

## **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DISOLUCIONES Y PELÍCULAS DE QUITOSANA CON EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CÚRCUMA**

Pedro Badillo<sup>1\*</sup>, Mario A. García<sup>2</sup>, Ana S. Falco<sup>3</sup>, Pedro Borges<sup>3</sup> y Alicia Casariego<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Gastronomía, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1½, Riobamba, Chimborazo, Ecuador.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi. Av. Simón Rodríguez s/n Barrio El Ejido, Sector San Felipe, Latacunga, Ecuador.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3½, CP 19200, La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Calle 222 No. 2317, CP 13600, La Habana, Cuba.

E-mail: pedroabadilloa79@hotmail.com

Recibido: 13-03-2019 / Revisado: 21-03-2019 / Aceptado: 02-04-2018 / Publicado: 30-04-2019

### **RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las concentraciones de polímero y extracto hidroalcohólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) en la actividad antimicrobiana de disoluciones y películas de quitosana de 275 kDa de masa molecular y grado de desacetilación de 75 %, obtenida por N-desacetilación de la quitina de langosta común (*Panulirus argus*). De forma general, todos los tratamientos, transcurridos 8 h de la inoculación, inhibieron el desarrollo de las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* evaluadas, aunque los tratamientos resultaron más efectivos contra *St. aureus*.

**Palabras clave:** actividad antimicrobiana, películas de quitosana, disoluciones de quitosana, extracto hidroalcohólico de cúrcuma, *Curcuma longa*.

### **ABSTRACT**

#### **Antimicrobial activity of solutions and films of chitosan with turmeric hydroalcoholic extract**

The objective of the present work was to evaluate the effect of the polymer and turmeric (*Curcuma longa* L.) hydroalcoholic extract concentrations on the antimicrobial activity of solutions and films of chitosan with 275 kDa of molecular mass and degree of deacetylation of 75%, obtained by N-deacetylation of chitin from common lobster (*Panulirus argus*). In general, all the treatments, after 8 h of the inoculation, inhibited the development of the strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* evaluated, although the treatments were more effective against *St. aureus*.

**Keywords:** antimicrobial activity, solutions of chitosan, films of chitosan, turmeric hydroalcoholic extract, *Curcuma longa*.

### **INTRODUCCIÓN**

El estilo de vida de los consumidores actuales, unido al deseo de adquirir productos naturales y beneficiosos para la salud, ha motivado que el consumo de alimentos frescos se haya incrementado en los últimos años (1). Por ello, resulta necesario el desarrollo de tecnologías de conservación que retrasen los procesos de deterioro y mantengan la calidad e inocuidad

---

\***Pedro Arturo Badillo Arévalo:** Licenciado en Gestión Gastronómica (Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, 2009). Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Universidad de La Habana, 2016). Actualmente se encuentra cursando el Doctorado Curricular Colaborativo en Ciencias de los Alimentos en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. Se desempeña como docente en la Escuela de Gastronomía de la ESPOCH.

microbiológica durante la comercialización de los productos alimenticios, especialmente de frutas y hortalizas enteras y mínimamente procesadas (2).

Una alternativa a esta problemática, la constituyen los recubrimientos biodegradables elaborados a partir de varios polímeros como la quitosana, los cuales previenen el deterioro y prolongan la vida útil de los productos hortofrutícolas (3, 4), aunque muchos investigadores han combinado la quitosana con extractos y aceites esenciales derivados de productos naturales para potenciar su efecto antioxidante y antimicrobiano en determinadas aplicaciones (5).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de polímero y extracto hidroalcohólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) en la actividad antimicrobiana de disoluciones y películas de quitosana obtenida por N-desacetilación de la quitina de langosta común (*Panulirus argus*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una quitosana de 275 kDa de masa molecular y grado de desacetilación de 75 %, producida en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (La Habana, Cuba), por N-desacetilación de la quitina de langosta común (*P. argus*). Para preparar las disoluciones formadoras de película (DFP) se emplearon, además, Tween 80 (Acros Organics, Bélgica), ácido láctico 90 % (Merck, Alemania), extracto hidroalcohólico de cúrcuma (EHC) con una concentración de polifenoles totales de 5,5 µg/µL obtenido en el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (La Habana) y agua destilada.

