



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
QUITOSAN

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

HERMENEGILDO GARCIA ALVARADO

ASESORA: OFB. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

278197



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

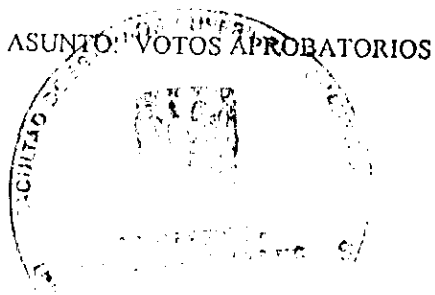
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. M. C. Cernón García Mjares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que se revisó la TESIS.

Pruebas de actividad antibacteriana de quitosán

que presenta el pasante: Hermenegildo García Alvarado
con número de cuenta: 8009262-9 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 13 de Abril 1992

PRESIDENTE	Q.F.I. <u>Andrea Recorní</u>	<u>Andrea A. Recorní</u>
VOCALES	Q.F. B. <u>Maricela Nué</u>	<u>Maricela Nué</u>
SECRETARÍO	Q.F.B. <u>Susana P. Miranda Castro</u>	<u>Susana P. Miranda Castro</u>
PRIMER SUPLENTE	M. en C. <u>Virginia Lara Saadón</u>	<u>Virginia Lara Saadón</u>
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. <u>Lidia Rangel Trujano</u>	<u>Lidia Rangel Trujano</u>

DEDICATORIAS

Con mucho cariño y respeto a mi querida mama por estar siempre al pendiente de mi brindándome su apoyo y comprensión.

A mi papa por su apoyo incondicional.

A mis hermanos: Felix, Ricardo, Galdino, Sergio y Bernardo.

A mis sobrinos: Valeria, Jorge, Berenice y el más pequeño de todos Cesar.

A mis amigos y compañeros de carrera: Arnulfo, Profirió, Luis, Felipe, Olivia, Tere, Javier, Jorge, Adrián, Martín, Alfredo, Inocencio, Eva María, Liliam, Rocío, Cecilia, María Luisa, y Gloria.

Siempre los voy a recordar.

A mis amigas de I.A. Lety y Maricarmen.

A mi amigo Adolfo compañero de CCH.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO y a la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.

Al H. Jurado. Especialmente a Patricia Miranda C. Mi asesora por haber confiado en mi y darme la oportunidad de haber realizado el presente trabajo.

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.

Al profesor Gerardo Martínez C.

Al maestro Andrés Romero R.

A la señora Seve y al señor Guadalupe.

A todos les doy las gracias por su aportación y su apoyo.

INDICE

ABREVIATURAS-----	1
RESUMEN-----	2
1.-INTRODUCCION-----	3
2.- ANTECEDENTES-----	4
2.1.-GENERALIDADES DE QUITINA Y QUITOSAN-----	4
2.1.1.-QUITOSAN EN LA NATURALEZA-----	5
2.1.2.-QUITOSAN OBTENIDO DE LA QUITINA DE CRUSTACEOS-----	6
2.2.-PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL QUITOSAN-----	8
2.2.1.- SOLUBILIDAD-----	8
2.2.2.- PROPIEDADES FUNCIONALES-----	9
2.2.3.- PROPIEDADES CATIONICAS-----	9
2.3.- USOS Y APLICACIONES DEL QUITOSAN-----	10
2.4.- ANTECEDENTES DE ANTIMICROBIANOS-----	11
2.5.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL QUITOSAN-----	12
2.6.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL QUITOSAN-----	13
2.7.- GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS -----	15
2.7.1.- MORFOLOGIA-----	15
2.8.- CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS-----	17
3.- OBJETIVOS-----	19
4.- MATERIALES Y METODOS -----	21
4.1.- PRUEBA DE ACTIVIDAD EN DISCOS KIRBY-BAUER-----	24
4.2.- PRUEBA DE ACTIVIDAD ATRAVES DE CINETICA DE CRECIMIENTO-----	25
4.3.- PRUEBA DE ACTIVIDAD POR CUENTA VIABLE-----	26
5.- RESULTADOS Y DISCUSIONES-----	28
6.- CONCLUSIONES-----	43
7.- BIBLIOGRAFIA-----	46

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
C	Carbono
NHCOCH ₃	Grupo Acetamido
NaOH	Hidróxido de sodio
KOH	Hidróxido de potasio
H ₃ PO ₄	Acido fosfórico
NAG	N-acetilglucosamina
NH ₂	Amina libre
NH ₃	Ion amonio
PAS	Acido paraminosalisílico
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
CO-A	Coenzima A
Gram (+)	Gram positivo
Gram (-)	Gram negativo
sp.	Silvestre
(p/v)	Peso volumen
tD.	Tiempo de duplicación
mg.	Miligramo
nm.	Nanomerto
ml.	Mililitro
μl.	Microlitro
D.O.	Densidad óptica

RESUMEN

El objetivo de este estudio fué examinar la acción antibacteriana de quitosán, obtenido de los desechos del caparazón de camarón (*Pandalus borealis*), sobre bacterias gram positivas y gram negativas de colección ATCC y cepas proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la sección de Bioquímica – Genética de la FES Cuautitlan. Empleando tres métodos conocidos. El primero consistió en la prueba en discos, método de Kirby-Bauer; el segundo es el de cinética de crecimiento de un microorganismo, y el tercer método empleado fue el de cuenta viable.

La primera prueba que se realizo fue utilizando la técnica de Kirby-Bauer, donde se probó en doce cepas bacterianas donde se obtuvieron resultados positivos en las siguientes bacterias gram positivas: *S. aureus*, *S. faecalis*, *M. luteus* y en gram negativas: *E. aerogenes*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*. Donde hubo halos de inhibición.

En la prueba de cinética de crecimiento se probó el quitosán a dos concentraciones de 0.5 % y 1.0 % en la cepa de *S. aureus* ATCC 6538p presentando inhibición del crecimiento en ambas siendo mayor la inhibición a la concentración de 1.0 %.

La tercera prueba realizada fue por cuenta viable probándose el quitosán en dos cepas una gram (+) *S. aureus* ATCC 6538p y otra gram (-) *E. aerogenes*. Los resultados que se obtuvieron fueron que en *S. aureus* ATCC 6538p reduce dos ciclos logarítmicos de crecimiento mientras que en *E. aerogenes* reduce un ciclo logarítmico de crecimiento.

1.- INTRODUCCION

En la actualidad se han desarrollado muchos agentes antimicrobianos para combatir las enfermedades infecciosas que son ocasionadas por diversos microorganismos; hongos, bacterias y virus. Por lo que, en el presente trabajo se probó la acción antibacteriana de un producto de origen natural conocido como quitosán. El cual fue obtenido de los desechos del caparazón de camarón en el laboratorio de biotecnología en la coordinación general de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.

Con la finalidad de probar uno mas de los usos y aplicaciones de esté producto de las diversas alternativas que presenta el quitosán, se prueba en diferentes cepas bacterianas gram (+) y gram (-) para tener una alternativa diferente contra las diferentes infecciones que ocasionan las bacterias.

El quitosán es un polimero 100% natural derivado de la quitina y muy similar a la celulosa en cuanto a composición química, que mediante diversos tratamientos químicos fue extraído del caparazón de camarón (*Pandalus borealis*). El tratamiento que se hace con el quitosán consiste en aplicarlo a diferentes cepas bacterianas para inhibir su crecimiento, a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de la solución de quitosán, empleando tres métodos conocidos método de (KIRBY-BAUER) prueba en discos, cinética de crecimiento de un microorganismo, y el método de cuenta viable. La aplicación del quitosán consiste en buscar las condiciones necesarias de solubilidad, pH y concentración del quitosán a las cuales se podría inhibir el crecimiento de las bacterias gram positivas y gram negativas de colección ATCC (American Type Culture Collection) y cepas que fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la sección de bioquímica-genética de la FES. Cuautitlan. La aplicación de quitosán en solución a diferentes cepas bacterianas ofrece una nueva alternativa como agente antimicrobiano. Ya que además se reporta que tambien inhibe el crecimiento de una gran variedad de hongos.

2.- ANTECEDENTES

2.1 - GENERALIDADES SOBRE QUITINA Y QUITOSAN.

