

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL QUITOSANO: UNA REVISIÓN DE LA LITERATURA

ANTIMICROBIAL EFFECT OF CHITOSAN: A REVIEW

Ayala Valencia, German¹

Resumen

A través del tiempo, diferentes estudios han evaluado el efecto antimicrobiano de diversos materiales de origen biológico; entre estos, el quitosano ha tomado gran importancia al ser un polímero natural, biodegradable, no tóxico en concentraciones moderadas y que posee actividad antimicrobiana. El efecto antimicrobiano del quitosano se atribuye a la capacidad quelante y a la presencia de un grupo amino con carga positiva que puede interactuar con los compuestos de carga opuesta y que están presentes en la superficie de los microorganismos. Sin embargo, en la literatura se reportan resultados contradictorios respecto a la actividad antimicrobiana del quitosano, indicando la existencia de factores intrínsecos y extrínsecos los cuales podrían modificar dicha actividad antimicrobiana. Este trabajo presenta una revisión de la literatura sobre las propiedades antimicrobianas del quitosano así como los mecanismos de acción de este biopolímero sobre los hongos y bacterias. Finalmente se reportan algunas perspectivas sobre el uso del quitosano acoplado con nanopartículas metálicas y cómo estos sistemas podrían tener un mayor efecto inhibitorio contra los microorganismos.

Palabras clave: conservantes, biopolímeros, actividad antimicrobiana, nanopartículas, industria de alimentos.

Abstract

Over time, various studies have examined the antimicrobial effect of several materials from biological origin, among them the chitosan has become very important to be a natural polymer, biodegradable, non-toxic in moderate concentrations and which has an antimicrobial activity. The antimicrobial effect of chitosan is due to the chelating ability and the presence of an amina group with positive charged and that can interact with compounds of oppositely charged located on the surface of microorganisms. However, in the literature were reported contradictory results about the antimicrobial activity of chitosan, indicating the existence of intrinsic and extrinsic factors which may modify the antimicrobial activity. The present paper shows a review about the antimicrobial properties of chitosan and its mechanisms of action on fungi and bacteria. Finally is reported some perspectives to use chitosan coupling with metallic nanoparticles and as these systems might have a higher inhibitory effect against microorganism.

Keywords: preservatives, biopolymers, antimicrobial activity, nanoparticles, food industry.

¹Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de Sao Paulo. Av. Duque de Caxias Norte 225. A.A. 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil. gayalav1230@gmail.com

Introducción

La intoxicación alimentaria debido a la presencia de microorganismos es una gran problemática de seguridad social la cual afecta tanto al consumidor como a la industria. Recientes acontecimientos de brotes de microorganismos hallados en alimentos han sido reportados, el primero involucró la presencia de *Escherichia coli* O104:H4 en verduras comercializadas en Alemania, Francia y Suecia para el año de 2011 [1], el segundo reporte implicó la presencia de *Escherichia coli* y *Campilobacter* que fueron hallados en productos lácteos comercializados en los Estados Unidos durante el año de 2012 [2]. En ambos casos, la presencia de estos microorganismos en los alimentos generó problemas de salud en las poblaciones involucradas [1, 2].

Con la finalidad de evitar estos problemas de salud pública y garantizar la seguridad alimentaria, la presencia de microorganismos potencialmente patógenos al hombre ha sido drásticamente controlada en los alimentos a través del tiempo. Una de las alternativas más frecuentes es el uso de conservantes artificiales tales como el ácido sórbico, ácido benzoico, sorbato sódico, sorbato de potasio, sulfitos, nitritos, nitratos entre otros [3]. Otra alternativa es el uso de conservantes de origen natural que inhiban el crecimiento de microorganismos [4-6], un ejemplo de conservante natural es el quitosano el cual resulta de la desacetilación de la quitina, que a su vez se encuentra en los exoesqueletos de artrópodos, insectos y en la pared celular de algunos hongos [7].

