

INFLUENCIA DE LA IRRADIACIÓN GAMMA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DISOLUCIONES Y PELÍCULAS DE QUITOSANA

Mario A. García^{1*}, Dainelys Cruz¹, Nilia de la Paz², Manuel Rapado³ y Tatiana Beldarraín⁴

¹Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, La Habana, Cuba. CP 13600. E-mail: marioifal@gmail.com

²Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ave. 26 No. 1605 e/Boyeros y Puentes Grandes. La Habana, Cuba.

³Departamento de Radiobiología. Centro para las Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear, Calle 30 No. 502 e/ 5ta y 7ma. Playa. La Habana, Cuba.

⁴Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, Carretera al Guatao km 3 ½, La Habana, Cuba. CP 19200.

RESUMEN

Se evaluó la influencia de la dosis de irradiación con Co60 y concentración de polímero en la actividad antimicrobiana de disoluciones formadoras de cobertura (DFC) y películas de quitosana. Se prepararon DFC de quitosanas irradiadas (5; 10; 20 y 50 kGy) al 1,5 y 2 % (m/v) disueltas en ácido láctico al 1 % (m/v) y Tween 80 al 0,1 % (v/v). La actividad antimicrobiana de las DFC se evaluó mediante el método de los pocillos, mientras que la de las películas mediante el método de difusión en agar. Se utilizaron cepas atenuadas de microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos y una levadura. Las películas y DFC de quitosanas irradiadas a 20 y 50 kGy presentaron un efecto inhibitorio sobre *E. coli* ATCC 25922 y su actividad dependió de la concentración. La actividad antimicrobiana de las películas de quitosana irradiada fue superior a la de las DFC.

Palabras clave: quitosana, irradiación gamma, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Influence of gamma irradiation on antimicrobial activity of solutions and films of chitosan

The effect of irradiation dose with 60Co and polymer concentration on antimicrobial activity of chitosan coating-forming solutions (CFS) and films was evaluated. It was prepared CFS of irradiated chitosan (5, 10, 20 and 50 kGy) at 1.5 y 2% (w/v) dissolved in lactic acid at 1% (w/v) and Tween 80 at 0.1% (v/v). The antimicrobial activity of CFS was assessed through wells method, while agar diffusion method was used for films evaluation. It was used attenuated stumps of microorganisms Gram-positives, Gram-negatives and a yeast. Films and CFS of irradiated chitosans at 20 y 50 kGy presented an inhibitory effect against *E. coli* ATCC 25922 and their activity depended on polymer concentration. Chitosan films showed higher antimicrobial activity than CFS.

Keywords: chitosan, gamma irradiation, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

Existe una tendencia mundial hacia el consumo de productos frescos, con menos conservantes de origen químico y lo más parecido a su forma original. Esto se debe a que se ha asociado el consumo de conservantes químicos como los benzoatos, nitritos, nitratos y anhídrido sulfuroso, entre otros, con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas. Esto genera la búsqueda

***Mario A. García Pérez:** Licenciado en Ciencias Alimentarias (2006). Master en Ciencia y Tecnología de Alimentos (2009). Se desempeña como profesor de Principios de Ingeniería de Alimentos, Conservación de Alimentos y Ciencia y Tecnología de Frutas y Hortalizas en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. Su área de investigación está relacionada con el empleo de polímeros naturales en la industria alimentaria.

da de alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (1).

El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente sus características sensoriales, nutritivas e inocuidad (2). En este contexto, las películas y disoluciones de quitosana han demostrado potencialidades para su aplicación en la conservación de alimentos (3,4).

La quitosana, polisacárido compuesto por unidades repetitivas de α (1-4)-D-glucosamina, se obtiene por la desacetilación de la quitina, polímero natural presente en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y artrópodos (5,6). La quitosana como agente antimicrobiano ha sido utilizada en la industria alimentaria en una gran variedad de productos cárnicos donde es capaz de inhibir o disminuir el crecimiento de los principales microorganismos patógenos y relacionados con el deterioro, mientras que en leche procesada, las disoluciones de quitosana han sido utilizadas para minimizar la contaminación microbiana (7).