QUITINA

La quitina es un biopolímero natural muy abundante en la naturaleza, junto con otros componentes (proteínas y sales minerales), aparece como constituyente estructural de los artrópodos, hongos y algas unicelulares. Químicamente se describe como β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. En la naturaleza se encuentra en varias configuraciones, α , β , γ quitina, siendo la más abundante la α quitina.⁽⁸⁾

La quitina está formada por unidades de aminoazúcares unidas por enlaces del tipo β -1-4. En este biopolímero los grupos amino se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amida de ácido acético. Este aminopolisacárido es de tipo lineal, llegando a formar cadenas de miles de unidades de N-acetilglucosamina. Estructuralmente la quitina es similar a la celulosa, la diferencia entre los dos polímeros es que el grupo hidroxilo en la posición C-2 de la celulosa es sustituido por un grupo acetamido (NHCOCH_3).^(13,32)

La quitina es un sólido blanco, que generalmente cristaliza. Debido a sus diferentes propiedades físicas y químicas puede tener varias modificaciones químicas; una hidrólisis química o enzimática de la quitina da como resultado oligómeros de aminoazúcares tales como; N-acetil glucosamina, quitobiosa y quitotriosa. Como biopolímero no soluble en agua, es desacetilado, mediante una hidrólisis con NaOH o KOH a temperaturas elevadas y convertido a quitosán, haciéndolo más hidrosoluble.⁽³²⁾

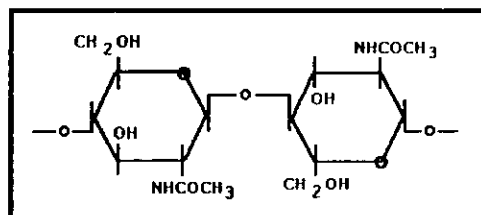


FIG. 1 Estructura química de la quitina

QUITOSAN

El quitosán es un polímero natural de alto peso molecular, derivado de la quitina de la forma desacetilada, químicamente descrita como (1-4)-2-Amino-desoxi- β -D-glucosa, siendo un polímero de los más abundantes en la naturaleza. Es un polímero de los más abundantes en la naturaleza. Es un poliamino lineal cuyo grupo amino se encuentra disponible para reacciones químicas y formación de sales con ácidos, y puede ser considerado como un derivado de la celulosa que se encuentra en forma de fibra, polvo o película transparente. Se reporta que la geometría de la molécula de quitosán es ortorrómbica, similar a la de la α -quitina. El peso molecular del quitosán reportado por algunos autores es de 1.2×10^5 daltons⁽²²⁾, y para el quitosán del caparazón de camarón 1.45×10^5 y 1.85×10^5 daltons.⁽¹³⁾

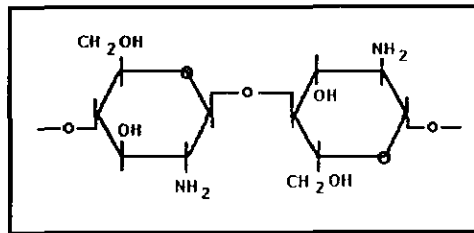


FIG. 2 Estructura química del quitosán

2.1.1 - QUITOSAN EN LA NATURALEZA

El quitosán es sintetizado in vivo por algunos organismos como son cangrejo, camarón y otros artrópodos y algunos hongos como son *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium crisogenum*, y *Neurospora crasa*. Por desacetilación enzimática, de quitina La desacetilación enzimática es llevada a cabo por la quitindesacetilasa. Esta enzima hidroliza el grupo acetamida en la quitina y ésta es inactivada por la UDP-N-acetil-glucosamina 6-fosfato^(8, 32)

2.1.2 - EL QUITOSAN OBTENIDO DE LA QUITINA DE LOS CRUSTACEOS

La recuperación de quitina y modificación a quitosán de algunos crustáceos como el cangrejo (*Cancer magister*), cangrejo rey (*Paralithodes camtschatica*), y camarón pacífico (*Pandalus borealis*) es llevado a cabo por un proceso general que consiste en tres pasos principalmente. (ver figura 3)

.Remoción de las proteínas que se encuentran en el material del camarón.

.Eliminación de los minerales o desmineralización.

.Desacetilación de la quitina para obtener quitosán.

La remoción de las proteínas del caparazón se lleva a cabo mediante un tratamiento con hidróxido de sodio.

La desmineralización se hace con ácido clorhídrico, para obtener la quitina.

La conversión de quitina a quitosán se hace por medio de una hidrólisis alcalina utilizando nuevamente hidróxido de sodio o hidróxido de potasio concentrado a altas temperaturas, efectuándose de esta manera la desacetilación.^(3,5,7,32)

OBTENCION DE QUITOSAN

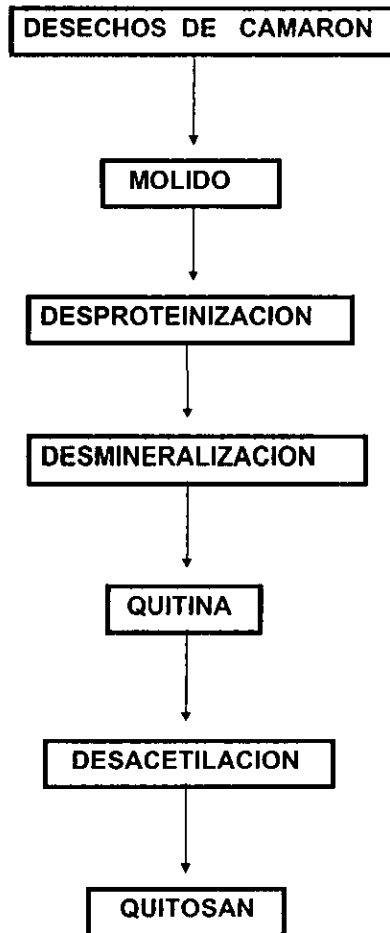


FIG.3. Diagrama general para la extracción de quitina y modificación a quitosán a partir de los desechos de camarón.^(3, 8, 32)

2.2.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL QUITOSAN.

2.2.1 SOLUBILIDAD.

Se reporta que el quitosán es soluble en ácidos orgánicos, en ácido clorhídrico, en ácido nítrico, siendo uno de los mejores el ácido fórmico en un rango de 0.2-100% y en soluciones acuosas de ácido acético al (5%). A un pH de 4.0 a 4.2, también ha sido solubilizado en una mezcla de ácido acético y metanol.^(13,24)

La solubilidad del quitosán se debe en parte a los aminogrupos que se encuentran presentes en la molécula, ya que son los que aceptan el protón de la carga positiva de los ácidos en que se disuelven.^(13,24)

El quitosán, es soluble a pH aproximadamente de 4.0-4.2 e insoluble a pH por arriba de 5.5 en ácido sulfúrico a temperatura ambiente, en agua, en soluciones alcalinas neutras a pH de 7.0, y en solventes orgánicos (por ejemplo dimetilformaldehído, y dimetilsulfóxido).

La solubilidad del quitosán depende de la forma en que el grupo amino se encuentre, ya sea en forma libre (-NH₂) o como ión amonio (-NH₃⁺).^(20,25)

(ver cuadro 1)

(-NH ₂) Amina libre	(-NH ₃ ⁺) Ión amonio
Soluble en soluciones ácidas	Soluble pH < 6.5
Insoluble a pH > 6.5	Forma soluciones viscosas
Insoluble en H ₂ PO ₄	Forma geles con polianiones
Insoluble en muchos solventes orgánicos	Permanece soluble en mezclas de alcohol/agua

Cuadro 1. Solubilidad del quitosán (Paul A. Sanford. Chitosan: Uses and potential applications.)

2.2.2- PROPIEDADES FUNCIONALES

VISCOSIDAD: La viscosidad de las soluciones de quitosán está en función a varios parámetros: la concentración del solvente tipo de disolvente, peso molecular del biopolímero, el pH, la temperatura y la presencia de ciertas sales en solución.^(2,13)

La viscosidad de las soluciones de quitina y quitosán es directamente proporcional a la concentración y el polímero es prácticamente lineal.⁽¹³⁾

2.2.3 PROPIEDADES CATIONICAS

El quitosán es un polielectrólito a pH ácido, presenta una alta densidad de carga por unidad de glucosamina, interactúa fuertemente con muchos materiales que portan cargas negativas por ejemplo: proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos dando una neutralidad eléctrica.⁽⁷⁾

El quitosán es un excelente floculante debido a su gran número de grupos $-NH^{3+}$ que pueden interactuar con las cargas negativas de las demás moléculas.^(7,32)

Se adhiere fácilmente a polímeros naturales semejantes al pelo y a la piel los cuales están compuestos de mucopolisacáridos y proteínas cargados negativamente.⁽³²⁾

2.3.- USOS Y APLICACIONES DEL QUITOSAN

El quitosán tiene gran importancia en la aplicación industrial, agrícola, de los alimentos y farmacéutica así como aplicaciones biomédicas. Los usos más importantes en la industria de los alimentos son en la clarificación de bebidas como lo son jugos de frutas y cerveza, así como la reducción de la turbidez ocasionada por bacteria, también en la recuperación de proteínas de desechos alimenticios para posteriormente ser utilizadas en la alimentación del ganado, para mejorar la producción de semillas como arroz, trigo y frijol, como regulador en la formación de cristales de hielo en alimentos congelados, como agente espesante, texturizante, quelante, emulsificante, en la elaboración de aderezos, bebidas, gelatinas y productos lácteos.^(1,3,7,24)

En la industria farmacéutica es usado como excipiente y como lubricante en el tableteado, en la fabricación de tabletas con actividad antifúngica y como componente de cosméticos.^(7,9,24)

En aplicaciones biomédicas, inhibe gran cantidad de hongos y es aplicado en dermatitis, además el polímero es utilizado en oftalmología en la fabricación de lentes de contacto. Se ha probado en animales de laboratorio como hipocolesterolémico, también se ha probado que estimula el sistema inmune, y en los procesos de cicatrización. El quitosán también posee la propiedad de unirse a enzimas por lo que puede ser utilizado en la purificación y en la inmovilización de enzimas, además debido a sus propiedades coagulantes y quelantes tiene un uso importante en la purificación de aguas residuales.^(1,13,24,32)

2.4. - ANTECEDENTES DE ANTIMICROBIANOS.

