation of physical properties of edible chitosan films prepared by different drying methods", *Drying Technology*, v. 26, pp. 176-185, 2008.
- [15] CARDENAS, G., DIAZ, J., MELENDREZ, M.F., et al., "Physicochemical properties of edible films from chitosan composites obtained by microwave heating", *Polymer Bulletin*, v. 61, pp. 737-748, Dec 2008.
- [16] FERNANDEZ-PAN, I., ZIANI, K., PEDROZA-ISLAS, R., et al., "Effect of drying conditions on the mechanical and barrier properties of films based on chitosan", *Drying Technology*, v. 28, pp. 1350-1358, 2010.
- [17] FERNANDEZ-SAIZ, P., LAGARON, J.M., OCIO, M.J., "Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, pp. 3298-3307, Apr. 2009.
- [18] THAKHIEW, W., DEVAHASTIN, S., SOPONRONNARIT, S., "Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films", *Journal of Food Engineering*, v. 99, pp. 216-224, Jul 2010.
- [19] SRINIVASA, P.C., RAMESH, M.N., KUMAR, K.R., et al., "Properties of chitosan films prepared under different drying conditions", *Journal of Food Engineering*, v. 63, pp. 79-85, Jun 2004.
- [20] HASHIZUME, M., KOBAYASHI, H., OHASHI, M., "Preparation of free-standing films of natural polysaccharides using hot press technique and their surface functionalization with biomimetic apatite", *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 88, pp. 534-538, Nov 2011.
- [21] SUN, F., CHA, H.R., BAE, K., et al., "Mechanical properties of multilayered chitosan/CNT nanocomposite films", *Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing*, v. 528, pp. 6636-6641, Aug 2011.
- [22] RITTHIDEJ, C.C., PHAECHAMUD, T., KOIZUMI, T., "Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 232, pp. 11-22, Jan 2002.
- [23] RIVERO, S., GARCIA, M.A., PINOTTI, A., "Heat treatment to modify the structural and physical properties of chitosan-based films", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, pp. 492-499, Jan 2012.
- [24] MUDARISOVA, R.K., KULISH, E.I., KUZINA, L.G., et al., "Thermal modification of chitosan films as a way to control their transport properties", *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 82, pp. 1479-1482, Aug 2009.
- [25] KUMAR, S., DUTTA, J., DUTTA, P.K., "Preparation, characterization and optical property of chitosan-phenothiazine derivative by microwave assisted synthesis", *Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry*, v. 46, pp. 1095-1102, 2009.
- [26] CHASCHIN, I.S., GRIGOREV, T.E., GALLYAMOV, M.O., et al., "Direct deposition of chitosan macromolecules on a substrate from solutions in supercritical carbon dioxide: Solubility and conformational analysis", *European Polymer Journal*, v. 48, pp. 906-918, May 2012.

- [27] KING, J.W., WILLIAMS, L.L., "Utilization of critical fluids in processing semiconductors and their related materials", *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 7, pp. 413-424, 2003.
- [28] WAKAYAMA, H., HALL, S.R., MANN, S., "Fabrication of CaCO₃-biopolymer thin films using supercritical carbon dioxide", *Journal of Materials Chemistry*, v. 15, pp. 1134-1136, 2005.
- [29] CAI, H., ZHANG, Z. P., SUN, P. C., et al., "Synthesis and characterization of thermo- and pH-sensitive hydrogels based on Chitosan-grafted N-isopropylacrylamide via gamma-radiation", *Radiation Physics and Chemistry*, v. 74, pp. 26-30, Sep 2005.
- [30] ZHAI, M.L., ZHAO, L., YOSHII, F., et al., "Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation", *Carbohydrate Polymers*, v. 57, pp. 83-88, Aug 2004.
- [31] ZHAO, L., LUO, F., ZHAI, M.L., et al., "Study on CM-chitosan/activated carbon hybrid gel films formed with EB irradiation", *Radiation Physics and Chemistry*, v. 77, pp. 622-629, May 2008.