El quitosano es un poli-(b-1/4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa, este biopolímero ha sido catalogado como el segundo más abundante en la naturaleza después de la celulosa [8,9]. El quitosano presenta una serie de características únicas tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad, lo que permite su aplicación en diferentes industrias tales como: alimentos, farmacéutica y de cosméticos, así como en la agricultura y en la remoción de metales pesados para el tratamiento de aguas residuales provenientes de industrias [8, 10, 11].

Diferentes investigaciones han evaluado el efecto antimicrobiano del quitosano en estado líquido (coloide) y sólido (membrana) [12-15], no obstante, la comparación entre los diferentes trabajos reportados en la literatura permite observar la existencia de resultados contradictorios respecto a la actividad antimicrobiana del quitosano. De esta manera, el objetivo del presente trabajo es hacer una revisión de la literatura sobre el efecto antimicrobiano del

quitosano con la finalidad de entender mejor los diferentes factores que podrían alterar dicha propiedad.

Efecto antimicrobiano del quitosano

El efecto antimicrobiano del quitosano ha sido ampliamente estudiado y comprobado a través del tiempo [12-19], sin embargo, todavía no ha sido bien dilucidado el mecanismo de acción antimicrobiano de este biopolímero.

Una de las principales razones para que el quitosano posea actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3 (carbono 2) el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares [20-22]. Además, el quitosano tiene propiedad quelante, lo que permite que este biopolímero se pueda ligar selectivamente a metales presentes en las estructuras externas de los microorganismos, inhibiendo así la producción de toxinas [23]. También se ha reportado que el quitosano puede inhibir enzimas debido a la interacción quitosano-ADN que altera la síntesis de ARN mensajero [24].

En la literatura se ha reportado que el quitosano posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana, en hongos el quitosano suprime la esporulación y posterior producción de esporas [19]. Por otro lado, el efecto antimicrobiano en bacterias ha sido un proceso complejo que difiere entre bacterias Gram positiva y Gram negativas [8].

Jeon *et al.* [25] evaluaron la actividad de quito-oligosacáridos producidos en un biorreactor a partir de quitosano de masa molecular de 685 kDa y grado de desacetilación del 89 % contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* KCTC 1682, *Escherichia coli* O-157 ATCC 11775, *Salmonella typhi* KCTC 2424 y *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750) y Gram positivas (*Streptococcus mutans* KCTC 3065, *Micrococcus luteus* KCTC 1024, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Saphylococcus epidermis* KCTC 1917 y *Bacillus subtilis* KCTC 1028). La actividad antimicrobiana usando quito-oligosacáridos fue alcanzada con quitosano de masa molecular de 10 000 kDa. Los autores también reportaron que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las Gram positivas a los quito-oligosacáridos.

No *et al.* [26] evaluaron el efecto antimicrobiano del quitosano con diferente masa molecular (1671, 1106, 746, 470, 224 y 28 kDa), el quitosano fue estabilizado

a diferentes valores de pH (entre 4.5 y 5.9). El efecto antimicrobiano de estos coloides fue evaluado en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio parahaemolyticus*), y Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *L. bulgaris*). Los autores concluyeron que las bacterias Gram positivas fueron más susceptibles a los coloides de quitosano. También agregaron que el quitosano de baja masa molecular no presentó actividad antimicrobiana, la cual fue afectada inversamente por el pH.

Chung *et al.* [27] también evaluaron el efecto antimicrobiano de coloides de quitosano con grado de desacetilación de 75 y 95 % sobre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 27198), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27853) y *Streptococcus faecalis* (ATCC 4200). Los autores concluyeron que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las bacterias Gram positivas. Lo anterior podría ser debido a la mayor hidrofiliidad de las bacterias Gram negativas, tornándolas más susceptibles al quitosano en medio líquido.

Zhong *et al.* [28] utilizaron quitosano con masa molecular de 50 kDa y grado de desacetilación de 96 %, la actividad antimicrobiana del quitosano fue evaluada en estado líquido sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina*. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Chung *et al.* [27].