Desde el siglo XVII se emplearon varias sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas (por ejemplo la quinina para la malaria y la emetina para la amibiasis) No fue sino hasta el siglo XX, que empieza la quimioterapia como ciencia con Paul Herlich quien fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva y reconocer las reacciones químicas específicas entre los microorganismos y los medicamentos ya que descubrió que las arsefaminas a base de arsénico ataca al (*Treponema palidum*), causante de la sífilis en el hombre. ^(10.)

En 1935 continuó el desarrollo de la quimioterapia antimicrobiana con el descubrimiento de las sulfonamidas por Domugk. ^(10.)

En 1940 Chain y Florey encontraron que la penicilina descubierta por Fleming tenía un uso quimioterapéutico efectivo. Posteriormente y durante los últimos 25 años, la investigación quimioterapéutica se centró fundamentalmente en las sustancias de origen microbiano llamadas antibióticos. Además del desarrollo de la penicilina también se dio el de otras sustancias como la estreptomycinina, tetraciclina cloranfenicol y otras. ^(10,25)

La modificación química de las moléculas por biosíntesis ha constituido un método en el desarrollo de nuevos antimicrobianos, como los aminoglucosidos, el ácido paraminosalisílico (PAS) y los nitrofuranos. ^(9,10)

Existen otras alternativas más recientes de agentes antimicrobianos como son: los betalactámicos de nuevas estructuras. El carbapenem obtenido originalmente de *Streptomyces cattleya* y *Streptomyces olivaceus*, imipenem, meropenem en plena fase de investigación clínica, ácido olivámico, carpetimicina, asparenomicina derivado de (*Streptomyces tukononensis*), pluracidomicina derivado de (*Streptomyces sulfanofacrus*). Nitrofuranos como nimorazol, nifurtimox(lampit), nitrofurantoina, benzidazol, granadil, metenamina espectomicina aislada en 1961 del *Spectoyces spectabis* y *Spectoyces flavopersicus* por los laboratorios Upjohn. ⁽²⁸⁾

El origen del grupo de las Quinolonas se remonta al año de 1962 y en la actualidad se encuentran en plena expansión investigativa y comercial. Como ejemplo está la sinomicina, antibiotico aislado en 1970, en cultivos de *Micromonospora inyoensis* entre otros⁽²⁸⁾

Los antibióticos actúan sobre las bacterias en los siguientes niveles a través de inhibición de la síntesis de pared celular, inhibición de la función de la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos⁽⁹⁾

2.5 - ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL QUITOSAN

Se ha reportado la posible actividad antimicrobiana del quitosán, para que esta sustancia produzca inhibición del crecimiento bacteriano:⁽²⁵⁾

1) La naturaleza policationica de quitosán interfiere con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas en la superficie celular de las bacterias. Quitosán, y otras poliaminas interactúan con la membrana celular alterando la permeabilidad de la célula, por ejemplo: la levadura de panadería es inhibida por ciertos cationes como acetato de uranilo, sulfato de aluminio, anilina y D-glucosamina, los cuales actúan sobre la superficie celular de la levadura previniendo la entrada de glucosa.⁽²⁵⁾

2) El otro mecanismo involucra la unión de quitosán con la molécula de ADN, para inhibir la síntesis de ARNm. Ha sido propuesto que cuando el quitosán es liberado de la pared celular de hongos patógenos por las enzimas hidrolíticas de la planta hospedadora, el quitosán penetra el núcleo de los hongos e interfiere con la síntesis de ARNm y las proteínas.⁽²⁴⁾

Los oligómeros de la molécula de quitosán consistentes en siete unidades de azúcares han sido probados que son los que poseen la mayor actividad antifúngica.

2.6- MEDICION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antibacteriana de un agente se mide *in vitro* para determinar su potencia y la sensibilidad del microorganismo.

La determinación puede realizarse por varios métodos conocidos principalmente: difusión, dilución, cinética de crecimiento, ensayo enzimático y cromatografía.⁽¹⁰⁾

Método de difusión: se emplean dos técnicas que son la de los cilindros conocida como penicilindros y la de discos de papel ó técnica de (KIRBY-BAUER).^(9,10)

En la técnica de los penicilindros se utilizan pequeños cilindros de acero inoxidable sin fondo que se colocan en el medio de cultivo sólido, que ha sido sembrado en forma abundante con la bacteria de prueba ajustado a la turbidez a 0.5 de Mc Farland, en los penicilindros es colocado el antibacteriano que se va a utilizar el cual difunde en el medio de forma radial alrededor del penicilindro ocasionando la inhibición de la bacteria^(9,10)

En la técnica de (KIRBY-BAUER), se emplean discos de papel filtro que son impregnados con el antibacteriano; la actividad comienza partir del disco se por difusión en gradiente de concentración en el medio. Como la difusión es un proceso continuo, el gradiente de concentración nunca es estable por mucho tiempo; sin embargo puede lograrse la estabilización permitiendo que la difusión se inicie antes de que comience el crecimiento bacteriano, una vez difundido el antibacteriano en el medio, se producen distintas zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los discos. El inóculo bacteriano se ajusta la turbidez a 0.5 estándar de Mc Farland.^(9,10)

Pruebas de dilución: en estas pruebas se incorporan cantidades conocidas de las sustancias antibacterianas en medios bacteriológicos líquidos. Los medios son inoculados después con las bacterias que se van a poner a prueba y se incuban. El punto final se toma como la cantidad de antibacteriano requerida para inhibir el crecimiento, o para matar a la bacteria de prueba. Unos pocos antibacterianos inhiben el crecimiento bacteriano sin destruir a las bacterias, pero la mayor parte de los antibacterianos modernos ejercen actividad letal.^(9,10)

2.6.1 FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Entre los diversos factores que afectan la actividad antimicrobiana de un antimicrobiano deben considerarse los siguientes, ya que influyen significativamente en el resultado de las pruebas:

- a) pH del medio: Algunos agentes antibacterianos presentan mayor actividad a pH ácido y otros a pH alcalino.
- b) Estabilidad del agente antibacteriano: A la temperatura de incubación varios agentes pierden su actividad mientras que otros son bastante estables.
- c) Tamaño del inóculo: En general, cuando más grande sea el inóculo bacteriano más baja será la "sensibilidad" aparente del microorganismo. Las grandes poblaciones bacterianas se inhiben en forma menos rápida y completa que las pequeñas poblaciones.
- d) Duración de la incubación: En muchos casos los microorganismos no mueren cuando se exponen poco tiempo a los agentes antibacterianos, sino que solamente se inhibe su multiplicación. Cuanto más tiempo están en incubación, mayor es la oportunidad que tienen de presentarse las mutantes resistentes.
- e) Actividad metabólica de los microorganismos: En general, los microorganismos de crecimiento rápido son más sensibles a la acción de los antibacterianos, que aquellos que se encuentran en fase de reposo. Las bacterias "persistentes" son aquellas metabólicamente inactivas las cuales sobreviven a exposiciones prolongadas a los antimicrobianos.^(9,19)

2.7.- GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS

2.7.1 MORFOLOGIA.

2.5.1.1 PARED CELULAR: las bacterias se han clasificado de acuerdo a la composición de su pared celular en gram positivas y gram negativas. La pared celular de las bacterias gram positivas es más rígida que la pared celular de las bacterias gram negativas. Esto debido al grueso de la capa de mureina de la pared celular que puede contar hasta con un 90% del peso seco de la pared celular de las bacterias gram positivas. En contraste con la pared celular de las bacterias gram negativas que contienen solo un 10% de mureina, pero que son adicionados con una capa delgada de lipopolisacáridos los cuales contribuyen a su comportamiento químico y funcional.⁽²¹⁾ (ver cuadro 2)

CARACTERISTICAS	Gram positivas	Gram negativas
Estructura de la pared celular	Gruesa (15-80nm) Una sola capa (monocapa)	Delgada (10-15nm) Triple capa (multicapa)
Composición de la pared celular	Baja en lípidos (1-4%) presenta péptido glicano; es un componente importante el 50% del peso. Acidos teicóicos	Alta en lípidos (11-22%) péptido glicano presente en una capa interna rígida; representa el 10% del peso seco. No hay Acidos teicóicos
Requerimientos nutricionales	Relativamente complejos en muchas especies	Relativamente sencillos
Resistencia a la ruptura mecánica	Más resistentes	Menos resistentes

Cuadro 2. características de la pared celular de las bacterias.(M.J. Pelzcar, E.C.S. Chan. Microbiología: segunda edición. 429. 1982.)

2.7.1.2 MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.

Composición: Su contenido en proteínas es superior al que presentan las células de los mamíferos, es decir entre un 60 y 70%, también presenta de un 20 a un 30% de carbohidratos. La membrana citoplasmática puede contener hasta un 20% de la proteína total de una bacteria. Se han encontrado diversas proteínas que poseen funciones catalíticas o de transporte.

