

**Evaluación de quitosano como agente  
antimicrobiano en el control de *Listeria  
monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella  
Typhimurium***

**José Raúl Quintero García**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de quitosano como agente  
antimicrobiano en el control de *Listeria  
monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella  
Typhimurium***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**José Raúl Quintero García**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 201

## Evaluación de quitosano como agente antimicrobiano en el control de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*

José Raúl Quintero García

**Resumen.** En este estudio se utilizó quitosano proveniente de crustáceos y de insectos con el objetivo de identificar su capacidad antimicrobiana y comparar el desempeño entre ambos. Se utilizaron las cepas bacterianas serovar 4b CECT 4032 de *Listeria monocytogenes*, y O157:H7 CECT 5947 de *Escherichia coli*, y CECT 443 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Cada una de las cepas fueron tratadas con quitosano al 1% (tanto de crustáceo como de insecto), dos niveles de pH (5.00, 6.25) y dos niveles de inoculación ( $10^3$  UFC/mL,  $10^6$  UFC/mL) obteniéndose 24 tratamientos que fueron evaluados con un Diseño Completamente al Azar (DCA) y arreglo factorial, con dos repeticiones. Los resultados se analizaron a través un ANDEVA y una separación de medias Duncan para los factores principales y una separación con el método de Cuadrados Mínimos (LSMEANS) para las interacciones, y fueron expresados y comparados junto con un control y control ácido de cada cepa mediante curvas de supervivencia. Los resultados obtenidos mostraron una fuerte actividad antimicrobiana por parte del quitosano, siendo el quitosano de crustáceo el que presento una mayor actividad a un pH de 5.00. La actividad antimicrobiana del quitosano se ve potenciada en bacterias Gram positivas, como *L. monocytogenes*, en comparación con bacterias Gram negativos como *E. coli* y *S. Typhimurium*. El efecto antimicrobiano del quitosano se vio influenciado por diversos factores como: fuente, pH del medio, tipo de patógeno y nivel de inoculación. Sin embargo, se demostró que en soluciones acuosas ácidas su efecto es mucho mayor.

**Palabras clave:** Bactericida, factores extrínsecos, factores intrínsecos, inhibición, quitina.

**Abstract.** In this study, chitosan from crustaceans and insects was used in order to identify their antimicrobial capacity and compare performance between them. Bacterial strains serovar 4b CECT 4032 from *Listeria monocytogenes*, O157:H7 CECT 5947 from *Escherichia coli* and CECT 443 from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium were used. Each of the strains were treated with 1% chitosan (both crustacean and insect), two pH levels (5.00, 6.25) and two levels of inoculation ( $10^3$  CFU/mL,  $10^6$  CFU/mL) obtaining 24 treatments that were evaluated using a Randomized Complete Design (RCD) with factorial arrangements and two replicates. Results were analyzed through an ANOVA, and a Duncan mean separation for the main factors, and Ls means for the interactions, and were expressed and compared with an acid control and control of each strain using survival curves. Results obtained showed a strong antimicrobial activity by chitosan with the crustacean chitosan being with the highest activity at a pH of 5.00. The antimicrobial activity of chitosan is enhanced in Gram positive bacteria, such as *L. monocytogenes* compared to Gram negative bacteria such as *E. coli* and *S. Typhimurium*. The antimicrobial effect of chitosan was influenced by various factors such as: source, pH of the medium, type of pathogen and level of inoculation. However, it was shown that in acidic aqueous solutions its effect is much greater.

**Key words:** Bactericidal, chitin, extrinsic factors, inhibition, intrinsic factors.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>19</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>21</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Recuento de <i>Escherichia coli</i> suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 5.00.....	7
2. Recuento de <i>Escherichia coli</i> suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 5.00.....	7
3. Recuento de <i>Escherichia coli</i> suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 6.25.....	8
4. Recuento de <i>Escherichia coli</i> suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 6.25.....	8
5. Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 5.00.....	10
6. Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 5.00.....	10
7. Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 6.25.....	11
8. Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 6.25.....	11
9. Recuento de <i>Salmonella</i> Typhimurium suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 5.00.....	13
10. Recuento de <i>Salmonella</i> Typhimurium suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 5.00.....	13
11. Recuento de <i>Salmonella</i> Typhimurium suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 6.25.....	14
12. Recuento de <i>Salmonella</i> Typhimurium suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 6.25.....	14
Figuras	Página
1. Sobrevivencia de <i>Escherichia coli</i> O157: H7 CECT 5947 en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con 1% de quitosano de insecto y crustáceo, almacenado a 37 °C.....	6
2. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b CECT 4032 en caldo soya tripticasa (TSB) suplementado con 1% de quitosano de insecto y crustáceo, almacenado a 37°C.....	9
3. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium serovar Typhimurium CECT 443 en caldo soya tripticasa (TSB) suplementado con 1% de quitosano de insecto y crustáceo, almacenado a 37°C.....	12

Figuras	Página
4. Reducción de microorganismos patógenos en quitosano de insecto (QI) y quitosano de crustáceo (QC) al 1% a pH 5.00 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).....	16
5. Reducción de microorganismos patógenos en quitosano de insecto (QI) y quitosano de crustáceo (QC) al 1% a pH 6.25 con recuento a las 8 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).....	17
6. Reducción de microorganismos patógenos en quitosano de insecto (QI) y quitosano de crustáceo (QC) al 1% a pH 6.25 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).....	18

Anexos	Página
1. Realización de la dilución.....	23
2. Realización de siembra.....	23
3. Tabla de reducción de microorganismos patógenos en quitosano al 1% a pH 5.00 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).....	24
4. Tabla de reducción de microorganismos patógenos en quitosano al 1% a pH 6.25 con recuento a las 8 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).....	24
5. Tabla de reducción de microorganismos patógenos en quitosano al 1% a pH 6.25 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).....	24
6. Estructura molecular de la quitina.....	25
7. Estructura molecular del quitosano.....	25
8. Cuadro resumen de <i>Escherichia coli</i> .....	25
9. Cuadro resumen de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
10. Cuadro resumen de <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	26

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los consumidores siguen la tendencia de adquirir alimentos con menos conservantes o aditivos químicos. Esto representa una problemática para la industria de alimentos, la cual, ha buscado innovar mediante el uso de compuestos naturales que satisfagan dichas necesidades. Uno de los compuestos estudiados en la actualidad es el quitosano debido a que se considera un polímero natural, biodegradable, no tóxico en concentraciones moderadas y con capacidades antimicrobianas (Ayala Valencia 2015). El quitosano o quitosan, es un polímero lineal compuesto principalmente por unidades de glucosamina y se obtiene mediante el proceso de la desacetilación de la quitina (SIAQ, Sociedad Iberoamericana de Quitina 2017). Por otra parte, la quitina se considera el segundo polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, y se puede encontrar en abundantes grupos de organismos como insectos, arácnidos, hongos y crustáceos (Elieh-Ali-Komi y Hamblin 2016).

Tanto la quitina como el quitosano, han sido material de investigación por sus propiedades antimicrobianas frente a diversos tipos de microorganismos como, por ejemplo: algas, bacterias, levaduras y hongos (Younes y Rinaudo 2015; Chávez 2018). Las investigaciones recientes demuestran que el quitosano tiene propiedades bactericidas y bacteriostáticas lo cual despierta el interés de las industrias (Rejane *et al.* 2009). Dicha capacidad se ve atribuida a la presencia de grupos aminos con carga positiva a pH inferiores a 6.3, los cuales, llegan a interactuar con la carga negativa de la pared celular de las bacterias, generando de este modo un rompimiento o lisis de esta estructura y por consecuencia, la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares del microorganismo (Rabea *et al.* 2003).

De igual forma, se destaca que el efecto antimicrobiano del quitosano y la quitina se debe a una serie de factores intrínsecos y extrínsecos. Entre algunos de estos factores están: microorganismo: especie y fase de desarrollo; peso molecular del quitosano, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante; estado físico del quitosano: líquido (coloide) o sólido (membrana); factores ambientales: pH, temperatura y tiempo (Kong *et al.* 2010).

La búsqueda de compuestos de origen natural, como el quitosano y la quitina es de suma importancia en la actualidad. El uso de este compuesto, industrialmente, se encuentra en pleno desarrollo; esto se debe a sus diversos beneficios, permitiendo su aplicación en diferentes áreas como la biomedicina, sistemas de administración de fármacos, hidrogeles, tratamiento de agua y envasado de alimentos. Para la industria de alimentos, sus propiedades antimicrobianas pueden ser de gran utilidad (Honarkar y Barikani 2009),

inclusive, puede utilizarse indirectamente mediante el empaque en una variedad de comidas (Lee *et al.* 2003).