Chung & Chen. [29] utilizaron quitosano con masa molecular de 30 kDa y grado de desacetilación de 97 %. El quitosano fue dispersado para formar coloides y su efecto antimicrobiano fue evaluado en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los autores reportaron igual susceptibilidad de la *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) al contacto con quitosano.

Kyum Kim *et al.* [30] evaluaron el efecto antimicrobiano de membranas de quitosano hechas a partir de dispersiones de quitosano con diferentes viscosidades (40, 100 y 200 mPa). La actividad antimicrobiana de las membranas fue evaluada contra *Listeria monocytogenes* (Gram positiva), *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Salmonella typhimurium* (Gram negativa). Los autores reportaron que *Listeria monocytogenes* (Gram positiva) fue más susceptible que las Gram negativas a las membranas de quitosano.

Valencia *et al.* [31] emplearon quitosano comercial con grado de desacetilación del 85 % y evaluaron su efecto antimicrobiano en estado líquido (coloide) y

sólido (membrana) contra *Staphylococcus aureus*. En ningún de los dos casos, el quitosano tuvo efecto antimicrobiano contra este microorganismo.

La revisión y la comparación de los resultados reportados en la literatura muestran la existencia de resultados contradictorios en relación al efecto antimicrobiano del quitosano contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Una posible explicación a estos resultados podría ser la existencia de factores intrínsecos y extrínsecos que influenciarían las propiedades antimicrobianas del quitosano.

Factores que afectan la actividad antimicrobiana del quitosano

Ming Kong *et al.* [8] reportaron que el efecto antimicrobiano del quitosano es influenciado por cuatro factores: (1) microorganismo: especie y fase de desarrollo; (2) factores intrínsecos del quitosano: peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante; (3) estado físico del quitosano: líquido (coloide) o sólido (membrana); (4) factores ambientales: pH, temperatura y tiempo.

Especie de microorganismo y fase de desarrollo

El efecto antimicrobiano del quitosano varía conforme al microorganismo en estudio, siendo diferente para hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Lo anterior podría estar fuertemente ligado a las estructuras externas características de cada microorganismo.

Tsai & Su. [32] citaron que la carga superficial de las células cambia con la fase de crecimiento, lo que indica que la susceptibilidad de las células a los antibióticos y compuestos químicos también cambia con dicha fase de crecimiento.

Chen & Chou. [13] evaluaron el efecto antimicrobiano de soluciones de lactosa-quitosano en agua sobre *Staphylococcus aureus* CCRC 12657 y encontraron que este microorganismo fue más susceptible al final de la fase exponencial de crecimiento.

Yang *et al.* [33] aplicaron soluciones de maltosa-quitosano en agua sobre *Escherichia coli* O157:H7 y encontraron que esta bacteria fue menos resistente a la maltosa-quitosano en la mitad de la fase exponencial de crecimiento.

Factores intrínsecos del quitosano

Masa molecular y solubilidad. En la literatura se reporta que el quitosano con masa molecular entre 4.6-

100 kDa puede tener efecto antimicrobiano, cuando la masa molecular es menor a 4.6 kDa, dicha actividad antimicrobiana no es percibida. Mohammed [34] reportó que es necesario un mínimo de siete unidades de glucosamina para que el quitosano pueda inhibir el crecimiento de microorganismos. Por otra parte, cuando la masa molecular de este biopolímero es superior a 100 kDa, el quitosano no tiene efecto antimicrobiano debido a la pérdida de su solubilidad, lo que impide su interacción con los microorganismos [20, 34-36].