La actividad antimicrobiana de la quitosana depende de varios factores como el grado de desacetilación, masa molecular, pH del medio, temperatura y otros (8). Usualmente, la masa molecular de la quitosana es muy alta, lo cual limita su aplicabilidad para un propósito particular y efectividad en una acción específica (9). Algunas investigaciones han reportado que a medida que disminuye la masa molecular de la quitosana aumenta su actividad antibacteriana y antifúngica (10). El empleo de las radiaciones ionizantes es un método simple y rápido que sirve para disminuir la masa molecular de un polímero (9).

Teniendo en cuenta las potencialidades de la irradiación gamma para la modificación de la quitosana e incrementar su capacidad antimicrobiana, así como su aprovechamiento en busca de una explotación económica beneficiosa y disminución del problema medioambiental, además de la importancia que representan los antimicrobianos naturales para garantizar la inocuidad de los alimentos, el objetivo del presente tra-

bajo fue evaluar la influencia de la dosis de irradiación con Co^{60} y concentración de polímero en la actividad antimicrobiana de disoluciones y películas de quitosana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó quitosana con una masa molecular de 275,221 kDa y 74,74 % de desacetilación, obtenida en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, por N-desacetilación química de la quitina de langosta común (*Panulirus argus*). El proceso de irradiación de la quitosana se realizó en el Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear con una fuente de Co^{60} para proporcionar a las muestras dosis de 5; 10; 20 y 50 kGy para obtener quitosanas con masas moleculares de 247,847; 221,563; 126,469 y 77,063 kDa, respectivamente. La quitosana se envasó en bolsas de polietileno de baja densidad de 50 μm de espesor previamente a la irradiación.

Para la elaboración de las películas, mediante una modificación de la tecnología reportada (11), se prepararon disoluciones formadoras de cobertura (DFC) de quitosanas, irradiadas o no, a diferentes concentraciones (1,5 y 2 % m/v) en una disolución al 1 % (v/v) de ácido láctico con agitación magnética durante 2 h. Previamente, se adicionó, como sustancia superficialmente activa, Tween 80 al 0,1 % (v/v) en la disolución de ácido láctico al 1 % (v/v). Las disoluciones fueron vertidas en moldes de vidrio de 400 cm^2 y se secaron durante 10 h en estufa a 60 °C sin circulación de aire. Todas las películas de quitosana se acondicionaron en desecadores hasta su evaluación.

Para el ensayo se utilizaron cepas atenuadas de microorganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Lactobacillus plantarum* ICIDCA, *Lactobacillus paracasei* IIIA), Gram-negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* IIIA). Estas cepas se seleccionaron teniendo en cuenta su relación con el deterioro de alimentos y patogenicidad (12).

La actividad antimicrobiana de las DFC de quitosana se determinó por el método de los pocillos, sobre placas de 120 mm de diámetro de agar Müller-Hinton con perforaciones de 5 mm, se vertió una alícuota (1 mL) de cada una de las suspensiones de los microorganismos de

ensayo (10^5 ufc/mL) y se extendió con una espátula de Drigalski. En cada orificio se adicionaron 100 μ L de DFC de quitosana a diferentes concentraciones y dosis de irradiación; se usó como control el ácido láctico (1 % v/v). Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C y se midieron (en mm) los halos transparentes alrededor de los pocillos (13-15). Se realizaron cinco repeticiones de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las DFC de quitosana.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas de quitosana se empleó la técnica de difusión en agar. Se cortaron discos de 5 mm de cada una de las películas de quitosana a diferentes concentraciones y dosis de irradiación. Con unas pinzas se colocaron las películas en la superficie del agar Müller-Hinton, previamente inoculado con 1 mL de cada una de las suspensiones microbianas. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h. Se midió la zona transparente alrededor de las películas (en mm). Se realizaron cinco repeticiones de este experimento.