Las DFP se prepararon con quitosana al 1,5 y 2,0 % (m/v) en disolución al 1 % de ácido láctico con agitación magnética durante 2 h. Luego se adicionó Tween 80 al 0,1 % (v/v) y EHC al 0,2 y 0,4 % (v/v), para obtener varias combinaciones (Tabla 1). Las disoluciones se envasaron en frascos de vidrio estériles hasta la evaluación de su actividad antimicrobiana *in vitro* mediante un reto microbiano.

Las películas se obtuvieron de acuerdo a uno de los métodos propuestos (5). Las películas de quitosana y cúrcuma se acondicionaron en bolsas de doble cierre Ziploc® (Thai Griptech Co. LTD, Tailandia) y a su vez en desecadora en condiciones de humedad relativa controlada entre 21 y 22 % mediante una disolución saturada de acetato de potasio, hasta la evaluación de su actividad antimicrobiana.

Las concentraciones de quitosana fueron seleccionadas sobre la base de lo reportado (6) en cuanto a las propiedades físicas de las películas, mientras que las de EHC fueron asumidas a partir de las concentraciones mínimas inhibitorias de este extracto para diferentes microorganismos (7).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las DFP y películas de quitosana con adición de EHC, se emplearon los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (patógeno Gram-positiva); *Escherichia coli* ATCC 25922 (patógeno Gram-negativa); *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (microorganismo contaminante de alimentos, Gram-positiva y esporulado); *Fusarium* sp.; *Penicillium* sp. y *Sacharomyces cerevisiae*.

**Tabla 1. Combinaciones de disoluciones y películas de quitosana y extracto hidroalcohólico de cúrcuma elaboradas**

Tratamiento	Disolución formadora de película			
	Quitosana (% m/v)	Extracto hidroalcohólico de cúrcuma (% v/v)	Ácido láctico (% v/v)	Tween 80 (% v/v)
Q1	1,5	0,0	1,0	0,1
Q1C1	1,5	0,2	1,0	0,1
Q1C2	1,5	0,4	1,0	0,1
Q2	2,0	0,0	1,0	0,1
Q2C1	2,0	0,2	1,0	0,1
Q2C2	2,0	0,4	1,0	0,1

Las suspensiones microbianas se prepararon a partir de cultivos jóvenes de menos de 24 h. Se tomó una porción de cada cultivo y se suspendió en agua destilada estéril, se agitó en un vortex para homogeneizar el contenido y se calculó la concentración microbiana mediante la escala McFarland. Se ajustó la misma mediante diluciones en agua a  $10^4$  ufc/mL.

Para realizar el reto microbiano en las DFP, se dispuso una alícuota de cada uno de los microorganismos a los tubos que contenían las DFP, se homogeneizaron nuevamente y se sembraron en los medios específicos de cada microorganismo para tener el conteo (log ufc/mL) al inicio; se incubaron las placas a  $35 \pm 1$  °C y se contaron a las 24 y 72 h.

Los microorganismos se mantuvieron en contacto con las DFP durante 6 h y se sembraron en los tiempos 2; 4 y 6 h; se siguió el mismo procedimiento que se describe en el párrafo anterior. Esta experiencia se realizó por triplicado.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las películas se prepararon placas vertidas con los medios selectivos específicos para cada microorganismo y se inocularon con 0,1 mL de las suspensiones microbianas, se diseminaron los microorganismos con espátula de Drigalsky y sobre la superficie se colocaron 3 discos de 1 cm de diámetro de las películas en estudio. Se incubaron las placas sin invertir y se realizó la medición de los halos de inhibición a las 24 h. Se incubaron nuevamente y se comprobó la medición a las 72 h. Los resultados se expresaron en mm como la diferencia entre el contorno de los discos y la zona de inhibición.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 muestra los resultados de la actividad antimicrobiana de las DFP al 1,5 y 2,0 % (m/v) de quitosana con diferentes concentraciones de EHC frente a microorganismos causantes del deterioro de alimentos y patógenos. De forma general, se observa que en todos los casos, transcurridas 8 h de la inoculación, se inhibió el desarrollo de las cepas de *E. coli*, *St. aureus* y *B. subtilis* evaluadas, aunque los tratamientos resultaron más efectivos contra *St. aureus*, caso en el que se inhibió dicho microorganismo al cabo de las 3 h de realizarse la inoculación, lo que coincide con los reportes que indican que la quitosana muestra mayores efectos bactericidas para bacterias Gram-positivas

