

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE QUITOSAN, CARACTERIZADO FISICA Y QUIMICAMENTE

P R E S E N T A

QFB. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGICA)



ASESORAS
MC. NIDIA ARAGON SALGADO
MC. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE QUITOSAN, CARACTERIZADO FISICA Y QUIMICAMENTE

P R E S E N T A

QFB. SUSANA PATRICIA MERANDA CASTRO
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGICA)

ASESORAS
MC. NIDIA ARAGON SALGADO
MC. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, en el Instituto de Química, de la UNAM y el Instituto Mexicano del Petróleo

Dedicatoria

A la memoria de mi padre Víctor Miranda del Valle

A mi madre Blanca Castro Vda de Miranda

A mis hermanos Víctor, Arturo, Carlos y Claudia

Con amor
a mi hija
Gabriela Menéndez Miranda

Los verdaderos sacerdotes del bien de la conciencia son verdaderos gladiadores, y no luchan con simples armas para matar, sus armas de lucha son, el conocimiento, la fe, la sabiduría, la justicia y la verdad.

No se convence solo con evidencias, sino con el ejemplo.

Xochipilli

Agradecimientos

M.C. Nidia Aragón Salgado

M.C. Virginia Lara Sagahon

M.C. René Miranda Ruvalcaba

Dra. Raquel López Arellano

Dr. Juan Manuel Aceves

Dr. Manuel Salmón

Dr. Armando Cabrera

Dra. Amelia Farrés Gonzalez- Saravia

M.C. Clara Inés Alvarez Manrique

Dra. Gabriela Bárcenas Morales

Dra. Susana Mendoza Elvira

QFB Maria Eugenia Rosales

Por su invaluable amistad y ayuda

INDICE

	Página
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIACIONES	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCION	1
1.- ANTECEDENTES	4
1.1 Cronología sobre Quitina -Quitósán	6
1.2 Estructura Molecular de Quitina y Quitósán	10
1.3 Propiedades Físicas y Químicas de Quitina y Quitósán	12
1.2.1 Reacciones orgánicas comunes	12
1.2.2 Complejos con metales pesados	14
1.2.3 Solubilidad	14
1.2.4 Propiedades de solución del Quitósán	15
1.2.5 Reacciones enzimáticas	16
1.4 Procesos de manufactura de Quitina y Quitósán	16
1.5 Aplicaciones del Quitósán	20
1.5.1 Agricultura	20
1.5.2 Industria alimentaria	20
1.5.3 Clarificación y purificación de aguas y bebidas	21
1.5.4 Farmacéutico	21
1.5.5 Inmovilización de células y enzimas	22

1.6 Quitina y Quitosán como agentes antimicrobianos.....	24
1.6.1 Quitina y Quitosán con actividad antifúngica	24
1.6.2 Quitosán con actividad bactericida	24
2.-OBJETIVOS	29
3.- METODOLOGIA	32
3.1 Extracción de Quitina de exoesqueletos de camarón.....	33
3.2 Desacetilación de la quitina obtenida para obtener quitosán	34
3.3 Caracterización Física y Química del Quitosán obtenido	34
3.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo	34
3.3.2 Espectrometría de masas (EM-FAB)	35
3.3.3 Difracción de Rayos X	36
3.3.4 Solubilidad de quitosán	37
3.3.5 Porcentaje de desacetilación	37
3.4 Evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán sobre las bacterias	
Staphylococcus aureus 6538p y Escherichia coli 10536.....	38
3.4.1 Ensayos preliminares de actividad antibacteriana.....	38
3.4.2 Actividad antibacteriana del quitosán	39
3.4.2.1 Preparación de las soluciones de quitosán	39
3.4.2.2 Preparación del inóculo.....	40
3.4.2.3 Cinéticas de crecimiento	40
4.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
4.1 Caracterización física y química del quitosán	43
4.1.1 Espectrofotometría Infrarrojo	43
4.1.2 Espectrometría de masas	48

4.1.3 Difracción de Rayos X	52
4.1.4 Solubilidad de Quitina y Quitosán	54
4.1.5 Porcentaje de desacetilación	55
4.2 Evaluación de la actividad antibacteriana del Quitosán en <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p y <i>Escherichia coli</i> 10536	55
4.2.1 Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana	56
4.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana del Quitosán en <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4.2.3 Evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán en <i>Escherichia coli</i>	74
4.2.4 Comparación del comportamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> frente al Quitosán.....	87
5.- CONCLUSIONES	90
6.- REFERENCIAS	93
7.- APENDICE	103

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Solventes comunes para quitina y quitosán	15
Tabla 2 Resumen de aplicaciones de quitina y quitosán	23
Tabla 3 Resultados de las frecuencias de Infrarrojo de quitina obtenida, quitina comercial y quitosán.....	44
Tabla 4 Solubilidades de quitina y quitosán	54
Tabla 5 Valores de densidad óptica de la cinética de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5.....	58
Tabla 6 Logaritmos de UFC/ ml de la cinética de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5.....	61
Tabla 7 Valores de densidad óptica de la cinética de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5.....	68
Tabla 8 Logaritmos de UFC/ ml de la cinética de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5.....	69
Tabla 9 Valores de densidad óptica de la cinética de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5.....	71
Tabla 10 Logaritmos de UFC/ml de la cinética de <i>Saphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5.....	72
Tabla 11 Valores de densidad óptica de la cinética de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5.....	76

Tabla 12	Logaritmos de UFC/ml de la cinética de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5.....	77
Tabla 13	Valores de densidad óptica de la cinética de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5.....	81
Tabla 14	Logaritmos de UFC/ ml de la cinética de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5.....	82
Tabla 15	Valores de densidad óptica de la cinética de <i>Escherichia coli</i> a Diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5.....	85
Tabla 16	Logaritmos de UFC/ ml de la cinética de <i>Escherichia coli</i> a Diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5.....	86

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructura de la quitina	11
Figura 2 Estructura del quitosán	11
Figura 3 Reacción de neutralización de quitina / quitosán	12
Figura 4 Esquema general de producción de quitina y quitosán	19
Figura 5 Cuadro metodológico	31
Figura 6 Espectro de Infrarrojo de quitina obtenida	45
Figura 7 Espectro de Infrarrojo de quitina comercial	46
Figura 8 Espectro de infrarrojo de quitosán	47
Figura 9 Espectro de masas de quitina comercial, quitina obtenida, quitosán obtenido	49
Figura 10 Interpretación de las principales señales del espectro de masas de quitina obtenida.....	50
Figura 11 Interpretación de las principales señales del espectro de masas de Quitosán obtenido.....	51
Figura 12 Patrón de Difracción de Rayos X de Quitina y Quitosán obtenidos	52
Figura 13 Patrón de Difracción de Rayos X de quitina comercial.....	53
Figura 14 Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5 (D.O. vs tiempo).....	58
Figura 15 Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5 (Log UFC / ml vs tiempo).....	61

Figura 16	Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5 (densidad óptica vs tiempo).....	68
Figura 17	Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5 (Logaritmo UFC / ml vs tiempo).....	69
Figura 18	Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5 (densidad óptica vs tiempo).....	71
Figura 19	Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5 (Logaritmo UFC / ml vs tiempo).....	72
Figura 20	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5 (Densidad óptica vs tiempo).....	76
Figura 21	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 4.5 (Logaritmo UFC / ml vs tiempo).....	77
Figura 22	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5 (densidad óptica vs tiempo).....	81
Figura 23	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 5.5 (Logaritmo UFC / ml vs tiempo)	82
Figura 24	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5 (densidad óptica vs tiempo).....	85
Figura 25	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de quitosán a pH 6.5 (Logaritmo UFC / ml vs tiempo).....	86

RESUMEN

El quitosán es la forma desacetilada de la quitina, el cual ha cobrado gran interés a nivel mundial dadas sus múltiples aplicaciones. Dentro de estas aplicaciones se ha planteado la posible actividad antimicrobiana del polímero, sin embargo existen diferencias de comportamiento fisicoquímico y biológico de éste dependiendo del origen, la forma de extracción, así como de la forma de desacetilación de la quitina.

Algunos autores han estudiado la actividad antimicrobiana de derivados del quitosán sobre diversos microorganismos, con tiempos de exposición cortos (120 min) y en concentraciones variables de quitosán comercial del cual se desconoce su forma de extracción. Sus resultados en algunos casos han sido contradictorios.

En este trabajo se obtuvo quitina a partir de exoesqueletos de camarón, la cual fue extraída y modificada a quitosán de acuerdo al proceso estudiado previamente en nuestro laboratorio. La quitina y el quitosán fueron caracterizados física y químicamente usando infrarrojo, espectrometría de masas, difracción de rayos X, porcentaje de desacetilación y solubilidad.

La actividad antibacteriana del quitosán obtenido fue evaluada a través de cinéticas de crecimiento de dos bacterias de colección: *Staphylococcus aureus* 6538p y *Escherichia coli* 10536, empleando cuatro concentraciones de quitosán en solución (500, 250, 125 y 62.5 ppm), a tres pH's de la solución (4.5, 5.5 y 6.5) durante 5 horas de cultivo.

En la caracterización física y química de la quitina se mostraron ligeras diferencias comparada con la quitina comercial. El quitosán obtenido presentó un 85 % de desacetilación y total solubilidad en agua acidulada.

Los resultados de la actividad antibacteriana mostraron el carácter multifuncional del quitosán en solución ya que el efecto sobre *Staphylococcus aureus* fue bacteriostático, aglutinante y nutriente, mientras que para *Escherichia coli* fue bactericida.

ABSTRACT

Chitosan is the deacetylated form of chitin, which has been of great interest at world level due its multiple applications. Inside these applications it has thought about the possible antimicrobial activity of the polymer, however differences of physicochemical and biological behavior exist depending on the origin, the extraction form, as well as in the way of deacetylation of chitina.

Some authors have studied the antimicrobial activity of chitosan derivatives on diverse microorganisms, with short times of exposition (120 min) and in variable concentrations of commercial chitosan, of which their extraction form is ignored. Their results in some cases have been contradictory.

In this work chitin was obtained from shrimp shells, which was extracted and modified to chitosan according to the process studied previously in our laboratory. The chitin and chitosan were characterized physical and chemically using infrared spectrophotometry, mass spectrometry, X rays diffraction, deacetylation percentage and solubility.

The antibacterial activity of the obtained chitosan was evaluated through growth kinetics of two collection bacterias: *Staphylococcus aureus* 6538p and *Escherichia coli* 10536, using four chitosan concentrations in solution (500, 250, 125 and 62.5 ppm), three pH's of the solution (4.5, 5.5 and 6.5) during 5 hours of cultivation.

In the physical and chemical characterization slight differences were shown compared with the commercial chitin. The obtained chitosan presented 85% deacetylation and a total solubility in acid water.

The results of the antibacterial activity showed the multifunctional character of chitosan in solution, the effect on *Staphylococcus aureus* it was bacteriostatic, agglutinant and nutritious, while for *Escherichia coli* it was bactericide.

INTRODUCCION

Hablar de quitina y quitosán, es hablar de algo nuevo sin serío.

Este material existe desde que los primeros seres vivos aparecieron en la Tierra. Es nuevo porque desde hace aproximadamente treinta años, se le ha redescubierto, dadas sus propiedades encontradas y que se siguen encontrando.

Vivimos en una época en que la tecnología ha avanzado a tal punto que no se ha pensado que la Naturaleza lo da prácticamente todo, inclusive la solución a los problemas creados por uno mismo. Utilizar a la naturaleza y copiar sus procesos, es quizá la mejor forma de vivir.

La quitina y el quitosán son materiales poliméricos naturales. Su naturaleza química, aunque aparentemente sencilla, la hace una molécula muy versátil en cuanto a su aplicación.

Desde hace más de treinta años los japoneses comenzaron a experimentar con la quitina y el quitosán, desde la forma en cómo lo separaban de las estructuras que los contenían, hasta las más diversas aplicaciones en la amplia gama de industrias que conforman este mundo actual.

La quitina y el quitosán son sustancias renovables con grandes posibilidades de explotación. En Japón se tienen más de doscientas industrias dedicadas a este rubro, y más

de diez mil médicos la están probando en distintas enfermedades con gran éxito, aparte de todas las demás áreas de aplicación.

En algunos países como Canadá y Estados Unidos, se tienen industrias explotadoras de quitina y quitosán que, aunque no se comparan con Japón, se piensa que crecerán en un futuro no muy lejano, ya que muchas Universidades están estudiando el potencial de estos compuestos

Hablar de quitina y quitosán en México, es hablar de un material poco conocido, pero que pudiera tener una gran capacidad de explotación. México cuenta con reservas de este material en sus tres litorales, si consideramos que éste puede provenir de los crustáceos (camarón, jaiba, langosta y langostilla).

Se dice que un material que no tiene aplicación, es de poco interés para la industria y por lo tanto nadie se interesa en invertir, pero quienes hablan así, carecen de visión. Ante sus ojos se están presentando las posibilidades, y es una desgracia que al paso del tiempo no se aprovechen estas oportunidades. Esperamos que en un futuro no muy lejano, la explotación de este material que aunque en muchas ocasiones se le presente como una panacea no se le considere de esta forma.

El estudio que se presenta en este trabajo de tesis, pretende colaborar en el conocimiento de una de las aplicaciones del quitosán como agente antibacteriano, sobre el cual no se tiene mucha información, además de que el quitosán empleado en este estudio fue obtenido de materia prima nacional y bajo la tecnología de extracción creada en nuestros laboratorios.

1.- ANTECEDENTES

El universo nació hace cerca de 15 billones de años. Los materiales con alta temperatura y densidad se expandieron, liberaron energía, se enfriaron y dieron nacimiento a las estrellas, incluyendo a las estrellas de la vía láctea, a los planetas, y toda clase de cosas vivas visibles a nosotros.

El sol nació hace 5 billones de años y dio nacimiento a la tierra, 0.4 billones de años después de su propia aparición. Hace tres billones de años (1.4 billones de años posterior al nacimiento de la tierra) el primer ser vivo apareció en la tierra.

Desde entonces, la tierra como parte del universo ha continuado existiendo bajo la ley de Hubble, ha nutrido varias clases de entidades vivas, y ha hecho que éstas continúen con su evolución.

Hablar del "nacimiento de la tierra" es porque la quitina y el quitosán, pudieron ser "la forma primordial" del primer ser viviente. Realmente, comenzó a existir mucho antes que los dinosaurios. En el período Precámbrico tardío, hace dos billones de años, aparecieron los seres vivos con núcleos conteniendo quitina alrededor de éste. En el período Silúrico, 440 millones de años, las plantas terrestres que contenían celulosa aparecieron. Cerca de la misma era, peces acorazados también aparecieron. En el período Devónico (370 millones de años), los artrópodos declararon su aparición sobre la tierra; en el período Carbonífero (350 millones de años), una libélula voló.

Hace doscientos millones de años, los primeros dinosaurios vivieron. Durante la última mitad del período Jurásico (150 millones de años) cuando el Estegosaurio prosperó, la tribu de cangrejos mas rica en quitina apareció sobre la tierra.

Después de que la familia de dinosaurios ocupó la tierra por 100 millones de años, desde el período Jurásico al Cretáceo, éstos fueron extinguidos por un cometa que chocó en la Península de Yucatán hace 65 millones de años. Comparado con la extinción de grandes animales, una tribu de cangrejos y algunos animales pequeños escaparon de tal crisis.

Los primates aparecieron en el período Terciario tan pronto como los dinosaurios se extinguieron. El *Homo habilis*, el ancestro del humano, nació hace cerca de 4 millones de años y evolucionó al presente *Homo sapiens* finalmente hace 300 mil años.

Desde que los seres vivos aparecieron, la quitina junto con la celulosa los han beneficiado en general y han mantenido un balance ecológico. Los vertebrados, y también las plantas no pueden producir quitina, esto depende de insectos, de crustáceos y de las esporas de hongos (Matsunaga 1998).

La quitina es la versión animal de la celulosa y es el segundo polímero más abundante en la naturaleza. La quitina es al crustáceo como la celulosa es a los árboles. Forma un material de construcción fuerte, flexible, particularmente cuando está combinado con proteínas, con otras biomoléculas y con algunos materiales inorgánicos, tales como el carbonato de calcio.

Uno de los derivados más importantes de la quitina es el quitosán, el cual debido a sus propiedades, ha sido estudiado en cientos de aplicaciones de las cuales se han derivado una gran cantidad de patentes.

Entre las diversas aplicaciones del quitosán se ha planteado la capacidad antimicrobiana de este biopolímero. Hasta la fecha, no se ha establecido con precisión el modo de acción del quitosán sobre los microorganismos. Entre las escasas investigaciones realizadas existen puntos de vista contrarios, lo cual hace que salgan a la luz muchas más dudas acerca del comportamiento del biopolímero en relación a su actividad inhibitoria frente a los microorganismos.

1.1 Cronología sobre quitina-quitosán

- ◇ Hace cerca de 4000 años el legendario libro de texto de Agricultura en China, escrito por el Dios de la Agricultura, enlistaba al cangrejo como medicina.
- ◇ En la Dinastía Ming (14 a la 17 centuria) en China una antigua farmacopea "Lista de Hierbas" muestra al caparazón de cangrejo como medicina.
- ◇ En el siglo 16 los viejos remedios de usar té hecho de caparazones de cangrejo o langosta tostados, para el mantenimiento o recuperación de la salud, se conocieron en varias partes del mundo. El famoso violín Stradivarius tuvo una cubierta de una mezcla de barniz y quitina tomada de las alas de la cigarra, la cual producía un hermoso sonido.
- ◇ En 1811 un profesor francés de historia, Braconnot, aisló quitina de hongos y lo llamó "fungina".
- ◇ En 1823 un científico francés, Ogier, encontró que la composición externa de la piel de algunas criaturas vivas y acuñó el nombre de "quitina" que significa "envoltura" en griego.
- ◇ En 1859 Rouge encontró quitosán.
- ◇ En 1894 Hope-Seyler lo nombró "quitosán".

- ◇ En 1950 investigación de quitina-quitosán para propósitos militares se llevó a cabo a través de la cooperación entre la Academia Médica de la URSS y Lichtenstein.
- ◇ En 1965 las aplicaciones en agricultura e industria comenzaron en los Estados Unidos y China.
- ◇ En Abril de 1977 la primera Conferencia Internacional sobre quitina-quitosán tuvo lugar en Boston, USA.
- ◇ En Abril de 1982 el Ministerio de Agricultura y Pescadería comenzó un proyecto de diez años sobre el desarrollo de "Biomasa no utilizada".
- ◇ En Julio de 1982 la segunda Conferencia Internacional sobre quitina-quitosán fue llevada a cabo en Sapporo, Japón.
- ◇ En 1984 el Seminario Japón-América sobre "La nueva función de quitina-quitosán" tuvo lugar en la Universidad de Delaware, USA.
- ◇ En Abril de 1985 el Ministerio Japonés de educación otorgó dinero para la investigación científica: Investigación General a 13 Universidades para "Nuevos desarrollos de Investigaciones básicas y aplicadas sobre quitina-quitosán y enzimas relacionadas"
- ◇ En 1985 se llevó a cabo la tercera Conferencia Internacional sobre quitina y quitosán en Ancona, Italia.
- ◇ En Febrero de 1986 el profesor Hirano y su grupo de la Universidad de Tottori en Japón, confirmaron el decremento del colesterol y grasas neutras en sangre por quitina-quitosán usado en experimentos con animales.
- ◇ En Febrero de 1986 el Colegio Farmacéutico Tohoku (el profesor y la señora Suzuki y algunos colaboradores) reportaron la activación de las células (NK) por el oligosacárido quitina, inhibidas por células cancerosas.
- ◇ En Marzo de 1986 el profesor Sugano y su grupo de la Universidad de Kyusu en Japón, reportó un incremento en el colesterol HDL y un decremento del LDL, con un decremento total de colesterol por quitina-quitosán.
- ◇ En Marzo de 1986 Fuji Bio Co. Ltd (Presidente: Sr. Karnei) en Japón comercializó alimentos conteniendo quitina-quitosán por primera vez en el mundo.
- ◇ En 1987 el primer libro popular sobre quitina-quitosán en japonés "La revolución del cangrejo" (Crab revolution) por Kesao Kaneko fue publicado.