La membrana citoplasmática contiene numerosas enzimas, entre las que se encuentran las siguientes: 1) Los citocromos y otras enzimas que intervienen en los procesos de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. 2) Las enzimas que intervienen en los procesos de biosíntesis de lípidos, Acetil-coA y Malonil-coA. 3) Las enzimas que actúan en la última fase de la biosíntesis de la pared celular, que solo se encuentra en las bacterias gram negativas. 4) La DNA replicasa. 5) Las exoenzimas.⁽²⁾

La membrana citoplasmática es muy importante porque controla el paso de sustancias químicas en solución del exterior hacia adentro y hacia afuera de la célula además impide la pérdida de las proteínas periplasmáticas y protege a la célula. La presencia de poros proteínicos en la membrana externa la hace permeable a los solutos de peso molecular bajo; por lo que las moléculas grandes de antibióticos penetran con relativa lentitud, lo cual explica la resistencia bastante elevada que manifiestan las bacterias gram negativas a éstos. La membrana externa varía ampliamente de una especie gram negativa a otra.^(9,18)

2.7.1.3 CITOPLASMA.

En las bacterias, el citoplasma contiene ARN demasiado agregado, el cromosoma de la bacteria es una molécula cíclica de ADN de doble cadena con una longitud más larga que la misma célula.⁽²⁾

Las bacterias son células procariotas, ya que carecen de núcleo, aparato mitótico, nucleolo, histonas, mitocondrias y membrana nuclear.^(2, 10)

2.7.1.4- DIFERENCIAS RELATIVAS DE LAS BACTERIAS.

Estas diferencias son importantes de conocer porque son las responsables de la manera en que estos dos grupos de bacterias responden a varios tratamientos y agentes tales como la tinción de Gram y ciertos antimicrobianos como las penicilinas, estreptomicinas, eritromicinas, desinfectantes y mutantes.⁽²²⁾

2.8- CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS

CUADRO 5 CEPAS GRAM POSITIVAS

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Coco gram (+) en pares o racimos de uvas. Aerobio	Coco gram (+) en pares de cadenas o en tetradas. Aerobio.	Coco gram (+) en pares, racimos o en conglomerados. Aerobio.
Morfología: Colonias redondas lisas elevadas y resplandecientes de color gris a amarillo.	Morfología: Colonias dicoidales de 1-2 mm. de diámetro de color amarillo.	Morfología: Colonias lisas de color amarillo.
Patología: Producen necrosis tisular, puede producir también neumonía, sepsis y endocarditis.	Patología: Forma parte de la flora normal del intestino donde puede presentar infecciones.	Patología: Puede ocasionar enfermedades intestinales.
No forma esporas	No forma esporas	No forma esporas

(E. Jawets. Microbiología Medica. Segunda Edición, 155, 1985)

CUADRO 6 CEPAS GRAM NEGATIVAS

<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. tiphy</i>
Bacilo gram (-) recto ó ligeramente curvado. Aerobio	Bacilo gram (-) bastoncillos Aerobio	Bacilo gram (-) bastoncillos Aerobio	Bacilo gram (-) bastoncillos Aerobio
Morfología: Colonias de color verde ó verde azuladas en medio de cultivo sólido TSA., AN. Y MH.	Morfología: colonias de color blanco gris circulares convexas en medio de cultivo TSA, AN., y M.H.	Morfología: Colonias de color amarillo elevadas no hay resplandor metálico en medio. TSA., A.N., y M.H.	Morfología: Colonias de color blanco que sobreviven a la congelación en medio TSA., y A.N.
Patología: Se aísla en diversas lesiones, heridas, quemaduras, aparato urinario, vías respiratorias, medio otitis media.	Patología: Causa infección en las vías urinarias y diarrea.	Patología: Tiene cápsula pequeña y se encuentra de vida libre lo mismo en el tracto intestinal y produce infección en vías urinarias y sepsis.	Patología: causa salmonelosis en humanos.
No forma esporas	No forma esporas	No forma esporas	No forma esporas

(E. Jawets. Microbiología Médica. Segunda Edición, 167, 1985)

TSA. Trypticaseína soya agar

MH. Mueller Hinton

AM. Agar nutritivo

3.- OBJETIVOS.

GENERAL: Probar la acción antibacteriana de quitosán obtenido a partir de desechos de camarón, empleando tres diferentes técnicas: la de Kirby-Bauer, la de Cinética de crecimiento, y la técnica de Cuenta viable, para demostrar si el quitosán presenta actividad bactericida sobre diferentes bacterias gram (+) y gram (-), de colección ATCC y silvestres.

PARTICULARES.

- 3.1.- Probar la acción antibacteriana del quitosán a diferentes concentraciones empleando la técnica de difusión en discos (técnica de Kirby-Bauer) sobre bacterias gram positivas y gram negativas de colección ATCC y cepas silvestres, para demostrar si el quitosán es realmente efectivo, en las diferentes cepas en las que fue aplicado de acuerdo con la técnica utilizada.
- 3.2.- Probar la acción antibacteriana del quitosán a través de cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, probando dos concentraciones, para demostrar la actividad bactericida del quitosán.
- 3.3.- Probar la acción antibacteriana del quitosán a través de cuenta viable, en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p gram (+) y *Enterobacter aerogenes* gram (-), para demostrar esta acción en estas bacterias y observar la diferencia que presenta el quitosán en cada una de las cepas.

HIPOTESIS

Si se emplean tres técnicas diferentes de pruebas antibacterianas se podrá probar que el quitosán presenta actividad bactericida sobre diferentes bacterias gram (+) y gram (-), de colección ATCC Y silvestres.

4.- MATERIAL Y METODOS.

4.1 - MATERIAL BIOLOGICO

4.1. 1.- OBTENCION Y CLASIFICACION DE CEPAS

.Las cepas utilizadas en el desarrollo experimental fueron cepas de colección ATCC (American Type Culture Collection) y cepas silvestres que fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la sección de Bioquímica-Genética de la FES Cuautitlan.

CUADRO 5 CEPAS UTILIZADAS

ATCC DE COLECCION		Cepas donadas por la sección de Bioquímica-Genética.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 11778	<i>Salmonella tiphy</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 10741	

4.1.2 – MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

CUADRO 6

MEDIOS DE CULTIVO	REACTIVOS
-Agar Mueller Hinton (M.H.)	-Hidróxido de sodio NaOH
-Agar Trypticaseína Soya (T.S.A.)	-Acido acético CH_3COOH
-Infusión de Cerebro Corazón (B.H.I.)	-Fosfato de sodio NaH_2PO_4
	-Difosfato de sodio $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

4.1.3 – MATERIAL DE CRISTALERIA Y APARATOS

MATERIAL DE CRISTALERIA

- cajas de petri
- vasos de precipitados de 100, 250, y 500 ml.
- Pipetas de 1.5 y 10 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 50, 250, y 1000 ml.
- Tubos de ensaye
- Gradilla para tubos de esaye
- Micropipetas de 100 μ l y 1000 μ l.
- Asa
- Varilla de vidrio
- Discos de papel
- Hisopos de algodón
- algodón

APARATOS

- Incubadora
- Agitador con regulador de temperatura y velocidad
- Microscopio
- Espectrofotómetro
- Centrifuga
- Balanza analítica
- bortex

4.1.4- PREPARACION DE LA SOLUCION DE QUITOSAN.

El quitosán con el que se llevó a cabo el trabajo fue preparado por la QFB. Patricia Miranda C. del laboratorio de Biotecnología, Este quitosán fue obtenido a partir de quitina extraída de los desechos de camarón y siguiendo la metodología establecida en este laboratorio.⁽³²⁾

El quitosán se disuelve en agua y se van agregando gotas de ácido acético concentrado poco a poco y con agitación hasta alcanzar un pH aproximado de 4.0 donde alcanza su disolución. Se ajusta el pH al cual se va a utilizar la solución con hidróxido de sodio NaOH 50 % (p/v). Al final se esteriliza la solución de quitosán , se guarda en refrigeración a 4°C.

4.2- PRUEBA DE ACTIVIDAD EN DISCOS, TECNICA DE (KIRBY-BAUER)

La técnica de Kirby-Bauer es el método usado con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos para medir la susceptibilidad de las bacteria a diferentes agentes antimicrobianos . Se colocan discos de papel filtro impregnados con el antimicrobiano en la superficie del agar previamente inoculado con el microorganismo a probar. El antimicrobiano de los discos difunde en el agar, produciendo distintas zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de antimicrobiano a los que las bacteria son sensibles.

Se toma una colonia con una asa estéril y se coloca en 5 ml. de medio de cultivo líquido tripticaseína soya (TS) o infusión de cerebro y corazón (BHI) se incuba a 37°C. Durante tres horas aproximadamente, se ajusta la turbidez de Mac Farland, con un hisopo de algodón hidrófilico inocuo cuidadosamente estandarizado se toma la muestra introduciéndola en el tubo que contiene el cultivo. Una vez remojado el hisopo se aplica sobre la superficie del medio de cultivo agar Mueller Hinton en placas de 5-6 mm. de grosor. Se colocan los pequeños discos de papel de 5 mm. de diámetro impregnados con la solución de quitosán sobre la superficie de la placa sembrada. Se incuban a 37°C. Por 18 horas. Posteriormente se examina la placa observando zonas de inhibición alrededor de los discos. Una zona de inhibición (área clara) indica que el microorganismo fue inhibido por el quitosán difundido en el agar sobre el disco.