Los valores de los indicadores medidos se sometieron a análisis de varianza factorial mediante el programa STATISTICA (versión 7, 2004, StatSoft. Inc., Tulsa, EE.UU.). La prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) se usó para determinar la diferencia estadística entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados de la capacidad antagonica de las DFC al 1,5 y 2 % (m/v) de quitosana, respectivamente, a diferentes dosis de irradiación frente a microorganismos causantes del deterioro de alimentos. Como se puede observar, el efecto antimicrobiano no se vio interferido, en ninguno de los casos, por el ácido láctico utilizado en la preparación de las DFC.

Los resultados de la prueba de antagonismo mostraron que la dosis de irradiación posee poca influencia sobre los microorganismos diana estudiados, ya que solo *E. coli* se inhibió con la disolución al 1,5 % (m/v) de quitosana irradiada con 20 y 50 kGy; con esta última dosis, la inhibición fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que para el resto de los microorganismos. Los resultados informados respecto a las propiedades inhibitorias de la quitosana explican que su efecto es mayor sobre las bacterias Gram-negativas (16,17). Su acción antimicrobiana es dependiente de la masa molecular, grado de desacetilación y tipo de microorganismo (10,18-20).

Al aumentar la concentración de la quitosana en la DFC no se incrementó la inhibición, lo cual era esperado. En trabajos anteriores se refiere que altas concentraciones

Tabla 1. Resultados medios del tamaño del halo (mm) como expresión del antagonismo de quitosana irradiada (DFC al 1,5 % (m/v)) contra los microorganismos indicadores (n=5)

Dosis de Irradiación (kGy)	<i>St. aureus</i> (Gram +)	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>L. plantarum</i> (Gram +)	<i>S. cerevisiae</i> (Levadura)	<i>B. subtilis</i> (Gram +)	<i>L. paracasei</i> (Gram +)
Control	5* a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
0	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
5	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
10	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
20	5 a	9,5 b	5 a	5 a	5 a	5 a
50	5 a	12,5 c	5 a	5 a	5 a	5 a

* 5 mm indican que no hubo inhibición.

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

Tabla 2. Resultados medios del tamaño del halo (mm) como expresión del antagonismo de quitosana irradiada (DFC al 2 % (m/v)) contra los microorganismos indicadores (n=5)

Dosis de Irradiación (kGy)	<i>St. aureus</i> (Gram +)	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>L. plantarum</i> (Gram +)	<i>S. cerevisiae</i> (Levadura)	<i>B. subtilis</i> (Gram +)	<i>L. paracasei</i> (Gram +)
Control	5* a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
0	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
5	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
10	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
20	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
50	5 a	12,5 b	5 a	5 a	5 a	5 a

* 5 mm indican que no hubo inhibición.

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

de quitosana (2 % m/v) son menos efectivas que las bajas concentraciones (0,5 y 1 % 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 (21), aunque otros investigadores encontraron que la habilidad de inhibición de la quitosana se incrementa con su concentración (22,23). Los resultados de este estudio indican que la actividad inhibitoria de las DFC de quitosana no se afectó por su concentración ni dosis de irradiación, excepto para el caso de *E. coli*, donde se observó una influencia ($p \leq 0,05$) de la dosis de irradiación.

Estudios recientes revelan que el mecanismo de actividad antimicrobiana de la quitosana está relacionado, también, con el tiempo de exposición y propiedades físico-químicas de las DFC, además de las características intrínsecas de los microorganismos (24). Se ha encontrado que las sales cuaternarias de quitosana son veinte veces más efectivas contra *E. coli* que la quitosana nativa (25). 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. Sin embargo, existe controversia respecto a si la quitosana disuelta en ácido es un antimicrobiano más eficaz que la hidrosoluble. En este

sentido, se ha reportado que la disuelta en agua presenta una actividad antimicrobiana significativa contra los microorganismos probados (26).