Los recursos de quitina para el procesamiento industrial se encuentran mayormente en industrias con productos marítimos como un método de aprovechamiento de subproductos (Gouda Fouad 2008). Sin embargo, en los últimos estudios han reportado el enorme potencial que pueden tener los insectos como materia prima para la aplicación en diferentes industrias (Amador-Mendoza *et al.* 2016). Uno de estos insectos es el *Tenebrio molitor*, el cual es utilizado en diferentes aplicaciones, incluyendo alimentación animal. La caracterización físico-química del quitosano proveniente de dicho insecto, indica un rendimiento aceptable, lo cual, ha despertado el interés en diferentes industrias (Sáenz-Mendoza *et al.* 2019).

Para las industrias de alimentos, es una obligación brindarles a sus clientes alimentos de calidad e inocuidad para su salud. Muchas de las enfermedades transmitidas por los alimentos en la actualidad son atribuidas al crecimiento microbiano que se da en estos, lo cual, hace casi necesario el empleo de compuestos químicos para reducir el peligro biológico presente en los alimentos. Sin embargo, en los últimos años, estas enfermedades se deben a una serie de efectos perjudiciales como la inducción de resistencia de conservantes artificiales o químicos en patógenos o su acumulación en los consumidores humanos, obligando de esta manera a innovar en nuevos conservantes de origen natural (Méndez Natera 2008). El propósito de este estudio se basó en buscar nuevas alternativas a estas problemáticas mediante la aplicación de quitosano procedente de dos fuentes (crustáceos e insectos). Se evaluaron las propiedades antimicrobianas de ambas fuentes en cepas bacterianas de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, por ser las bacterias más comunes en las industrias de alimentos y se comparó su desempeño en diferentes escenarios de pH y concentración de inóculo inicial, por lo cual, se establecieron los siguientes objetivos:

- Evaluar la capacidad del quitosano como alternativa para el control de microorganismos en las cepas bacterianas de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*.
- Identificar los factores como pH y concentración de microorganismo que cuentan con el mejor desempeño del quitosano.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase I. Experimentación de la capacidad antimicrobiana del quitosano.

**Cultivos bacterianos.** Se utilizaron las cepas bacterianas de *Listeria monocytogenes* serovar 4b CECT 4032, *Escherichia coli* O157: H7 CECT 5947 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CECT 443.

**Preparación del medio control.** Se realizaron siembras de medios controles para observar el crecimiento en un estado óptimo de cada una de las cepas bacterianas. El control se realizó con los medios caldo Luria Bertani (LB) para *E. coli* y caldo soya tripticasa (TSB) para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, acorde a lo establecido por el fabricante, obteniendo un volumen final de 19 ml. Se esterilizó a 121 °C por 20 min en una autoclave y se inoculó con el patógeno correspondiente.

**Preparación del medio control ácido.** Se realizaron dos controles ácidos (pH 6.25 y 5.00) con el objetivo de comparar el desempeño del quitosano en diferentes escenarios. La preparación de los controles se realizó utilizando el medio LB para los controles de *E. coli* y TSB para los controles de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* respectivamente. Se utilizó ácido acético al 1% para acidificar el medio y se ajustó el pH deseado utilizando NaOH al 10% hasta alcanzar un volumen final de 19 ml del medio. Los medios se esterizaron a 121 °C por 20 min, y se dejaron reposar a temperatura ambiente para finalmente ser inoculados con el patógeno correspondiente.

**Preparación de medio con quitosano.** Para el medio con quitosano, se utilizó quitosano proveniente de dos fuentes (insecto y crustáceo) los cuales se adquirieron de las casas comerciales, SigmaAldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para quitosano de crustáceo y MealFood Europe para el de insecto (*Tenebrio molitor*). Para la preparación de los medios se utilizó LB para *E. coli* y TSB para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* respectivamente. Se utilizó ácido acético al 1% para acidificar el medio y se ajustó el pH deseado (6.25, 5.00) utilizando NaOH al 10%. El medio se esterilizó a una temperatura de 121 °C por 20 minutos. Una vez esterilizado, se dejó reposar hasta que alcanzara una temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregó la solución de quitosano al 1% esterilizado por filtración mediante un filtro PVDF de 0.45 µm obteniendo una concentración final de quitosano en el medio de cultivo de 0.15%. El volumen final del medio sin el inóculo fue de 19 ml.

**Realización de la dilución y siembra.** Se partió de un criovial con una concentración de  $10^8 - 10^9$  UFC/ml de cada patógeno, el cual se homogenizó en un vórtex por siete segundos. Se tomó una alícuota de 100 µL y luego se depositó en un tubo eppendorf con 900 µL de

agua de peptona. Este paso se repitió hasta alcanzar la concentración deseada ( $10^3$  UFC/ml,  $10^6$  UFC/ml). Una vez alcanzada la dilución, se tomó 1 ml del último eppendorf, se depositó en el medio a trabajar (control, control ácido, medio con quitosano de insecto o medio con quitosano de crustáceo). Los tratamientos se mantuvieron en baño maría con agitación a una temperatura de 35 °C. Se tomaron alícuotas de cada tratamiento a las 0, 3, 6, 8, 24 y 49 horas. Se homogeneizó en el vórtex por siete segundos. Se realizaron diluciones decimales con dos series (A, B) con dos placas en cada una. Los medios de crecimiento utilizados fueron Agar LB para *E. coli* y Agar Soya Trypticase (AST) para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*. Se incubaron a una temperatura de 37 °C con recuento a las 24 horas, para *E. coli* y *S. Typhimurium*, y 48 horas para *L. monocytogenes* siguiendo la metodología de Kyung *et al.* (2011). Los resultados obtenidos fueron expresados en UFC/ml y se graficó la curva de sobrevivencia de cada patógeno.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial. Se evaluaron 24 tratamientos con dos repeticiones para un total de 48 unidades experimentales. Se realizó un análisis de varianza para definir la significancia del modelo y se realizó una separación de medias Duncan ( $P < 0.05$ ) para observar diferencias significativas entre cada uno de los factores principales, y un análisis de medias ajustadas con el método de cuadros mínimos (LMEANS) para comparar la interacción entre los niveles de los factores evaluados. Los análisis se realizaron a través del programa “Statistical Analysis System” SAS® versión 9.4.

## **Fase II. Identificación del mejor tratamiento inhibitorio.**

**Estimación de la reducción.** De los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento de la fase I, se escogió el quitosano de crustáceo y el quitosano de insecto en ambos niveles de pH (5.00, 6.25) que obtuvo un mayor efecto. Para la estimación de la reducción se consideró los logaritmos de la concentración inicial (tiempo cero horas) menos los logaritmos de las horas 24 y 49 para los quitosanos de crustáceo e insecto a un nivel de pH bajo. En el caso de los quitosanos con un nivel de pH alto se consideró los logaritmos de la concentración inicial menos los logaritmos de las horas ocho y 49.

**Análisis estadístico de los resultados.** La identificación del mejor tratamiento se realizó mediante un análisis estadístico con el programa SAS® versión 9.4. Se seleccionaron los tratamientos con quitosano de crustáceo y quitosano de insecto a pH de 5.00 y 6.25 a ambos niveles de inoculación en los tres tipos de microorganismos. Se realizó una separación de medias Duncan ( $P < 0.05$ ) con un análisis de medias ajustadas con el método de cuadros mínimos (LMEANS).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Fase I. Experimentación de la capacidad antimicrobiana del quitosano.**

Se midió el potencial antimicrobiano de ambos quitosanos mediante la comparación de sus efectos empleando curvas de sobrevivencia a diferentes niveles de inoculación ( $10^3$  UFC/ml y  $10^6$  UF/ml) y pH (6.25 y 5.00) en las tres cepas bacterianas (*E. coli*, *S. Typhimurium*, y *L. monocytogenes*). Se observó una interacción altamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre cada uno de los factores que se sometieron los microorganismos, lo cual sugiere que cada uno de los tratamientos presentaron un efecto en cada uno de los microorganismos estudiados.

En la figura 1, se puede observar un efecto bacteriostático en la carga poblacional de *E. coli* O157:H7 cuando es sometida a estrés mediante la acidificación del medio. Este efecto se incrementa cuando el nivel de pH se encuentra bajo ( $< 5.00$ ). Estudios demuestran que *E. coli* comienza a inhibirse a valores de pH inferiores a 4 (Bogh Sorensen y Zeuthen 2003).