- [32] LI, B., LI, J., XIA, J., et al., "Effect of gamma irradiation on the condensed state structure and mechanical properties of konjac glucomannan/chitosan blend films", *Carbohydrate Polymers*, v. 83, pp. 44-51, Jan 2011.
- [33] KHAN, R.A., SALMIERI, S., DUSSAULT, D., et al., "Preparation and thermo-mechanical characterization of chitosan loaded methylcellulose-based biodegradable films: Effects of gamma radiation", *Journal of Polymers and the Environment*, v. 20, pp. 43-52, Mar 2012.
- [34] ZHAO, L., MITOMO, H., NAGASAWA, N., et al., "Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives", *Carbohydrate Polymers*, v. 51, pp. 169-175, Feb 2003.
- [35] PRAXEDES, A.P.P., DA SILVA, A.J.C., DA SILVA, R.C., et al., "Effects of UV irradiation on the wettability of chitosan films containing dansyl derivatives", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 376, pp. 255-261, Jun 2012.
- [36] SIONKOWSKA, A., WISNIEWSKI, M., SKOPINSKA, J., et al., "Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films", *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, pp. 3026-3032, Dec 2006.
- [37] SIONKOWSKA, A., SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J., PLANECKA, A., et al., "The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin", *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, pp. 2486-2491, Dec 2010.
- [38] SIONKOWSKA, A., KACZMAREK, H., WISNIEWSKI, M., et al., "The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films", *Surface Science*, v. 600, pp. 3775-3779, Sep 2006.
- [39] SIONKOWSKA, A., PLANECKA, A., KOZLOWSKA, J., et al., "Weathering of chitosan films in the presence of low- and high-molecular weight additives", *Carbohydrate Polymers*, v. 84, pp. 900-906, Mar 2011.
- [40] ALONSO, D., GIMENO, M., OLAYO, R., et al., "Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles", *Carbohydrate Polymers*, v. 77, pp. 536-543, Jul 2009.
- [41] YOUN, D.K., NO, H.K., KIM, D.S., et al., "Decoloration of chitosan by UV irradiation", *Carbohydrate Polymers*, v. 73, pp. 384-389, Aug 2008.
- [42] FUENTES, S., RETUERT, J., GONZALEZ, G., "Preparation and properties of chitosan hybrid films from microwave irradiated solutions", *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 53, pp. 1511-1514, Jun 2008.
- [43] SIONKOWSKA, A., "Effects of solar radiation on collagen and chitosan films", *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 82, pp. 9-15, Jan 2006.
- [44] GARCIA, M.A., PINOTTI, A., MARTINO, M., et al., "Electrically treated composite films based on chitosan and methylcellulose blends", *Food Hydrocolloids*, v. 23, pp. 722-728, May 2009.
- [45] SOUZA, B.W.S., CERQUEIRA, M.A., MARTINS, J.T., et al., "Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings", *Food Hydrocolloids*, v. 24, pp. 330-335, Jun 2010.
- [46] SOUZA, B.W.S., CERQUEIRA, M.A., CASARIEGO, A., et al., "Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings", *Food Hydrocolloids*, v. 23, pp. 2110-2115, Dec 2009.

- [47] ASSIS, O.B.G., "Change in hydrophilic characteristics of chitosan films by hmds plasma treatment", *Quimica Nova*, v. 33, pp. 603-606, 2010.
- [48] ZHAO, Y., TANG, S., MYUNG, S.W., et al., "Effect of washing on surface free energy of polystyrene plate treated by RF atmospheric pressure plasma", *Polymer Testing*, v. 25, pp. 327-332, 2006.
- [49] TOUFIK, M., MAS, A., SHKINEV, V., et al., "Improvement of performances of PET track membranes by plasma treatment", *European Polymer Journal*, v. 38, pp. 203-209, 2002.