que para bacterias Gram-negativas (8). El mecanismo de su acción antimicrobiana no está totalmente dilucidado, aunque los investigadores coinciden en tres posibles acciones: carácter catiónico, agente quelante y penetración al interior de la célula (9).

En el caso de *E. coli*, las DFC de quitosana al 1,5 % (m/v) (Q1, Q1C1 y Q1C2) presentaron la mayor capacidad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de esta bacteria a las 3 h de incubación, sin que se observaran diferencias ( $p \leq 0,05$ ) atribuibles a la adición de EHC. Al aumentar la concentración de quitosana hasta 2,0 % (m/v) en las DFC no se incrementó la inhibición, aunque en este caso, a diferencia de las DFC de quitosana al 1,5 % (m/v), se observó un efecto beneficioso del EHC a las concentraciones de 0,2 y 0,4 % (v/v), aunque de poca influencia, desde un punto de vista práctico, en la actividad antimicrobiana contra los microorganismos estudiados.

En trabajos anteriores se refiere que altas concentraciones de quitosana (2,0 % m/v) son menos efectivas que las bajas concentraciones (0,5 y 1,0 % m/v), puesto que a estas últimas, la quitosana se une a componentes aniónicos de la membrana celular y causa la muerte por pérdida de los componentes intracelulares, mientras que, a altas concentraciones la quitosana adicional se aloja alrededor de la célula para obstaculizar esta pérdida de componentes (10), aunque otros investigadores encontraron que la habilidad de inhibición de la quitosana se incrementa con su concentración (11, 12).

La actividad inhibitoria de la quitosana contra bacterias Gram-negativas está mayormente relacionada con sus propiedades químicas y estructurales. Su actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas se incrementa cuanto mayor sea la masa molecular del polímero, porque este se ubica alrededor de la célula e inhibe la absorción de nutrientes, mientras que en las Gram-negativas se une al ADN impidiendo la replicación celular y causando disturbios en el metabolismo (13).

Aunque los oligómeros de quitosana se han observado dentro de *E. coli*, en la mayoría de los casos es difícil que la quitosana atraviese directamente la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Sin embargo, la carga positiva del  $\text{NH}_3^+$  de la quitosana puede interactuar con la superficie de las bacterias Gram-negativas, la cual consiste predominantemente de componentes