El método de inactivación de *E. coli* consiste en la acidificación intracelular de la bacteria, es decir, daña o interrumpe el proceso bioquímico de la misma. Según Romero *et al.* (2011), a niveles bajos de pH, el ingreso de protones es más rápido que la capacidad de la célula para mantener la homeostasis. Cuando los ácidos orgánicos penetran la célula, estos se disocian produciendo una reducción en el pH intracelular de la bacteria. A menor pH en el exterior de la bacteria, mayor es el flujo de ácidos orgánicos hacia su interior. Un constante flujo de protones con el tiempo causa el agotamiento de la energía celular y por ende la muerte de la misma. Variables como el tipo de ácido utilizado y la concentración del mismo son de suma importancia al momento de emplearse como factores de inactivación. Estudios demuestran que los ácidos orgánicos son los mejores inhibidores (Glass *et al.* 1992), siendo el ácido acético el mejor para inactivar *E. coli* O157:H7 en comparación con el ácido láctico o el ácido cítrico. Por otra parte, cuando se le agrega quitosano al medio de crecimiento se puede observar una interacción del microorganismo con ambos factores de inactivación. A un nivel de pH de 5.00, tanto el quitosano de crustáceo como el de insecto presentaron un efecto bactericida en la carga microbiana para ambos niveles de inoculación, llegando a reducir hasta dos Log de la concentración inicial a las 49 horas. En cambio, cuando se utilizó un pH de 6.25, se observó una fuerte reducción en las primeras 8 horas y posteriormente el cultivo llega a recuperarse hasta alcanzar los niveles de saturación en el medio de cultivo.

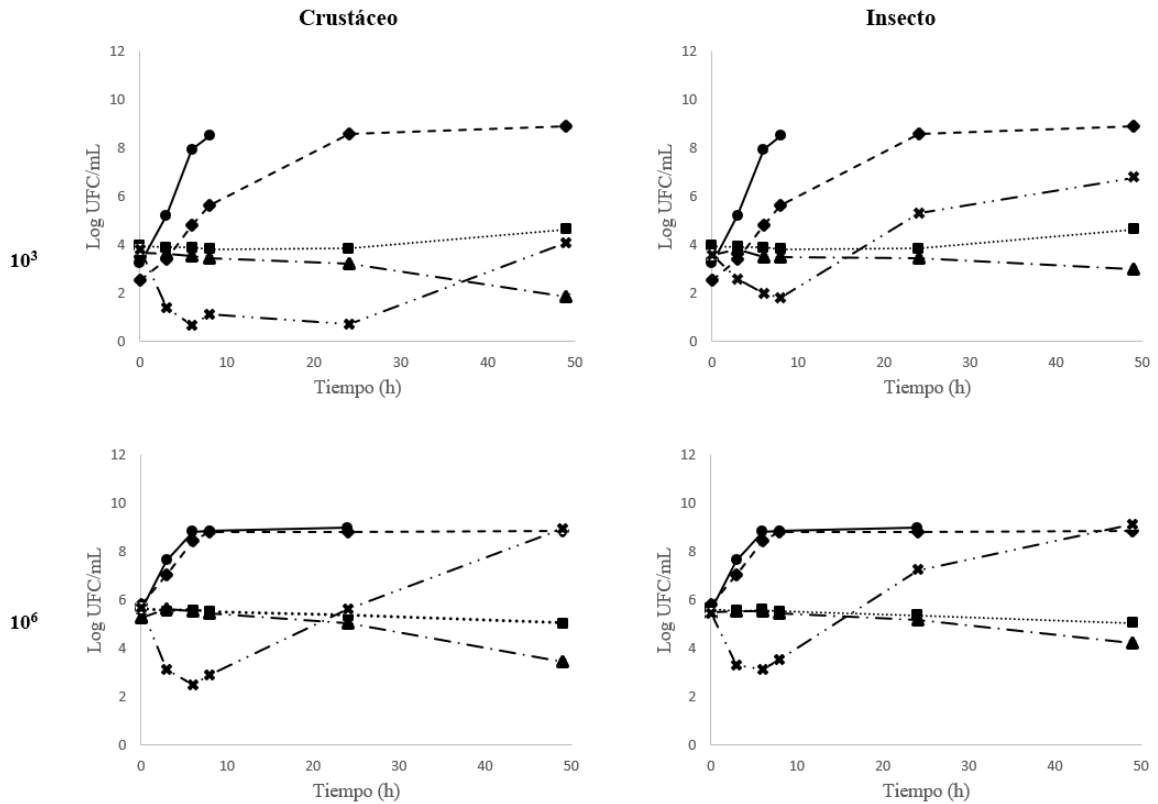


Figura 1. Sobrevivencia de *Escherichia coli* O157: H7 CECT 5947 en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con 1% de quitosano de insecto y crustáceo, almacenado a 37 °C. Tratamiento control: CLB pH 7.2 (●), control ácido: CLB pH 5.00 (■); control ácido CLB pH 6.25 (◆); quitosano pH 5.00 (▲); quitosano pH 6.25 (×).

Por otro lado, se puede observar una diferencia en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 cuando se encuentra a diferentes niveles de inoculación. Cuando el microorganismo se encuentra a una carga inicial de  $10^3$ , la fase logarítmica o exponencial a pH 6.25 es retardada, el microorganismo empieza su fase logarítmica alrededor de las 24 horas, sin embargo, no llega a una fase estacionaria. En comparación a una concentración inicial de  $10^6$ , el cultivo empieza su fase logarítmica desde las ocho horas y es capaz de alcanzar la fase estacionaria con ambos quitosanos.

Cuando se compara los tratamientos de ambos quitosanos a un pH de 5.00 en los diferentes tiempos se puede observar que, en el caso del quitosano de crustáceo con un nivel de inóculo bajo, no existe una diferencia significativa desde la hora cero hasta la hora 24, es decir, el cultivo mantiene una fase adaptación o existe un efecto bacteriostático hasta las primeras 24 horas y posteriormente se observa un declive en la hora 49. Por otra parte, cuando se obtiene un nivel de inóculo alto, se obtienen diferencias significativas en las diferentes horas de exposición, sin embargo, en la hora 49 donde se obtiene el mayor efecto antimicrobiano (cuadro 1).

Cuadro 1. Recuento de *Escherichia coli* suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 5.00 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.68 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.25 ± 0.11 <sup>WB</sup>
3	3.60 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.62 ± 0.11 <sup>XB</sup>
6	3.54 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.52 ± 0.11 <sup>XB</sup>
8	3.46 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.42 ± 0.11 <sup>XB</sup>
24	3.21 ± 0.12 <sup>WA</sup>	5.01 ± 0.11 <sup>YB</sup>
49	1.84 ± 0.12 <sup>XA</sup>	3.42 ± 0.11 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		5.59

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>W-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

Se puede observar un efecto similar cuando se suplementa con quitosano de insecto a un mismo pH. En este caso, *E. coli* tanto en un inóculo bajo como alto, presenta diferencias significativas en las diferentes horas, sin embargo, es a la hora 49 donde se obtiene un mayor efecto (cuadro 2).

Cuadro 2. Recuento de *Escherichia coli* suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 5.00 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.59 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.48 ± 0.11 <sup>WB</sup>
3	3.78 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.54 ± 0.11 <sup>WB</sup>
6	3.49 ± 0.11 <sup>XA</sup>	5.51 ± 0.11 <sup>WB</sup>
8	3.50 ± 0.11 <sup>XA</sup>	5.45 ± 0.11 <sup>WB</sup>
24	3.44 ± 0.12 <sup>XA</sup>	5.15 ± 0.11 <sup>XB</sup>
49	2.97 ± 0.12 <sup>YA</sup>	4.21 ± 0.11 <sup>YB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		5.59

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>W-Y</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

En cambio, cuando se expone *E. coli* a un tratamiento quitosano, tanto de crustáceo como de insecto, a un pH de 6.25 se obtiene una mayor reducción en la hora seis, posteriormente, el cultivo se recupera y alcanza una fase estacionaria hasta la hora 49. Esto se puede observar en los cuadros 3 y 4 donde obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes tiempos y en ambos niveles de inoculación.

Cuadro 3. Recuento de *Escherichia coli* suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 6.25 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.82 ± 0.11 <sup>UA</sup>	5.64 ± 0.09 <sup>UB</sup>
3	1.41 ± 0.13 <sup>VA</sup>	3.13 ± 0.12 <sup>VB</sup>
6	0.66 ± 0.13 <sup>WA</sup>	2.49 ± 0.12 <sup>WB</sup>
8	1.13 ± 0.12 <sup>XA</sup>	2.88 ± 0.12 <sup>XB</sup>
24	0.72 ± 0.12 <sup>YA</sup>	5.62 ± 0.11 <sup>YB</sup>
49	4.08 ± 0.11 <sup>ZA</sup>	8.93 ± 0.11 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		5.59

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>U-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

Cuadro 4. Recuento de *Escherichia coli* suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 6.25 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.56 ± 0.11 <sup>VA</sup>	5.43 ± 0.11 <sup>VB</sup>
3	2.58 ± 0.12 <sup>WA</sup>	3.28 ± 0.10 <sup>WB</sup>
6	1.96 ± 0.12 <sup>XA</sup>	3.12 ± 0.10 <sup>WB</sup>
8	1.80 ± 0.12 <sup>XA</sup>	3.51 ± 0.10 <sup>XB</sup>
24	5.31 ± 0.11 <sup>YA</sup>	7.23 ± 0.11 <sup>YB</sup>
49	6.76 ± 0.11 <sup>ZA</sup>	9.10 ± 0.11 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		5.59

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

La figura 2, muestra el efecto que tuvieron los diferentes tratamientos frente a *L. monocytogenes* serovar 4b CECT 4032. La primera diferencia que se puede observar en *L. monocytogenes* en comparación con *E. coli* es el efecto bactericida que presenta el ácido acético en ambos niveles de inoculación (10<sup>3</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/ml) en el control ácido de pH 5.00.