- [50] GANCARZ, I., POŹNIAK, G., BRYJAK, M., "Modification of polysulfone membranes: 3. Effect of nitrogen plasma", *European Polymer Journal*, v. 36, pp. 1563-1569, 2000.
- [51] WANG, Y.J., YIN, S.H., REN, L., et al., "Surface characterization of the chitosan membrane after oxygen plasma treatment and its aging effect", *Biomedical Materials*, v. 4, Jun 2009.
- [52] THEAPSAK, S., WATTHANAPHANIT, A., RUJIRAVANIT, R., "Preparation of chitosan-coated polyethylene packaging films by DBD plasma treatment", *Acs Applied Materials & Interfaces*, v. 4, pp. 2474-2482, May 2012.
- [53] VARTIAINEN, J., RATTO, M., TAPPER, U., et al., "Surface modification of atmospheric plasma activated BOPP by immobilizing chitosan", *Polymer Bulletin*, v. 54, pp. 343-352, Jul 2005.
- [54] VARTIAINEN, J., TUOMINEN, M., NATTINEN, K., "Bio-hybrid nanocomposite coatings from sonicated chitosan and nanoclay", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 116, pp. 3638-3647, Jun 2010.
- [55] DEMINA, T.S., YABLOKOV, M.Y., GIL'MAN, A.B., et al., "Effect of direct-current discharge treatment on the surface properties of chitosan-poly(L,L-lactide)-gelatin composite films", *High Energy Chemistry*, v. 46, pp. 60-64, Jan 2012.
- [56] RIVERO, S., GARCIA, M.A., PINOTTI, A., "Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan", *Journal of Food Engineering*, v. 90, pp. 531-539, Feb 2009.
- [57] NOGUEIRA, G.M., SWISTON, A.J., BEPPU, M.M., et al., "Layer-by-layer deposited chitosan/silk fibroin thin films with anisotropic nanofiber alignment", *Langmuir*, vol. 26, pp. 8953-8958, Jun 2010.
- [58] MAURSTAD, G., BAUSCH, A.R., SIKORSKI, P., et al., "Electrostatically self-assembled multilayers of chitosan and xanthan studied by atomic force microscopy and micro-interferometry," *Macromolecular Symposia*, v. 227, pp. 161-172, Jul 2005.
- [59] MIHAI, M., "Novel biocompatible chitosan based multilayer films", *Romanian Biotechnological Letters*, v. 16, pp. 6313-6321, Jul-Aug 2011.
- [60] ZHANG, G.J., GAO, X., JI, S.L., et al., "One-step dynamic assembly of polyelectrolyte complex membranes", *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 29, pp. 1877-1884, Aug 2009.
- [61] VAN DER HEYDEN, A., WILCZEWSKI, M., LABBE, P., et al., "Multilayer films based on host-guest interactions between biocompatible polymers", *Chemical Communications*, pp. 3220-3222, 2006.
- [62] SCHNEIDER, A., RICHERT, L., FRANCIUS, G., et al., "Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films", *Biomedical Materials*, v. 2, pp. S45-S51, Mar 2007.
- [63] LUNDIN, M., BLOMBERG, E., TILTON, R.D., "Polymer dynamics in layer-by-layer assemblies of chitosan and heparin", *Langmuir*, v. 26, pp. 3242-3251, Mar 2010.
- [64] LUNDIN, M., SOLAQA, F., THORMANN, E., et al., "Layer-by-layer assemblies of chitosan and heparin: Effect of solution ionic strength and pH", *Langmuir*, v. 27, pp. 7537-7548, Jun 2011.
- [65] LU, H.Y., HU, N.F., "Loading behavior of {chitosan/hyaluronic acid}(n) layer-by-layer assembly films toward myoglobin: An electrochemical study", *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, pp. 23710-23718, Nov 2006.