El hecho de la pobre inhibición observada contra *St. aureus*, *L. plantarum*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* y *L. paracasei* podría atribuirse al hecho de que han ganado en resistencia a muchos antibióticos clínicos (27-29). Además, los estudios demuestran que la actividad antimicrobiana de la quitosana contra las bacterias Gram-positivas se incrementa cuanto mayor es la masa molecular del polímero, porque 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 (5).

Respecto al comportamiento de *S. cerevisiae*, generalmente muestra mayor resistencia que las bacterias a los efectos inhibitorios de la quitosana, lo que pudiera deberse a que la presencia de este polímero en la pared celular de estos microorganismos les induce un poder protector ante la quitosana añadida externamente (30).

Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados de la capacidad antagonica de las películas de quitosana a diferentes concentraciones y dosis de irradiación frente a microorganismos causantes del deterioro de alimentos. Como se observa, todas las dosis de irradiación

Tabla 3. Resultados medios del tamaño del halo de inhibición (mm) observado entre las diferentes dosis de irradiación a una concentración de quitosana del 1,5 % (m/v)

Dosis de Irradiación (kGy)	<i>St. aureus</i> (Gram +)	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>L. plantarum</i> (Gram +)	<i>S. cerevisiae</i> (Levadura)	<i>B. subtilis</i> (Gram +)	<i>L. paracasei</i> (Gram +)
0	5* a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
5	5 a	8,5 b	5 a	5 a	5 a	5 a
10	5 a	8,5 b	5 a	5 a	5 a	5 a
20	5 a	9,5 bc	5 a	5 a	5 a	5 a
50	5 a	10 c	5 a	9,5 bc	5 a	5 a

* 5 mm indican que no hubo inhibición.

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

inhibieron el crecimiento de *E. coli* aunque variaron en el grado de intensidad. Es evidente que la película incrementa el potencial antimicrobiano de la quitosana, ya que se obtienen halos de inhibición significativamente superiores ($p \leq 0,05$) en *E. coli* respecto al resto de las bacterias estudiadas.

Con respecto a las dosis de irradiación de la quitosana, se observa que la mayor inhibición de *E. coli* es a las dosis superiores (20 y 50 kGy), significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) a las obtenidas con dosis inferiores de irradiación. Esto podría deberse a que con la dosis

de irradiación disminuye la masa molecular de la quitosana, lo que garantiza que penetre con facilidad a la célula y se una al ADN impidiendo la replicación de este microorganismo.

Además, a 50 kGy se observó un efecto inhibitorio de la película de quitosana contra *S. cerevisiae* para una concentración de quitosana de 1,5 % (m/v). Es interesante señalar que para este microorganismo no existió inhibición con la técnica del pocillo. En otros trabajos se ha observado este mismo comportamiento y se ha sugerido que en la interfase pocillo-medio de cultivo

Tabla 4. Resultados medios del tamaño del halo de inhibición (mm) observado entre las diferentes dosis de irradiación a una concentración de quitosana al 2 % m/v

Dosis de Irradiación (kGy)	<i>St. aureus</i> (Gram +)	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>L. plantarum</i> (Gram +)	<i>S. cerevisiae</i> (Levadura)	<i>B. subtilis</i> (Gram +)	<i>L. paracasei</i> (Gram +)
0	5* a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
5	5 a	10 c	5 a	5 a	5 a	5 a
10	5 a	10,5 c	5 a	5 a	5 a	5 a
20	5 a	11 cd	5 a	8,5 b	5 a	5 a
50	5 a	12 d	5 a	9,5 bc	5 a	5 a

* 5 mm indican que no hubo inhibición.

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

existe mayor superficie de contacto, pero por las características del medio (pH neutro), la difusión de la quitosana dentro del mismo es muy baja y se incrementa con el empleo de la película (31).