Grado de desacetilación y densidad de carga positiva. La desacetilación de la quitina es el proceso químico donde se emplea hidróxido de sodio con la finalidad de hidrolizar los grupos acetamino (-NHCOCH₃) para obtener grupos amino (-NH₂) que es característico del quitosano [37]. El grado de desacetilación está dado entre 0 y 100 %, donde un mayor grado de desacetilación está asociado con una mayor solubilidad y densidad de carga protónica. Estos dos factores son muy importantes para la adhesión del quitosano a la pared celular de los microorganismos [36, 37].

Kong *et al.* [38] evaluaron el efecto antimicrobiano del quitosano con dos diferentes grados de desacetilación (83.5 y 97.5 %) sobre *Staphylococcus aureus* a pH 5.5 y reportaron que el efecto antimicrobiano fue más fuerte usando el quitosano con mayor grado de desacetilación.

Takahashi *et al.* [39]. también evaluaron el efecto antimicrobiano del quitosano con seis diferentes grados de desacetilación (75.5 %, 79.7 %, 83.9 %, 88.0 %, 90.1 % y 92.2 %) con la finalidad de inhibir el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los autores también reportaron que la actividad antimicrobiana del quitosano aumento con el grado de desacetilación.

La densidad de carga positiva en el quitosano es definida como la capacidad que tiene este biopolímero para protonar su grupo amino y pasar de -NH₂ a -NH₃⁺, esta protonación depende del grado de desacetilación y del pH del medio. Los grupos -NH₃⁺ son los responsables de interactuar con las estructuras externas de los microorganismos y desestabilizarlas [25, 40].

Capacidad quelante. El quitosano puede formar complejos con iones de metales pesados tales como Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ y Cu²⁺, esta capacidad quelante ha sido ampliamente utilizada para remover metales pesados en aguas residuales de diferentes industrias [10]. Por otra parte, la membrana celular de los microorganismos tiene iones de Mg²⁺ y Ca²⁺ los cuales pueden ser desestabilizadas por las

interacciones con el quitosano, generando así lisis de la membrana celular [38].

Estado físico del quitosano: líquido (coloide) o sólido (membrana)

En la literatura se reporta que la actividad antimicrobiana del quitosano es mayor cuando está dispersa en medio líquido en comparación a un medio sólido, esto es debido a la mayor capacidad de difusión del compuesto al estar disperso en medio líquido. En comparación, una membrana de quitosano solamente tendrá actividad antimicrobiana en su superficie [41, 42].

Factores extrínsecos

pH. El pH es un factor muy importante, la solubilidad del quitosano se da a un pH ácido, también el efecto antimicrobiano se consigue únicamente cuando este biopolímero está en un medio ácido, donde el pH es inferior al pK del quitosano, (pH ≤ 6.3) lo que permite la protonación de los grupos amino [26, 32, 41, 42].

Temperatura y tiempo. No *et al.* [26] evaluaron el efecto del tiempo y la temperatura sobre el almacenamiento de dispersiones de quitosano e investigaron como estas variables (tiempo y temperatura) afectaban la actividad antimicrobiana de este biopolímero contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. El efecto antimicrobiano fue evaluado en dispersiones de quitosano recién preparadas y después de almacenadas a 4 y 25 °C por 15 semanas. Los autores reportaron que las dispersiones recién preparadas mostraron una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las dispersiones almacenadas. Lo anterior podría ser debido a la fragmentación de las cadenas de quitosano, lo cual podría disminuir la actividad antimicrobiana. Esta hipótesis fue verificada posteriormente a través de ensayos reológicos, donde se encontró que la viscosidad de las dispersiones almacenadas a 4 °C por 15 días disminuyó entre 44 - 48 % en comparación con el valor de viscosidad inicial, de forma similar, las dispersiones almacenadas a 25 °C por el mismo tiempo, presentaron una disminución de la viscosidad entre 81- 90 %. Esta disminución de la viscosidad fue relacionada con la fragmentación de las cadenas poliméricas del quitosano.