Bajo este esquema se realizan las siguientes pruebas. CUADRO 7

Concentración de quitosán %	pH
0.1	7.0
0.5	7.0
0.05	4.0, 4.2, 5.8, 6.0 y 7.0
0.005	4.0, y 7.0
0.0005	4.0, y 7.0
5×10^{-4}	4.0, y 7.0
5×10^{-5}	4.0, y 7.0

4.3- PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIANA DE QUITOSAN A TRAVES DE CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.

4.3.1: CINETICA DE CRECIMIENTO

Se toma una colonia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. De un cultivo en una placa de agar, con una asa. Se transfiere a un matraz que contenga 50 ml. de medio de cultivo fresco BHI. Se incuba el cultivo durante toda la noche a 37°C. Después de la incubación de este mismo cultivo se toman 25 ml. y se colocan en un matraz de 1 lt. Que contiene 250 ml. de medio de cultivo fresco BHI. Se toma una muestra de 5 ml. para leer en el espectrofotómetro a una absorbancia de 580 nm. El espectrofotómetro es calibrado usando como blanco medio de cultivo BHI estéril. El cultivo se incuba a 37°C., con agitación, se toman muestras a intervalos de una hora y se mide densidad óptica.

4.3.2 - PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIANA DE QUITOSAN A TRAVES DE CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.

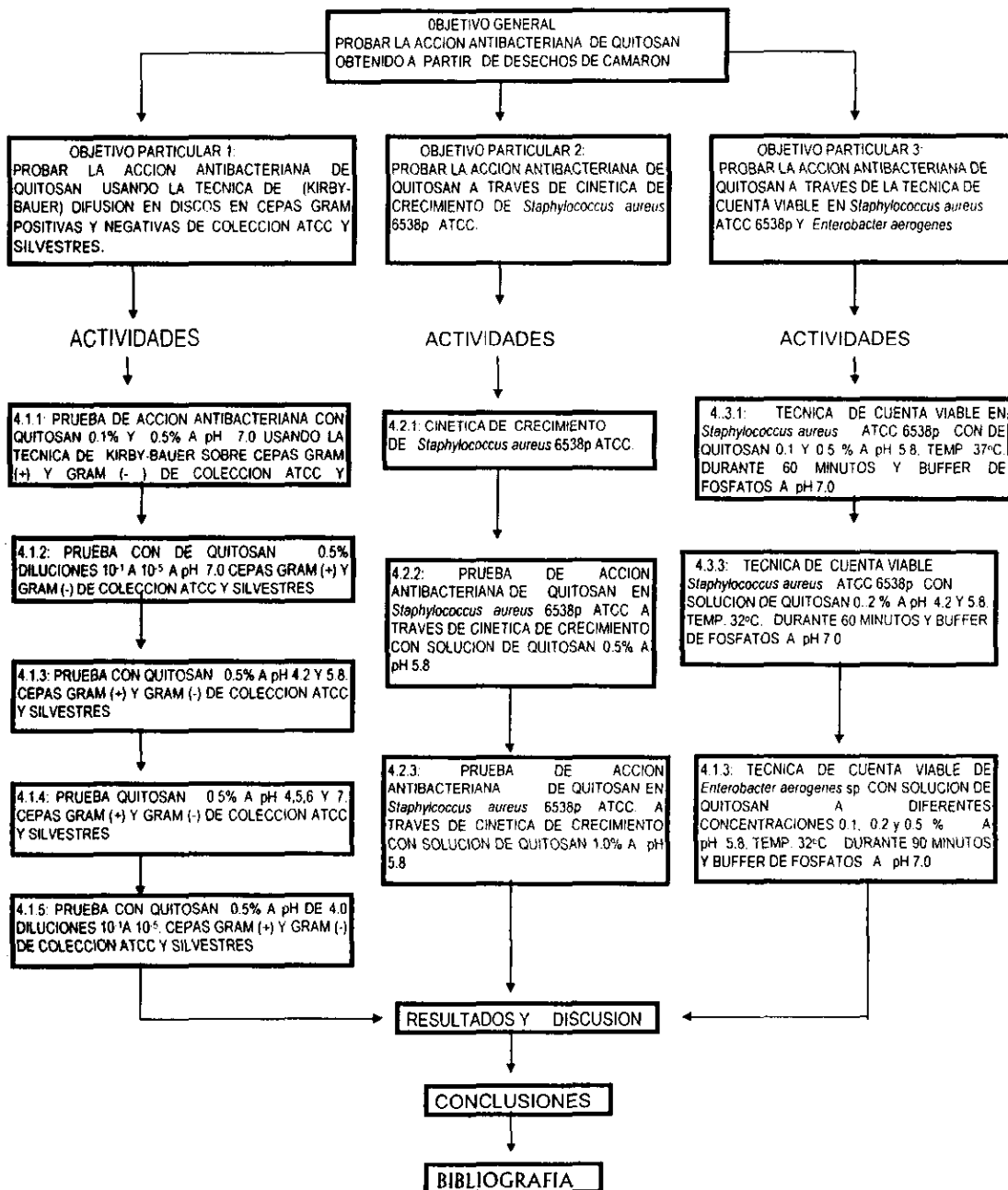
Se toma una colonia bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. De un cultivo en una placa de agar, con una asa. Se transfiere a un matraz de 250 ml. con 50 ml. de medio de cultivo fresco BHI. Se incuba durante 24 horas a 37°C. Después de la incubación de este mismo cultivo se toman dos muestras de 25 ml. cada una y se ponen en un matraz de 1 lt. con 250 ml. de medio de cultivo fresco BHI. Al matraz 1 se le agregan 12.5 ml. de solución de quitosán y al matraz 2. Se le agregan 12.5 ml. de agua acidificada a pH 4.0 para usarse como control. Se toma una muestra de 5 ml. y se lee en el espectrofotómetro a una absorbancia de 580 nm. El espectrofotómetro es calibrado usando como blanco medio de cultivo BHI estéril. Se incuban a 37°C., con agitación, tomando muestras a intervalos de una hora y se mide densidad óptica.

4.4.- PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIANA DE QUITOSAN A TRAVES DE CUENTA VIABLE DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p Y *Enterobacter aerogenes* .

Se toma una colonia bacteriana de un cultivo en una placa de agar, con una asa . Se transfiere a un tubo con medio de cultivo líquido BHI. se pone a incubar a 37° C. Durante 18 horas, se toma de éste cultivo 1 ml. y se coloca en un tubo que contiene 10 ml. de la solución de quitosán en diferentes concentraciones. (0.1, 0.2, y 0.5 %).

Se prepara un blanco con buffer de fosfatos y se utiliza en vez de la solución de quitosán, con el fin de usarse como control, en la misma proporción que la anterior, una vez preparados los tubos se agitan y se toman 10 microlitros con una micropipeta de cada uno de los tubos y se colocan en cajas con medio de cultivo sólido tripticaseína soya agar. (TSA)., se incuban a 32°C. De 60 a 90 minutos, tomando muestras a intervalos de 20 minutos cada una. Las cajas en las que se puso el cultivo se estrían y se incuban a 37°C. Durante 24 horas, se hace el recuento de colonias sobrevivientes y se gráficán los resultados.

CUADRO METODOLOGICO



5.- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1.1 PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIAL DE QUITOSAN SOLUCIONES DE 0.1 % Y 0.5 % A pH 7.0 USANDO LA TECNICA (KIRBY-BAUER).

En la tabla N° 1 Se reportan los resultados de la prueba efectuada en cepas de colección ATCC. con solución de quitosán 0.1 % y 0.5 % a pH 7.0.

Tabla N° 1 Solución de quitosán a pH 7.0

CEPAS ATCC		0.1 %	0.5 %
<i>Escherichia coli</i>	25922	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	3	3
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	3	3
<i>Streptococcus faecalis</i>	10536	3	3
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	3	3
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	11778	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538p	3	3
<i>Escherichia coli</i>	10741	3	3

Los halos de inhibición se observan cuando alrededor del disco impregnado con solución de quitosán aparece un área clara lo que indica que no hubo crecimiento bacteriano.

En ambas pruebas se observa que hubo halo de inhibición a las concentraciones de 0.1% y 0.5 %.

En la tabla N° 2 se reportan los resultados de las cepas silvestres en las que se probó las soluciones de quitosán 0.1 % y 0.5 %.

Tabla N° 2 Solución de quitosán a pH 7.0

CEPAS SILVESTRES	0.1 %	0.5 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	3

Observándose que hubo halos de inhibición en las siguientes cepas: *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*. A ambas concentraciones.

De acuerdo con los resultados de las tablas N° 1 y 2 se observó que la solución de quitosán 0.1% y 0.5 % presentaron el mismo halo de inhibición y que únicamente en las cepas *E. coli* y *S. typhi* No hubo halo de inhibición. Según la concentración inhibitoria mínima (MIC) de los resultados obtenidos se establece que las bacterias son resistentes a la solución de quitosán 0.1 y 0.5 %.