- [66] LIU, Y.L., YU, C.H., LEE, K.R., et al., "Chitosan/poly(tetrafluoroethylene) composite membranes using in pervaporation dehydration processes", *Journal of Membrane Science*, v. 287, pp. 230-236, Jan 2007.
- [67] KUJAWA, P., MORAILLE, P., SANCHEZ, J., et al., "Effect of molecular weight on the exponential growth and morphology of hyaluronan/chitosan multilayers: A surface plasmon resonance spectroscopy and atomic force microscopy investigation", *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, pp. 9224-9234, Jun 2005.
- [68] HUGUENIN, F., ZUCOLOTTI, V., CARVALHO, A.J.F., et al., "Layer-by-layer hybrid films incorporating WO₃, TiO₂, and chitosan", *Chemistry of Materials*, v. 17, pp. 6739-6745, Dec 2005.

- [69] HUGUENIN, F., GONZALEZ, E.R., OLIVEIRA, O.N., et al., "Electrochemical and electrochromic properties of layer-by-layer films from WO₃ and chitosan", *Journal of Physical Chemistry B*, v. 109, pp. 12837-12844, Jul 2005.
- [70] CHEN, J., CHEN, X., YIN, X., et al., "Bioinspired fabrication of composite pervaporation membranes with high permeation flux and structural stability", *Journal of Membrane Science*, v. 344, pp. 136-143, Nov 2009.
- [71] CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B. W.S., et al., "Physical and thermal properties of a chitosan/alginate nanolayered PET film", *Carbohydrate Polymers*, v. 82, pp. 153-159, Aug 2010.
- [72] CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., et al., "Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production", *Carbohydrate Polymers*, v. 85, pp. 522-528, Jun 2011.
- [73] CADO, G., KERDJOUDJ, H., CHASSEPOT, A., et al., "Polysaccharide films built by simultaneous or alternate spray: A rapid way to engineer biomaterial surfaces", *Langmuir*, v. 28, pp. 8470-8478, Jun 2012.
- [74] BRATSKAYA, S., MARININ, D., SIMON, F., et al., "Adhesion and viability of two enterococcal strains on covalently grafted chitosan and chitosan/kappa-carrageenan multilayers", *Biomacromolecules*, v. 8, pp. 2960-2968, Sep 2007.
- [75] BOUDOU, T., CROUZIER, T., AUZELY-VELTY, R., et al., "Internal composition versus the mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films: The influence of chemical cross-linking", *Langmuir*, v. 25, pp. 13809-13819, Dec 2009.
- [76] ALMODOVAR, J., PLACE, L. W., GOGOLSKI, J., et al., "Layer-by-layer assembly of polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers: a spectroscopic study of hydrophilicity, composition, and ion pairing", *Biomacromolecules*, v. 12, pp. 2755-2765, Jul 2011.
- [77] ANNAMALAI, S.K., PALANI, B., PILLAI, K.C., "Highly stable and redox active nano copper species stabilized functionalized-multiwalled carbon nanotube/chitosan modified electrode for efficient hydrogen peroxide detection", *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 395, pp. 207-216, Feb 2012.
- [78] CAO, X.D., DONG, H., LI, C.M., et al., "The enhanced mechanical properties of a covalently bound chitosan-multiwalled carbon nanotube nanocomposite", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 113, pp. 466-472, Jul 2009.
- [79] CHEN, Q.P., AI, S.Y., ZHU, X.B., et al., "A nitrite biosensor based on the immobilization of Cytochrome c on multi-walled carbon nanotubes-PAMAM-chitosan nanocomposite modified glass carbon electrode", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 24, pp. 2991-2996, Jun 2009.
- [80] COCHE-GUERENTE, L., DESBRIERES, J., FATISSON, J., et al., "Physicochemical characterization of the layer-by-layer self-assembly of polyphenol oxidase and chitosan on glassy carbon electrode", *Electrochimica Acta*, v. 50, pp. 2865-2877, May 2005.