Por sí solo, el ácido acético es capaz de reducir hasta cuatro log; sin embargo, a pH 6.25 existe un efecto bacteriostático a un nivel de inoculación de 10<sup>3</sup> UFC/ml, pero no existe ningún efecto a un nivel de inoculación alto. Por otra parte, cuando se le agrega quitosano al medio de crecimiento se puede observar un efecto mayor sobre el microorganismo.

A un nivel de inoculación de  $10^3$  UFC/ml ambos quitosanos presentan una reducción de cuatro log en las dos fuentes de quitosano (crustáceo e insecto) y en ambos pH (5.00 y 6.25), incluso, se puede llegar a eliminar por completo el crecimiento del microorganismo como es el caso del quitosano de crustáceo a pH 6.25 y un nivel de inoculación de  $10^3$ .

A un nivel de inoculación de  $10^6$  y un pH de 5.00, tanto el quitosano de crustáceo como el de insecto presentan una actividad antimicrobiana reduciendo hasta cinco log la concentración inicial. Sin embargo, a un pH de 6.25 en el mismo nivel de inoculación, solo existe una actividad antimicrobiana hasta las ocho horas del desarrollo del cultivo; se observa una fase exponencial hasta las 49 horas, pero no llega a una fase estacionaria. Esto nos indica que puede existir una fuerte interacción entre el microorganismo y ambas fuentes de quitosano, sin embargo, el microorganismo puede desarrollar una resistencia al tratamiento si hay condiciones favorables como el pH del medio.

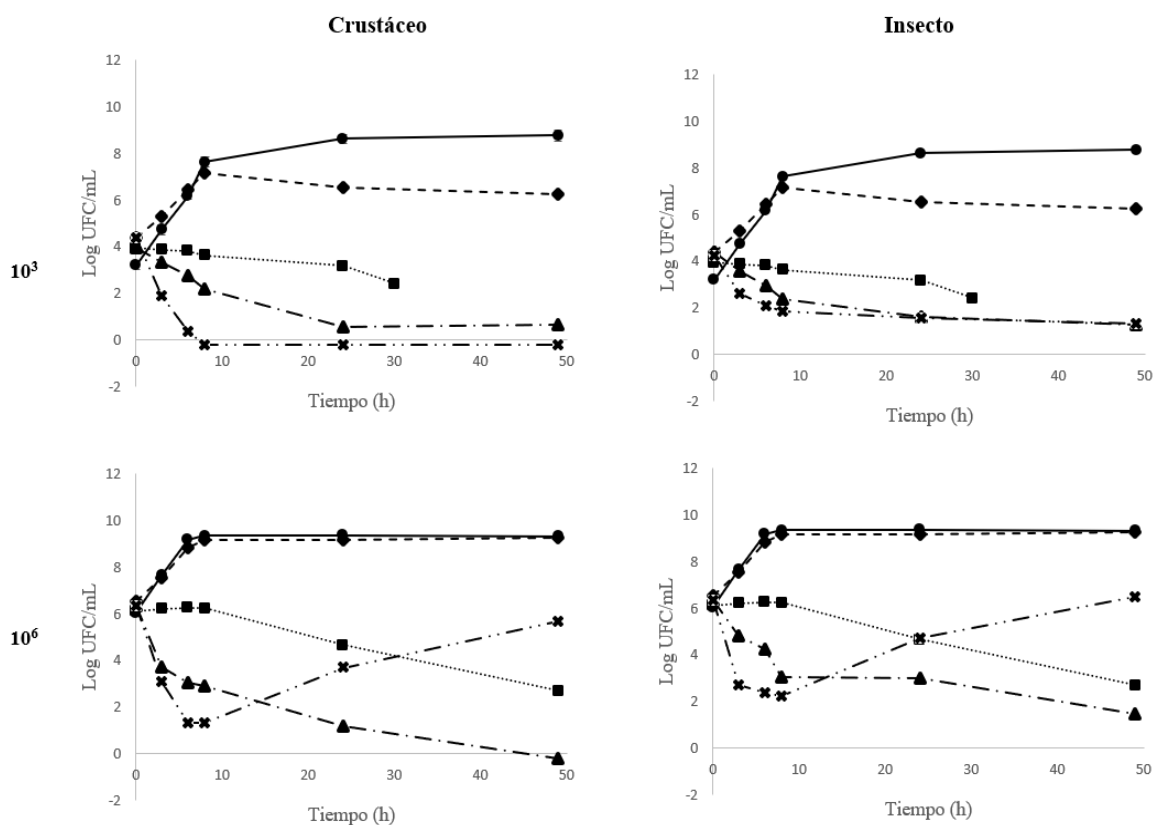


Figura 2. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* serovar 4b CECT 4032 en caldo soya tripticasa (TSB) suplementado con 1% de quitosano de insecto y crustáceo, almacenado a 37 °C.

Tratamiento control: CTSB pH 7.2 (•), control ácido: CTSB pH 5.00 (■); control ácido CTSB pH 6.25 (◆); quitosano pH 5.00 (▲); quitosano pH 6.25 (×).

El efecto antimicrobiano comparado en el tiempo para *L. monocytogenes* a un pH de 5.00 es el que presentó una mayor reducción a las 49 horas para ambos niveles de inoculación,

llegando a reducir casi por completo las colonias. Tanto el quitosano de crustáceo como el de insecto presentaron diferencias significativas entre horas y entre los niveles de inoculación (cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Recuento de *Listeria monocytogenes* suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 5.00 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo $10^3$	Nivel de inóculo $10^6$
0	$3.95 \pm 0.24^{WA}$	$6.36 \pm 0.23^{VB}$
3	$3.33 \pm 0.26^{WXA}$	$3.72 \pm 0.23^{WB}$
6	$2.77 \pm 0.26^{XYA}$	$3.04 \pm 0.23^{XB}$
8	$2.20 \pm 0.24^{YA}$	$2.20 \pm 0.24^{YA}$
24	$0.57 \pm 0.26^{ZA}$	$1.19 \pm 0.26^{YB}$
49	$0.65 \pm 0.42^{ZA}$	$-0.21 \pm 0.26^{ZA}$
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		12.28

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) indicando separación entre tiempo.

Cuadro 6. Recuento de *Listeria monocytogenes* suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 5.00 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo $10^3$	Nivel de inóculo $10^6$
0	$4.36 \pm 0.23^{VA}$	$6.36 \pm 0.23^{VB}$
3	$3.59 \pm 0.24^{WA}$	$4.79 \pm 0.23^{WB}$
6	$2.94 \pm 0.23^{XA}$	$4.26 \pm 0.23^{WB}$
8	$2.39 \pm 0.22^{YA}$	$3.05 \pm 0.23^{XB}$
24	$1.63 \pm 0.26^{ZA}$	$2.98 \pm 0.26^{YB}$
49	$1.28 \pm 0.26^{ZA}$	$1.45 \pm 0.26^{ZA}$
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		12.28

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) indicando separación entre tiempo.

De igual forma, se observa un efecto a un pH neutro de 6.25 cuando se obtiene un nivel de inóculo bajo. Este efecto se puede observar en las 49 horas y es más prominente en el tratamiento de quitosano de crustáceo el cual, no presento colonias desde la hora ocho (cuadro 7) en comparación con el quitosano de insecto donde el mayor efecto se presenta en la hora 49 (cuadro 8).

Cuadro 7. Recuento de *Listeria monocytogenes* suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 6.25 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	4.36 ± 0.23 <sup>WA</sup>	6.36 ± 0.23 <sup>VB</sup>
3	1.88 ± 0.26 <sup>XA</sup>	3.11 ± 0.26 <sup>WB</sup>
6	0.39 ± 0.26 <sup>YA</sup>	1.33 ± 0.26 <sup>XB</sup>
8	-0.21 ± 0.26 <sup>YA</sup>	1.31 ± 0.26 <sup>XB</sup>
24	-0.21 ± 0.26 <sup>YA</sup>	3.69 ± 0.24 <sup>YB</sup>
49	-0.21 ± 0.26 <sup>YA</sup>	5.66 ± 0.23 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		12.28

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

Cuadro 8. Recuento de *Listeria monocytogenes* suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 6.25 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	4.22 ± 0.23 <sup>WA</sup>	6.36 ± 0.23 <sup>WB</sup>
3	2.63 ± 0.23 <sup>XA</sup>	2.73 ± 0.22 <sup>XA</sup>
6	2.07 ± 0.26 <sup>XYA</sup>	2.39 ± 0.22 <sup>XA</sup>
8	1.87 ± 0.26 <sup>YA</sup>	2.24 ± 0.26 <sup>XA</sup>
24	1.57 ± 0.26 <sup>YA</sup>	4.74 ± 0.22 <sup>YB</sup>
49	1.33 ± 0.26 <sup>ZA</sup>	6.48 ± 0.22 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		12.28

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>W-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

En el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CECT 443, la acidificación del medio de crecimiento puede retardar el crecimiento de este. Esto se puede observar al comparar la curva de crecimiento del control ácido a 6.25 y el control ácido a 5.00 donde, el microorganismo alcanza la fase estacionaria desde las ocho horas de desarrollo en el control acidificado a 6.25, y en control acidificado a 5.00 alcanza la fase estacionaria a las 49 horas (figura 3). Esto indica una alta resistencia a ácidos orgánicos por parte de *S. Typhimurium* si es comparado con *E. coli* y *L. monocytogenes*.