Mecanismo de acción antimicrobiano del quitosano

Las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa que contiene lipo-polisacáridos, en el interior de estos compuestos se encuentran algunos cationes que son estabilizados electrostáticamente por grupos fosfato y carboxilo (con cargas negativas). Un posible

mecanismo de acción del quitosano puede ser debido a la interacción que este polímero podría establecer con los cationes (a través de la capacidad quelante) lo cual desestabilizaría la membrana externa en estos microorganismos [8, 36].

En bacterias Gram positivas el efecto antimicrobiano del quitosano puede ser debido a la densidad de carga positiva. Las bacterias Gram positivas tienen en sus estructuras externas diversos polímeros con carga negativa tales como el ácido lipoteicoico y pectidoglicanos los cuales pueden interactuar con el quitosano a través de los grupos $-\text{NH}_3^+$. Tanto en las bacterias Gram positivas como Gram negativas la desestabilización de las estructuras externas envuelven el rompimiento de las mismas (lisis), generando así una salida de compuestos proteicos y soluciones minerales desde el interior de los microorganismos [8, 36].

En los hongos, posteriormente a la lisis celular, el quitosano puede ingresar y desnaturalizar las enzimas o inhibir el ADN y la síntesis de mRNA lo cual no permite la esporulación y formación de esporas [19].

Perspectivas: Acoplamiento del quitosano con nanopartículas, su efecto antimicrobiano y algunas aplicaciones en alimentos

En la literatura se reporta que la adición de nanopartículas (NPs) puede aumentar el efecto antimicrobiano del quitosano, lo anterior podría ser debido al aumento en la densidad de carga positiva, haciendo que los grupos $-\text{NH}_3^+$ y las cargas positivas de las NPs compitan por los mismo grupos de cargas negativas presentes en los microorganismos. Por otra parte, se reporta también que las NPs alteran la capacidad quelante del quitosano [8, 36, 43, 44].

Wang *et al.* [45] evaluaron el efecto antimicrobiano en mezclas de quitosano con sales de zinc y quitosano con NPs de zinc. Los autores concluyeron que el efecto antimicrobiano en *Escherichia coli* y *Corynebacterium* fue más severo cuando el quitosano estaba mezclado con las NPs.

Jung *et al.* [46] y An *et al.* [47] también reportaron que las mezclas de quitosano con NPs de plata presentaron un mayor efecto antimicrobiano en comparación con el quitosano o las sales de plata separadas.

Higazy *et al.* [48] realizaron un estudio comparativo de mezclas de quitosano con iones metálicos de Ag^{1+} , Zn^{2+} y Zr^{2+} , siendo evaluado el efecto antimicrobiano de estos sistemas en *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los autores concluyeron que el acoplamiento

del quitosano con Zn fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana.

Valencia *et al.* [31] evaluaron el efecto antimicrobiano de sistemas coloidales y membranas de quitosano y quitosano con NPs de plata en *Staphylococcus aureus*. Los autores reportaron que el quitosano (en coloide y membrana) no inhibió el crecimiento de este microorganismo, no obstante la mezcla entre quitosano con NPs de plata si fue efectiva.

Algunas aplicaciones del quitosano en la ingeniería y ciencia de los alimentos son reportadas en la literatura. Este biopolímero es empleado principalmente como conservante, aplicado por aspersión sobre hortalizas y algunas frutas frescas, tales como tomate y moras [49], también es frecuentemente usado en alimentos con pH bajo [26]. El quitosano es ampliamente utilizado en países como los Estados Unidos, Alemania y Japón como conservante de alimentos procesados tipo espagueti, salsa de soya y sardinas [43]. Actualmente no se dispone de mucha información sobre las aplicaciones del quitosano acoplado con nanopartículas metálicas en sistemas alimenticios.

Conclusiones

El quitosano es un biopolímero que puede tener actividad antibacteriana y antifúngica, su efecto inhibitorio puede depender de cuatro factores: microorganismo (especie y fase de desarrollo), factores intrínsecos del quitosano (peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante), estado físico del quitosano (en estado líquido o sólido) y factores ambientales (pH, temperatura y tiempo).