- ◇ En abril de 1988 el Ministerio Japonés de Comercio comenzó el “plan para los Plásticos no contaminantes”.
- ◇ En abril de 1988 Unichika Co. Ltd. en Japón desarrolló una piel artificial de quitosán “Beschitin W”.
- ◇ En 1988 la cuarta Conferencia Internacional sobre quitina -quitosán se llevó a cabo en Trondheim, Noruega.
- ◇ En Junio de 1989 el grupo de estudio sobre quitina-quitosán japonés fue organizado por el Dr Yabuki, el primer presidente.
- ◇ En Agosto de 1989 el Dr. Matsunaga el presidente de la Fundación Médica Shoekai, se reunió con el Sr. Kamei el Presidente de Fuji Bio, Co, LTD, después con el Dr. Akita Matsunaga emprendió el uso clínico y la distribución de alimentos saludables conteniendo quitina-quitosán.
- ◇ En Julio de 1990 en la ceremonia Budista de agradecimiento a las langostas del mar del Japón, en el puerto de Sakai, en la prefectura de Tottori en Japón, se llevaron a cabo cursos especiales acerca del quitosán en la agricultura, por el Dr. Hirano en la Universidad de Tottori y el Dr. Matsunaga de la Fundación Shoekai.
- ◇ En Agosto de 1990 un niño de Sakhalin, Constantin, quien sufrió de quemaduras en casi el 80 % de su cuerpo, fue admitido en el Hospital del Colegio Médico de Sapporo en Japón y su vida fue salvada por el uso de “Beschitin W” y mostró una marcada mejoría en la función normal de la piel.
- ◇ En Septiembre de 1990 el Profesor Azuma y su grupo del Instituto de Investigación de Inmunología en la Escuela de Medicina de la Universidad de Hokkaido en Japón, reportó la prevención de la metástasis de cáncer por quitina-quitosán y lo explicó por una teoría de cementación de moléculas en una Reunión en la ciudad de Nagoya en Japón. Fue reportado por los periódicos, la radio NHK y se convirtió en un tópico popular.
- ◇ En 1990 el periódico especializado en medicina herbolaria “Kampo Iyaku Shinbun” continuó con reportes especiales sobre quitina-quitosán.
- ◇ En Diciembre de 1990 la prefectura de Tochigi del Instituto Textil de Japón desarrolló un agente antibacterial de quitina-quitosán para aplicarse a textiles.
- ◇ En 1991 se llevó a cabo la quinta Conferencia Internacional sobre quitina-quitosán en la Universidad de Princeton en EUA.
- ◇ En Septiembre de 1991 la Asociación de quitina-quitosán fue organizada. El primer presidente es el Dr. Akira Matsunaga.

- ◇ En Agosto de 1992 tres médicos jóvenes de Ucrania, visitaron al Dr. Matsunaga, el presidente de la Fundación Shoeikai, y comenzaron los estudios clínicos en cooperación entre Japón-Rusia después de la explosión de un generador atómico de electricidad.
- ◇ En Octubre de 1992 la Escuela de Agricultura de la Universidad de Tottori desarrolló una especie de algodón de quitosán "Quinto sol" (Sun Five). Se usó en medicina veterinaria y fue permitida por el Ministerio de Agricultura y Pescadería de Japón.
- ◇ En Octubre de 1992 bajo los auspicios del Ministerio de Pescadería en Japón, el profesor Okuda y colaboradores de la Escuela de medicina de la Universidad de Ehime y el Profesor Karo y colaboradores de la Universidad Femenina de Hiroshima, reportaron la prevención de la elevación de la presión sanguínea causada por NaCl. Ellos presentaron una teoría acerca del quitosán como agente de prevención de alta presión sanguínea. Esto causó sensación en el campo académico.
- ◇ En Marzo de 1993 el Instituto Nacional de Salud y Nutrición de Japón confirmaron la habilidad del quitosán para decrecer los niveles de colesterol.
- ◇ En Abril de 1993 Canadian Nova Chem desarrolló tecnología haciendo un derivado de quitosán (NOCC) para ser usado en la prevención del crecimiento de tejido blando y queloide después de la cirugía, y el alivio del dolor de las articulaciones.
- ◇ En Mayo de 1993 la Universidad Médica de Tottori y Unichika, Co, Ltd en Japón comenzó el desarrollo de un agente anticáncer "Brachitin" y como ingrediente principal la quitina.
- ◇ En Junio de 1993 Ehzai y Sunfive en Japón vendió "Chitiback S" y "Chitiback P", el material ortopédico para animales con una alta bioafinidad.
- ◇ En Julio de 1993 la Universidad Femenina Nihon y Katokichi Co, Ltd., en Japón, reportaron el estudio cooperativo de que el quitosán calentado tiene antimutagenicidad. Se considera que ocurre por la adsorción del mutágeno al quitosán.
- ◇ En Abril de 1994 se llevó a cabo el primer Simposium Asia-Océano Pacífico sobre quitina y quitosán, en Malasia.
- ◇ En 1994 la Asociación China sobre quitina fue instalada en Taiwan. Su presidente es Ka Chomin. El primer Seminario Académico sobre quitina fue atendido por el Dr. Togura.
- ◇ En 1994 la décima Conferencia sobre Medicina de Hierbas japonesa fue llevada a cabo sobre la relación entre quitina-quitosán y la presión sanguínea.
- ◇ En Agosto de 1994 la sexta Conferencia Internacional sobre quitina y quitosán fue llevada a cabo en la Universidad Guinea en Polonia.

- ◇ En 1995 la primera Conferencia Internacional Europea tuvo lugar en Francia.
- ◇ En Mayo de 1995 se llevó a cabo en la Asociación China sobre quitina el segundo seminario Académico y fue presidida por el Dr. Matsunaga.
- ◇ En Junio de 1995 fue declarado “el estándar de alimentos procesados con quitosán” por la Fundación de la Asociación Japonesa de Alimentos saludables y nutritivos.
- ◇ En Septiembre de 1995 la Asociación Taiwanesa de Cangrejos fue establecida por el Dr. Koei Ko, El Primer Foro sobre quitina y quitosán fue llevado a cabo por el Dr. Akira Matsunaga.
- ◇ En Octubre de 1995 Toyo Igakusha de Japón publicó el libro “Salud quitina-quitosán”, en japonés.
- ◇ En Diciembre de 1995 se llevó a cabo la primera discusión de estudios clínicos cooperativos entre Japón –Taiwan sobre los “Efectos del quitosán en cáncer”.
- ◇ En 1996 fue llevado a cabo el décimo Simposium Internacional sobre quitina-quitosán en Sapporo Japón.
- ◇ En 1996 tuvo lugar en Italia el Segundo Simposium sobre enzimas de quitina.
- ◇ En 1997 en Francia fue la séptima Conferencia Internacional sobre quitina y quitosán.
- ◇ En el año 2000 se va a llevar a cabo la octava Conferencia Internacional sobre quitina-quitosán, en Yamaguchi, Japón.

1.2 Estructura Molecular de quitina y quitosán

La elucidación de las estructuras moleculares de quitina y quitosán literalmente se ha llevado centurias . En realidad, algunos de los detalles están aún siendo descubiertos. Braconnot encontró en 1811 que la quitina contenía nitrógeno, y en 1878 Ledderhose escribió que el ácido acético y la glucosamina eran los productos de hidrólisis de quitina. No fue hasta los años 50' que hubo un consenso en la comunidad científica, que la quitina era un polisacárido consistente de pequeñas porciones de unidades de glucosamina y

grandes proporciones de N- acetil glucosamina (Jeanloz, 1950). Ahora se reconoce que la mayoría de los preparados comerciales de quitina, como un copolímero lineal compuesto de aproximadamente 70-90% N-acetil glucosamina y 10-30% de D- glucosamina (Domszy, 1985), conectadas a través de uniones β (1----4), (Figura 1). La mayoría de preparaciones de quitosán comercial contienen 75-95% de unidades glucosamina y 5-25 % de unidades n-acetilglucosamina (Figura 2) (Domszy, 1985). El peso molecular de estos polisacáridos puede ser tan alto como 10^6 d. (Maghami, 1988), a menos de que algunos tratamientos especiales sean usados para degradarlos. Algunos experimentos basados en reacciones de degradación con lisozima (Sashiwa, 1989) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Varum, 1992) han sugerido que las dos diferentes unidades están distribuidas al azar.

También se sabe que la quitina y el quitosán exhiben polimorfismo (Muzzarelli, 1977). Generalmente las cadenas individuales asumen una estructura lineal, las cuales tienen una torsión completa cada 10.1- 10.5 Å a lo largo del eje de la cadena.

Figura 1 Estructura de la quitina

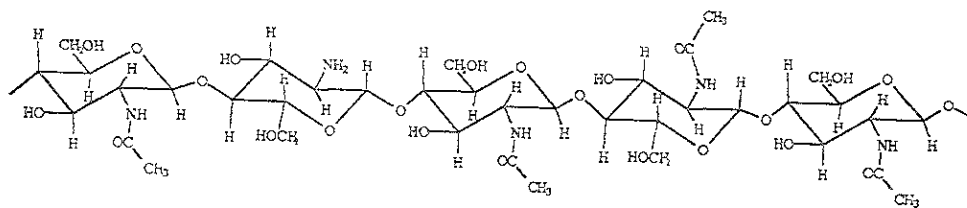
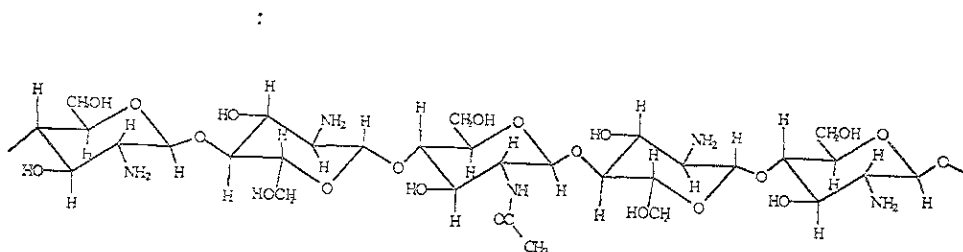


Figura 2. Estructura del quitosán



1.3 Propiedades Físicas y Químicas

Aunque las estructuras moleculares de quitina y quitosán parecen muy similares, las reacciones químicas a las que se sujetan y sus propiedades físicas son sorprendentemente distintas. Ambos compuestos poseen grupos hidroxil y amino primarios reactivos, pero el quitosán es usualmente menos cristalino que la quitina, lo cual presumiblemente hace al quitosán más accesible a los reactivos.

El quitosán también tiene una alta concentración de grupos amino primarios, lo cual le confiere un carácter nucleofílico básico. Bajo calentamiento, ambos compuestos se descomponen antes de fundirse. (Muzarelli 1977, Zikakis 1984, Tokura 1990).

1.3.1 Reacciones orgánicas comunes.

La quitina y el quitosán ambos pueden ser considerados bases débiles, y como tales experimentan las reacciones típicas de neutralización de los compuestos alcalinos. En estas reacciones el par de electrones no unidos del grupo amino primario de las unidades de glucosamina llevan a cabo el rol de aceptores de protones. Por lo tanto, los grupos amino primarios se convierten en grupos cargados catiónicamente, (ver Figura 3).

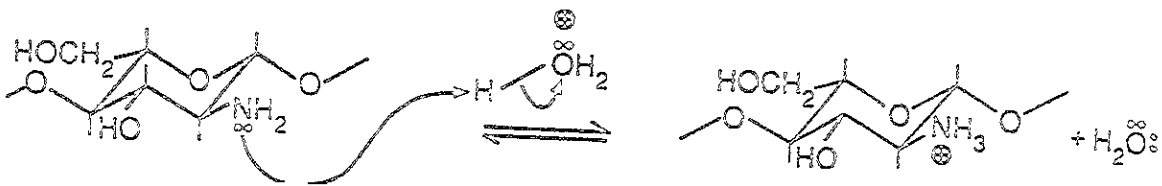


Figura 3. Reacción de neutralización de quitina / quitosán

El quitosán es insoluble en soluciones acuosas neutras o alcalinas pero es soluble en soluciones acidificadas. La multitud de sitios catiónicos a lo largo de la cadena del quitosán permite la solubilidad en agua incrementando la polaridad del compuesto y el grado de repulsión electrostática polímero-polímero. La quitina posee un porcentaje insuficiente de unidades de glucosamina para permitir la solubilidad en agua, aún bajo condiciones ácidas.

El par de electrones no unidos al grupo amino primario hacen también al quitosán un nucleófilo potente que reacciona con la mayoría de los aldehídos para formar iminas (Kurita, 1988).

La quitina y el quitosán son susceptibles a la hidrólisis ácida o básica. Bajo condiciones ácidas o alcalinas puede ser liberado tanto ácido acético como los grupos N-acetil del C₂ son convertidos en aminas primarias (Muzarelli, 1977). Condiciones ácidas también resultan en cierto grado de depolimerización debido a que ocurre la hidrólisis de los enlaces β glicosídicos (Madhavan, 1974).

Aunque la mayoría de las reacciones de quitina y quitosán involucran el grupo amino primario, es posible modificar selectivamente los grupos hidroxilo. Esto puede ser llevado a cabo protegiendo el grupo amino a través de la formación de acetato o formato del polisacárido y la subsecuente reacción de la sal con un electrófilo (Muzarelli 1977). El grupo hidroxil del C₆ es más reactivo que el hidroxilo del C₃ y es por tanto preferencialmente derivatizado.

La reacción de sulfatación es un ejemplo común de este tipo. Esta reacción puede ser llevada a cabo sobre quitina y quitosán. Los productos de esta reacción tienen propiedades anticoagulantes similares a las de heparina (Wolfson 1959).

1.3.2. Complejos con metales pesados.

En adición a las propiedades de intercambio iónico, tanto la quitina como el quitosán son capaces de formar complejos con muchos metales pesados de transición, así como de algunos de los grupos 3 al 7 de la tabla periódica (Muzarelli 1973). No se forman complejos entre estos polímeros y los metales de los grupos 1 ó 2. Los complejos metal pesado / polímero se cree que se forman como resultado de un enlace dativo. Esto involucra la donación del par de electrones no unidos del nitrógeno y / o el oxígeno de los grupos hidroxilo al ión del metal pesado. El ión cúprico parece ser el que forma uno de los complejos metálicos más fuertes con el quitosán en el estado sólido (McKay 1986, Domard 1982). Los iones ferrosos también son capaces de unirse a quitosán. Experimentalmente, una mezcla de quitosán en polvo (100 mg) y una solución de nitrato ferroso (25 mg) en 50 ml de agua fue agitado por 74 horas a temperatura de 30 °C, bajo estas condiciones cerca del 28 % del metal se acomplejó con el quitosán. La velocidad de formación y la estabilidad de estos complejos son dependientes de los contraiones, la competencia entre iones de metales pesados, la temperatura, el pH de la solución, del tamaño de partícula, la cristalinidad, el grado de N- acetilación de la quitina o el quitosán (Koshijima 1973).

1.3.3 Solubilidad

Probablemente las diferencias más notables entre la quitina y el quitosán recae en sus respectivas solubilidades. La siguiente tabla. 1, resume la mayoría de los solventes comunes para quitina y algunos para quitosán. Hay relativamente pocos solventes para quitina, mientras que casi todas las soluciones acuosas ácidas disuelven al quitosán.

Nótese en la tabla que la mayoría de los solventes enlistados para quitina son tóxicos y por lo tanto no pueden ser usados en aplicaciones en alimentos que requieren la formación de soluciones del polímero (Capozza, 1975, Austin 1975).

De cualquier modo, algunos de los solventes de quitosán son relativamente seguros para consumirse, permitiendo la formación de soluciones adecuadas para hacer geles o espumas. Por ejemplo, el quitosán es fácilmente disuelto en una mezcla de 80 partes de agua y 20 partes de vinagre.

Tabla 1. Solventes comunes para quitina y quitosán

Solventes para quitina	Solventes para quitosán
Dimetilformamida, cloruro de litio	Acido fórmico, agua
Diethylformamida, cloruro de litio	Acido acético
Hexafluoroisopropanol	Acido láctico, agua
Hexafluoroacetona sesquihidratada	Acido glutámico, agua
1,2 Cloroetanol, ácido sulfúrico	-

Capozza 1975, Austin 1975.

1.3.4 Propiedades de Solución del quitosán

Cuando el quitosán está sujeto a mezclas de ácido / agua, una proporción de los grupos amino primarios de la molécula de quitosán se protonan y por lo tanto adquieren una carga positiva. De aquí, que las moléculas de quitosán solvatadas son policationes y coagulan si a una solución de éste se le adiciona un ión o molécula portando cargas negativas múltiples. Por ejemplo, el alginato de sodio y la mayoría de los aniones bivalentes tales como el

sulfato y fosfato o polioxianiones metálicos cargados, y muchas proteínas forman complejos iónicos insolubles con quitosán (Draget, 1991).

1.3.5 Reacciones Enzimáticas

La lisozima degrada a la quitina y el quitosán bajo las condiciones propias de temperatura, fuerza iónica y pH (Sashiwa, 1989; Amano, 1978; Hirano, 1989; Allan, 1991; Santos, 1991; Nordtveit, 1991). En general, a mayor grado de N acetilación de la quitina o quitosán la reacción es mas rápida; ésta es también facilitada por decremento de la cristalinidad del polisacárido. Algunas bacterias poseen quitinasas o quitosanasas, las cuales degradan el polímero (Jeuniaux, 1971).

Cuando la quitina o el quitosán son tomados oralmente son considerados esencialmente como no digeribles por humanos. Se reconoce que los humanos no contienen bacterias que poseen quitinasas y quitosanasas en la flora intestinal, mientras que los animales como el pez, las gallinas y los conejos si las tienen siendo capaces de digerir grandes cantidades de quitina y quitosán (Kono, 1987; Hirano, 1986, Hirano 1990) Existen bajas concentraciones de lisozima en la saliva y en el fluido estomacal de los humanos y la enzima puede degradarse en pequeñas proporciones. La degradación hidrolítica también puede llevarse a cabo en el estómago, siendo el pH entre 1 y 2 (Fukada, 1991).

1.4 Procesos de manufactura de quitina y quitosán

La primera compañía productora de quitina y quitosán que abrió en 1971 fue la Kyowa Oil & Fat Co. de Japón. (Muzarelli 1977). Algunos años mas tarde la compañía Kyokuro de

Japón y Marine Commodities International Inc. and Food, Chemical & Research Laboratory, Inc, ambas en Estados Unidos comenzaron su producción. En 1986, habían 15 productores de quitina y quitosán en Japón con una producción anual de 40 y 700 toneladas respectivamente. (Hirano, 1989). Ambos polímeros son producidos también por Pronova Biopolymer, Inc. en los Estados Unidos.