- [81] DOS SANTOS, D.S., BASSI, A., RODRIGUES, J.J., et al., "Light-induced storage in layer-by-layer films of chitosan and an azo dye", *Biomacromolecules*, v. 4, pp. 1502-1505, Nov-Dec 2003.
- [82] JAFRI, S.H.M., DUTTA, J., SWEATMAN, D., et al., "Current-voltage characteristics of layer-by-layer self-assembled colloidal thin films", *Applied Physics Letters*, v. 89, Sep 2006.
- [83] KOMATHI, S., GOPALAN, A.I., LEE, K.P., et al., "Fabrication of a novel layer-by-layer film based glucose biosensor with compact arrangement of multi-components and glucose oxidase", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 24, pp. 3131-3134, Jun 2009.
- [84] MISCORIA, S.A., DESBRIERES, J., BARRERA, G.D., et al., "Glucose biosensor based on the layer-by-layer self-assembling of glucose oxidase and chitosan derivatives on a thiolated gold surface", *Analytica Chimica Acta*, v. 578, pp. 137-144, Sep 2006.
- [85] VASCONCELLOS, F.C., SWISTON, A.J., BEPPU, M.M., et al., "Bioactive polyelectrolyte multilayers: Hyaluronic acid mediated B lymphocyte adhesion", *Biomacromolecules*, v. 11, pp. 2407-2414, Sep 2010.
- [86] CONSTANTINE, C.A., MELLO, S.V., DUPONT, A., et al., "Layer-by-layer self-assembled chitosan/poly(thiophene-3-acetic acid) and organophosphorus hydrolase multilayers", *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, pp. 1805-1809, Feb 2003.

- [87] CASELI, L., DOS SANTOS, D.S., FOSCHINI, M., et al., "The effect of the layer structure on the activity of immobilized enzymes in ultrathin films", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 303, pp. 326-331, Nov 2006.
- [88] CASELI, L., DOS SANTOS, D.S., FOSCHINI, M., et al., "Control of catalytic activity of glucose oxidase in layer-by-layer films of chitosan and glucose oxidase", *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, v. 27, pp. 1108-1110, Sep 2007.
- [89] Aravind, U.K., Mathew, J., Aravindakumar, C.T., "Transport studies of BSA, lysozyme and ovalbumin through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane", *Journal of Membrane Science*, v. 299, pp. 146-155, Aug 2007.
- [90] COSTA, R.R., CUSTODIO, C.A., ARIAS, F.J., et al., "Layer-by-Layer Assembly of Chitosan and Recombinant Biopolymers into Biomimetic Coatings with Multiple Stimuli-Responsive Properties", *Small*, v. 7, pp. 2640-2649, Sep 2011.
- [91] KAMBUROVA, K., MILKOVA, V., PETKANICHIN, I., et al., "Effect of pectin charge density on formation of multilayer films with chitosan", *Biomacromolecules*, v. 9, pp. 1242-1247, Apr 2008.
- [92] NURAJE, N., ASMATULU, R., COHEN, R.E., et al., "Durable antifog films from layer-by-layer molecularly blended hydrophilic polysaccharides", *Langmuir*, v. 27, pp. 782-791, Jan 2011.
- [93] GRECH, J.M.R., MANO, J.F., REIS, R.L., "Chitosan beads as templates for layer-by-layer assembly and their application in the sustained release of bioactive agents", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 23, pp. 367-380, Jul 2008.
- [94] GUZMAN, E., CAVALLO, J.A., CHULIA-JORDAN, R., et al., "pH-induced changes in the fabrication of multilayers of poly(acrylic acid) and chitosan: fabrication, properties, and tests as a drug storage and delivery system", *Langmuir*, v. 27, pp. 6836-6845, Jun 2011.