5.1.2 PRUEBA CON SOLUCION DE QUITOSAN 0.5 % A pH 7.0 HACIENDO DILUCIONES 0.05 A 5×10^{-5}

En la tabla N° 3 se reportan los resultados de la prueba realizada con solución de quitosán a 0.5 % con diluciones 0.05 A 5×10^{-5} en cepas gram positivas y gram negativas de colección ATCC y silvestres

Tabla N° 3

Halo de inhibición/ dilución

CEPA	0.5%	0.05	0.005	0.0005	5×10^{-4}	5×10^{-5}
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	3	0	0	0	0	0
<i>S. faecalis</i> ATCC 10536	3	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	3	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3	3	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	3	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	3	3	0	0	0	0

Observándose que solamente hubo inhibición al aplicar la solución de quitosán al 0.5 % y en las diluciones hechas, únicamente presentan inhibición dos cepas *S. aureus*. y *E. coli* ATCC 25922 dilución. 0.05

5.1.3 PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIAL DE SOLUCION DE QUITOSAN

0.5 % pH 4.2 y 5.8, USANDO COMO CONTROL AGUA A pH 4.2 Y 5.8

En la tabla N° 4 se reportan los resultados de la prueba de acción antibacterina de quitosán solución 0.5 % sobre cepas gram positivas y gram negativas. La prueba se realizo de la siguiente manera se colocan cuatro discos en la caja que contiene la cepa, se ponen dos discos con quitosán a diferente pH, y los otros dos con el control.

Tabla N° 4.

HALO DE INHIBICION/CONC.	Quitosán	0.5 %	Control	Control
CEPA	pH = 5.8	pH = 4.2	pH = 5.8	pH = 4.2
<i>Staphylococcus aureus.</i>	3	8	0	0
<i>Escherichia coli</i>	6	8	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	3	0	0
<i>Salmonella tiphy</i>	6	8	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	6	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	6	8	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3	6	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10741	3	6	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9548	6	6	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 11778	3	3	0	0

De acuerdo con los resultados se observaron halos de inhibición mayores a pH de 4.2 en la solución de quitosán a 0.5 % y en las cepas *Staphylococcus aureus.*, *Salmonella tiphy*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. Observando que en los discos que fueron impregnados con agua a pH 4.2 y 5.8 no hubo halo de inhibición en ninguna de las cepas tratadas

En esta prueba se obtuvieron resultados en los halos de inhibición de 3 mm. de diámetro según la concentración inhibitoria mínima la cepa es conciderada resistente y las que presentan un halo de inhibición de 8 mm. de diámetro son consideradas susceptibles.

5.1.4 RESULTADOS PRUEBA CON SOLUCION DE QUITOSAN 0.5 % pH
4,5,6,7. UTILIZANDO COMO CONTROL AGUA A pH 4.0

En la tabla N° 5 se reportan los resultados de la prueba realizada con solución de quitosán 0.5 % a pH 4,5,6 y 7 sobre cepas gram negativas de colección ATCC y silvestres.

Tabla N° 5

pH/ Halo de inhibición diámetro en mm.

Cepas gram negativas	4	5	6	7	control
<i>Salmonella typhi</i>	11	9	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	12	10	6	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	7	10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 11778	11	10	8	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10	8	7	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9	8	7	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10741	12	10	8	0	0

La prueba de pH se realiza con la finalidad de encontrar un pH adecuado para la disolución de la molécula de quitosán y el crecimiento bacteriano para que este no se vea afectado por el mismo.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que los halos de inhibición se presentan entre un pH 4 a 6, y los halos de inhibición más grandes aparecen en las cepas: *E. coli*, *E. coli* ATCC 10741, *S. Typhi.*, y *P. aeruginosa* ATCC 11778. A pH 4.0. observándose que a medida que aumenta el pH disminuye el halo de inhibición.

Con respecto a los resultados de la tabla N°1 y los presentados en la tabla N° 5 a pH de 7.0 no son iguales por que la solución de quitosán es diferente.

En la tabla N° 6 se reportan los resultados de la prueba realizada con solución de quitosán 0.5 % a pH 4,5,6 y 7 sobre cepas gram positivas de colección ATCC y silvestres.

Tabla N° 6

pH/Halo de inhibición diámetro en mm.

Cepas gram positivas	4	5	6	7	control
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	8	8	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	15	10	8	6	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11	11	8	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10236	13	12	9	7	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	10	10	6	0	0

. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que el halo de inhibición más grande se da en las cepas: *S. aureus* ATCC 6538p y 25923, *S. aureus*, *S. faecalis* ATCC 10236. A pH 4.0.

De los resultados observados en las tablas 5 y 6 se da el halo de inhibición más grande a pH 4.0 en bacteria gram positivas

Las cepas que presentan un halo de inhibición mayor de 8 mm diámetro según la concentración inhibitoria mínima (MIC) son consideradas susceptibles a la concentración de quitosán 0.5 % a pH 4.0.

5.1.5 PRUEBA CON SOLUCION DE QUITOSAN 0.5 % pH 4.0 DILUCIONES
0.05 A 5×10^{-5} USANDO COMO CONTROL AGUA A pH 4.0.

En la tabla N° 7 Se reportan los resultados obtenidos de la prueba realizada con solución de quitosán 0.5 % diluciones 0.05 a 5×10^{-5} en cepas gram positivas de colección ATCC y silvestres.

Tabla N° 7

Halo de inhibición en mm./ dilución

Cepas gram positivas	0.5%	0.05	0.005	0.0005	5×10^{-4}	5×10^{-5}	Ctrl.
<i>S. aureus</i>	9	9	9	6	6	6	0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	9	9	8	7	6	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9	7	7	0	0	0	0
<i>M. luteus</i> ATCC 9431	9	6	6	0	0	0	0
<i>S. faecalis</i> ATCC 10536	6	8	0	0	0	0	0

Las diluciones se hicieron para verificar si disminuyendo la concentración se presentaría un halo de inhibición más grande o si era necesario diluirlo o ponerlo directamente a la concentración inicial de 0.5 %.

Se observó que los halos de inhibición más grandes se dan a la concentración de 0.5 %. A como van aumentando las diluciones de la solución de quitosán los halos de inhibición van disminuyendo su tamaño hasta desaparecer.

Las cepas que presentan un halo de inhibición mayor de 8 mm diámetro según la concentración inhibitoria mínima (MIC) son consideradas susceptibles a la concentración de quitosán 0.5 hasta 0.005 %.

En la tabla N° 8 Se reportan los resultados obtenidos de la prueba realizada con solución de quitosán 0.5 % diluciones 10^{-1} a 10^{-5} en cepas gram negativas de colección ATCC y silvestres.

Tabla N° 8 Halo de inhibición en mm./ dilución

Cepas gram negativas	0.5 %	0.05	0.005	0.0005	5X 10^{-4}	5X 10^{-5}	Ctrol
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	0	0	9	0	0	0	0
<i>B. cerus</i> ATCC 11778	10	9	7	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 10741	9	6	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	7	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	9	8	7	0	0	0	0
<i>S. typhi</i>	8	7	0	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	9	7	6	0	0	0	0

De acuerdo con los resultados se observo que el halo de inhibición más grande aparece en los discos con la concentración de 0.5 % en las diluciones de 0.05 y 0.005 En *Bacillus cerus* ATCC 11778, *Pseudomona aeruginosa* ATCC y *Enterobacter aerogenes*.

En cepas gram (+) dio el mismo tamaño en el halo de inhibición 9 mm. de diámetro y en cepas gram (-) los resultados son variables que van desde 8 a 10 mm. de diámetro por lo que la solución de quitosán presenta el mismo efecto en ambas cepas.

Las cepas que presentan un halo de inhibición mayor de 8 mm diámetro según la concentración inhibitoria mínima (MIC) son consideradas susceptibles a la concentración de quitosán 0.5 a 0.005 %.

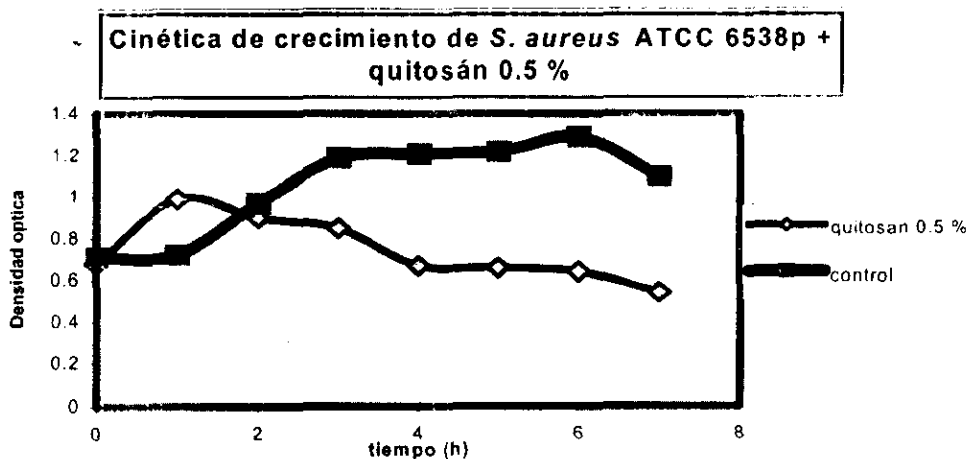
5.2.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p + SOLUCIÓN DE QUITOSAN 0.5 % A UNA ABSORBANCIA DE 580 nm. DURANTE 7 HORAS.