La mayoría de las plantas productoras de quitina y quitosán están localizadas cerca de las procesadoras de cangrejo y camarón, los cuales son transportados de las plantas procesadoras a las instalaciones de producción. Estos arreglos resuelven el problema de colocación de los desperdicios de los cosechadores de mariscos y provee al productor de quitina y quitosán con una materia prima barata y disponible. Una vez transportados los desperdicios de marisquerías son molidos en hojuelas y tratados con una solución alcalina para disolver las proteínas no acomplejadas presentes en los desperdicios. Los líquidos son separados de los sólidos, y las proteínas son mas tarde recuperadas y vendidas en aproximadamente 0.55 dólares por kilogramo (Muzarelli, 1977). Lo que queda del desperdicio de los caparazones es tratado con ácido clorhídrico para extraer los minerales tales como el carbonato de calcio y magnesio (Bough 1978, Brine 1981, Carroad 1978, Cosio 1982, Charaiambous 1989, Hirano 1991, Kamasashi 1961, Knorr 1991, Kobelke 1989, Kurita 1993, No Hong 1989, 1995, Shimañara 1988, Skjakbraek 1988, Wu A. 1978).

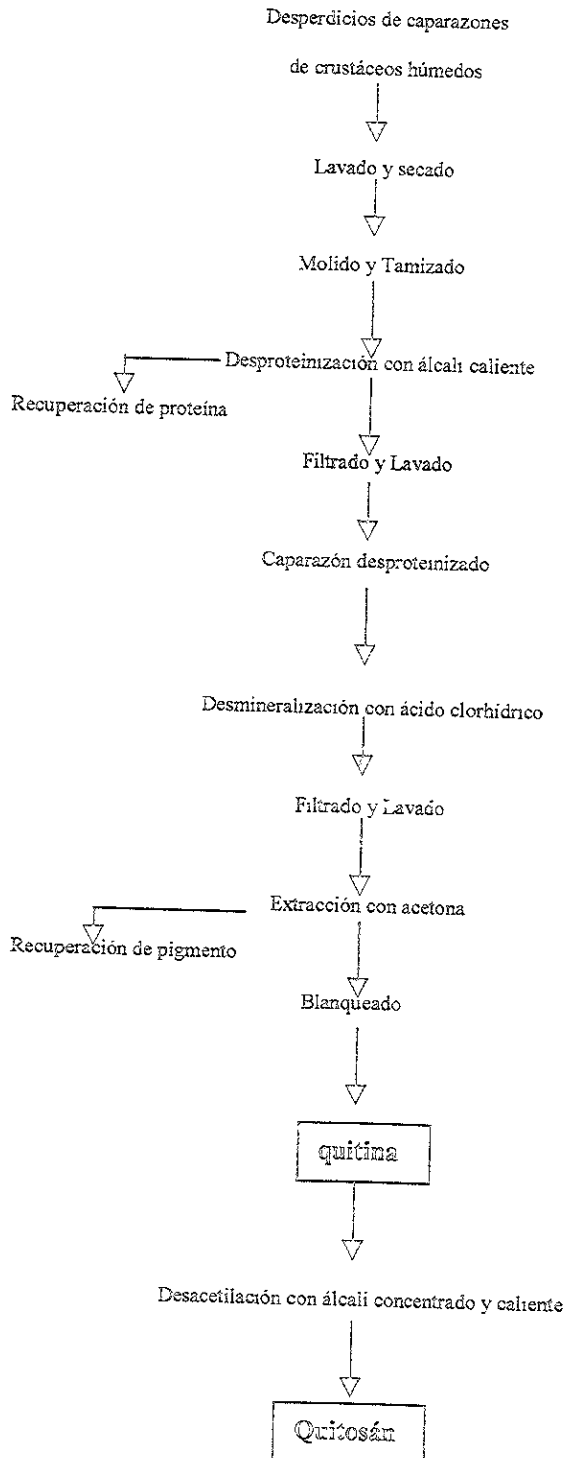
El residuo es principalmente quitina, aunque pequeñas cantidades de proteínas acomplejadas pueden estar presentes. El producto es lavado con agua y secado.

La mayor parte de la quitina aislada es usada para hacer quitosán para lo cual se pone en una solución alcalina concentrada y caliente por 2 a 4 horas, en ocasiones bajo una atmósfera de nitrógeno, para minimizar las reacciones no deseables de oxidación. Este tratamiento violento causa hidrólisis de muchos de los enlaces N- acetil y convierte las unidades de N-acetilglucosamina en unidades de glucosamina. Posteriormente, las hojuelas de quitosán se separan del licor, se lavan con agua y se secan (Figura 4).

El quitosán puede ser producido en una variedad de formas, incluyendo hojuelas, polvos, glóbulos, películas y geles (Alimuniar 1992, Arcidiacono 1992, Berkely 1979, Bough 1978, Broussignac 1968, Brzeski 1982, Knorr 1991, Lusena 1953, Mima 1983, Moorjani 1975, Wu A 1978).

Figura 4

ESQUEMA GENERAL DE PRODUCCION DE QUITINA Y QUITOSAN



Fuente: No Hong K., and Meyers Samuel P (1995).

1.5 Aplicaciones del quitosán

El hecho de que mucho del quitosán está disponible y es empleado en numerosas aplicaciones comerciales, provee un estímulo para idear nuevos métodos de adaptación de esta valiosa fuente de polímero biodegradable. Dentro de las aplicaciones ya bien conocidas se tienen los siguientes campos:

1.5.1 Agricultura

La investigación en la Universidad del estado de Washington ha mostrado que el recubrimiento de semillas de trigo con quitosán ha incrementado el rendimiento de los cultivos (Santos, 1991). Esta práctica es permitida por la Agencia de Protección al Ambiente en USA y ha sido adoptada por 11 estados (Nordtveit, 1991; Jeuniaux, 1971). El quitosán aparentemente dispara una respuesta en la semilla que puede denominarse como un mecanismo de autoprotección, en especial al ataque de hongos patógenos, muchos de los cuales contienen quitina en sus paredes celulares (Hadwiger, 1984).

1.5.2 Industria Alimentaria.

Las características como dureza, biodegradabilidad y bioactividad, hacen de la quitina y sus derivados materiales que en la industria procesadora de alimentos pueden ser empleados para modificar o controlar las propiedades funcionales de los alimentos, ya sea como reguladores de formación de cristales de hielo en alimentos congelados, agentes espesantes, texturizantes, quelantes, emulsificantes para la elaboración de aderezos, salsas, bebidas, pastelería, embotidos, gelatinas, productos lácteos (Austin 1981, Knorr 1984).

La quitina microcristalina, producida por hidrólisis ácida controlada, es apropiada para su uso como espesante y estabilizador que supera por mucho (10 a 20 veces más eficiente)

a otros polímeros empleados comúnmente como celulosa microcristalina para la elaboración de mayonesas, manteca de cacahuete y otros alimentos tipo emulsión. (Austin 1981, Charalambous 1989, Knorr 1984).

1.5.3 Clarificación y Purificación de Aguas y bebidas

La aplicación más grande y sencilla del quitosán es en la clarificación de agua de deshecho. En 1986 aproximadamente 500 toneladas de quitosán fueron utilizados para este propósito en Japón (Hirano, 1989). La Agencia de protección al medio Ambiente de EUA ha aprobado el uso de leños u hojuelas de quitosán como medio de filtro en el tratamiento de agua potable .

1.5.4 Farmacéutico

Las compañías farmacéuticas han investigado activamente las posibles aplicaciones biomédicas del quitosán. Como un vehículo de distribución de fármacos el quitosán es fácilmente mezclado propiciando la formación de glóbulos, películas, tubos, polvos u otras. El fármaco es liberado generalmente de la matriz de quitosán al estar en contacto con los fluidos corporales (Allan, 1991). El quitosán ha mostrado ser biodegradable cuando ha sido implantado en animales de prueba (Santos, 1991), y esto parece ser debido a la acción de la lisozima, la cual está presente en la mayoría de las heridas (Kajiki, 1988). El quitosán, los alginatos y los glucanos β (1-3) tienen actividad inmunoestimulante, debido parcialmente a la estimulación de TNF-alfa, IL-1 e IL-6 y producción de monocitos, los cuales podrían ser muy útiles en el tratamiento de las infecciones y enfermedades virales. En algunos casos, sin embargo, la actividad inmunoadyuvante del quitosán ha impedido el proceso de

cicatrización (Santos, 1991). Las aplicaciones biomédicas de quitina y quitosán han sido revisadas en algunos artículos (Sandford, 1991).

1.5.5 Inmovilización de células y enzimas

El quitosán ha sido usado para inmovilizar células conteniendo enzimas útiles y para la inmovilización de enzimas directamente (Draget, 1991). Las células y las enzimas pueden ser atrapadas en geles ionotrópicos de quitosán, esto es, la mezcla de soluciones de quitosán con polímeros aniónicos (ej. polifosfatos, alginato de sodio, carragenina o pectina). Alternativamente, lechos de quitosán pueden ser entrecruzados para hacerlos insolubles antes de que las enzimas queden atrapadas. Se pueden fabricar columnas de afinidad con la unión de antígenos protéicos o anticuerpos al quitosán.

1.5.6 Cosméticos y cuidado personal

Por lo menos una loción para la piel conteniendo quitosán como ingrediente activo ha sido introducido en el mercado de los Estados Unidos, y Wella, Inc de Alemania está vendiendo en este país y Japón un shampoo que contiene quitosán de bajo peso molecular. El quitosán es apropiado para este propósito ya que tiene propiedades humectantes y capacidad de formar películas. En la Tabla 2 se enlistan diversas aplicaciones y algunos ejemplos.

Tabla 2 Resumen de aplicaciones de quitina y quitosán

	Remoción de iones metálicos
	Floculante / coagulante
	Filtración
	Desalinación
	Tratamiento de superficie
	Papel de Fotografía
	Papel copia sin carbón
	Aditivo
	Tratamiento de terminado
	Fijador de colorantes
	Filamentos de hilado húmedo
	Filamentos electrohilados
	Decolorante de aguas de desecho
	Esponjas y bendajes
	Vasos sanguíneos artificiales
	Control de colesterol en sangre
	Antiinflamatorio
	Inhibidor de tumores
	Propiedades antivirales
	Inhibición de la placa dental
	Cicatrizante
	Piel artificial
	Fluido del humor vítreo
	Lentes de contacto
	Liberación de drogas
	Tratamiento de recuperación de hueso
	Pólvora de maquillaje
	Barniz de uñas
	Humectante
	Fijador
	Loción de baño
	Crema de manos
	Pasta de dientes
	Shampoo
	Inmovilización de enzimas
	Recuperación de células
	Inmovilización de células
	Electrodos de glucosa
	Recubrimiento de semillas
	Recubrimiento de hojas
	Fertilizantes hidropónicos
	Liberación controlada de agroquímicos
	Remoción de la turbidez en líquidos
	Preservativos
	Estabilización de color
	Productos para pérdida de peso
	Empaques biodegradables
	Oligosacáridos
	Glucosamina y sulfato de glucosamina
	quitosán
	Derivados de quitosán
	Separación de drogas
	Bioseparación
	Pervaporación
	Remoción de PCB
	Detoxificación de agentes químicos

Fuente: Chitin and Chitosan. An Expanding Range of Markets Await Exploitation. Technical Insights.

1.6 Quitina y quitosán como agentes antimicrobianos

1.6.1 Quitina y quitosán con actividad antifúngica

El quitosán inhibe el crecimiento de una amplia variedad de "hongos" (Allan 1979, Stoessel y Hirano y Nagao 1989). Existen dos modelos propuestos para la inhibición del crecimiento microbiano:

i) La naturaleza policationica del quitosán interfiere con los residuos cargados negativamente de las moléculas en la pared de la célula (Young and Kaus 1983).

Algunos estudios de absorción UV indican que el quitosán causa una considerable salida de material proteico de *Pythium paroeocandrum* a pH 5.8 (Leuba y Stossel 1985).

La liberación de los productos inducida por policationes en células de plantas, se inhibe fuertemente por cationes divalentes y tal acción es de tipo competitiva. La salida de los productos inducida por policationes en células vegetales se reduce por poligalacturonato, presumiblemente debido a la formación complejos polianión-polication (Young 1982).

ii) El otro mecanismo involucra la unión del quitosán con el ADN para inhibir la síntesis de ARNm (Hadwigwer 1985).

Se propone que cuando el quitosán se libera de la pared celular de patógenos fungales, debido a la acción de enzimas hidrolíticas de la planta hospedera, alcanza el núcleo del hongo e interfiere con la síntesis de ARNm y proteína.

También se dice que los oligómeros de quitosán consistentes de 7 unidades de azúcar han mostrado que poseen la mayor actividad antifúngica (Kendra y Hadwiger 1984).

1.6.2 Quitosán con actividad bactericida

Por otro lado, el quitosán y otras poliaminas interactúan con la membrana celular para alterar la permeabilidad de la misma. Por ejemplo, la levadura de panadería es inhibida por ciertos cationes como el acetato de uranio, el sulfato de amonio, la anilina y D-glucosamina,

el cual actúa en la superficie celular de la levadura previniendo la entrada de glucosa (Ralston 1964).

A bajas concentraciones, el quitosán policationico probablemente se une a la superficie bacteriana cargada negativamente, causando aglutinación. A altas concentraciones, el gran número de cargas positivas impartirá una carga positiva neta en las superficies bacterianas para mantener a la bacteria en suspensión y elevando aun mas la concentración de quitosán, la superficie bacteriana estará cubierta totalmente previniendo la salida de los componentes intracelulares impidiendo la transferencia de masa en ambos sentidos (Sudarshan 1992).

Los agentes antibacterianos, han sido clasificados en diversos grupos dependiendo del "sitio blanco" o el sitio en donde interactúan con la célula para inhibir su función. Los agentes antibacterianos cationicos, como el quitosán, podrían ser una alternativa, particularmente en el sellado de heridas actuando como película aislante y con características bacteriostáticas (Allan y cols.1984). Estos tienen algunas ventajas sobre otros tipos de desinfectantes, esto es, poseen gran actividad antibacterial, amplio espectro, y una baja toxicidad hacia las células mamíferas (Franklin 1981, Takemono 1989). El sitio de acción de los biocidas cationicos es la pared o la membrana celular de la bacteria (Franklin 1981, Kanazawa 1993).

El sitio de interacción de los biocidas de bajo peso molecular es la membrana citoplasmática de la bacteria y su modo de acción se resume como sigue:

- i) Adsorción a la superficie de la célula bacteriana
- ii) Difusión a través de la pared celular
- iii) Unión a la membrana citoplasmática

- iv) Ruptura de la membrana citoplasmática
- v) Liberación de los constituyente tales como iones K, ADN y ARN
- vi) Muerte de la célula (Franklin 1981)

Se asume que biocidas catiónicos, con una densidad de carga con forma de una espiral sencilla de polielectrolitos que incrementa con el peso molecular, y se produce una potenciación de la adsorción de policationes en la superficie celular cargada negativamente (proceso i). Esto también es favorable para la unión del polication a la membrana citoplasmática (proceso iii).

En el trabajo realizado por Chun-Ho y colaboradores en 1997, quienes evaluaron la actividad antibacteriana de algunos derivados de quitina y quitosán (policationes), el Dietilaminoetil - quitina (DEAE-quitina) presenta mayor actividad que el Dietilaminoetil -quitosán (DEAE-quitosán) y éste a su vez muestra un aumento con respecto trietilaminoetil - quitina (TEAE-quitina) en donde los grupos alquil se incrementan. En este trabajo se resume que los agentes antibacterianos fueron más activos contra *S. aureus* que contra *E. coli*, y esto lo explican por las diferencias en la estructura de las paredes celulares entre bacterias (Gram +) y (Gram -). Las células Gram (+) presentan una pared celular con estructura simple. Fuera de la membrana citoplasmática hay solo una capa rígida, constituida de peptidoglicano. Esta pared relativamente gruesa, está compuesta de redes con muchos poros, lo cual permite que moléculas extrañas entren en la célula sin dificultad. Por otro lado, las bacterias Gram (-) tienen paredes celulares muy complicadas. Hay otra estructura fuera de la capa de peptidoglucano, la cual es llamada "membrana externa" con una estructura similar a la membrana citoplasmática.

En relación a la estructura de la bicapa, la membrana externa es una barrera potencial contra moléculas extrañas. Esta estructura complicada de las bacterias Gram (-) podría explicar la razón por la cual los agentes antibacterianos son más activos contra *Staphylococcus aureus* que con *Escherichia coli* (Chun-Ho Kim 1997).

Purnama y Masatoshi en 1994 hablan de la incorporación de este polímero a alimentos procesados y aseguran la inhibición de bacterias que deterioran a los alimentos, inclusive la inhibición de cultivos iniciadores en carne.

Estos autores, y en acuerdo con Young 1982, resumen que el modo de inhibición por quitosán sobre el crecimiento de algunas bacterias de putrefacción y algunos cultivos iniciadores, puede ser debido a la interacción del quitosán con las membranas o los componentes de la pared celular y que resulta en un incremento de la permeabilidad de las membranas y la salida del material. También podría deberse a la capacidad de unión del agua y en la inhibición de varias enzimas por quitosán. Éste tiene actividad bioabsorbente y puede adsorber nutrientes de la bacteria, inhibiendo su crecimiento.

En otro trabajo realizado por Papineau y colaboradores en 1991 quienes trabajaron con quitosán-lactato y quitosán hidroglutamato usando *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como organismos de prueba, obtuvieron resultados de inhibición contra estos dos microorganismos y concluyen que el mecanismo se centra en el trastorno o bloqueo de la función de la membrana. En este estudio el efecto de la exposición del quitosán a los 2 minutos parece que es más que la sola aglomeración. La liberación de los constituyentes intracelulares es probablemente una de las claves en la inactivación celular.

2.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de la actividad antibacteriana de quitosán, obtenido a partir de quitina de exoesqueletos de camarón extraída bajo un proceso de extracción propio.