El comportamiento del microorganismo se ve alterado cuando a este se le agrega otro factor en el medio de crecimiento. Cuando se somete a *S. Typhimurium* a un medio de crecimiento con quitosano de crustáceo a pH 5.00, este presenta una reducción de cuatro log cuando se inicia con una concentración de inoculación de  $10^3$ , al igual que si se inicia con una concentración de  $10^6$ .

En cambio, la actividad del quitosano de insecto al mismo nivel de acidificación del medio es reducida hasta las 24 horas en ambos niveles de inoculación, posteriormente el microorganismo empieza una fase exponencial o logarítmica indicando una resistencia o una pérdida en la actividad antimicrobiana después de esta hora. Ambos quitosanos a un pH 6.25 son capaces de retardar la fase logarítmica del microorganismo, sin embargo, no se observa una reducción en el crecimiento para ambos niveles de inoculación.

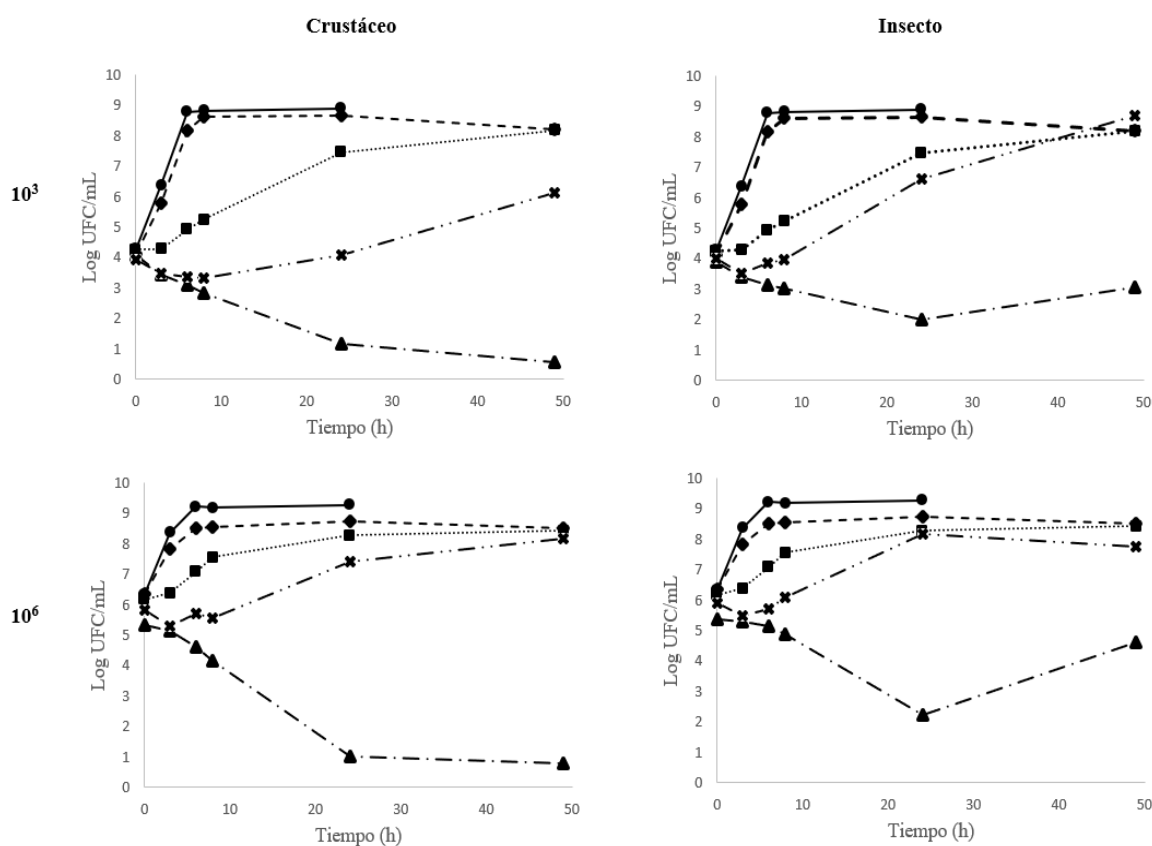


Figura 3. Sobrevivencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CECT 443 en caldo soya triptica (TSB) suplementado con 1% de quitosano de insecto y crustáceo, almacenado a 37 °C.

Tratamiento control: CTSB pH 7.2 (•), control ácido: CTSB pH 5.00 (■); control ácido CTSB pH 6.25 (◆); quitosano pH 5.00 (▲); quitosano pH 6.25 (×).

En el caso de *S. Typhimurium*, el quitosano de crustáceo fue el que presentó una mayor actividad en comparación con el quitosano de insecto cuando se comparan las horas a un

nivel de pH de 5.00. El quitosano de crustáceo presentó una mayor reducción a las 49 horas, presentando diferencias significativas entre horas y niveles de inoculación (cuadro 9).

Cuadro 9. Recuento de *Salmonella* Typhimurium suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 5.00 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	4.06 ± 0.11 <sup>VA</sup>	5.31 ± 0.11 <sup>WB</sup>
3	3.42 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.13 ± 0.11 <sup>WB</sup>
6	3.10 ± 0.12 <sup>XA</sup>	4.62 ± 0.11 <sup>XB</sup>
8	2.83 ± 0.12 <sup>XA</sup>	4.15 ± 0.11 <sup>YB</sup>
24	1.17 ± 0.12 <sup>YA</sup>	0.99 ± 0.12 <sup>ZA</sup>
49	0.54 ± 0.12 <sup>ZA</sup>	0.78 ± 0.12 <sup>ZA</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		4.58

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

Cuadro 10. Recuento de *Salmonella* Typhimurium suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 5.00 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.88 ± 0.12 <sup>VA</sup>	5.38 ± 0.11 <sup>WB</sup>
3	3.41 ± 0.12 <sup>WA</sup>	5.27 ± 0.11 <sup>WB</sup>
6	3.13 ± 0.12 <sup>XA</sup>	5.15 ± 0.11 <sup>WB</sup>
8	3.00 ± 0.12 <sup>XA</sup>	4.88 ± 0.11 <sup>XB</sup>
24	1.98 ± 0.12 <sup>YA</sup>	2.23 ± 0.12 <sup>YA</sup>
49	3.04 ± 0.11 <sup>XZA</sup>	4.62 ± 0.11 <sup>ZA</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		4.58

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

Por otra parte, el quitosano de insecto presentó una mayor inactivación hasta las primeras 24 horas y posteriormente se recupera presentando diferencias significativas entre las horas y los niveles de inoculación (cuadro 10). Por otra parte, no se observa un efecto antimicrobiano como tal sobre *S. Typhimurium* cuando se obtiene un nivel de pH neutro de 6.25. Ninguno de los dos quitosanos presentó un efecto antimicrobiano en ambos niveles

de inoculación ya que el microorganismo presentó una adaptabilidad entre las horas tres y seis (cuadro 11 y 12).

Cuadro 11. Recuento de *Salmonella* Typhimurium suplementado con quitosano de crustáceo al 1% a pH 6.25 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.91 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.80 ± 0.11 <sup>VXB</sup>
3	3.46 ± 0.11 <sup>XA</sup>	5.30 ± 0.11 <sup>WB</sup>
6	3.34 ± 0.12 <sup>XA</sup>	5.70 ± 0.11 <sup>XB</sup>
8	3.33 ± 0.12 <sup>XA</sup>	5.56 ± 0.11 <sup>XB</sup>
24	4.09 ± 0.11 <sup>YA</sup>	7.42 ± 0.11 <sup>YB</sup>
49	6.12 ± 0.11 <sup>ZA</sup>	8.15 ± 0.11 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		4.58

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

Cuadro 12. Recuento de *Salmonella* Typhimurium suplementado con quitosano de insecto al 1% a pH 6.25 en seis tiempos diferentes.