TABLA N° 9

Densidad óptica

Tiempo/Hrs.	Quitosán 0.5 %	Control
0	0.688	0.712
1	0.990	0.720
2	0.905	0.975
3	0.855	1.190
4	0.670	1.200
5	0.662	1.220
6	0.646	1.290
7	0.740	1.100

GRAFICA 1



Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
 $r = 0.811$ $m =$ pendiente
 $r = 0.788$ $r =$ regresión
 $m = -0.00751$ $b =$ intercepto

Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* + quitosán 0.5 %

$r = -0.441$

$b = 0.657$

$m = -0.009985$

$m =$ pendiente

$r =$ regresión

$b =$ intercepto

En la gráfica N° 1 Se observa la diferencia del crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p con solución de quitosán 0.5 %.

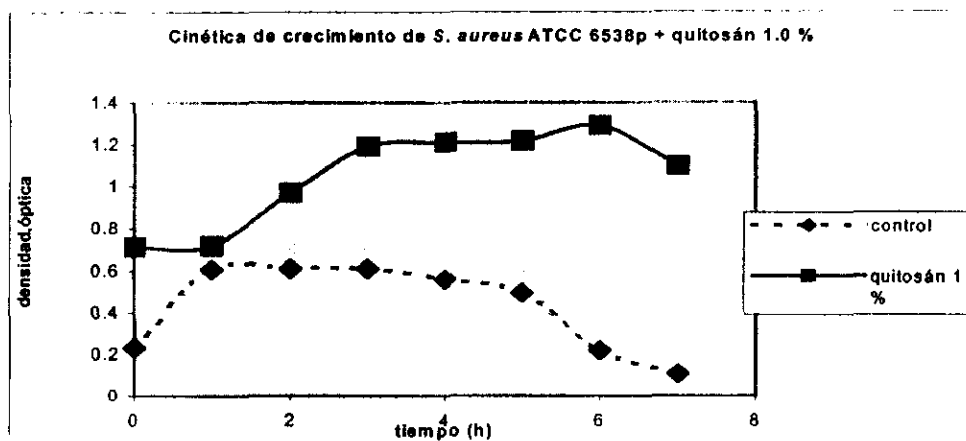
De acuerdo con los resultados obtenidos y los resultados que se han reportado según Allan, C., and Hadwinger. The Funggicidal on fungus of vargyn cell wall composition Exp. Mycology. (1983). Se da por hecho que hubo una actividad antibacteriana del quitosán a 0.5 %.

5.2.2 RESULTADOS CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p + SOLUCION DE QUITOSAN 1.0 % A UNA ABSORBANCIA DE 580 nm. DURANTE 7 HORAS.

TABLA N° 10
Densidad óptica

Tiempo/Hrs.	Quitosán 1.0 %	Control
0	0.231	0.712
1	0.608	0.720
2	0.610	0.975
3	0.612	1.190
4	0.562	1.200
5	0.492	1.220
6	0.220	1.290
7	0.110	1.100

GRAFICA 2



Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

$$r = 0.811$$

donde: m = pendiente

$$b = 0.787$$

r = regresión

$$m = -0.00751$$

b = intercepto

Tiempo de duplicación de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* + quitosán 1.0 %

$$r = -0.446$$

donde: m = pendiente

$$b = 0.563$$

b = intercepto

$$m = -0.00379$$

r = regresión

En la gráfica N° 2 Se observa la diferencia del crecimiento de *S. aureus* ATCC

6538p con solución de quitosán 1.0 %. Donde fue aumentada la concentración de la solución de quitosán

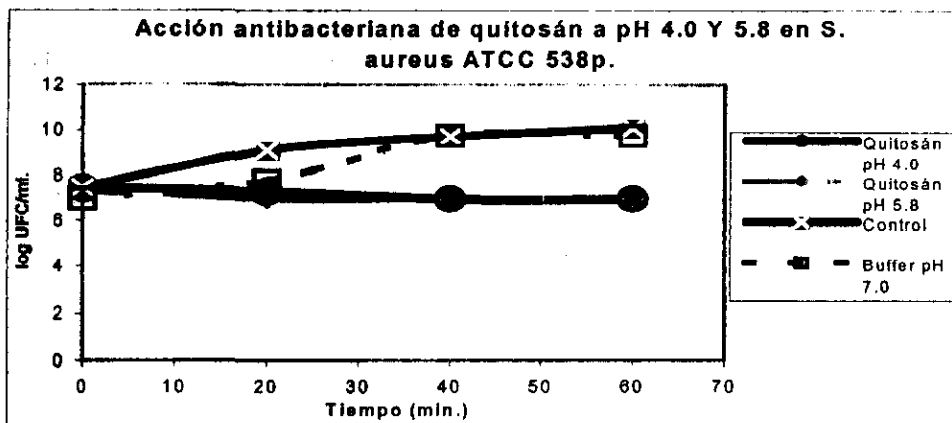
De acuerdo con los resultados obtenidos y los resultados que se han reportado según Allan, C., and Hadwinger. The Funggical on fungus of vargyn cell wall composition . Exp. Mycology. (1983). Se da por hecho que hubo una actividad antibacteriana del quitosán a 1.0 %. Presentándose mayor actividad antibacteriana a mayor concentración de quitosán.

5.3.1 RESULTADOS PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIANA DE QUITOSAN 0.2 % A pH 4.0 y 5.8 POR CUENTA VIABLE EN *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.

TABLA N° 11
log UFC/ml. de cultivo

T. (mins.)	Quitosán 0.2 % pH 4.0	Quitosán 0.2 % pH 5.8	Buffer pH 7.0	Control pH 4.0
0	30×10^6	20×10^6	30×10^6	10×10^6
20	20×10^6	10×10^6	130×10^6	60×10^6
40	10×10^6	10×10^6	530×10^6	60×10^6
60	10×10^6	10×10^6	1250×10^6	60×10^6

GRAFICA 3



Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: con quitosán a pH 5.8 el crecimiento es menor que con quitosán a pH 4.0, comparándolos con los resultados donde se utilizo buffer de fosfatos y el control el crecimiento de ambos es mayor que los otros.

De acuerdo con los resultados obtenidos y los resultados que se han reportado en pruebas de acción antibacteriana de quitosán según. N. R. Sudarshan, D.G.

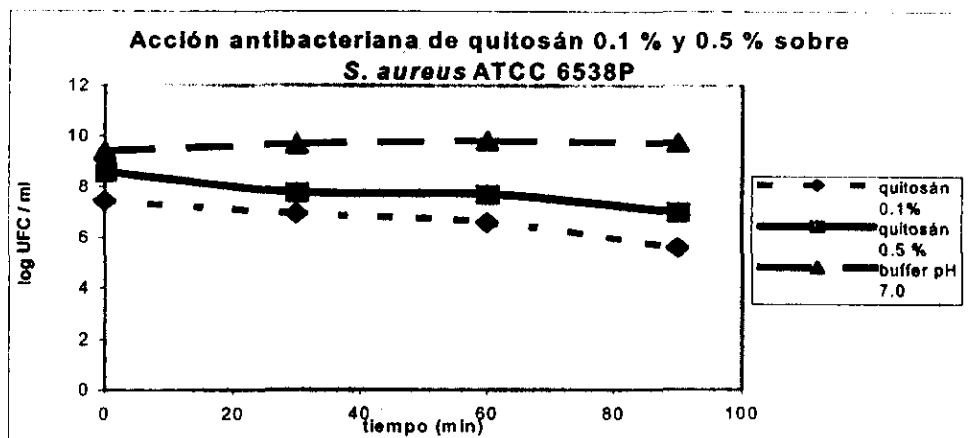
Hoover and Knorr. Antibacterial acción of chitosan. Food Biothecnology 6: 3 (1992). en las que se reporta la reducción de un ciclo logaritmico de crecimiento. Por lo que se determina que el quitosán obtenido del caparazón de camarón tambien presenta actividad antibacterina.

5.3.2 RESULTADOS PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIANA DE QUITOSAN 0.1 Y 0.5 % A pH 5.8 POR CUENTA VIABLE EN *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.

TABLA N° 12
Log. UFC/ ml. De cultivo

0	260 x 10 ⁶	410 x 10 ⁶	250 x 10 ⁶
30	90 x 10 ⁶	61 x 10 ⁶	480 x 10 ⁶
60	40 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶	660 x 10 ⁶
90	4 x 10 ⁶	10 x 10 ⁶	550 x 10 ⁶

GRAFICA 4



Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: con quitosán 0.5 % el crecimiento es menor que con quitosán 0.1 %, comparandolos con los resultados

donde se utilizó buffer de fosfatos el crecimiento es mayor que con la solución de quitosán.

De acuerdo con los resultados obtenidos y los resultados que se han reportado en pruebas de acción antibacteriana de quitosán según N. R. Sudarshan, D.G Hoover and Knorr. Antibacterial acción of chitosan. Food Biothecnology 6: 3 (1992). en las que se reporta la reducción de un ciclo logarítmico de crecimiento. Por lo que se determina que el quitosán obtenido del caparazón de camarón también presenta actividad antibacterina.