El quitosano al ser un polímero biodegradable, proveniente de residuos pesqueros (en mayor proporción), no tóxico, biocompatible y además poseer actividad antimicrobiana presenta un amplio espectro de aplicaciones, siendo utilizado como conservante en la ingeniería de alimentos. Por otro lado, el acoplamiento del quitosano con nanopartículas metálicas puede maximizar su potencial antibacteriano y antifúngico, no obstante existe la necesidad de desarrollar más investigaciones en esta área con la finalidad de evaluar las posibles aplicaciones de los acoplamientos de quitosano con nanopartículas metálicas en alimentos.

Agradecimientos

El autor agradece a la FAPESP por su beca de Doctorado (2012/24047-3).

Referencias

- [1] Milk Facts (2012). <http://milkfacts.info/Milk%20Microbiology/Disease%20Outbreaks.htm> [Consulta: Oct 2013].
- [2] World Health Organization Europe. (2013). <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/communicable-diseases/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection/> [Consulta: Oct 2013].
- [3] Badui, D.S. (2006). *Química de los Alimentos*, 4 edn., (Pearson, México).
- [4] Jamab, M.S.; Niazmand, R. (2009). Effect of essential oil of *Mentha piperita* and *Ziziphora clinopodioides* on *Lactobacillus acidophilus* activity as bioyogurt starter culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sciences*. 6, 129-131.
- [5] Lemay, M.J.; Choquette, J.; Delaquis, P.J.; Claude, G.; Rodrigue, N.; Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 217-226.
- [6] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253.
- [7] Fai, A.E.C.; Stamford, T.C.M.; Stamford, T.L.M. (2008). Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(5), 435-451.
- [8] Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K.; Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- [9] Hafdani, F.N.; Sadeghinia, N. (2011). A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. *World Academy of Science and Technology*. 50, 252-256.
- [10] Duarte, E.R.; Verbel, J.O.; Jaramillo, B.E. (2009). Remoción de cromo de aguas residuales de curtiembres usando quitosana obtenido de desechos de camarón. *Scientia et Technica*. 42, 290-295.
- [11] Pájaro, Y.; Díaz, F. (2012). Remoción de cromo hexavalente de aguas contaminadas usando quitosana obtenido de exoesqueleto de camarón. *Revista Colombiana de Química*. 4, 283-298.
- [12] Allan, C.R.; Hardwiger, L.A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*. 3, 285-287.
- [13] Chen, Y.L.; Chou, C.C. (2005). Factors affecting the susceptibility of *Staphylococcus aureus* CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. *Food Microbiology*. 22, 29-35.
- [14] Choi, B.K.; Kim, K.Y.; Yoo, Y.J.; Oh, S.J.; Choi, J.H.; Kim, C.Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 18, 553-557.
- [15] Chung, Y.C.; Wang, H.L.; Chen, Y.M.; Li, S.L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*. 88, 179-184.
- [16] Fernandes, J.C.; Tavaría, F.K.; Soares, J.C.; Ramos, O.S.; João Monteiro, M.; Pintado, M.E.; Xavier Malcata, F. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*. 25, 922-928.
- [17] Helander, I.M.; Wright, A.V.; Mattila-Sandholm, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*. 8, 146-150.
- [18] Helander, I.M.; Nurmiäho-Lassila, E.L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 235-244.
- [19] Hernandez-Lauzardo, A.N.; Bautista-Banos, S.; Velazquez-del Valle, M.G.; Mendez-Montecalvo, M.G.; Sanchez-Rivera, M.M.; Bello-Perez, L.A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*. 73, 541-547.
- [20] Chen, C.S.; Liao, W.Y.; Tsai, G.J. (1998). Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection*. 61, 1124-1128.
- [21] Shahidi F.; Arachchi, J.K.V.; Jeon, Y.L. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 37-51.
- [22] Rabea, E.I.; Badawy, M.E.T.; Stevens, C.V.; Smaghe, G.; Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4, 1457-1465.
- [23] Cuero, R.G.; Osuji, G.; Washington, A. (1991). N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters*. 13, 441-444.
- [24] Sudarshan, N.R.; Hoover, D.G.; Knorr, D. (1992). Antibacterial Action of Chitosan Food Biotechnology. 6, 257-272.
- [25] Jeon, Y.J.; Park, P.J.; Kim, S. K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*. 44, 71-76.
- [26] No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, S.H.; Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of Chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 74, 65-72.
- [27] Chung, Y.C.; Su, Y.P.; Chen, C.C.; Jia, G.; Wang, H.L.; Wu, J.C.G.; Lin, J.G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25, 932-936.
- [28] Zhong, Z.; Xing, R.; Liu, S.; Wang, L.; Cai, S.; Li, P. (2008). Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research*. 343, 566-570.
- [29] Chung Y.C.; Chen C.Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*. 99, 2806-2814.
- [30] Kim, K.W.; Min, B.J.; Kim, Y.T.; Kimmel, R.M.; Cooksey, K.; Park, S.I. (2011). Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology*. 44, 565-569.
- [31] Valencia, G.A.; Vercik, L.C.O.; Ferrari, R.; Vercik, A. (2013). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using water-soluble starch and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. *Starch/Stärke*. 11-12, 931-937.
- [32] Tsai, G.J.; Su, W.H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 62, 239-243.