Los resultados de este estudio demuestran que las películas de quitosana son una opción viable para inhibir el crecimiento de *E. coli*, microorganismo responsable del deterioro de alimentos, así como causante de toxiinfecciones alimentarias.

Se ha informado (32) que diferentes quitosanas inhibieron el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram-negativas que ensayaron, aunque los efectos inhibitorios estuvieron influidos por la masa molecular, grado de desacetilación y concentración de la disolución. Al mismo tiempo pudo observarse, contrario a este estudio, que las quitosanas presentaron mayor actividad antimicrobiana para las bacterias Gram-positivas que para las Gram-negativas, como ha sido reportado en trabajos previos (19,33).

La relación entre la masa molecular de los oligómeros de quitosana y su actividad antimicrobiana ha sido reportada por varios trabajos. Se reportó (18) que la masa molecular de los oligómeros de quitosana es crítica para la inhibición del microorganismo y su eficiencia se

incrementa con la masa molecular, aunque quitosanas sin modificar mostraron una dependencia contraria entre la masa molecular y su actividad antimicrobiana; por ejemplo, la actividad antimicrobiana contra *E. coli* se incrementó con la disminución de la masa molecular, sin embargo, la actividad contra *St. aureus* se incrementó con el aumento de la masa molecular (34).

El empleo de películas de quitosana para alargar la durabilidad de alimentos ofrece una alternativa viable, porque los agentes con características bioactivas son más efectivos, generalmente, contra las bacterias Gram-positivas, debido a que la composición de la pared celular es menos compleja que la de las Gram-negativas; sin embargo, son estas últimas las más implicadas en el deterioro de alimentos, así como en la presencia de toxiinfecciones alimentarias.

CONCLUSIONES

Las películas y disoluciones formadoras de cobertura de quitosana presentaron un efecto inhibitorio sobre *E. coli* ATCC 25922 al ser irradiada con 20 y 50 kGy y su actividad dependió de la concentración. La actividad antimicrobiana de las películas de quitosana irradiada fue superior a la de las disoluciones.

REFERENCIAS

1. Álvarez-Parrilla, E. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas [en línea]. 2006. Consultado febrero 2014 en www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf.
2. Raibaudi, R. M.; Fortuna, R. S. y Belloso, O. M. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas [en línea]. 2006. Consultado febrero 2014 en www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf.
3. No, H.; Meyers, S.; Prinyawiwatkul, W. y Xu, Z. Review. J. Food Sci. 72(5): 87-100, 2007.
4. Dutta, P.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. y Dutta, J. Food Chem. 114: 1173-1182, 2009.
5. Cavalcante, A. E.; Montenegro, T. C. y Montenegro, T. L. Rev. Iberoam. Polím. 9(5): 435-451, 2008.
6. Arias, J.; Neira-Carrillo, A.; Yazdani-Pedram, M.; Fernández, M. y Arias, J. Tissue Eng. 14(5): 895-896, 2008.
7. Valenzuela, C. y Arias J. I. Avances en Ciencias Veterinarias 27(1): 33-42, 2012.
8. Devlieghere, F.; Vermeulen, A. y Debevere, J. Food Microbiol. 21: 703-714, 2004.
9. Rosiak J. M.; Janik I.; Kadlubowsky S.; Kozicki, P.; Kujawa, P.; Stasica, P. y Ulaski, P. The use of radiation technique for the formation of hydrogels [en línea]. 2002. Consultado febrero 2014 en mitr.p.lodz.pl/biomat/raport/0_radiation_hydrogels.html.
10. Ocloo, F. C. K.; Adu-Gyamfi, A.; Quarcoo, E. A.; Serfor-Armah, Y.; Asare D. K. y Owulah, C. Eur. J. Food Res. Rev. 2(3): 69-78, 2012.
11. Vodjani, F. y Torres, J.A. J. Food Proc. Eng. 58: 33-48, 1989.
12. Castillo, A. y Cabrera, E. Validación de medidas de control. Curso Pre-Congreso previo al XII Congreso de Inocuidad de Alimentos. Puerto Vallarta, México, 2010.
13. Diop, M. B.; Dubois-Dauphin, R.; Tine, E.; Ngom, V.; Destain, J. y Thonart, P. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 11(4): 275-281, 2007.
14. Gutiérrez L. y Acosta, V. Lasallista Invest. 5(2): 68-73, 2008.