Tiempo (h)	Nivel de inóculo 10 <sup>3</sup>	Nivel de inóculo 10 <sup>6</sup>
0	3.98 ± 0.11 <sup>VA</sup>	5.90 ± 0.12 <sup>VB</sup>
3	3.50 ± 0.11 <sup>WA</sup>	5.46 ± 0.11 <sup>WB</sup>
6	3.84 ± 0.11 <sup>VXA</sup>	5.72 ± 0.12 <sup>WB</sup>
8	3.96 ± 0.11 <sup>VXA</sup>	6.08 ± 0.12 <sup>XB</sup>
24	6.62 ± 0.11 <sup>YA</sup>	8.16 ± 0.12 <sup>YB</sup>
49	8.68 ± 0.11 <sup>ZA</sup>	7.75 ± 0.12 <sup>ZB</sup>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>		4.58

<sup>A-B</sup>: Medias con diferente letra en cada fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre nivel de inoculación.

<sup>V-Z</sup>: Medias seguidas con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05) indicando separación entre tiempo.

En general, el quitosano es muy reconocido por su actividad antimicrobiana. Este efecto antimicrobiano se debe a una serie de factores intrínsecos y extrínsecos, por ejemplo, microorganismo (especie y fase de desarrollo); peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante; estado físico del quitosano, líquido (coloide) o sólido (membrana); factores ambientales, pH, temperatura y tiempo

(Kong *et al.* 2010). Diferentes grados de desacetilación crean diferentes números de grupos amino en las cadenas principales de quitosano. Esto determina la densidad de carga, y, por lo tanto, la intensidad de las interacciones electrostáticas con las membranas celulares microbianas. Otros posibles modos de acción de la actividad antimicrobiana son las interacciones hidrofóbicas y los efectos quelantes de metales presentes en el quitosano (Ahmed y Ikram 2017).

### **Fase II. Identificación del mejor tratamiento inhibitorio.**

Existe una interacción altamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre cada uno de los factores que se sometieron los microorganismos. En la figura 4, se puede observar una diferencia significativa entre los diferentes quitosanos; siendo el quitosano de crustáceo el tratamiento con mayor efecto en comparación con el quitosano de insecto a un nivel de pH bajo (5.00).

De igual forma, se puede observar una diferencia entre los tipos de microorganismos donde se obtuvo que, para microorganismos Gram positivos como *L. monocytogenes* existe un mayor efecto en la reducción por la presencia de los quitosanos en el medio, llegando a reducir hasta 6.59 Log. Para los casos de *E. coli* y *S. Typhimurium*, Gram negativos, existe una mayor reducción por parte del quitosano de crustáceo, sin embargo, la reducción no es tan prominente como en el caso de *L. monocytogenes*. Esto concuerda con Goy *et al.* (2016) donde menciona que existe un mayor efecto bactericida en bacterias Gram positivas en comparación con bacterias Gram negativos. Este efecto puede deberse a la capa de peptidoglucano presente en las bacterias Gram positivas que las vuelve más susceptible al quitosano.

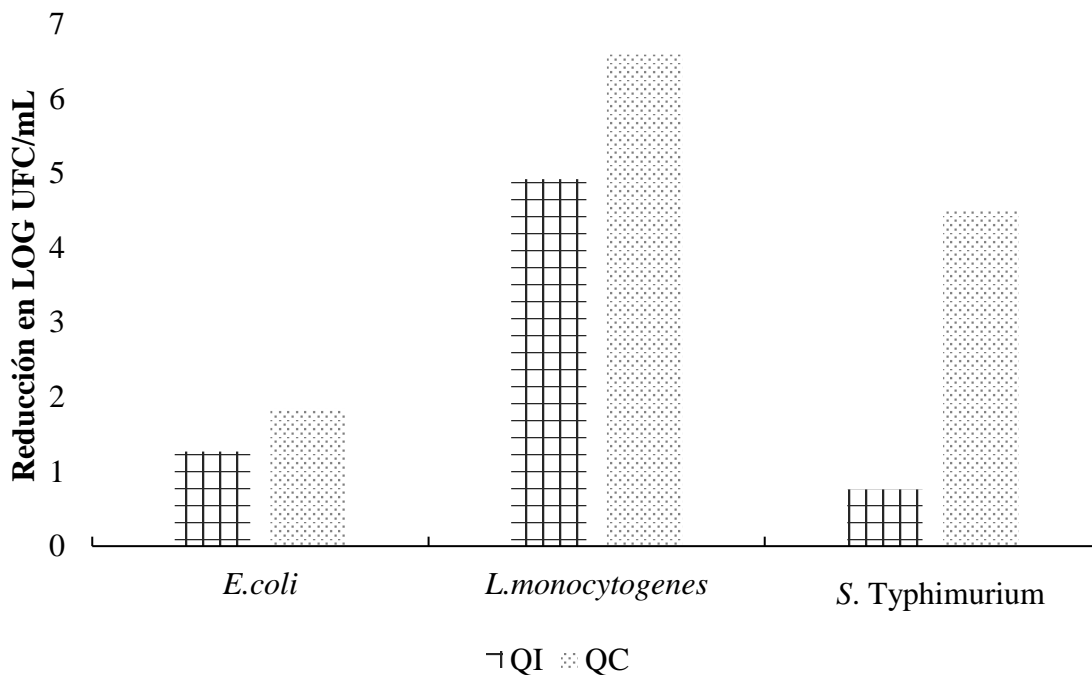


Figura 4. Reducción de microorganismos patógenos en quitosano de insecto (QI) y quitosano de crustáceo (QC) al 1% a pH 5.00 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).

En cambio, cuando se obtiene un nivel de pH alto (6.25), solo existe un efecto bactericida en las primeras ocho horas para los tres microorganismos cuando estos se someten a un nivel de inóculo alto (figura 5). A partir de la hora 10, el cultivo tiene la capacidad de recuperarse. El efecto bactericida más prominente se obtiene con el tratamiento de quitosano de crustáceo en comparación con el quitosano de insecto. De igual forma, hay un efecto mayor en el patógeno Gram positivas, *L. monocytogenes*, llegando a reducir hasta 4.99 Log UFC/ml en comparación con las otras dos bacterias Gram negativos, *E. coli* y *S. Typhimurium*.

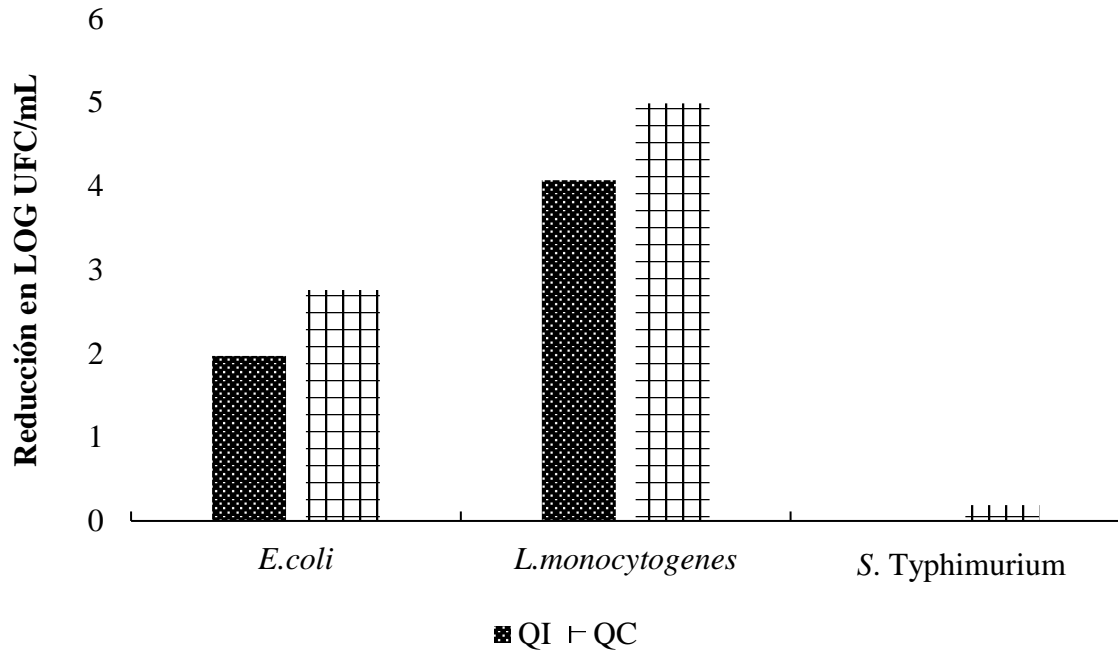


Figura 5. Reducción de microorganismos patógenos en quitosano de insecto (QI) y quitosano de crustáceo (QC) al 1% a pH 6.25 con recuento a las ocho horas en inóculo alto ( $10^6$ ).