- [33] Yang, T.C.; Li, C.F.; Chou, C.C. (2007). Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *International Journal of Food Microbiology*. 113, 258-262.
- [34] Mohammed, A. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*. 43, 837-842.
- [35] Tokura, S.; Ueno, K.; Miyazaki, S.; Nishi, N. (1997). Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular Symposia*. 1997, 120, 1-9.
- [36] Dutta, P.K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*. 114, 1173-1182.
- [37] Valencia, G.A. (2013). Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas. Tesis de Maestria presentada a la Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.
- [38] Kong, M.; Chen, X.G.; Liu, C.S.; Yu, L.J.; Ji, Q.X.; Xue, Y.P.; Cha, D.S.; Park, H.J. (2008). Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing System. *Frontiers of Materials Science in China*. 2, 214-220.
- [39] Takahashi, T.; Imai, M.; Suzuki, I.; Sawai, J. (2008). Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*. 40, 485-491.
- [40] Rhoades, J.; Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 80-84.
- [41] Chung, Y.C.; Kuo, C.L.; Chen, C.C. (2005). Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*. 96, 1473-1482.
- [42] Xie, Y.J.; Liu, X.F.; Chen, Q. (2007). Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*. 69, 142-147.
- [43] Cavalcante, A.E.F.; Montenegro, T.C.S.; Montenegro, T.L.S. (2008). *Revista Iberoamericana de Polimeros*. 9, 435-451.
- [44] Kubota, N.; KiKuchi, Y. (1998). Macromolecular complexes of chitosan. In S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* New York, USA: Marcel Dekker Inc., 595-628.
- [45] Wang, X.H.; Du, Y.M.; Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*. 56, 21-26.
- [46] Jung, W.K.; Koo, H.C.; Kim, K.W.; Shin, S.; Kim, S.H.; Park, Y.H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 2171-2178.
- [47] An, J.; Luo, Q.; Yuan, X.; Wang, D.; Li, X. (2011). Preparation and characterization of silver-chitosan nanocomposite particles with antimicrobial activity. *Journal of Applied Polymer Science*. 120, 3180-3189.
- [48] Higazy, A.; Hashem, M.; ElShafei, A.; Shaker, N.; Hady, M.A. (2010). Development of antimicrobial jute packaging using chitosan and chitosan-metal complex. *Carbohydrate Polymers*. 79, 867-874.
- [49] Ghaouth, A.E.; Arul, J.; Ponnampalam, R.; Boulet, M (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*. 56(6), 1618-1620