15. Alvarado, C. C. y Díaz, C. G. *Respyn*. 10: 1-9, 2009.
16. Helander, I. M. y Mattila-Sandholm, T. J. *Appl. Microbiol.* 88: 213-219, 2000.
17. Kumar, A. B. V.; Varadaraj, M. C.; Gowda, L. R. y Tharanathan, R. N. *Biochim. Biophys. Acta* 1770: 495-505, 2007.
18. Jeon, Y. J.; Park, P. J. y Kim, S. K. *Carbohydr. Polym.* 44: 71-76, 2001.
19. No, H. K.; Park, N. Y.; Lee, S. H. y Meyers, S. P. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 65-72, 2002.
20. Tsai, G. J.; Su, W. H.; Chen, H. C. y Pan, C. L. *Fish Sci.* 68: 170-177, 2002.
21. Sudarshan, N. R.; Hoover, D. G. y Knorr, D. *Food Biotechnol.* 6: 257-272, 1992.
22. Liu, N.; Chen, X.; Park, H.; Liu, C.; Liu, C.; Meng, X. y Yu, L. *Carbohydr. Polym.* 64: 60-65, 2006.
23. Lou, M. M.; Zhu, B.; Muhammad, I.; Li, B.; Xie, G. I.; Wang, Y. L.; Sun, G. Ch. y Li, H. Y. *Carbohydr. Res.* 346: 1294-1301, 2011.
24. Costa, H. S. R.; Dos Santos, K. S. C. R. y Ferreira, E. I. *Quim. Nova* 29(4): 776-784, 2006.
25. Jia, Z. S.; Shen, D. F. y Xu, W. L. *Carbohydr. Res.* 333: 1-6, 2001.
26. Qin, C. Q.; Li, H. R.; Xiao, Q.; Liu, Y.; Zhu, J. C. y Du, Y. M. *Carbohydr. Polym.* 63: 367-374, 2006.
27. Li, B.; Wang, X.; Chen, R.; Huangfu, W. G. y Xie, G. L. *Carbohydr. Polym.* 72: 287-292, 2008.
28. Li, B.; Liu, B. P.; Su, T.; Fang, Y.; Xie, G. L.; Wang, G. F.; Wang, Y. L. y Sun, G. C. *Plant Pathol. J.* 26: 189-193, 2010.
29. Li, B.; Su, T.; Chen, X. L.; Liu, B. P.; Zhu, B.; Fang, Y.; Qiu, W. y Xie, G. L. *Appl. Entomol. Zool.* 45: 145-152, 2010.
30. Allan, C. R. y Hadwiger, L. A. *Exp. Mycol.* 3: 285-287, 1979.
31. Sirmats, E. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antimicrobial activity of chitosan (tesis de maestría, Universidad de Clemson), 2008, 100 p.
32. Mahdy, M.; El-Kalyoubi, M. H.; Khalaf, M. M. y Abd, M. M. *Ann. Agric. Sci.* 58(1): 33-41, 2013.
33. Takahashi, T.; Imaia, M.; Suzuki, I. y Sawai, J. *Biochem. Eng. J.* 40: 485-491, 2008.
34. Holappa J.; Hjálmarisdóttir M.; Másson M.; Rúnarsson Ö.; Asplund T.; Soiminen P.; Nevalainen, T. y Järvinen, T. *Carbohydr. Polym.* 65(1): 114-118, 2006.