OBJETIVO PARTICULAR 1

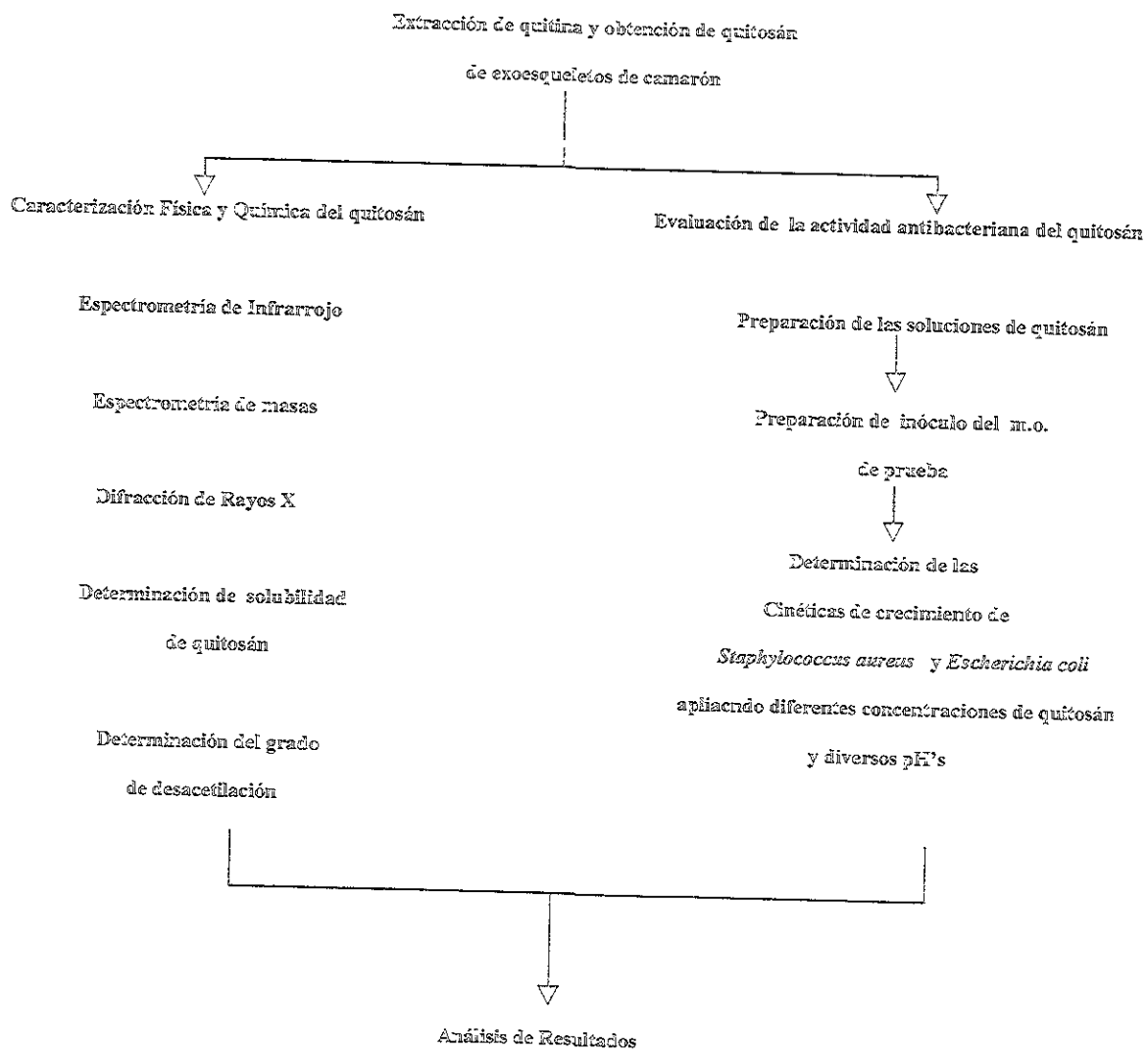
Caracterización física y química del quitosán obtenido.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán obtenido, sobre una bacteria Gram (+) y una bacteria Gram (-) a diferentes concentraciones y pH's de la solución de quitosán a través de cinéticas de crecimiento.

Figura No. 5

CUADRO METODOLOGICO



3.- METODOLOGIA

La primera parte de la tesis ha sido la preparación del quitosán, el cual fue obtenido a partir de la extracción de quitina de exoesqueletos de camarón, en donde las condiciones de extracción así como la forma de desacetilación del biopolímero, fueron estudiadas previamente por Patricia Miranda y Virginia Lara (Patente en trámite).

Por experiencia personal en relación a la extracción de quitina y su conversión a quitosán se puede afirmar que existen diferencias muy importantes del comportamiento del quitosán, tanto como formas de extracción de quitina y grados de desacetilación del quitosán se tengan, coincidiendo con Chun Ho y colaboradores (1997). Esto hace suponer que repercutirá en la actividad biológica mostrada por el producto.

Los productores de quitinas y/o quitosanes comerciales solo aportan datos en cuanto al origen del polímero. En los casos en los que los polímeros han sido preparados por los autores, éstos se concretan a decir el método utilizado en su preparación.

Considerando la importancia de definir o caracterizar el material de estudio y porque se está trabajando con un material que fue extraído con una nueva metodología, tanto la quitina como el quitosán fueron caracterizados física y químicamente antes de iniciar el estudio de la actividad antibacteriana. La quitina y el quitosán obtenidos fueron caracterizados por espectrofotometría de infrarrojo (IR), espectrometría de masas (EM), difracción de rayos X y solubilidad usando como patrón de comparación la quitina comercial de SIGMA. En el caso del quitosán se determinó el porcentaje de desacetilación.

En la segunda parte de la tesis se llevó a cabo la evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán obtenido, usando como bacterias de estudio al *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p como representante del grupo de bacterias Gram (+), y *Escherichia coli* ATCC 10336 del grupo de bacterias Gram (-) las cuales se emplean generalmente como estándares de medición de antibióticos.

En la evaluación se utilizó el quitosán obtenido a cuatro diferentes concentraciones (500, 250, 125 y 62.5 ppm) solubilizado en agua acidulada con ácido acético. También las soluciones de quitosán probadas en esta evaluación tuvieron tres diferentes pH's (4.5, 5.5, y 6.5)

Para observar el efecto antibacteriano se planteó el registro del crecimiento bacteriano a través de las cinéticas de crecimiento de los dos microorganismos durante 5 horas, medido en densidad óptica (DO) y Unidades Formadoras de Colonia / ml (UFC/ml).

Por lo tanto, se tienen como variables dependientes: el tipo de bacteria, la concentración de quitosán, el pH de la solución de quitosán y el tiempo de exposición del quitosán al medio de cultivo. Los datos registrados de Unidades Formadoras de colonia / ml fueron analizados estadísticamente por Regresión múltiple y ANOVA con el programa estadístico por computadora SAS versión 6.2.

3.1 Extracción de quitina de exoesqueletos de camarón

La extracción de quitina se llevó a cabo bajo las condiciones de desproteínización y desmineralización establecidas por Patricia Miranda y Virginia Lara (Patente en trámite).

3.2 Desacetilación de la quitina obtenida para obtener quitosán

Se llevó a cabo la desacetilación de la quitina utilizando una solución de NaOH al 50 %, a una temperatura de 100 °C por un tiempo de 45 min, con una relación de volumen de reacción de 1:10. Posteriormente el quitosán obtenido se lavó con agua destilada hasta pH neutro y se secó en un horno a 60 °C durante toda la noche.

A la forma desacetilada de la quitina se le denomina quitosán y este deberá tener como mínimo un 70 % de los grupos acetilo removidos.

3.3 Caracterización física y química del quitosán obtenido

3.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo (IR).

Se prepararon las muestras en forma de pastilla de KBr. Los espectros se realizaron en un Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 283. Las muestras corresponden a quitina comercial Sigma como patrón, a la quitina obtenida y al quitosán obtenido a partir de la desacetilación de la quitina obtenida. Este análisis fue llevado a cabo en el Instituto de Química de la UNAM.

La absorción de energía electromagnética de diferentes longitudes de onda produce diferentes estados excitados en las moléculas. La radiación infrarroja, por ejemplo, corresponde a energías relacionadas con las vibraciones moleculares. Una muestra introducida en un espectrofotómetro infrarrojo y expuesta a longitudes de onda de radiación infrarroja continuamente cambiantes absorberá luz cuando la radiación incidente corresponda a la energía de una vibración molecular concreta.

Los espectrofotómetros de infrarrojo típicos cubren las regiones de *tensión* y *deformación* molecular.

Las energías de las vibraciones de tensión de las moléculas orgánicas corresponden a una radiación infrarroja con números de onda comprendidos entre 1200 y 4000 cm^{-1} . Esta parte del espectro infrarrojo es de particular utilidad para detectar *la presencia de grupos funcionales* en los compuestos orgánicos.

Así, una señal de absorción en la región de los grupos funcionales de un espectro infrarrojo, es casi siempre una indicación definida de algún grupo funcional determinado que se halle presente en la muestra (Pretsch 1985). Generalmente este tipo de análisis sirven para identificar a las sustancias ya que presentan un patrón definido.

3.3.2 Espectrometría de masas (FAB)

Para llevar a cabo el análisis de masas de las muestras de quitina comercial, quitina obtenida y quitosán estas fueron solubilizadas en el sistema N,N-Dimetilacetamida/ LiCl 5 %, las cuales fueron analizadas en un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX505WA con la técnica FAB (Fast Atom Bombardment). Este análisis fue realizado en el Instituto Mexicano del Petróleo con la asesoría del Dr. Manuel Salmón

La espectrometría de masas es una técnica analítica muy poderosa que es usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos, y elucidar las propiedades químicas y estructurales de las moléculas.

La muestra a analizar, la cual puede ser sólida, líquida o vapor, es introducida a una cámara de vacío y posteriormente es ionizada.

Los iones, los cuales se encuentran en estado gaseoso, se clasifican en el analizador de masas de acuerdo a su relación masa / carga (m/z), y finalmente se captan por un detector;

así, los iones generan una señal eléctrica que es proporcional al número de éstos. El sistema de datos registra estas señales eléctricas y luego las convierte en un espectro de masas. Los iones y sus abundancias sirven para establecer el peso molecular y la estructura de los compuestos analizados por esta técnica. Los iones comúnmente son generados por el bombardeo de moléculas gaseosas con un haz de 70 eV electrones.

La técnica empleada en el análisis de masas fue la denominada FAB (Fast Atom Bombardment). Esta forma de ionizar a la molécula muestra es mucho más suave que la de Impacto Electrónico (IE) y que la de Ionización Química (IQ), de tal manera que los fragmentos obtenidos son mucho más grandes. La molécula es ionizada de una forma no directa y se utiliza un gas inerte como el Argón o Xenón, el cual se excitó y posteriormente se utilizó para bombardear a la molécula de análisis para generar el espectro de masas.

3.3.3 Difracción de Rayos X

Los patrones de difracción de rayos X fueron elaborados en un equipo SIEMENS Diffraktometer 500, a 20 mA, 30 Kv, en un rango de 3 – 35 °. Se prepararon las muestras de quitina comercial de Sigma y las muestras de quitina y quitosán obtenidas en este trabajo. Este análisis fue llevado a cabo en el laboratorio de Rayos X de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, con la ayuda del Dr. Juan Manuel Aceves.

El análisis de difracción de Rayos X, como otra técnica analítica que nos permite identificar a las sustancias y además nos indica el grado de cristalinidad. Ésta se puede modificar debido a la degradación sufrida por algún tratamiento.

3.3.4 Solubilidad de quitosán (prueba cualitativa)

Se pesaron 5 mg de muestra de quitina y quitosán obtenidos y se pusieron en contacto con los siguientes solventes: agua, bencina de petróleo, cloroformo, etanol, acetato de etilo, tolueno, hexano, metanol, acetona, N,N Dimetilacetamida /LiCl, ácido acético, ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico.

La prueba de solubilidad de quitina y quitosán es de suma importancia, ya que esto predice el comportamiento que el quitosán tendrá en solución acuosa ya que el agua y el ácido proveerá de los protones que le conferirá una carga neta positiva a la molécula del biopolímero.

3.3.5 Porcentaje de desacetilación del quitosán.

Se empleó el método volumétrico-destilación (Knapczyk 1989) . Se tomó una muestra de quitosán de 0.15- 0.3 g y se destiló con una mezcla de ácido fosfórico (85%) calentando a una velocidad de 1 °C/ min hasta alcanzar 160 ° C. Se utilizó como blanco la destilación de la mezcla agua- ácido fosfórico bajo las mismas condiciones. Ambos destilados se titularon con NaOH 0.1 N usando fenofaleína . El grado de desacetilación se determinó por la fórmula: $D = 100 - 2.03 \times V / m \%$, donde 2.03 es el coeficiente relacionado a la masa molecular de N-acetil-D- glucosamina, V es la diferencia en la cantidad de NaOH usados para titular la muestra y la referencia, m es la masa de la muestra.

La enlaces amida son más difíciles de romper que los grupos éster bajo condiciones alcalinas. Bajo condiciones básicas vigorosas, los grupos acetamido adyacentes a grupos

hidroxil *cis* pueden desacetilarse fácilmente, pero los análogos *trans* son mucho más resistentes

La quitina posee el arreglo 2,3 *trans* en su unidad monosacárida, y es muy estable en la mayoría de los reactivos incluyendo álcali acuoso (Muzzarelli, 1977), y lo que se pretende con esta técnica es lograr el mayor porcentaje de desacetilación posible.

3.4 Evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán sobre las bacterias

Staphylococcus aureus 6538p y *Escherichia coli* 10536.

3.4.1 Ensayos preliminares de actividad antibacteriana

En el ensayo preliminar se planeó el uso del quitosán sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* 6538p de la siguiente manera: En 10 ml de caldo de cultivo BHI se inoculó una colonia bacteriana y se incubó por 24 horas a una temperatura de 37 °C. Posteriormente este cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. La pastilla bacteriana obtenida se resuspendió en 8 ml de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.0), más 1 ml de agua acidificada con ácido acético a pH 4.0 (a este pH el quitosán estuvo totalmente disuelto).

Una vez preparado el cultivo control, se tomó una alícuota de 1 ml y se diluyó 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} . Se tomó una muestra de 100 μ l de cada dilución y se plaqueó sobre agar Müller Hinton. se incubó durante toda la noche y posteriormente se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Para la prueba con quitosán se preparó una solución del polímero al 0.05% en agua acidificada a pH 4.

Se procedió a hacer lo mismo que se detalló para el control, pero en este caso se resuspendió la pastilla bacteriana en 8 ml de buffer de fosfatos (0.1M) + 1 ml de la solución de quitosán al 0.05% y se tomaron muestras a los 20, 40 y 60 minutos; de igual

manera se hicieron diluciones decimales y 100 μ l de cada una se plaquearon e incubaron durante toda la noche a 37 °C y finalmente se contaron las Unidades Formadoras de Colonia.

3.4.2 Actividad antibacteriana del quitosán

La actividad antibacteriana del quitosán se estimó, durante el crecimiento activo de las bacterias de prueba. Esto se hizo para determinar del efecto del quitosán en solución a través de cinéticas de crecimiento de los microorganismos en medio de cultivo líquido. La medición a través del tiempo fue densidad óptica (D.O) a 590 nm y Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Se utilizaron dos bacterias de colección ATCC, las cuales se emplean como estándares de medición de antibióticos, la bacteria (Gram +) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P y la bacteria (Gram -) *Escherichia coli* ATCC 10536. Las soluciones de quitosán probadas tuvieron distintas concentraciones (500, 250 125 y 62.5 ppm) y diferentes pH's (4.5, 5.5 y 6.5). Se utilizó como control el medio de cultivo adicionado con el mismo volumen de agua acidificada al pH correspondiente a la prueba.

A partir de la determinación de UFC / ml se calcularon las velocidades de crecimiento de los microorganismos y el tiempo de duplicación.

3.4.2.1 Preparación de las soluciones de quitosán

Se pesaron las cantidades de quitosán correspondientes a cada una de las concentraciones planteadas y se colocaron cada una en 100 ml de agua destilada. Se agitaron vigorosamente y se les adicionaron lentamente pequeñas gotas de ácido acético concentrado hasta que se llegó a la disolución completa (aproximadamente a pH 4.2). Posteriormente cada una de

las soluciones fueron ajustadas al pH correspondiente a la experimentación (4.5, 5.5 y 6.5) usando NaOH, el cual se adicionó lentamente hasta alcanzar la disolución completa.

3.4.2.2 Preparación del inóculo

Una colonia de la bacteria de prueba fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de volumen conteniendo 50 ml de medio de cultivo (caldo nutritivo) a un pH de 6.9 y se incubó por 18 horas en un agitador rotatorio New Brunswick a 200 rpm y a una temperatura de 37 °C.

3.4.2.3 Cinética de crecimiento

Del inóculo se transfirieron 10 ml a cada uno de los matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 250 ml de caldo nutritivo e inmediatamente después se les adicionó el quitosán a la concentración y pH correspondientes a las pruebas. Se usó como control un matraz preparado de la misma forma, pero adicionado del mismo volumen de agua acidificada al pH de la prueba. Los matraces se incubaron en un agitador rotatorio marca New Brunswick, a una velocidad de 200 rpm y una temperatura de 37 °C.

Se tomaron muestras a intervalos de 1 hora. La densidad óptica a 590 nm se determinó en un espectrofotómetro Spectronic 20 y se efectuaron diluciones decimales con solución salina fisiológica (SSF) al 85%. Cada dilución se sembró en superficie en cajas de Agar Müeller Hinton. Se incubaron a 37 °C por 18-24 horas y se contaron las Unidades Formadoras de Colonia / ml. Los resultados se graficaron y analizaron por computadora con el programa estadístico "SAS", versión 6.2, con el que se obtuvo: Regresión múltiple, ANOVA y Superficies de Respuesta.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a las diferencias en los procesos de extracción y desacetilación, así como las diferencias propias de la especie de donde proviene el material quitinoso dan como resultado un producto con diferentes cualidades tanto físicas, químicas y biológicas, por esta razón el quitosán obtenido fue caracterizado física y químicamente antes de evaluar su actividad antibacteriana.

Los aspectos más importantes de la quitina y el quitosán son tanto su pureza, solubilidad, peso molecular y grado de desacetilación, ya que esto indica la cantidad de cargas positivas disponibles que estarán interactuando con las células bacterianas.

En primer instancia los análisis practicados tanto a la quitina como el quitosán fueron esencialmente para su identificación, ya que se conoce su estructura como un copolímero lineal de n-acetilglucosamina y D- glucosamina (Domzy, 1985).

El primer análisis de identificación que se realizó a la quitina obtenida y su conversión a quitosán fue el de espectrofotometría de infrarrojo. Se utilizó como patrón de referencia de la sustancia, el análisis de Infrarrojo de quitina comercial de Sigma.

4.1 Caracterización física y química del quitosán

4.1.1 Espectrofotometría Infrarrojo (IR)

Generalmente este tipo de análisis sirven para identificar a las sustancias ya que presentan un patrón definido. En este caso se realizó un espectro de IR de una muestra comercial de quitina para usarla como patrón.

Los resultados de espectrofotometría infrarrojo se pueden observar en Tabla 3 y Figura 6 para la quitina obtenida; en Tabla 3 y Figura 7 para la quitina comercial y en Tabla 3 y Figura 8 para el quitosán obtenido. La Tabla 3 muestra las frecuencias y los porcentajes de transmitancia correspondientes a los tres espectros. Como puede observarse en la tabla 3, las principales bandas características de la molécula de quitina obtenida se encuentran en las mismas regiones que las de la quitina comercial denotando que se trata de la misma sustancia. Ambos espectros muestran una señal ancha entre $3100-3500\text{ cm}^{-1}$. Esta señal puede deberse tanto a la presencia en la molécula de grupos OH, como a la existencia de NH. En la quitina existen ambos grupos funcionales, pero la amida se confirma con la banda observada entre $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ y los OH con las señales localizadas entre $1000-1160\text{ cm}^{-1}$ y $1200-1450\text{ cm}^{-1}$.

La Tabla 3 muestra también las frecuencias del quitosán obtenido (quitina parcialmente desacetilada) y el espectro correspondiente (Figura 8), que muestra claramente un ensanchamiento de la banda de 3426 , característico de los enlaces OH y NH, así mismo un acortamiento de la banda de 1600 que corresponde al grupo amida, lo cual indica la desacetilación de la quitina.