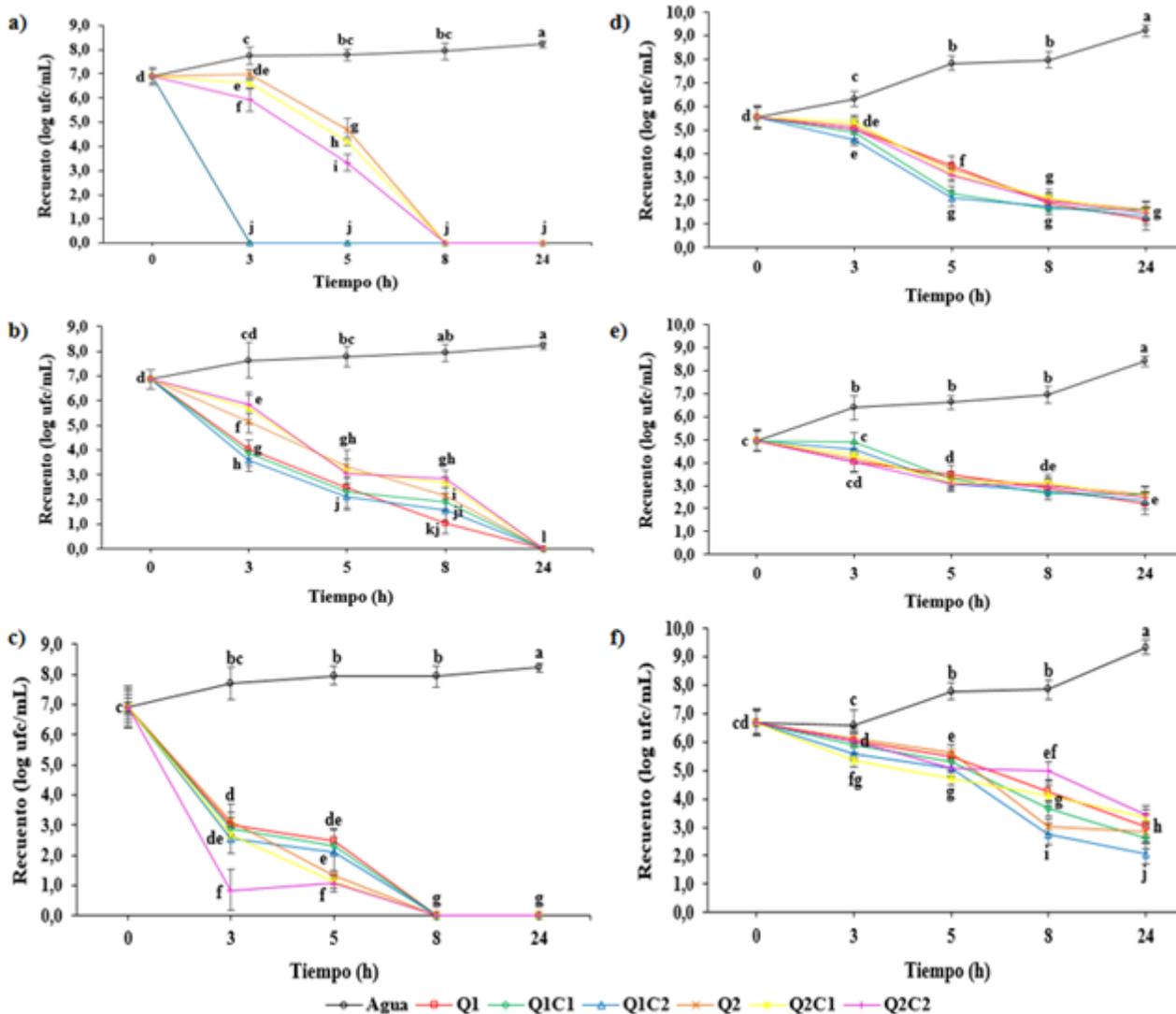


Fig. 1. Actividad antimicrobiana de las disoluciones formadoras de coberturas de quitosana con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de cúrcuma contra a) *E. coli*, b) *St. aureus*, c) *B. subtilis*, d) *Fusarium sp.*, e) *Penicillium sp.*, f) *S. cerevisiae* (n = 3). Las barras de error indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

aniónicos como lipopolisacáridos, fosfolípidos y lipoproteínas (14). Esta interacción pudiera afectar la organización de la membrana externa e incrementar su permeabilidad y, en consecuencia, la quitosana penetraría al interior de la célula. Otros estudios confirman una destrucción de la membrana externa por la quitosana en bacterias como *E. coli*, *Klebsiella* y *Staphylococcus* (15, 16).

Los resultados respecto a las propiedades inhibitorias de la quitosana explican que su efecto es mayor contra las bacterias Gram-negativas (17, 18) y su acción

antimicrobiana es dependiente de la masa molecular, grado de desacetilación y tipo de microorganismo (8, 19-21).

Algunos estudios revelan que el mecanismo de actividad antimicrobiana de la quitosana está relacionado, también, con el tiempo de exposición y propiedades físicas y químicas de las DFC, además de las características intrínsecas de los microorganismos (22).