- [95] HU, X. F., JI, J., "Construction of multifunctional coatings via layer-by-layer assembly of sulfonated hyperbranched polyether and chitosan", *Langmuir*, v. 26, pp. 2624-2629, Feb 2010.
- [96] PEREDA, M., PONCE, A.G., MARCOVICH, N.E., et al., "Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity", *Food Hydrocolloids*, v. 25, pp. 1372-1381, Jul 2011.
- [97] MEDEIROS, B.G.D., PINHEIRO, A.C., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., et al., "Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan - Evaluation of its gas barrier properties and application on 'Tommy Atkins' mangoes", *Journal of Food Engineering*, v. 110, pp. 457-464, Jun 2012.
- [98] GALLSTEDT, M., HEDENQVIST, M.S., "Oxygen and water barrier properties of coated whey protein and chitosan films", *Journal of Polymers and the Environment*, v. 10, pp. 1-4, Apr 2002.
- [99] MARUDOVA, M., LANG, S., BROWNSEY, G.J., et al., "Pectin-chitosan multilayer formation", *Carbohydrate Research*, v. 340, pp. 2144-2149, Sep 2005.
- [100] PINHEIRO, A.C., BOURBON, A.I., MEDEIROS, B.G.D., et al., "Interactions between kappa-carrageenan and chitosan in nanolayered coatings-Structural and transport properties", *Carbohydrate Polymers*, v. 87, pp. 1081-1090, Jan 2012.
- [101] CROLL, T.I., O'CONNOR, A.J., STEVENS, G.W., et al., "A blank slate? Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and chitosan onto various surfaces", *Biomacromolecules*, v. 7, pp. 1610-1622, May 2006.
- [102] BANGYEKAN, C., AHT-ONG, D., SRIKULKIT, K., et al., "Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films", *Carbohydrate Polymers*, v. 63, pp. 61-71, Jan 2006.
- [103] SHARMIN, N., KHAN, R.A., SALMIERI, S., et al., "Effectiveness of silane monomer on chitosan films and PCL-based tri-layer films", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 125, pp. 224-232, Jul 2012.
- [104] PARK, S.I., DAESCHEL, M.A., ZHAO, Y., "Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films", *Journal of Food Science*, v. 69, pp. M215-M221, Oct 2004.
- [105] LIAN, Z.X., MA, Z.S., WEI, J., et al., "Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings", *Process Biochemistry*, v. 47, pp. 201-208, Feb 2012.
- [106] SUZUKI, S., YING, B., YAMANE, H., et al., "Surface structure of chitosan and hybrid chitosan-amylose films - restoration of the antibacterial properties of chitosan in the amylose film", *Carbohydrate Research*, v. 342, pp. 2490-2493, Nov 2007.

- [107] BROWN, C.A., WANG, B.W., OH, J.H., "Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film", *Journal of Food Protection*, v. 71, pp. 319-324, Feb 2008.
- [108] DUAN, J., KIM, K., DAESCHEL, M.A., et al., "Storability of antimicrobial chitosan-lysozyme composite coating and film-forming solutions", *Journal of Food Science*, v. 73, pp. M321-M329, Aug 2008.
- [109] ALTINISIK, A., YURDAKOC, K., "Synthesis, Characterization, and Enzymatic Degradation of Chitosan/PEG Hydrogel Films", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 122, pp. 1556-1563, Nov 2011.
- [110] PORTA, R., MARINIELLO, L., DI PIERRO, P., et al., "Transglutaminase crosslinked pectin- and chitosan-based edible films: A review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, pp. 223-238, 2011.
- [111] DI PIERRO, P., CHICO, B., VILLALONGA, R., et al., "Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties", *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 744-749, Mar 2006.
- [112] SZTUKA, K., KOŁODZIEJSKA, I., "Effect of transglutaminase and EDC on biodegradation of fish gelatin and gelatin-chitosan films", *European Food Research and Technology*, v. 226, pp. 1127-1133, Mar 2008.