Con este análisis se puede decir que se identifica a la quitina y que ésta ha sufrido modificación en el grupo funcional amida.

Quitina obtenida			Quitina Comercial			Quitosán obtenido		
Frecuencia (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)	Grupo	Frecuencia (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)	Grupo	Frecuencia (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)	Grupo
3442	77	OH,NH	3434	67	OH,NH	3426	80	
3267	80		3295	75				
3107	86		3098	85				
2961	89							
2932	88		2940	88				
2891	87		2881	89		2872	86	
1660	80	Amida	1663	77	Amida	1659	87	Amida
1629	80	amida	1650	78	amida	1600	92	amida
1564	81		1571	83				
1415	86		1419	91		1421	93	
1379	82	OH	1380	86	OH	1378	91	
1314	85	OH	1320	90	OH	1321	93	
1261	88	OH, C=O				1261	96	
1205	88	C=O						
1159	82	C=O	1162	85	C=O	1153	87	
1116	81	C=O	1123	82	C=O			
1075	79	OH, C=O	1077	77	C=O	1083	85	
1027	80	OH	1037	78	OH	1032	86	

Tabla 3. Resultados de las frecuencias obtenidas de los espectros de infrarrojo de la quitina obtenida, quitina comercial y quitosán obtenido.

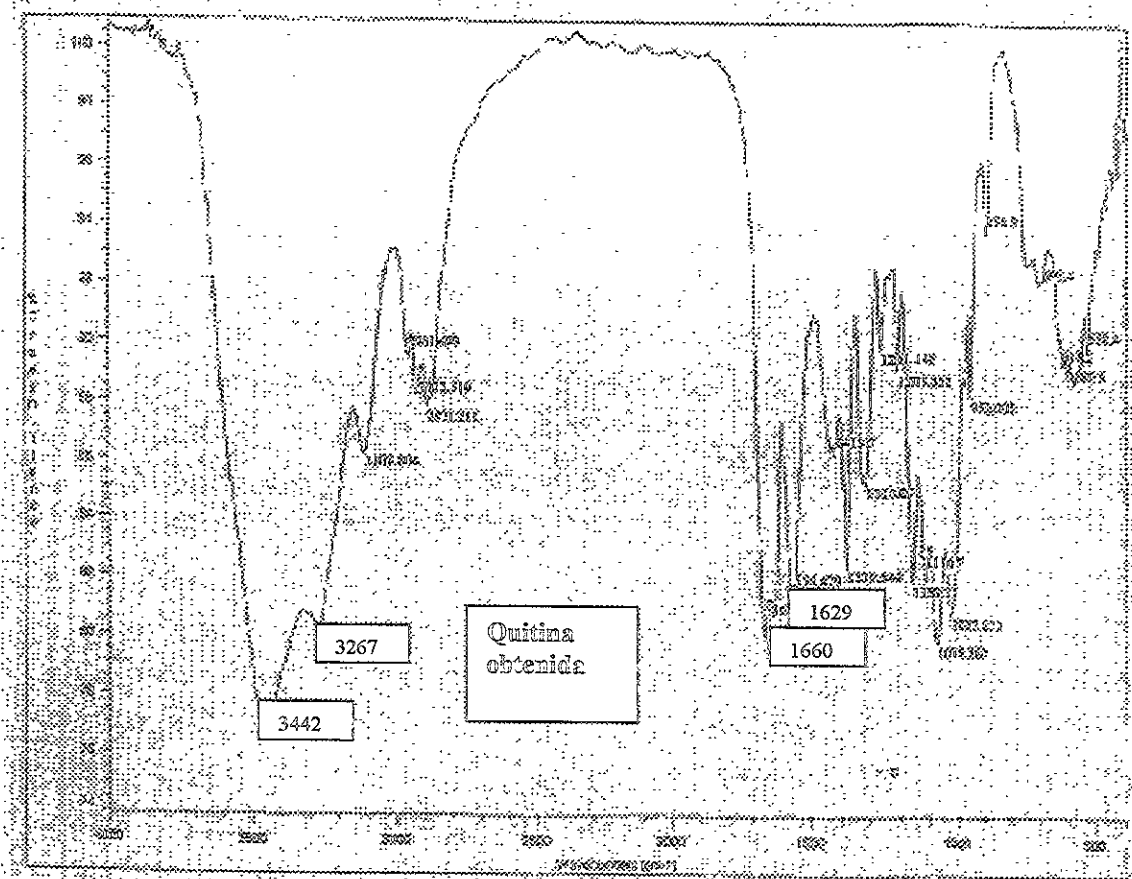


Figura 6. Espectro infrarrojo de quitina obtenida en este trabajo. Como se observa, tanto éste espectro como el de la quitina comercial (Figura 7) son similares, ya que presentan los mismos grupos funcionales.

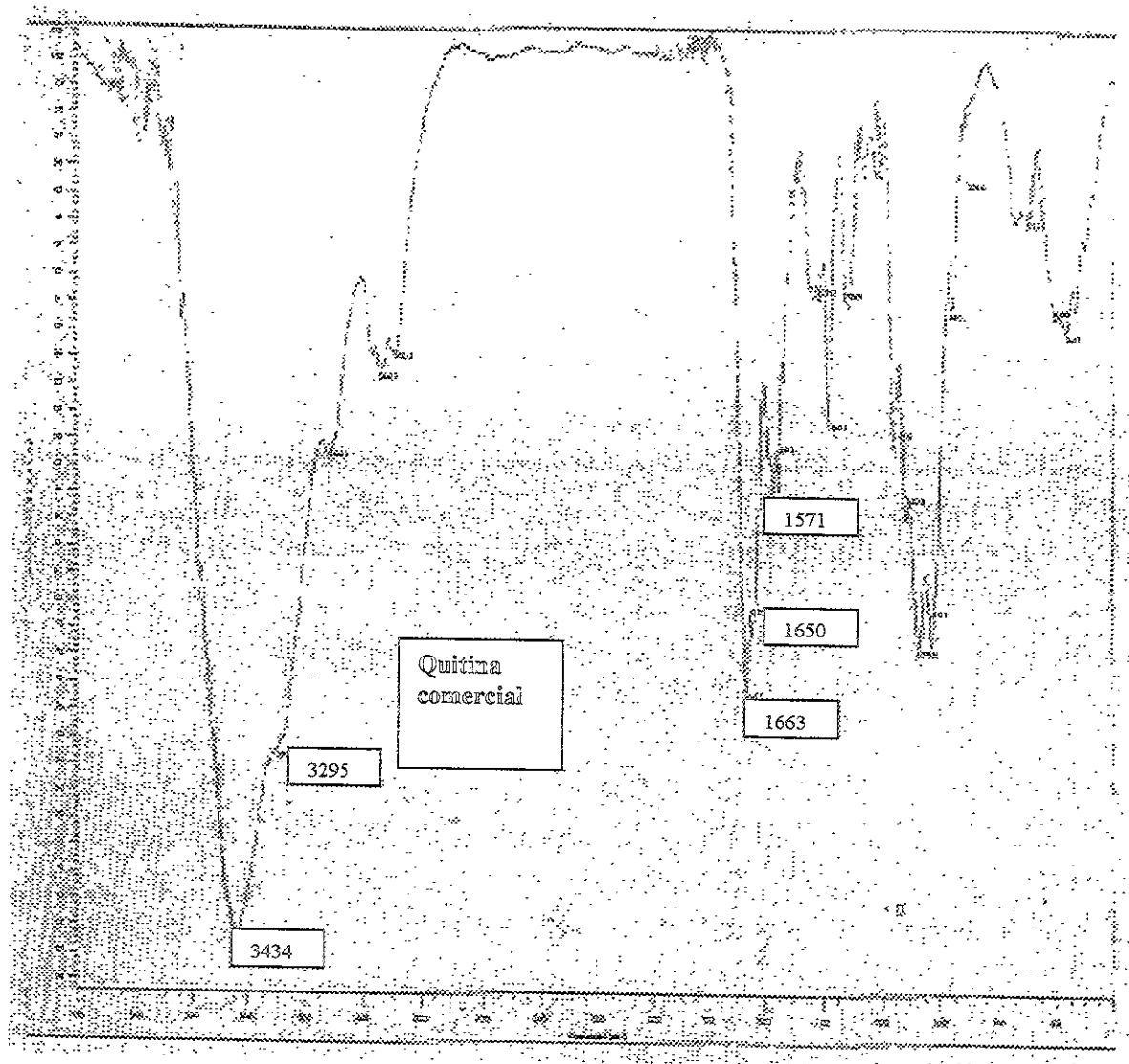


Figura 7. Espectro infrarrojo de quitina comercial de Sigma Este espectro se usó como patrón de comparación para identificar a la quitina obtenida en este trabajo.

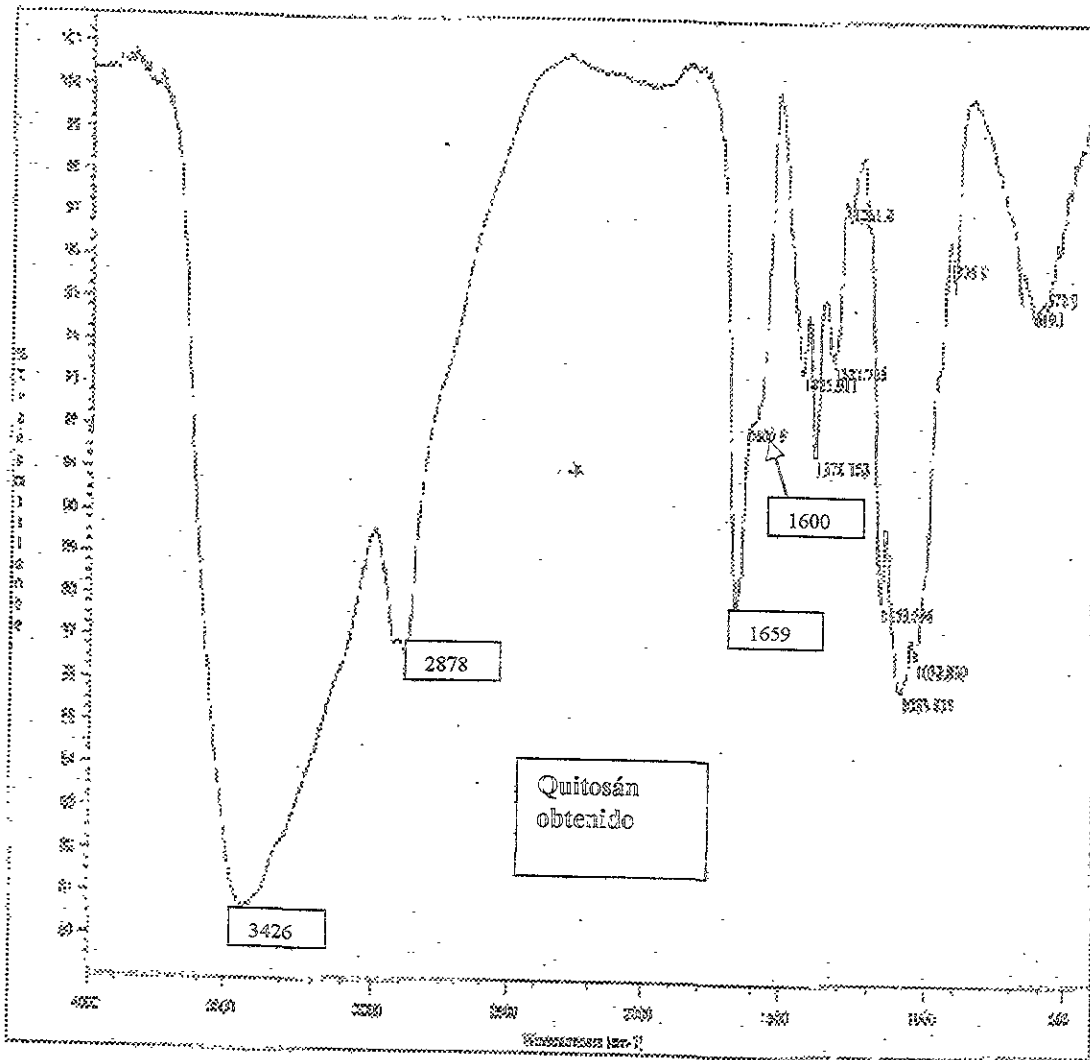


Figura 8 Espectro infrarrojo de quitosán Como puede observarse hay un acortamiento en las bandas 1659 y 1600 lo que indica la remoción de grupos acetilo, además se nota un ensanchamiento de la banda 3426 donde se puede ver el aumento del grupo amonio

4.1.2 Espectrometría de masas (FAB)

En la Figura 9, se muestran los espectros de masas de la quitina Comercial Sigma (a) usada como referencia, el espectro de masas de la quitina obtenida en este trabajo (b) y el quitosán obtenido (c)

En el espectro de masas de la quitina obtenida (b), el pico base (PB) corresponde a una relación de $m/z = 99$ cuya composición es $[C_4 H_8 O_3 N]$ fragmento A de la Figura 10; La señal $m/z = 191$ (40%) $[Monómero +1 - CH_3]$ fragmento B; la señal $m/z = 105$ (10%) $[C_4 H_8 O_3 + H]$ fragmento C, la señal $m/z = 173$ (4%) $[Monómero +1 - CH_3 - H_2O]$ fragmento D, la señal $m/z = 115$ (4%) $[C_4 H_6 O_3 N - H]$ fragmento E

En el espectro de masas del quitosán obtenido (Figura 9), se presentan los fragmentos 1421, 1321, 1221 y 1121, los cuales corresponden a. 1421= heptámeros totalmente acetilados; 1321= heptámeros parcialmente desacetilados; 1221= heptámeros parcialmente desacetilados; 1121= heptámeros totalmente desacetilados (ver Figura 11)

En relación a los espectros de masas de quitina comercial y quitina obtenida (figura 9 a y b) presentan las mismas señales aunque su abundancia no sea la misma, esto puede ser debido quizá a que aun siendo la misma molécula, el origen de ésta no es el mismo. La quitina comercial proviene de cangrejo y la quitina de este trabajo es de camarón.

En el espectro de masas del quitosán se observan fragmentos de peso molecular mayor que indican heptámeros desacetilados, aunque también presentan desmetilaciones (Figura 11). Esto puede indicar que el tratamiento de desacetilación no es selectivo.

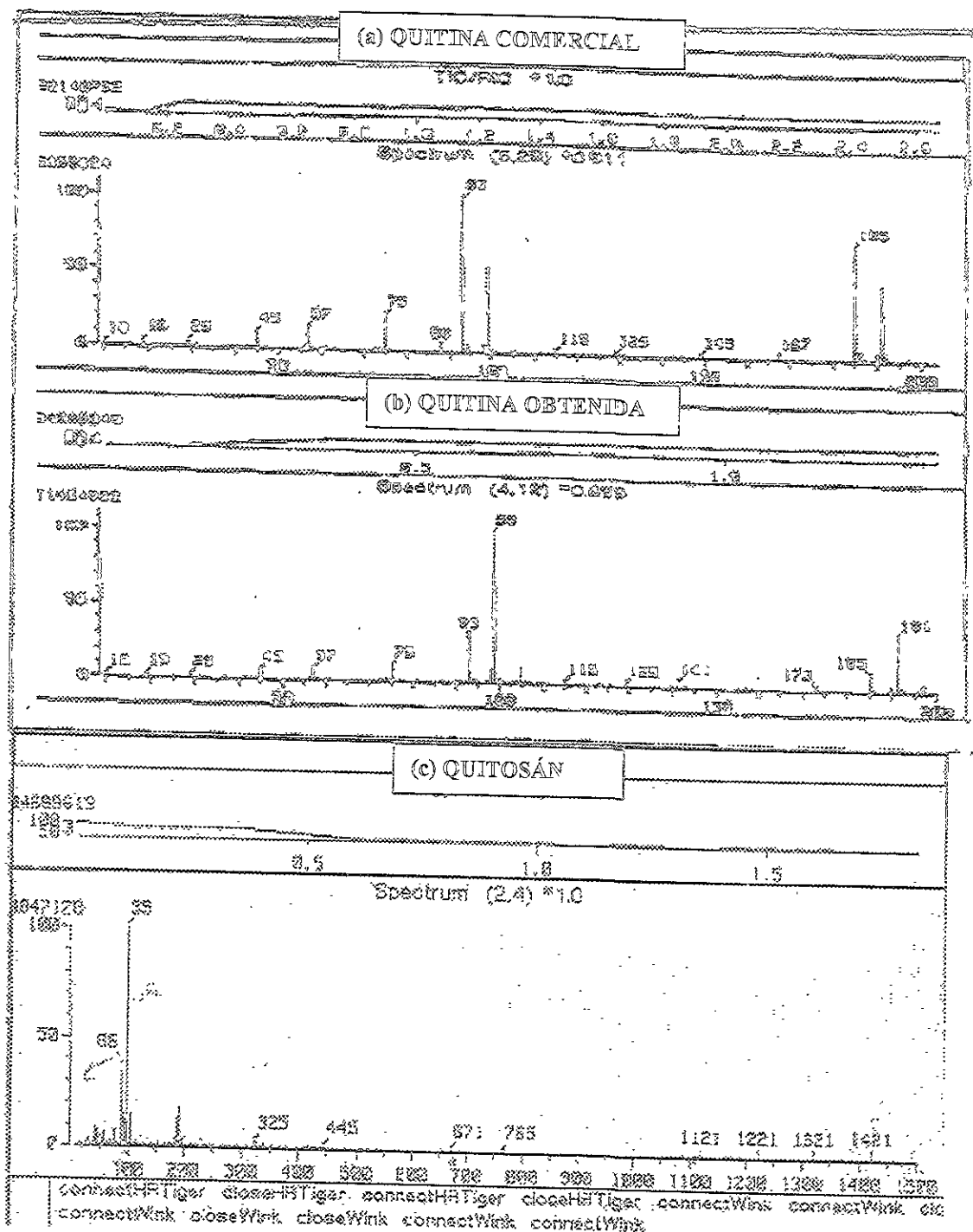
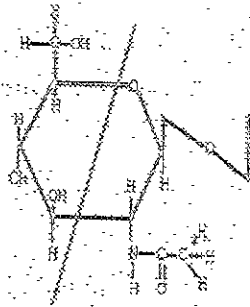


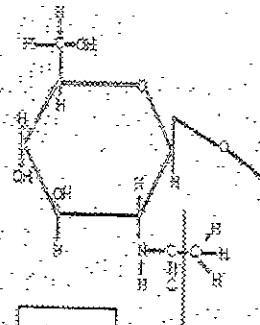
Figura 9 Espectro de masas -(FAB) de quitina Comercial (a), de quitina obtenida (b) y quitosán obtenido (c).