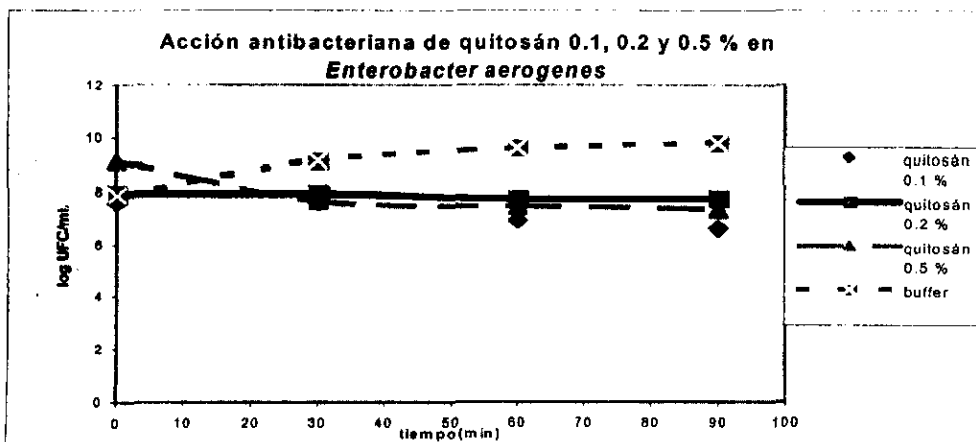
5.3.3 RESULTADOS PRUEBA DE ACCION ANTIBACTERIANA DE QUITOSAN 0.1, 0.2 Y 0.5 % A pH 5.8 POR CUENTA VIABLE EN *Enterobacter aerogenes*

Tabla N° 13

Log. UFC/ml de cultivo

Tiempo (mins)	Quitosán 0.1 %	Quitosán 0.1 %	Quitosán 0.1 %	Buffer pH 7.0
0	37×10^6	82×10^6	132×10^6	75×10^6
30	39×10^6	82×10^6	43×10^6	140×10^6
60	8×10^6	61×10^6	27×10^6	420×10^6
90	4×10^6	53×10^6	21×10^6	650×10^6

GRAFICA 5



Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: con quitosán 0.1 % el crecimiento es menor que con quitosán 0.2 y 0.5 %, comparandolos con los resultados donde se utilizó buffer de fosfatos el crecimiento es mayor que con solución de quitosán.

De acuerdo con los resultados obtenidos de quitosán aplicado a *E. aerogenes* y los resultados que se han reportado en pruebas de acción antibacteriana de quitosán en *E. aerogenes* según N.R. Sudarshan., D.G. Hoover and Knorr. Antibacterial acción of chitosan. Food Biothecnology 6: 3 (1992). en las que se reporta la reducción de un ciclo logarítmico de crecimiento.

Por lo que se determina que el quitosán obtenido del caparazón de camarón también presenta actividad antibacteriana.

6.- CONCLUSIONES.

De acuerdo con los objetivos planteados y en base a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente: que el quitosán obtenido de los desechos de camarón , resultado efectivo como antibacteriano siendo probada su actividad por tres métodos diferentes, en el primero fue utilizada la técnica de Kirby-Bauer, los resultados fueron mas favorables a una concentración de 0.5 %, por lo que se probó que la técnica es apropiada para dicha prueba. En cuanto a las bacterias en las que se probó las que mayor actividad presentan, están las gram positivas en este caso *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Además también tiene efecto en bacterias gram negativas como son; *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, y *Escherichia coli*.

Por medio de cinética de crecimiento se probó la actividad antibacteriana del quitosán utilizando dos concentraciones de la solución de quitosán 0.5 % y 1.0 %. En *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. Resultando más efectiva a la concentración de 1.0 %.

Por medio de la técnica de cuenta viable. La mejor actividad se dio a una concentración de 1.0 % de la solución de quitosán en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p Y *Enterobacter aerogenes* ya que en ambas cepas reduce más de un ciclo logarítmico de crecimiento.

Por lo que se concluye que el quitosán obtenido de los desechos de camarón, soluble en agua, si presenta actividad antibacteriana en diferentes gram positivas y gram negativas.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allan, C., and Hadwinger. The Fungicidal effects on fungus of varying cell wall composition *Exp. Mycology*. 3: 285-288. (1979)
- 2.- B. Davis, M.D. B.R. Bulbeco, M.D. *Tratado de Microbiología*. 2ª. Edición 153, 909. (1983)
- 3.- Bough W. A., Salter W.L. wa. A.C.M. and Perkins B.E. Influencia of Manufacturing variables of the characteristics and effectiveness of chitosan products of chemical composition of viscosity and molecular-weight of chitosan products. *Biotechnology and Bioengineering*. XX (1981)
- 4.- Charles J. Brine. *Introduction chitin: Accomplishments and perspectives*. Food and Pharmaceutical Products Division. Princeton, New Jersey 08540.
- 5.- Dallas G. Hoover and Rodney J. H. Gray. Function of cell wall acid in terminally injured *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* . 131 (2) 477-485. (1977)
- 6.- D.F. Kendra and L.A. Characterization of the smallest Chitosan Oligomer that maximally antifungal to *Fusarium solani* and *Elisita pisatin* formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycology* 8: 276 (1984)
- 7.- Dietrich Knorr. Use of chitinous polymers in food. *Food Technology* 1: 85-93, (1984)
- 8.- Dietrich Knorr. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*. 1: 114-120, (1991)
- 9.- Elmer W. Koneman, M.D. *Diagnostico Microbiologico*. 3ª .Edición Buenos Aires Argentina. 78-79, 612-616. (1988)

- 10.- E. Jawest. Microbiología Médica. 11ª. Edición, México D.F. 6,66,131-134,222,228,238,247-248,253. (1985)
- 11.- Erica Balli, Simón Silver, Bernard Witholt. Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington D.C. 254, (1992)
- 12.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Método SSA. Para la valoración de antibióticos, 5ª. Edición. México D.F. 72, (1988)
- 13.- George Doxastakis. Chemistry Technology functional properties and applications. Development in too Science. 3: 317-325, (1989)
- 14.- Jan Knapezyk, Anna Barbara Macura and Boleslaw Palwik. Simple test demostrating the antimicotic effects of chitosan. International Journal of Pharmaceutics. 80: 33-38, (1992)
- 15.- Jan Knapezyk. Excipiente ability of chitosan for directic tableting. International Journal of pharmaceutics. 89: 1-7, (1993)
- 16.- Jean F. Mac Fadin. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacteria de importancia clínica. 208-210,211,234,260.(1990)
- 17.- J.L. Lewba and P. Stossei. Chitosan and other poliamines antifungal activity and interaction whit Biological Membranes. Nestlé Research Departament, Nestlé Ltd. CH-1800. Vevey Switerlands. 215-216.(1983)
- 18.- L.A. Hadwinger, B. Fristepsky and R.C. Ragleman. Chitosan a natural regulation in plant-fungal interaction increases crop yield "chiptin", chitosan and related enzymes. Academic Press, New York 261-265, (1984)

- 19.- L.A. Hadwinger, D.F. Kendra, B.W. Fristensky and W.Wagoner. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. Department of plant pathology Washington State University Pullman W.A. 99164-6430. USA.
- 20.- Lutz Popper and Dietrich Knorr. Applications of High-Pressure Homogenization for food preservation. Food Technology. July 85-86, (1990)
- 21.- M.J. Pelzcar. Jr. R.D. Reid, E.C.S. Chan. Microbiología: 2ª.Edición, México D.F. 111-113, 427-429. (1982)
- 22.- Muzarelli, R. A. , "Natural Chelating Polymers." Pergamon Press, Oxford (1973)
- 23.- Muzarelli R.C. Jenaux Charles and Gooday G.W. Chitin in nature and technology. Pleum pres, N.Y. London ltd. 3rd. 212-214, (1992)
- 24.- N.R. Sudarshan, D.G. Hoover and Knorr. Antibacterial Action of Chitosan. Food Biothecnology. 6: (3) 257-271, (1992)
- 25.- Paul A. Sanford. Chitosan Uses and Potential applications. . 6: (3) 257-271, (1992)
- 26.- Paul de Kruif. Los cazadores de microbios. 7ª.Edición. México D.F. (1980)
- 27.- Rodolfo Quintero Ramírez. Ingeniería Bioquímica. 1ª.Edición. México D.F. 30-37, (1981)
- 28.- Remo M. Bergoglio. Antibióticos. 5ª.Edición. Buenos Aires Argentina. 321-324, (1993)
- 29.- Shaechter/Medoff/Eistein/Guerra. Microbiología Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2ª.Edición. Buenos Aires Argentina. 302-309. (1994)

- 30.- Stephen Nicol. Life after death for empty shells. *New Siefist*. 11: 46-47, (1989)
- 31.- Shigehiro Hirano, Chitosi Itakura, Haruyoshi Seino. Chitosan as ingredient for domestic animal feeds. *Journal Agricultur Food Chemisrty*. 38: 1214-1216, (1990)
- 32.- Sixto Berrocal Ana María, Soto Bautista Ana Maria. "Estudio de las variables que intervienen en la extracción de quitina y quitosán a partir del exoesqueleto de camarón". Tesis de Ingeniería en Alimentos. FES Cuautitlan UNAM. (1996)