A las 49 horas a un nivel de pH de 6.25, no existió un efecto bactericida tan prolongado en bacterias Gram negativo como lo son *E. coli* y *S. Typhimurim*. Dichas bacterias presentaron una capacidad de recuperarse, llegando a alcanzar una fase estacionaria a esta hora. Sin embargo, se puede observar que en bacterias Gram positivas como el caso de *L. monocytogenes* se observó una pequeña reducción o retraso en la recuperación. La reducción más significativa fue de 1.75 Log con el quitosano de insecto, siendo éste, el quitosano que presentó una mayor reducción en dicho tratamiento (figura 6).

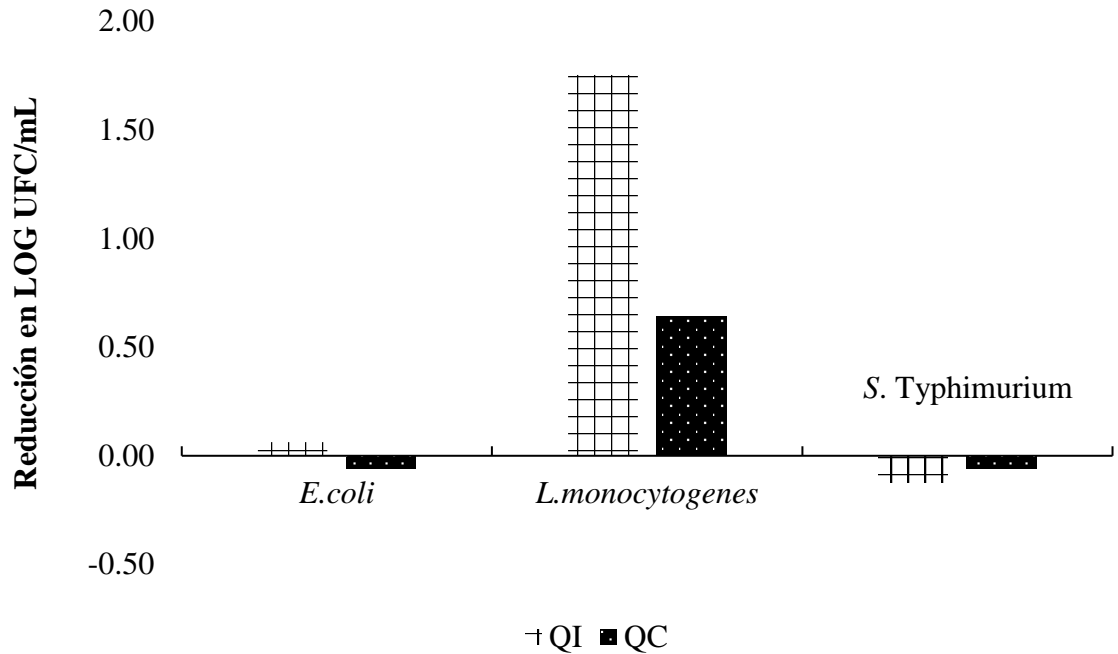


Figura 6. Reducción de microorganismos patógenos en quitosano de insecto (QI) y quitosano de crustáceo (QC) al 1% a pH 6.25 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).

La diferencia en el efecto antimicrobiano de los quitosanos en un pH ácido (5.00) y un pH más alcalino (6.25) concuerda con el estudio realizado por Hosseinnejad y Jafari (2016) donde menciona que el quitosano es un polímero que en soluciones acuosas ácidas y con un pH < 6.25 presenta una capacidad antimicrobiana. Esto se debe a que, el comportamiento policatiónico del quitosano en un medio ácido es el principal factor que contribuye a su actividad antimicrobiana. Debido a sus cargas superficiales positivas en condiciones ácidas, el quitosano interactúa con componentes aniónicos en la bacteria (Ahmed y Ikram 2017).

La carga positiva del quitosano interactúa con la carga negativa de la membrana celular alterando la permeabilidad de la bacteria. Un aumento en la permeabilidad de la bacteria provoca pérdida de nutrientes e incluso, puede llegar a provocar una hidrólisis mediante la modificación del ADN por la inhibición del ARNm de la bacteria. De igual forma, se demuestra que existe una mayor actividad por parte del quitosano cuando este se encuentre en soluciones más ácidas.

## 4. CONCLUSIONES

- Hubo una alta capacidad antimicrobiana tanto del quitosano de insecto como el de crustáceo. Sin embargo, existió un efecto mayor con bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes*) en comparación con bacterias Gram negativos (*E. coli* y *S. Typhimurium*).
- En la mayoría de los casos, el quitosano de crustáceo en comparación con el de insecto, fue el tratamiento que presentó una mayor actividad antimicrobiana frente a los diferentes patógenos.
- A pH de 5.00 el quitosano presentó una mayor actividad antimicrobiana por el aumento en la actividad de la carga superficial positiva que presenta dicho compuesto.
- Cuando se obtiene un nivel de inoculación bajo ( $10^3$ ), el quitosano presenta una mayor actividad antimicrobiana en comparación con un inóculo alto ( $10^6$ ), porque una inoculación alta permite una mayor adaptabilidad de los patógenos frente a la actividad del quitosano, lo cual se ve favorecido aún más cuando se tiene un nivel de pH de 6.25.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Aumentar la concentración de quitosano para observar si aumenta la actividad antimicrobiana frente a los patógenos en niveles de pH mayores a 6.25.
- Realizar análisis bioquímicos a los diferentes quitosanos para observar diferencias químicas en su estructura.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del quitosano con otras técnicas de inactivación.
- Aplicar el quitosano en diferentes matrices alimenticias o en el empaque para medir su actividad antimicrobiana.

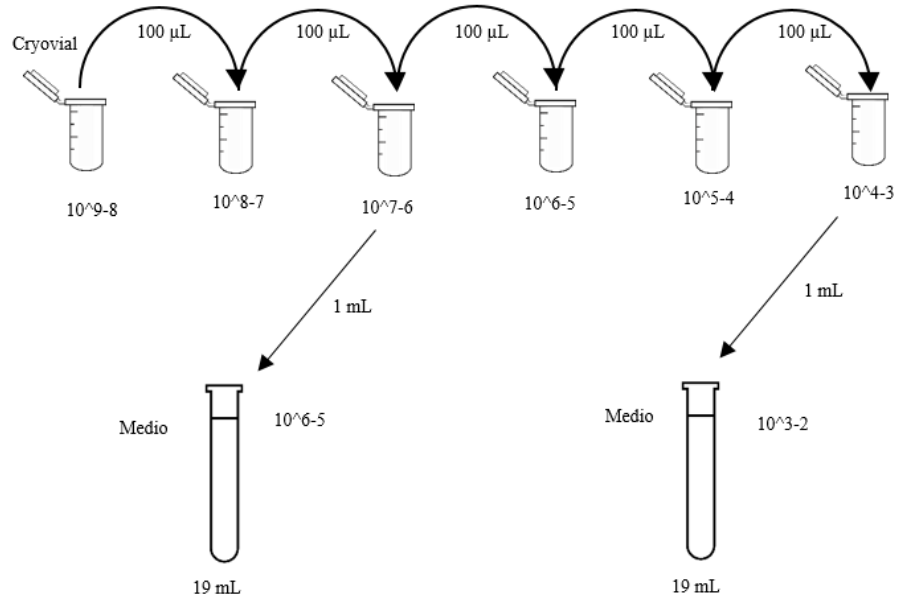
## 6. LITERATURA CITADA

- Ahmed S, Ikram S. 2017. Chitosan. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9781119364849.
- Amador-Mendoza A, Huerta Ochoa S, Herman-Lara E, Membrillo-Venegas I, Aguirre-Cruz A, Vivar-Vera M, Ramírez-Coutiño L. 2016. Effect of chemical biological and physical purification on chitin recovery from exoskeletons of shrimp (*Penaeus* sp) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*). Revista mexicana de ingeniería química. 15.
- Ayala Valencia G. 2015. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. Scientia Agroalimentaria. Vol. 2:32–38. 2339-4684.
- Bogh Sorensen L, Zeuthen P. 2003. Food preservation techniques. Boca Raton, Cambridge, Eng: CRC Press. 581 p. (Woodhead Publishing in food science and technology). ISBN:9781280373138.eng.<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=101392>.
- Chávez ME. 2018. Effect of chitosan pepper tree (*Schinus molle*) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides*. Rev.Mex.Ing.Quim.17(1):29:45.doi:10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Chavez.
- Elieh-Ali-Komi D, Hamblin MR. 2016. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. Int J Adv Res (Indore). 4(3):411–427. eng.
- Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. Appl Environ Microbiol. 58(8):2513–2516. eng.
- Gouda Fouad D. 2008. Chitosan as an antimicrobial compound mode of action and resistance mechanisms. Agypten: Universitat Bonn.
- Goy RC, Morais STB, Assis OBG. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. Revista Brasileira de Farmacognosia. 26(1):122–127. doi:10.1016/j.bjp.2015.09.010.
- Honarkar H, Barikani M. 2009. Applications of biopolymers I: chitosan. Monatsh Chem. 140(12):1403–1420. doi:10.1007/s00706-009-0197-4
- Hosseinnejad M, Jafari SM. 2016. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. Int J Biol Macromol. 85:467–475. eng. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.