A



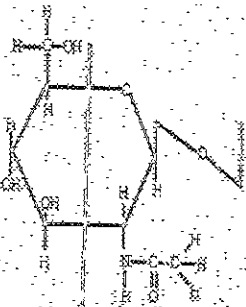
99

B



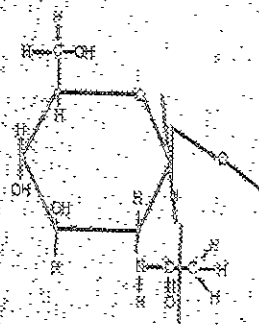
191

C



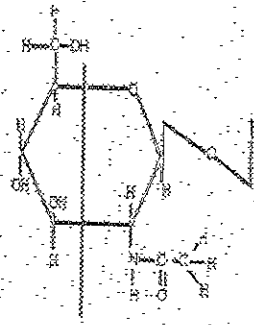
104+1

D



173

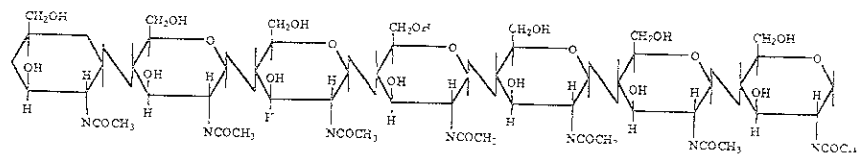
E



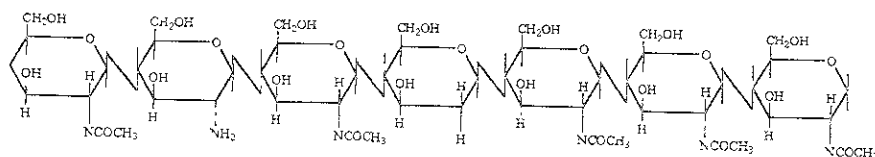
115

Figura 10. Interpretación de las principales señales de la fragmentación de quitina obtenida

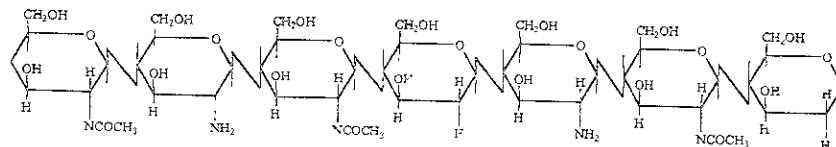
Fragmento 1421



Fragmento 1321



Fragmento 1221



Fragmento 1121

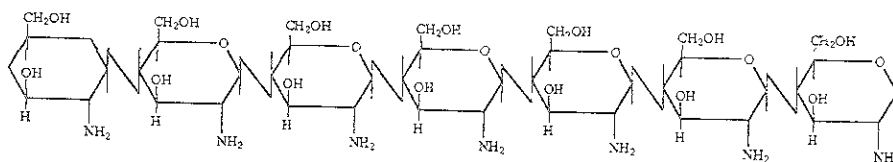


Figura 11. Interpretación de las señales de los principales fragmentos del espectro de masas del quitosán

El siguiente patrón de difracción (Figura 13) es de la quitina comercial y muestra los mismos picos marcados en el patrón de difracción de la quitina obtenida en este trabajo, con lo cual se confirma la identidad de la sustancia

Como puede observarse el pico presentado a los 20 grados es ligeramente más pequeño que el presentado por la quitina obtenida y esto puede atribuirse a la degradación de la molécula comercial

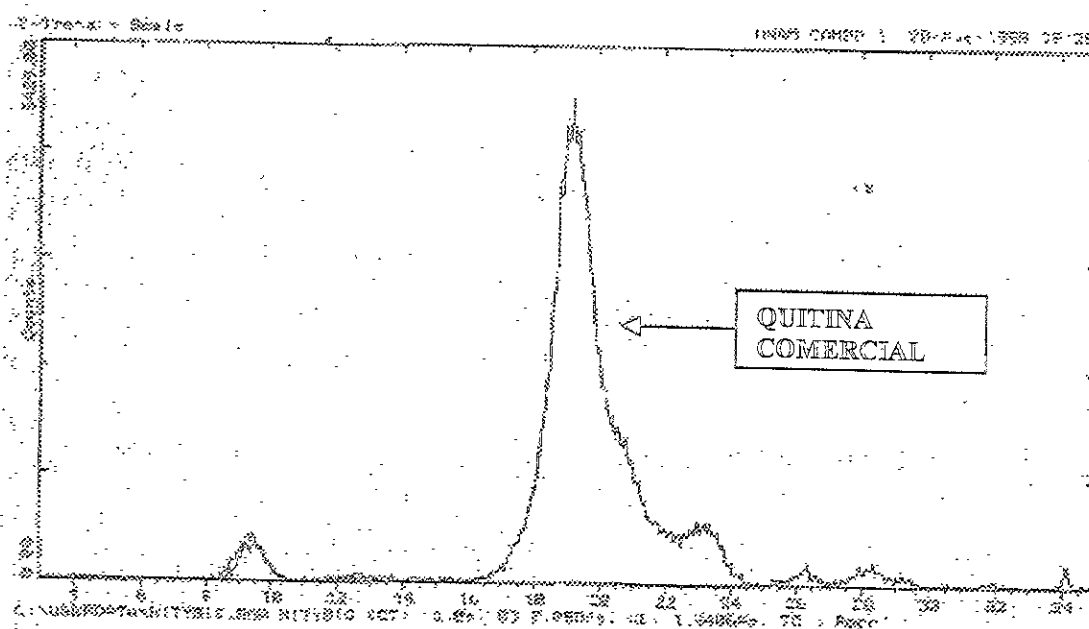


Figura 13. Patrón de difracción de Rayos X de quitina comercial

4.1.4. Solubilidad de quitina y quitosán

En la siguiente Tabla 4 se observa que la quitina y el quitosán obtenidos son prácticamente insolubles en todos los solventes orgánicos, mientras que el quitosán es soluble en todos los ácidos orgánicos y minerales probados. Cabe señalar que tanto la quitina como el quitosán son parcialmente solubles en N,N'-Dimetilacetamida / LiCl y este es un sistema muy utilizado para los análisis de este biopolímero, ya que se trata de un sistema que no lo degrada.

Tabla 4. Solubilidades de quitina y quitosán

SOLVENTES ORGANICOS	QUITINA	QUITOSAN
BENCINA DE PETROLEO	-	P
CLOROFORMO	-	-
ETANOL	-	-
ACETATO DE ETILO	-	-
TOLUENO	P	P
HEXANO	-	-
METANOL	-	-
ACETONA	-	-
NNDMac/ LiCl	P	P
ACIDOS ORGANICOS Y MINERALES	QUITINA	QUITOSAN
ACIDO ACETICO	-	+
ACIDO FORMICO	P	+
ACIDO BORICO	P	+
AC. CLORHIDRICO	+	+
AC. SULFURICO	+	+
AC NITRICO	-	+
AC. FOSFORICO	P	+

(+) = soluble ; P= parcialmente soluble ; (-) = insoluble

La prueba de solubilidad de quitina y quitosán es de suma importancia, ya que esto predice el comportamiento que el quitosán tendrá en solución acuosa. El quitosán obtenido en este trabajo muestra una completa solubilidad en agua acidificada (pH 4.2) con ácido acético, el cual va a ser compatible con el medio de cultivo donde se probará la actividad antibacteriana, aunado a que el agua y el ácido proveerán de los protones que le conferirá una carga neta positiva a la molécula del biopolímero.

4.1.5 Porcentaje de desacetilación

El porcentaje de desacetilación obtenido nos muestra que el quitosán presenta más del 85 % de grupos acetil removidos. Lo que quiere decir que se trata de un quitosán con alto grado de desacetilación y que presenta una gran cantidad de grupos amino disponibles para ser protonados y mantener a la molécula como polication.

4.2 Evaluación de la Actividad Antibacteriana del quitosán en *Staphylococcus aureus* 6538p y *Escherichia coli* 10536

Como en todos los ensayos de actividad antibacteriana, se utilizan microorganismos modelo para estudiar el comportamiento de los diversos agentes, es por esta razón que en este trabajo se utilizaron a dos bacterias "tipo" de la colección ATCC con estructuras y composición de pared celular diferentes, que las agrupan y diferencian en dos grandes grupos: Gram positivos (*Staphylococcus aureus* 6538 p) y Gram negativos como (*Escherichia coli* 10536).

4.2.1 Ensayo preliminar de actividad antibacteriana

Este ensayo tuvo la finalidad de establecer la metodología para llevar a cabo la prueba de actividad antibacteriana. En esta prueba se empleó a la bacteria *Staphylococcus aureus* y los resultados de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro fueron los siguientes:

Para el control al tiempo cero, se tuvieron 1.94×10^9 UFC/ml; a los veinte minutos 7×10^8 UFC/ml; a los 40 minutos = 3×10^8 UFC/ml y a los 60 minutos se tiene una población de 7×10^8 UFC/ml.

El valor de UFC/ml para la prueba con quitosán a 60 minutos de exposición y una concentración de 0.05% fue de 1.06×10^9 UFC/ml.

Como puede observarse en 60 minutos no se logra ver ningún efecto antibacteriano. De hecho en el control se nota que el microorganismo aún se encuentra en la fase lag, por lo cual se consideró insuficiente el tiempo de exposición del agente a la población bacteriana.

Por otro lado el empleo de buffer de fosfatos podría estar interfiriendo con el quitosán, ya que la presencia de estos iones podrían estar neutralizando las cargas positivas del mismo.

Debido a esto, se planteó otra estrategia de prueba. Se llevó a cabo la exposición del quitosán por un tiempo mayor, lo que nos daría la posibilidad de observar el efecto a lo largo del proceso de crecimiento y reproducción de la bacteria. El sistema de prueba (caldo de cultivo) arrojaría información más real, ya que el microorganismo no se encontraría en un estado de estrés, como en los modelos propuestos por Sudarshan en 1992 y Papineau en 1991, en donde el primero lleva a cabo sus ensayos en un sistema buffer por 120 minutos y el segundo lava y recolecta sus cultivos en agua estéril. En ambos casos las bacterias

Figura 14

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 4.5

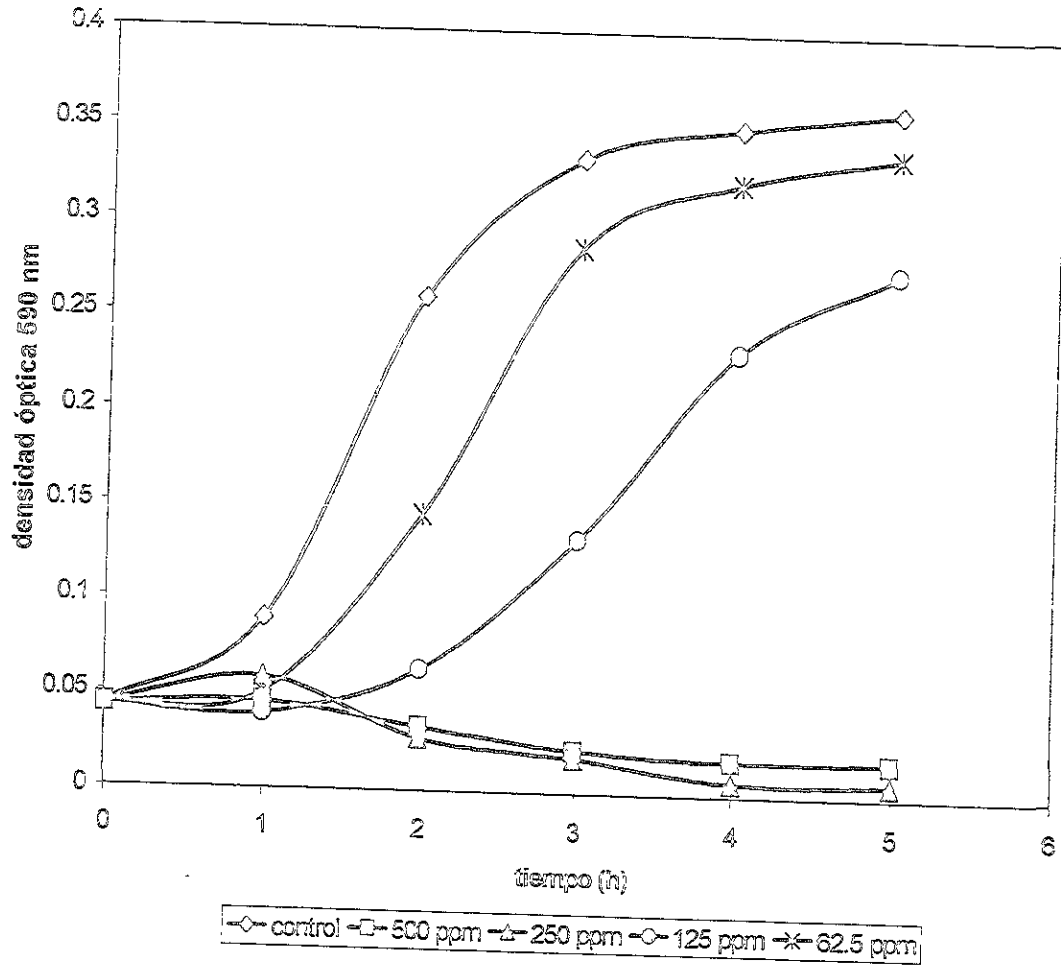


Tabla 5. Valores de densidad óptica de la cinética de *Staphylococcus aureus* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 4.5

0	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043
1	0.089	0.045	0.058	0.039	0.05
2	0.259	0.033	0.027	0.063	0.145
3	0.333	0.022	0.018	0.133	0.286
4	0.35	0.018	0.007	0.232	0.286
5	0.36	0.018	0.007	0.275	0.321
tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

pueden experimentar ya sea inanición o bien pueden ser destruidas por alteraciones en la presión osmótica ejercida por el agua.

4.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán en *Staphylococcus aureus*.

Se evaluó el efecto de la concentración de quitosán (500,250,125 y 62.5 ppm) a pH 4.5 sobre la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* y en la Figura 14 y Tabla 5 se muestra el resultado.

Como puede observarse, a las concentraciones de 500 y 250 ppm, prácticamente desde la primera hora no se observó ningún incremento en la densidad óptica del caldo de cultivo, inclusive hubo una disminución, y esto se debió principalmente a que una vez adicionado el quitosán a estas concentraciones, las células que se encontraban suspendidas se aglomeraron, formando cúmulos grandes de aproximadamente 3 mm. El caldo de cultivo desde ese momento quedó aparentemente sin células en suspensión.

Sin embargo a las concentraciones de 125 y 62.5 ppm no se observó el efecto aglutinante.

Al observar la Figura 15 y Tabla 6, respecto a la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* 6538p a las cuatro concentraciones (500, 250, 125 y 62.5 ppm) a pH 4.5, en este caso se cuantifica el crecimiento en términos de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC / ml). Se evaluó la viabilidad de las células durante el período de crecimiento. A la concentración de 500 ppm se muestra un decremento de células del orden de 7 ciclos logarítmicos a las tres horas. Para la concentración de 250 ppm se registró un descenso.

A partir de la tercera hora en las concentraciones de 500 y 250 ppm de quitosán se nota una recuperación. Se observó que las células que en un momento permanecieron unidas al polímero formando cúmulos, comenzaron a desunirse. Para corroborar la viabilidad de las células en los aglomerados, al final de la cinética se sembraron dichos cúmulos en agar, resultando que las células se encontraban vivas.

A las concentraciones de 125 y 62.5 ppm el efecto no parece ser el mismo. Al principio se observa una caída en el número de células viables, pero conforme transcurre el tiempo se nota una recuperación de éstas inclusive, al observar las pendientes de ambas curvas con respecto a la del control, se evidencia un aumento. Los tiempos de generación (T_g) tanto para el control como para las cinéticas a 125 y 62.5 ppm fueron los siguientes:

$T_{g \text{ control}} = 55,88 \text{ min}$; $T_{g \text{ quitosán } 125 \text{ ppm}} = 50,10 \text{ min}$; $T_{g \text{ quitosán } 62.5 \text{ ppm}} = 36,25 \text{ min}$,

indicando que a estas dos concentraciones hay una disminución en el tiempo de generación con respecto al control y pudiera ser atribuido a que el quitosán está funcionando en el medio de cultivo como una fuente de carbono adicional.

En relación al efecto de la concentración de quitosán a pH 4.5 sobre la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* se observó lo siguiente: La evaluación medida en densidad óptica (DO) aporta datos que pudieran indicar el carácter bactericida del quitosán a 500 y 250 ppm, ya que hay un descenso importante en la cantidad de partículas suspendidas en el caldo de cultivo, lo cual fue debido al efecto aglutinante que presentó el quitosán a esas concentraciones. Sin embargo se pudo probar a través de la evaluación medida en Unidades Formadoras de Colonias (UFC / ml) que el efecto fue bacteriostático a esas dos concentraciones.

Para las concentraciones de 125 y 250 ppm la evaluación en densidad óptica y UFC indican que a estas concentraciones no existe un efecto antibacteriano y hace suponer que el microorganismo incrementó su velocidad de crecimiento debido al incremento de la fuente de carbono proveniente del quitosán.

El análisis de regresión indica un efecto altamente significativo de la concentración de quitosán y del tiempo. Los efectos de la concentración y tiempo fueron cuadráticos y cúbicos. (ver apéndice).

Figura 15

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 4.5

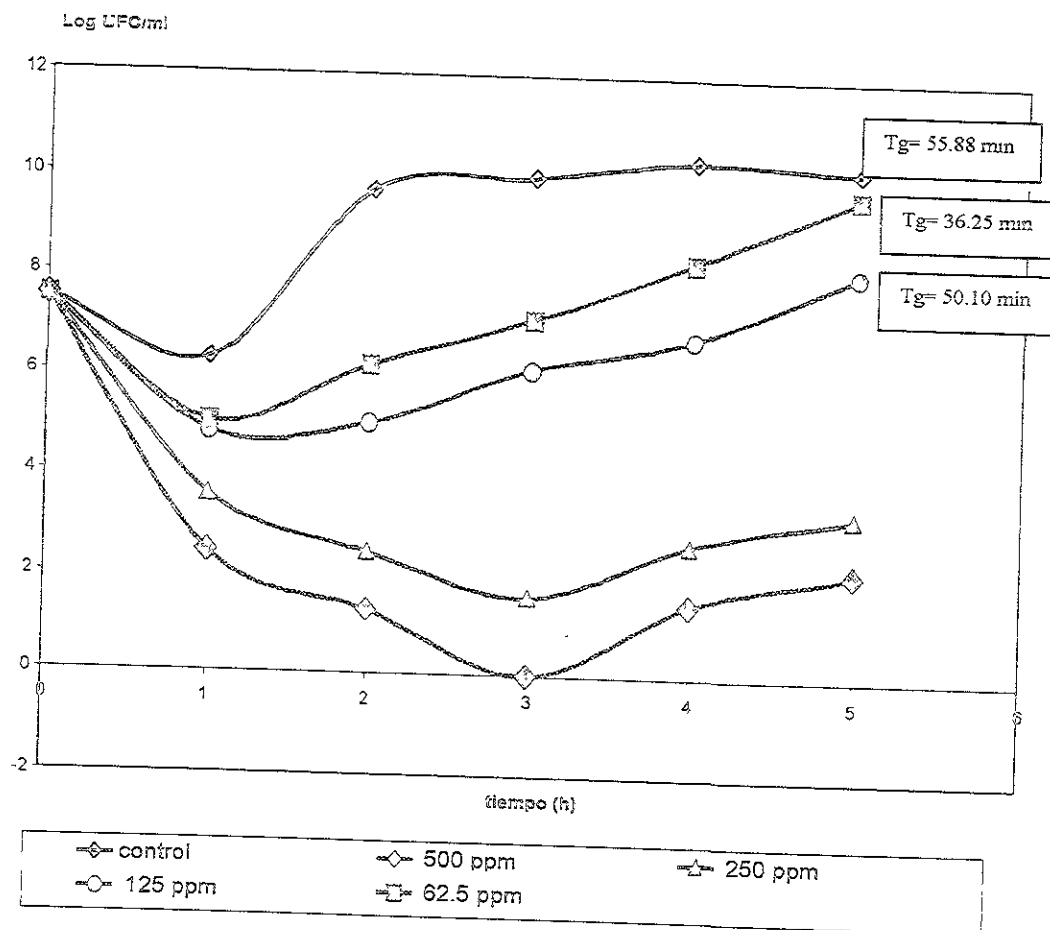


Tabla 6 Log. de UFC/ml de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 4.5

0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
1	6.3	2.46	3.59	7.5	7.5
2	9.71	1.3	2.47	4.84	5.03
3	10.01	0	1.6	5.03	6.19
4	10.36	1.47	2.69	6.13	7.14
5	10.22	2.17	3.3	6.79	8.32
tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Pudiera explicarse el efecto bacteriostático del quitosán sobre el comportamiento de *Staphylococcus aureus*, a la interacción de cargas de éste con la estructura de la pared bacteriana. A las concentraciones de 500 y 250 ppm a pH 4.5 se presentó un efecto inhibitorio, ya que éste se unió al debris de la célula o a los componentes de superficie de la bacteria que tienen una carga neta total negativa.