Se ha encontrado que las sales cuaternarias de quitosana son veinte veces más efectivas contra *E. coli* que la quitosana nativa (23). Este comportamiento se atribuye a las diferencias entre las especies microbianas, pero en la mayoría de los casos, su acción principal es la interacción electrostática que conduce a una lisis de la pared celular exterior (24). Sin embargo, existe controversia respecto a si la quitosana disuelta en ácido es un antimicrobiano más eficaz que la hidrosoluble. En este sentido, se informó que la disuelta en agua no tuvo ninguna actividad antimicrobiana significativa contra los microorganismos probados (25).

Diferentes quitosanas inhibieron el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram-negativas, aunque los efectos inhibitorios estuvieron influidos por la masa molecular, grado de desacetilación y concentración de la DFC (26). Al mismo tiempo pudo observarse, similar a este estudio, que las DFC de quitosanas presentaron mayor actividad antimicrobiana para las bacterias Gram-positivas que para las Gram-negativas, como ha sido reportado también en otros trabajos (19, 27).

La Tabla 2 muestra los resultados de la capacidad antagonista de las películas de quitosana con diferentes concentraciones de EHC frente a microorganismos causantes del deterioro de alimentos y patógenos. Como se observa, todas las películas inhibieron el crecimiento de los microorganismos evaluados, aunque se diferenciaron en el grado de intensidad. Es evidente que

las películas incrementaron el potencial antimicrobiano de la quitosana respecto a las DFP, lo cual puede asociarse al efecto de liberación controlada mediante difusión de los componentes bioactivos desde la película.

Las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa formada por lipopolisacáridos que proporcionan una superficie hidrofílica a la bacteria. Los componentes lipídicos y moléculas de lipopolisacáridos contienen grupos aniónicos (fosfatos, carboxilos) que contribuyen a la estabilidad de la capa de lipopolisacáridos a través de las interacciones electrostáticas con los cationes divalentes (28). La eliminación de estos cationes por agentes quelantes como el EDTA y la quitosana (9) resulta en la desestabilización de la membrana externa a través de la liberación de moléculas de lipopolisacáridos. La membrana externa sirve como una barrera contra la penetración de macromoléculas y compuestos hidrófobos. Así, las bacterias Gram-negativas son relativamente resistentes a los antibióticos hidrófobos y drogas. Por consiguiente, superar la membrana externa es un requisito previo de cualquier material para ejercer la actividad bactericida hacia las bacterias Gram-negativas (29).

Los polianiones en la superficie de la célula también toman parte en las interacciones electrostáticas con la quitosana y sus derivados. La carga negativa en la superficie celular de las bacterias Gram-negativas es superior

**Tabla 2. Actividad antimicrobiana de las películas de quitosana con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de cúrcuma contra microorganismos indicadores**

Tratamiento	Microorganismo					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>St. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicilium</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i>
Agua	0,0* (0,0) k	0,0 (0,0) k	0,0 (0,0) k	0,0 (0,0) k	0,0 (0,0) k	0,0 (0,0) k
Q1	1,0 (0,0) j	1,0 (0,0) j	2,5 (0,7) gh	2,0 (0,0) hi	1,0 (0,1) j	1,5 (0,2) ij
Q1C1	2,0 (0,0) hi	5,0 (0,1) cd	5,0 (0,1) cd	3,5 (0,2) f	2,0 (0,3) hi	1,5 (0,2) ij
Q1C2	2,5 (0,7) gh	6,0 (0,1) b	5,5 (0,3) bc	4,5 (0,1) de	3,5 (0,5) f	2,0 (0,2) hi
Q2	1,0 (0,0) j	2,0 (0,0) hi	2,5 (0,3) gh	1,0 (0,3) j	1,5 (0,2) ij	1,5 (0,1) ij
Q2C1	2,0 (0,0) hi	1,0 (0,1) j	2,5 (0,2) gh	5,0 (0,3) cd	3,0 (0,2) fg	3,5 (0,2) f
Q2C2	9,5 (0,7) a	9,5 (0,2) a	2,0 (0,0) hi	5,0 (0,2) cd	4,0 (0,1) ef	3,5 (0,1) f

\*Diferencia entre el contorno de la película y la zona de inhibición.