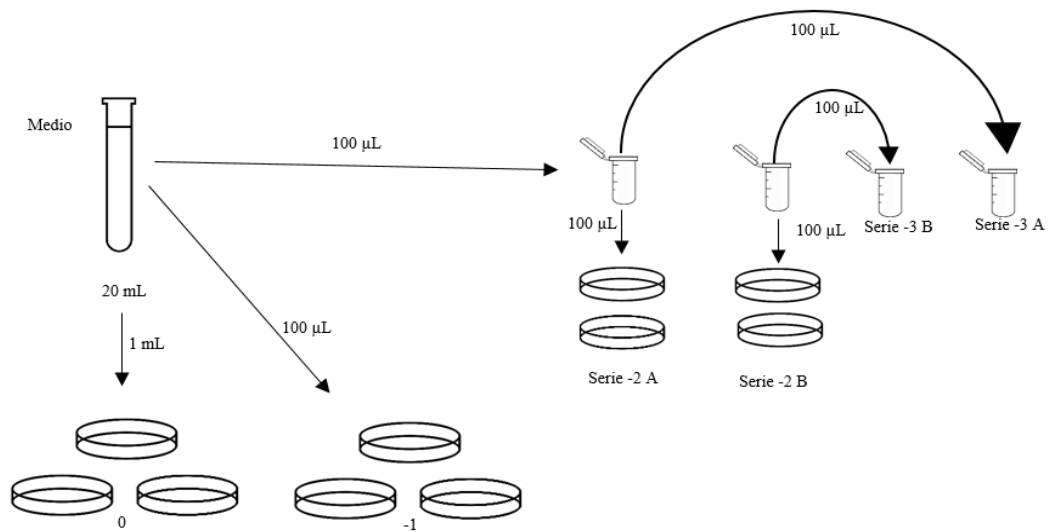
- Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 144(1):51–63. eng. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
- Kyung W, Kim BJ, Min, Young-Teck Kim, Robert M, Kimmel, Kay Cooksey, Park HJ. 2011. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT - Food Science and Technology.* 44:565–569.
- Lee CH, An DS, Park HJ, Lee DS. 2003. *Packag Technol Sci.* 16:99.
- Méndez Natera J. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola;* [consultado el 18 de marzo de 2008]. 8(1):1–22. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08002>.
- Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action: *Biomacromolecules.* (4):1457–1465.
- Rejane CG, De Britto D, Odilio BG. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *vol. 19 (n° 3):241–247.*
- Romero E, Lopez Malo A, Palou E. 2011. *Escherichia coli* de tipo patógeno en alimentos y modelación de su inactivación al aplicar diversos factores de conservación. *Temas selectos de ingeniería de alimentos, TSIA.5(2):28:39.* [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-2/TSIA-5\(2\)-E-Romero-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-2/TSIA-5(2)-E-Romero-et-al-2011.pdf).
- Sáenz-Mendoza AI, Zamudio-Flores PB, Palomino-Artalejo GA, Tirado-Gallegos JM, García-Cano VG, Ornelas-Paz JJ, Ríos-Velasco C, Acosta-Muñiz CH, Vargas-Torres A, Salgado-Delgado R. 2019. Caracterización fisicoquímica, morfológica y estructural de la quitina y quitosano de los insectos *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella*. 1.18(1):39:56.es. <http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/download/85/95>. doi:10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/Saenz.
- Shakeel A and Saiqa I (2017): *Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties.* Central University, Delhi, India.
- SIAQ, Sociedad Iberoamericana de Quitina. 2017. Quitina - quitosano. <http://www.siaq.net/quitina.html>.
- Younes I, Rinaudo M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs.* 13(3):1133–1174. eng. doi:10.3390/md13031133

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Realización de la dilución.



### Anexo 2. Realización de siembra.



**Anexo 3.** Tabla de reducción de microorganismos patógenos en quitosano al 1% a pH 5.00 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).

	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<b>QI</b>	$1.27 \pm 0.19^{AY}$	$4.92 \pm 0.23^{AX}$	$0.76 \pm 0.19^{AY}$
<b>QC</b>	$1.84 \pm 0.21^{BZ}$	$6.59 \pm 0.23^{BX}$	$4.50 \pm 0.23^{BY}$

A-B: separación de medias entre quitosanos.

X-Z: separación de medias entre patógenos.

QI: quitosano de insecto.

QC: quitosano de crustáceo.

**Anexo 4.** Tabla de reducción de microorganismos patógenos en quitosano al 1% a pH 6.25 con recuento a las 8 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).

	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<b>QI</b>	$1.97 \pm 0.17^{AX}$	$4.07 \pm 0.22^{AY}$	$0.01 \pm 0.22^{AZ}$
<b>QC</b>	$2.76 \pm 0.22^{BX}$	$4.99 \pm 0.22^{AY}$	$0.19 \pm 0.20^{BZ}$

A-B: separación de medias entre quitosanos.

X-Z: separación de medias entre patógenos.

QI: quitosano de insecto.

QC: quitosano de crustáceo.

**Anexo 5.** Tabla de reducción de microorganismos patógenos en quitosano al 1% a pH 6.25 con recuento a las 49 horas en inóculo alto ( $10^6$ ).

	<i>E.coli</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.Typhimurium</i>
<b>QI</b>	$0.06 \pm 0.19^{AX}$	$1.75 \pm 0.21^{AY}$	$-0.13 \pm 0.22^{AZ}$
<b>QC</b>	$-0.06 \pm 0.20^{BX}$	$0.64 \pm 0.20^{BY}$	$-0.06 \pm 0.20^{AZ}$

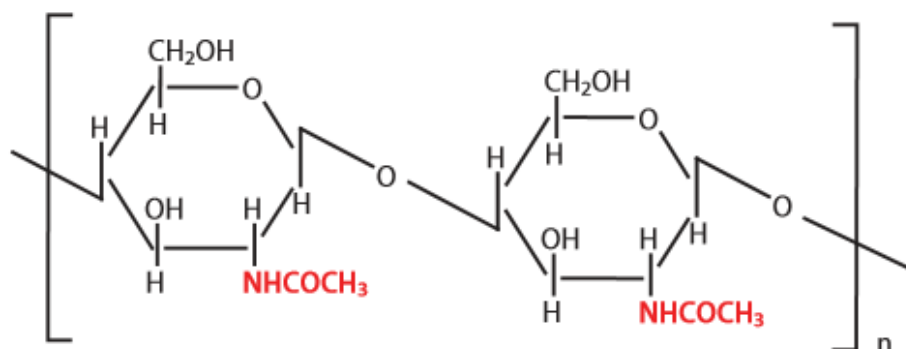
A-B: separación de medias entre quitosanos.

X-Z: separación de medias entre patógenos.

QI: quitosano de insecto.

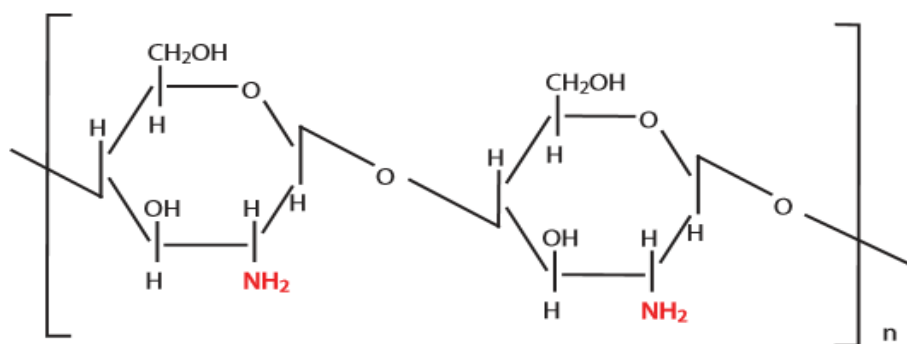
QC: quitosano de crustáceo.

**Anexo 6.** Estructura molecular de la quitina.



Fuente: Shakeel and Saiqa 2017

**Anexo 7.** Estructura molecular del quitosano.



Fuente: Shakeel A and Saiqa I 2017

**Anexo 8.** Cuadro resumen de *Escherichia coli*.

Análisis estadístico			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOGUFC Mean
0.99	5.59	0.28	5.09

**Anexo 9.** Cuadro resumen de *Listeria monocytogenes*.

Análisis estadístico			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOGUFC Mean
0.96	12.28	0.57	4.63

**Anexo 10.** Cuadro resumen de *Salmonella* Typhimurium.

<b>Análisis estadístico</b>			
<b>R-Square</b>	<b>Coeff Var</b>	<b>Root MSE</b>	<b>LOGUFC Mean</b>
0.99	4.58	0.26	5.75