Uno de los factores que también podría explicar el efecto bacteriostático del quitosán, es el tamaño del polímero, ya que la actividad inhibitoria de éste se incrementa cuando se tienen polímeros más pequeños, lo cual fue examinado por Stossel y Leuba en 1984, pero en este caso su modelo de estudio fue sobre *Fusarium oxysporum*.

Concordando con lo establecido por Sudarshan y colaboradores en 1992, quienes usaron poligalacturonato como polianión, el cual podría quelarse con el quitosán (policación) y de esta manera neutralizar sus cargas y demostrar que el quitosán era capaz de unirse a la superficie celular. Sus resultados fueron, que el efecto bactericida del quitosán, pudo ser bloqueado por el poligalacturonato después de la incubación a los dos minutos, inclusive hasta los treinta minutos. Esto evidencia la interacción del quitosán con la superficie de la bacteria como un factor importante para que la acción bactericida se lleve a cabo.

Sudarshan y colaboradores (1992) apoyan la hipótesis de que el quitosán actúa a nivel de la superficie celular bacteriana, aunque hay que destacar que las pruebas se hicieron durante 120 minutos y en condiciones de cultivo no adecuadas, ya que las bacterias se encontraban en un buffer de fosfatos, que no garantizaba que éstas pudieran reproducirse.

Chu Ho y colaboradores en 1997 trabajaron con derivados de quitosán: dietilaminoetil-quitina (DEAE-quitina), dietilaminoetil-quitosán (DEAE-quitosán) y trietilaminoetil-quitina (TEAE-quitina), los cuales fueron preparados a partir de quitina extraída de acuerdo al método de Hackman, y a concentraciones de 100, 200, 300 y 500 ppm. Sus resultados fueron los siguientes: En *Staphylococcus aureus*, a los 30 minutos se presentó la disminución de 1 ciclo celular a la concentración de 500 ppm y a los 120 min se observa el decremento de 2.5 ciclos usando DEAE-quitosán. Con TEAE-quitina, a la concentración de 500 ppm hubo un decremento del total de las bacterias a los 120 minutos.

Estos autores argumentan que el carácter bactericida y bacteriostático de los derivados de quitosán (TEAE-quitina y DEAE quitosán), se debe a la estructura de la pared celular de las bacterias Gram +, ya que fuera de la membrana citoplasmática solo hay una capa rígida de peptidoglicano, que aunque relativamente gruesa, está compuesta de una malla con muchos poros, los cuales permiten la entrada de moléculas extrañas dentro de la célula sin dificultad. Estos argumentos están basados en lo que otros autores refieren acerca de biocidas catiónicos de bajo peso molecular, en donde el sitio de acción del quitosán es la membrana citoplasmática de la bacteria, lo cual puede ser resumido como sigue: i) adsorción del quitosán a la superficie celular de la bacteria; ii) difusión a través de la pared; iii) unión a la membrana citoplasmática; iv) ruptura de la membrana citoplasmática; v) salida de material intracelular y vi) muerte de la célula.

Los argumentos expuestos por Chun Ho y colaboradores (1997), no son muy convincentes debido a que, en primera instancia aunque se trate de concentraciones de quitosán similares a las manejadas en este trabajo, no se lleva a cabo un monitoreo de la actividad de la

bacteria durante su de crecimiento, ya que 120 minutos no son suficientes debido a que en este lapso el cultivo se encuentra en la fase lag.

En segundo lugar, los compuestos utilizados por Chun Ho y colaboradores (1997) para elaborar los derivados de quitosán, son sales cuaternarias de amonio y yodo, los cuales son de por si biocidas.

Por último, no se puede considerar que el carácter biocida del quitosán se deba a la entrada indiscriminada del compuesto hasta alcanzar la membrana citoplásmica.

Estos autores explican que: los fosfolípidos en la membrana citoplasmática de las bacterias, son fosfoglicéridos que tienen terminales tanto hidrofílicas como hidrofóbicas y que el biocida catiónico TEAE-quitina con el mayor grupo alquil hidrofóbico, tiene la más alta actividad antibacteriana.

La razón que exponen Chun - Ho y colaboradores (1997) en relación a la actividad antibacteriana no concuerdan con los argumentos porque: los fosfolípidos en su parte hidrofóbica están orientados hacia adentro de la membrana, de donde es mas probable que los agentes antibacterianos se hubieran enfrentado primero a los fosfolípidos en su parte hidrofílica por encontrarse estos en la parte externa, a menos de que presentaran el fenómeno flip-flop atribuido a la presencia de moléculas como TEAE-quitina.

La otra razón que exponen es el efecto de los contraiones o del ion yodo en TEAE-quitina. Esta última que exponen pudiera ser la más congruente ya que para estos iones si se tiene evidencia de actividad antibacteriana.

En ese mismo trabajo Chun Hō y colaboradores (1997) prepararon hidrolizados de los derivados de quitosán, los cuales tuvieron un efecto bactericida y lo explican argumentando que el proceso de adsorción (i), de difusión (ii), de unión (iii), ruptura (iv), salida del material intracelular (v) y muerte celular (iv) se dio debido al tamaño de los hidrolizados del polímero.

Otro de los efectos observados del quitosán en la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* fue que a las concentraciones de 125 y 62.5 ppm no se presentó ningún efecto inhibitorio y si de nutriente y podría explicarse de la siguiente forma: Las soluciones de quitosán empleadas en este trabajo, fueron preparadas disolviendo primero éste en agua acidulada con ácido acético a pH 4, lo cual puede promover la hidrólisis del polímero. En este caso, se tendría no solamente al polímero cargado positivamente sino fragmentado.

Considerando el peso molecular de los fragmentos fueran pequeños, éstos entrarían mediante un transporte activo probablemente muy similar al de glucosa lo que explica que el quitosán esté actuando como una fuente adicional de carbono, evidenciándose esto con el tiempo de generación menor que el control (Figura 15).

Ahora bien, en la cinética de crecimiento de la Figura 16 y Tabla 7 se muestran los valores de densidad óptica de *Staphylococcus aureus* 6538p a las cuatro concentraciones de quitosán trabajadas (500, 250, 125 y 62.5 ppm), a un pH de 5.5

Durante estas curvas de crecimiento también hubo formación de aglomerados, los cuales eran más pequeños. Esto quizá es debido a que existen menos cargas positivas capaces de unirse a las células cuando el pH del quitosán en solución es de 5.5. Se plantea que la solubilidad óptima del quitosán se encuentra alrededor de 4.2-4.5, al pH utilizado en esta prueba la solubilidad de la molécula es menor y por tanto la disponibilidad de las cargas positivas se ve disminuida.

En la Figura 17 y Tabla 8, se valoraron las Unidades Formadoras de Colonia / ml (UFC/ml) y se observó un efecto similar al mostrado en la cinética a pH 4.5. A la concentración de 500 ppm es evidente un decremento de 2.9 ciclos logarítmicos a la segunda hora. A partir de la siguiente hora y en adelante, se logra aumentar el número de células, pero no se recupera la población con la que inició el cultivo.

A la concentración de 250 ppm a la quinta hora se tiene una disminución de 4.3 ciclos, mientras que para 125 ppm de quitosán la población se reduce a 3.2 ciclos logarítmicos.

Estos resultados se atribuyen al manejo de los cultivos. El cálculo de tendencias que se efectuó, permite establecer que el carácter inhibitorio del quitosán a pH 5.5 es de tipo bacteriostático.

Al observar Figura 17 se aprecia que, aunque se encuentre disponible el quitosán, probablemente el microorganismo no lo utilice como nutriente como en la cinética anterior a pH 4.5, ya que los tiempos de duplicación comparados con el control son mayores (del orden de 112.4 minutos para la concentración de 62.5 ppm). El carácter bacteriostático del quitosán se mostró a todas las concentraciones.

Figura 16

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 5.5

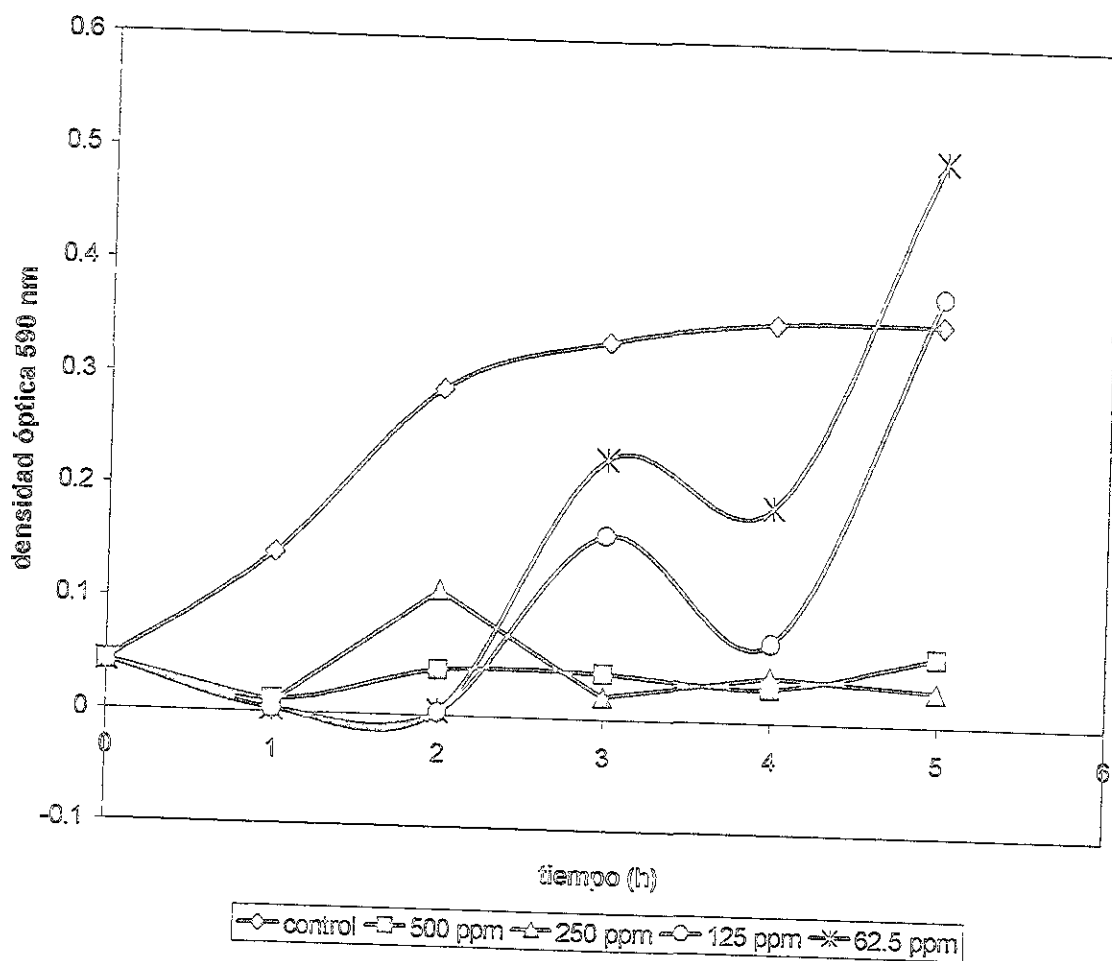


Tabla 7. Valores de densidad óptica de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 5.5

0	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048
1	0.141	0.066	0.011	0.048	0.048
2	0.29	0.064	0.006	0.07	0.042
3	0.335	0.06	0.004	0.062	0.038
4	0.354	0.062	0.007	0.141	0.031
5	0.356	0.06	0.04	0.147	0.187
Tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Figura 17

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 5.5

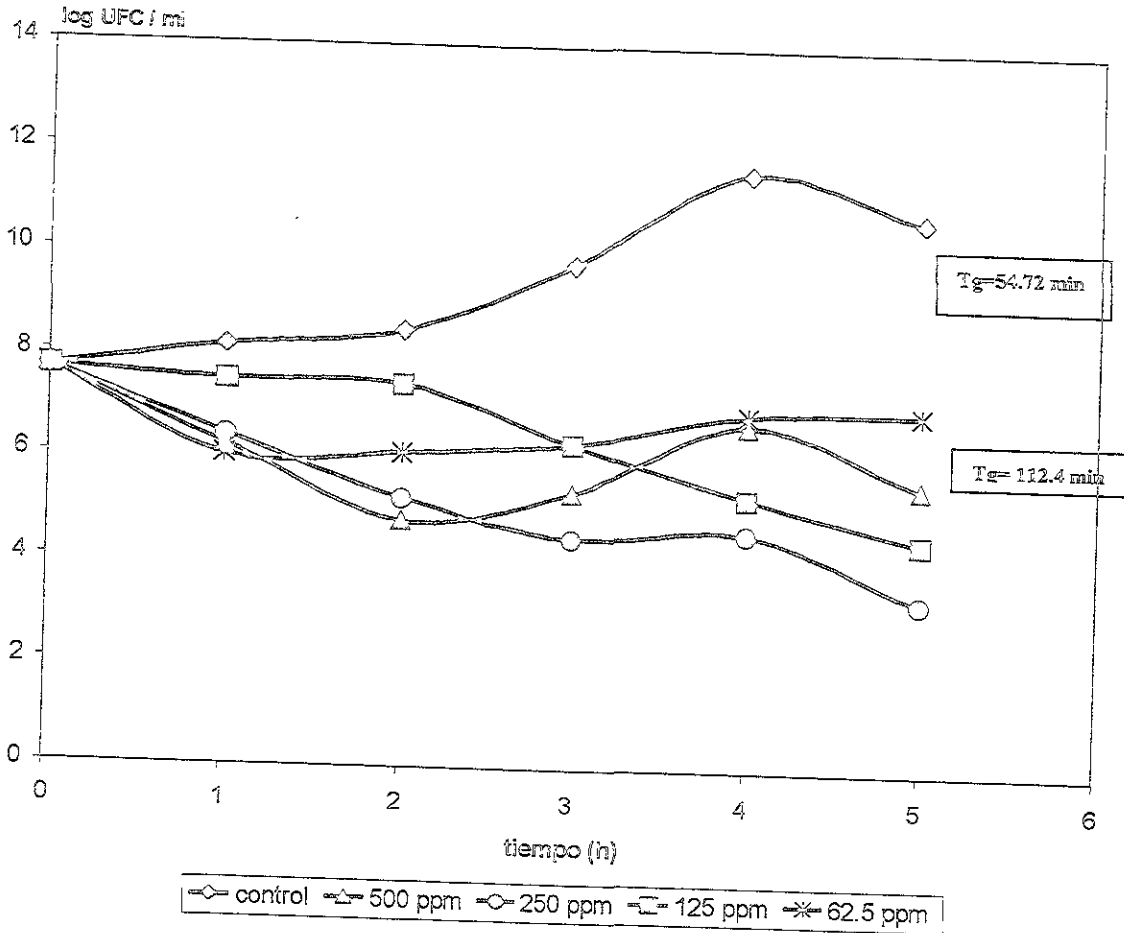


Tabla 8. Log UFC /ml/ de la cinética decrecimiento de *Staphylococcus aureus* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 5.5

0	7.69	7.69	7.69	7.69	7.69
1	8.17	6.2	6.4	7.5	6
2	8.49	4.77	5.2	7.44	6.09
3	9.79	5.34	4.47	6.3	6.3
4	11.59	6.71	4.59	5.3	6.92
5	10.7	5.52	3.3	4.47	6.98
tiempo	Control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

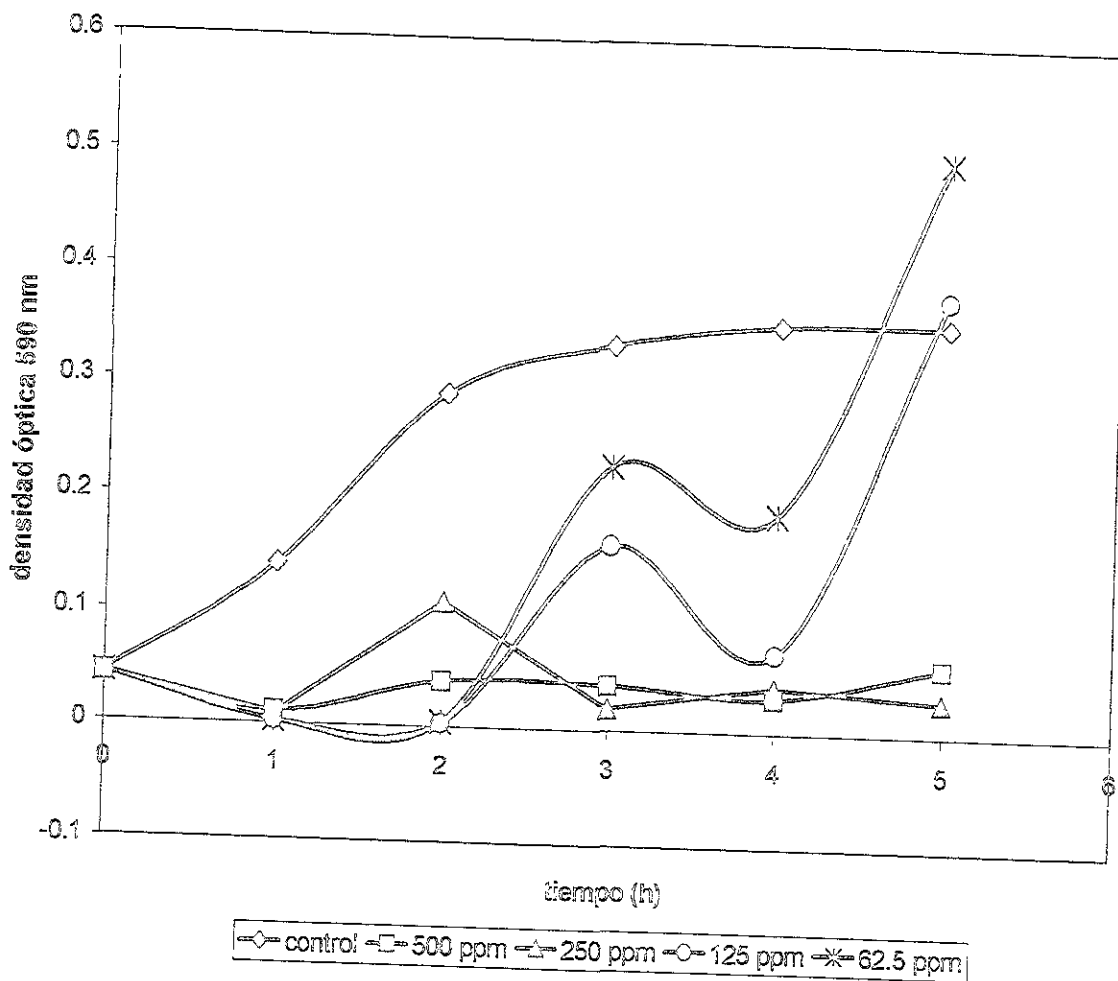
En lo que respecta al comportamiento de crecimiento del *Staphylococcus aureus* a pH 6.5 y a las concentraciones de 500, 250, 125 y 62.5, es similar al obtenido en las cinéticas anteriores a pH's de 4.5 y 5.5.