Media (Desviación estándar); n = 5.

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

que en las bacterias Gram-positivas, lo que conlleva a más quitosana adsorbida y un efecto inhibitorio mayor contra las bacterias Gram-negativas (30).

La pared celular de las bacterias Gram-positivas comprende el péptidoglicano y ácido teicoico. Este último es un polímero polianiónico esencial de la pared celular de bacterias Gram-positivas, que puede unirse covalentemente al ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglicano o anclarse en el exterior de la membrana citoplasmática. Los grupos poli-(glicerol fosfato) hacen al ácido teicoico responsable de la estabilidad estructural de la pared celular. Además, es crucial para la función de varias enzimas de la membrana (31).

La adición de aceites esenciales de romero y tomillo (1:1) mejoraron las propiedades antimicrobianas de películas de quitosana frente a patógenos como *E. coli*, *St. aureus* y *B. cereus* (32). Este fenómeno se debe a la acción de compuestos fenólicos como  $\alpha$ -pineno, acetato de bornilo, alcanfor, 1,8-cineol, timol, carvacrol y *p*-cimeno, los cuales en contacto con el microorganismo degradan e incrementan la permeabilidad de la pared celular, inhiben la actividad de las ATPasa, liberan el ATP intracelular, generan daño en las proteínas y la membrana citoplasmática, causan la migración de componentes de la célula, la coagulación del citoplasma y disminuyen la fuerza motora de los microorganismos (33, 34).

A películas de quitosana (2,0 % m/v en ácido acético al 1 %) con diferentes masas moleculares e incorporación de aceites esenciales y extractos de especias se

les evaluó su actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *St. aureus* y *B. cereus*, entre otros. De forma general, se observó que las bacterias Gram-positivas fueron las más sensibles, particularmente *B. cereus*, el cual fue inhibido a bajas concentraciones de los aditivos evaluados (35). Estos resultados fueron similares a los de otro trabajo (36), donde se reportó que las bacterias Gram-positivas son más sensibles que las Gram-negativas a los compuestos fenólicos, aldehídos, cetonas y terpenos, principales constituyentes de los extractos naturales y aceites esenciales.

Se reportó que las películas de quitosana no mostraron efecto inhibitorio sobre microorganismos como *E. coli*, *St. aureus* y *B. cereus* (37). La adición de aceite esencial de ajo a las películas tuvo mayor efecto inhibitorio sobre *St. aureus* y *B. cereus*, aunque también redujo el crecimiento de *E. coli*. Los resultados de este estudio demuestran que las películas de quitosana son una opción viable para inhibir el crecimiento de microorganismos responsables del deterioro de alimentos, así como causante de toxiinfecciones alimentarias.

## CONCLUSIONES

En general, todos los tratamientos después de transcurridas 8 h de la inoculación inhibieron el desarrollo de las cepas de *E. coli*, *St. aureus* y *B. subtilis* evaluadas, aunque los tratamientos resultaron más efectivos contra *St. aureus*.

## REFERENCIAS

1. Fernández M. Review: Active food packaging. *Food Sci Technol Int* 2000; 6(2):97-108.
2. García M. Películas y cubiertas de quitosana en la conservación de vegetales. *Cienc Tecnol Alim* 2008; 18(1):71-6.
3. Díaz R, Casariego A, Rodríguez J, Martínez A, García M. Coberturas de quitosana como método de envasado activo en vegetales enteros y cortados. *Cienc. Tecnol. Alim* 2010; 20(2):31-6.
4. Badillo PA, Rodríguez D, Casariego A, Borges P, García MA. Coberturas de quitosana con extracto hidroalcohólico de cúrcuma en la conservación de piña cortada. *Cienc Tecnol Alim* 2017; 27(1):18-23.
5. García MA. Potencialidades de la quitosana como agente antioxidante y antimicrobiano en la industria alimentaria. *Cienc Tecnol Alim* 2015; 25(1): 69-76.
6. Casariego A. (2009). Desarrollo de películas y coberturas de quitosana de empleo potencial en alimentos (tesis doctoral). La Habana: Universidad de La Habana; 2009.
7. Falco A, Martínez W, Rodríguez JL, Nuñez de Villavicencio M, Sevillano E. Actividad antimicrobiana de extractos hidroetanólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Curcuma longa*). *Rev Venez Cienc Tecnol Alim* 2011; 2(1):85-93.
8. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr Polym* 2001; 44:71-6.
9. Valenzuela C, Arias JI. Potenciales aplicaciones de películas de quitosana en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias* 2012; 27(1):33-42.

10. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol* 1992; 6:257-72.
11. Liu N, Chen X, Park H, Liu Ch, Meng X, Yu L. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydr Polym* 2006; 64:60-5.
12. Lou MM, Zhu B, Muhammad I, Li B, Xie GI, Wang YL, Sun GCh, Li HY. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminali*. *Carbohydr. Res* 2011; 346:1294-1301.
13. Cavalcante AE, Montenegro TC, Montenegro TL. Potencial biotecnológico de quitosana en sistemas de conservación de alimentos. *Rev Iberoam Polím* 2008; 9(5):435-51.
14. Nikaido H. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. En: Neidhardt FC, Ed. *Outer Membrane*, 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1996. pp. 29-47.
15. Didenko LV, Gerasimenko DV, Konstantinova ND, Silkina TA, Avdienko ID, Bannikova GE, Varlamov VP. Ultrastructural study of chitosan effects on *Klebsiella* and *Staphylococci*. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140:356-60.
16. Li XF, Feng XQ, Yang S, Fu GQ, Wang TP, Su ZX. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydr Polym* 2010; 79:493-99.
17. Helander IM, Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of Gram negative bacterial permeabilization. *J Appl Microbiol* 2000; 88:213-19.
18. Kumar ABV, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. Low molecular weight chitosans. Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770:495-505.
19. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002; 74:65-72.
20. Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1999; 62:239-43.
21. Ocloo FCK, Adu-Gyamfi A, Quarcoo EA, Serfor-Armah Y, Asare DK, Owulah C. Effect of gamma irradiation on antibacterial properties of sea crab shell chitosan. *Eur J Food Res Rev* 2012; 2(3):69-78.
22. Costa HSR, Dos-Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim Nova* 2006; 29(4):776-85.
23. Jia ZS, Shen DF, Xu WL. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res* 2001; 333:1-6.
24. Goy RC, de Britto D, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polím Cienc Tecnol* 2009; 19:241-47.
25. Qin CQ, Li HR, Xiao Q, Liu Y, Zhu JC, Du YM. Water solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr Polym* 2006; 63:367-74.
26. Mahdy M, El-Kalyoubi MH, Khalaf MM, Abd MM. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Ann Agric Sci* 2013; 58(1):33-41.
27. Takahashi T, Imai M, Suzuki I, Sawai J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochem Eng J* 2008; 40:485-91.
28. Helander I, Wright A, Mattila-Sandholm T. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci Tech* 1997; 8:146-50.
29. Kong M, Chen XG, Liu CS, Liu CG, Meng XH, Yu LJ. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids Surf B* 2008; 65:197-202.
30. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25:932-6.
31. Raafat D, Bargaen KV, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol* 2009; 74:3764-73.
32. Valderrama N (2014). Evaluación del comportamiento de películas comestibles de quitosana almacenadas bajo condiciones controladas (tesis de maestría). Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
33. Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot* 2004; 67(4):833-48.
34. Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-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 Safety* 2009; 8:157-80.
35. Hernández-Ochoa L, Macías-Castañeda CA, Nevárez-Moorillón GV, Salas-Muñoz E, Sandoval-Salas F. Antimicrobial activity of chitosan-based films including spices essential oils and functional extracts. *CyTA-J Food* 2012; 10:85-91.
36. Nychas GJE. *Natural antimicrobial from plants*. En: Gould GW, Ed. *New Method of Food Preservation*, Glasgow: Chapman and Hall; 1995. pp. 58-89.
37. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT* 2005; 38:859-65.