La Figura 18 y Tabla 9 muestran la cinética de crecimiento a pH de 6.5. Aparentemente hay una disminución en cuanto a la cantidad de células en suspensión y esto fue causado por la aglomeración de las células en el caldo de cultivo. Los cúmulos también más pequeños comparados con los formados en la cinética a pH 4.5.

La cinética de crecimiento del *Staphylococcus aureus* (Figura 19 y Tabla 10), en lo que se refiere a Unidades Formadoras de Colonias / ml el fenómeno es semejante al obtenido a pH's de 4.5 y 5.5. Se evidencia una ligera disminución de la viabilidad de las células a las concentraciones de 500, 250 y 125 ppm, a diferencia de la concentración de 62.5 ppm, en donde se logra tener una recuperación con un Tiempo de generación = 96.6 min. Aunque se mantiene el carácter bacteriostático del quitosán a pH 6.5, el efecto es la mitad del mostrado a pH 5.5

Figura 18

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 6.5



T2bia 9. Valores de densidad óptica de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* con quitosán diferentes concentraciones a pH de 6.5

0	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043
1	0.141	0.011	0.009	0.003	0.0025
2	0.29	0.04	0.11	0.003	0.004
3	0.335	0.04	0.02	0.162	0.23
4	0.354	0.03	0.04	0.07	0.19
5	0.356	0.06	0.03	0.38	0.5
tiempo	Control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Figura 19

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 6.5

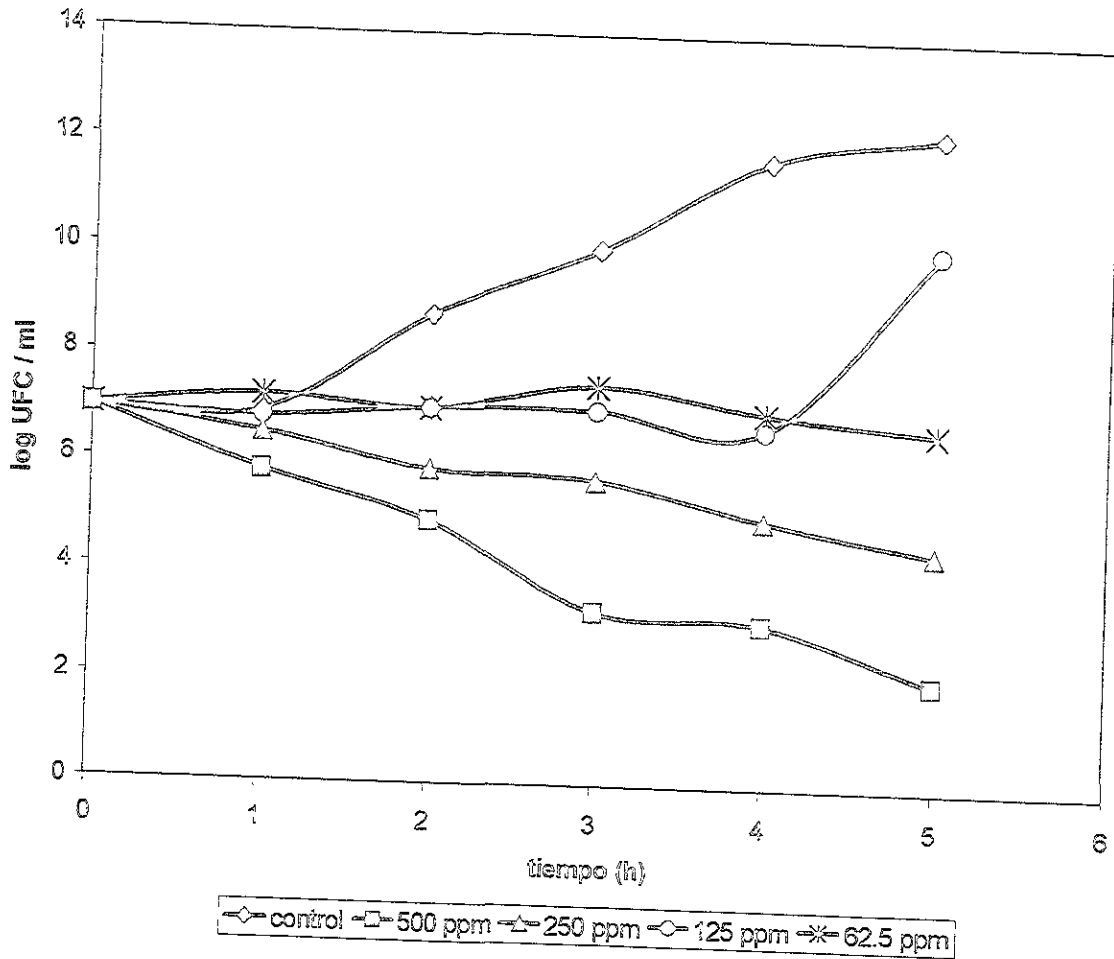


Tabla 10. Log de UFC / ml de la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH de 6.5

0	6.95	6.95	6.95	6.95	6.95
1	6.9	5.8	6.5	6.95	7.2
2	8.77	4.9	5.86	7	7
3	10.02	3.25	5.7	7	7.46
4	11.71	3.07	5	6.69	7
5	12.23	2.03	4.43	10.07	6.69
tiempo	Control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Como pudo observarse a través de las cinéticas de crecimiento del *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones y pH's, el efecto de la concentración y el tiempo son altamente significativos (ver apéndice), ya que a concentraciones de 500 y 250 ppm ejerce un efecto coagulante y de acuerdo a lo estudiado por Sudarshan y colaboradores (1992) en donde asegura que a bajas concentraciones el quitosán policationico probablemente se une a la superficie bacteriana cargada negativamente causando aglutinación. En altas concentraciones el quitosán podrá cubrir la superficie bacteriana y prever la salida de los componentes intracelulares, así como impedir una transferencia de masa a través de la barrera celular. Las concentraciones usadas por Sudarshan y colaboradores en 1992 fueron del orden de 10 veces más que las empleadas en este trabajo.

En lo que se refiere al efecto de los diferentes pH's de la solución de quitosán sobre el crecimiento de los microorganismos, se observa que el pH ácido del quitosán no juega un papel importante sobre la inhibición de los microorganismos y si para la solubilidad del quitosán, lo cual se corrobora con el análisis de regresión múltiple y ANOVA (ver apéndice).

Lo mostrado en estas cinéticas permite suponer que los efectos bacteriostático, aglutinante y de nutriente del quitosán está influenciado por el número de cargas positivas disponibles ya que a pH de 5.5 y 6.5 es menor. Debido a que el efecto aglutinante está asociado a la concentración del quitosán, este fenómeno se concibe como un tapizado de cargas positivas sobre la superficie bacteriana cargada negativamente, mientras que el efecto bacteriostático pudiera ser debido a la desestabilización de la pared celular, que aunque no

se tenga un exceso de cargas positivas, éstas son suficientes para desestabilizarla ya que este fenómeno también se asocia a la concentración del quitosán, en donde a mayor concentración mayor inhibición.

También es posible pensar que el efecto nutriente del quitosán, se deba no solamente al hecho de que el polímero pudiera estar hidrolizado y los fragmentos entraran a la célula, sino a la posibilidad de inducir a la bacteria para la producción de quitosanasas y de esta manera hidrolizar y asimilar al quitosán, por tanto sería importante monitorear la cinéticas durante más tiempo y ver su comportamiento frente a otra fuente de carbono.

4.2.3 Evaluación de la actividad antibacteriana del quitosán en *Escherichia coli*.

Como se mencionó al principio de esta evaluación, en los ensayos de actividad antibacteriana, se utilizaron microorganismos modelo para estudiar el comportamiento de los diversos agentes

La Figura 20 y Tabla 11 ilustran el comportamiento de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* en medio de cultivo nutritivo con la adición de quitosán a pH 4.5 a las concentraciones de 500, 250, 125 y 62.5 ppm. Es de hacer notar que a todas las concentraciones de quitosán el efecto es prácticamente bactericida comparado con el control. Desde la primera hora no hubo aumento en la densidad óptica de las partículas suspendidas en el caldo de cultivo. En este caso y a diferencia del cultivo de *Staphylococcus aureus* bajo las mismas condiciones, no hubo aglomeración de células.

En la Figura 21 y Tabla 12, donde se puede observar el crecimiento y viabilidad de *Escherichia coli* frente al quitosán a pH 4.5 a las concentraciones anteriores, el efecto es

claramente bactericida, obteniéndose la disminución de 6 ciclos logarítmicos a la concentración de 500 y 250 ppm y las bacterias llegan a ser totalmente inviables a la primera hora. A la concentración de 125 y 62.5 ppm se presenta el decremento de 4 ciclos a la misma hora.

El comportamiento de la cinética de crecimiento indica que el carácter del quitosán es bactericida a todas las concentraciones.

En este caso se podría argumentar que la naturaleza policatiónica del quitosán interfiere con los residuos de macromoléculas de la superficie celular cargados negativamente y consecuentemente altera la permeabilidad celular. Este argumento está basado en el trabajo de Papineau y colaboradores en 1992, cuando examinaron los efectos de la exposición de quitosán sobre *Escherichia coli* inducida con lactosa y sus resultados mostraron la presencia de β galactosidasa en el medio.

También se puede considerar que el quitosán se encuentre hidrolizado y los fragmentos de éste logren entrar al interior de la célula y actúe a otro nivel dentro de la célula, como es la interacción con proteínas o ácidos nucleicos como lo proponen Hadwiger y colaboradores en 1985.

Figura 20

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 4.5

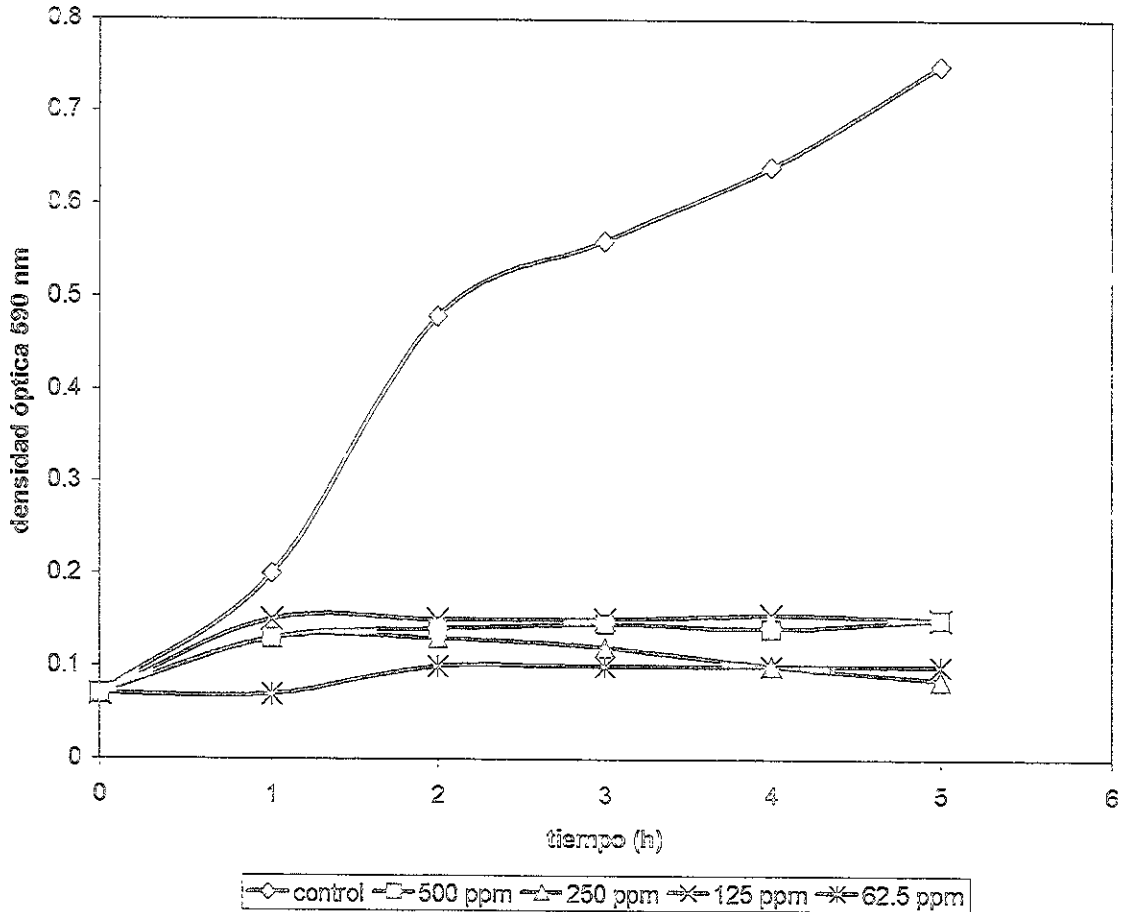


Tabla 11. Valores de densidad óptica de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH de 4.5

0	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
1	0.2	0.13	0.13	0.15	0.07
2	0.48	0.14	0.13	0.15	0.1
3	0.56	0.145	0.12	0.15	0.1
4	0.64	0.14	0.1	0.155	0.1
5	0.75	0.15	0.085	0.15	0.1
tiempo	Control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Figura 21

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 4.5

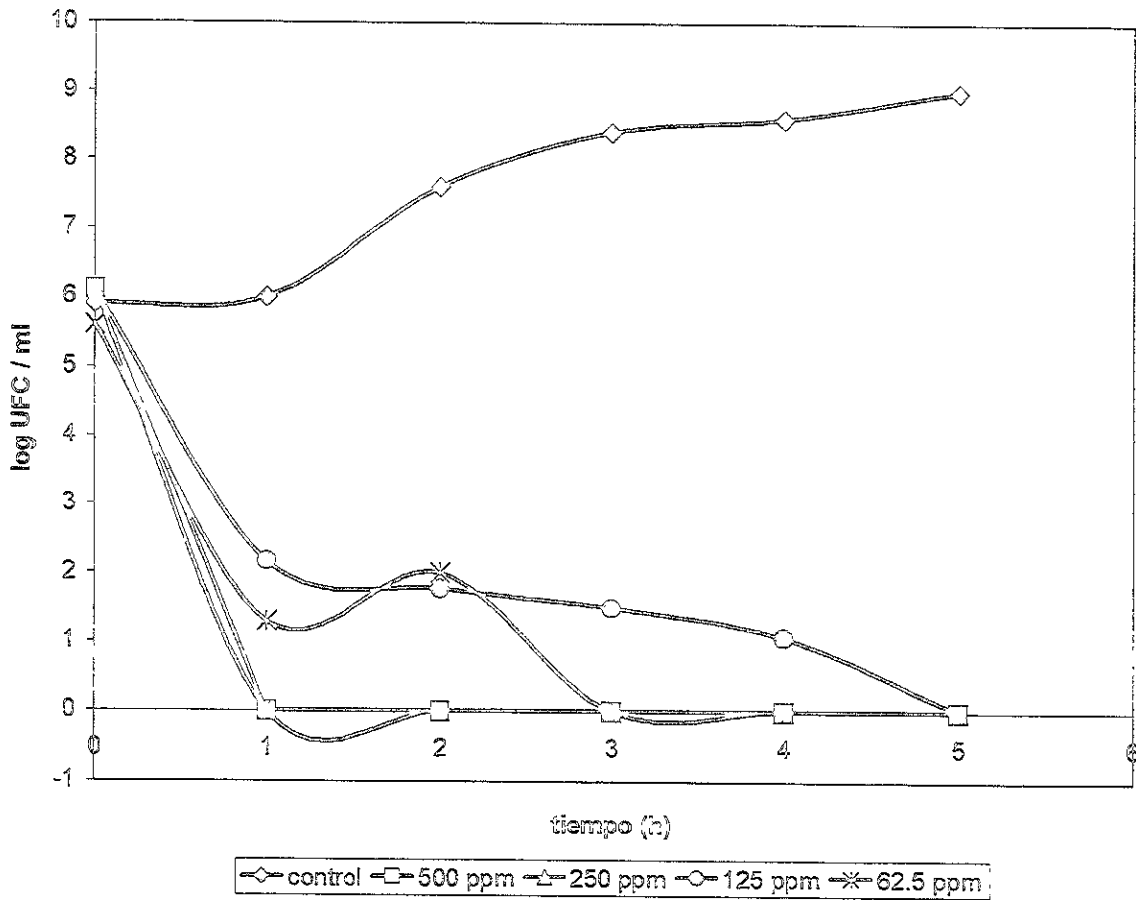


Tabla 12. Log UFC / ml de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 4.5

0	5.9	6.1	6.1	6.1	5.6
1	6	0	0	2.17	1.3
2	7.6	0	0	1.77	2
3	8.4	0	0	1.5	0
4	8.6	0	0	1.07	0
5	9	0	0	0	0
tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Sudarshan y colaboradores en 1992 y Papineau y colaboradores en 1991, establecen que la acción del quitosán ocurre a nivel pared y membrana celular. Sin embargo dadas sus características en bacterias Gram (+) y Gram (-) se podría afirmar que para *Escherichia coli* el quitosán actúa como bactericida mientras que para *Staphylococcus aureus* la acción es de tipo bacteriostático.

Aunque ambos tipos de bacterias presentan una pared, ésta tiene una composición y estructura más complejas y diferentes en *Escherichia coli*; consecuentemente esto hace que la interacción del quitosán deba ser conceptualizado con una "funcionalidad múltiple".

Algunas consideraciones que pudieran explicar el carácter bactericida sobre *Escherichia coli* son:

1.- Se descarta la posibilidad de que la alta sensibilidad de *Escherichia coli* al pH fuera un factor importante en la inactivación de la bacteria, debido a que el pH de la solución de quitosán no altera el pH del medio de cultivo ya que éste es un sistema amortiguador.

2.- El carácter oxidativo de la molécula de quitosán pudiera tener como primer blanco el lípido A constituyente importante de este microorganismo, en donde la carga neta de éste es negativa.

3.- Desde el punto de vista de la pared celular de las bacterias Gram (-), ésta está constituida también de peptidoglicano pero considerablemente más delgada que los Gram (+). Éste se asocia a la membrana citoplasmática por medio de interacciones iónicas, en donde además existen interacciones adicionales en aquellos sitios en que el peptidoglucano se sintetiza activamente con la participación de un lípido acarreador

presente en la membrana citoplasmática. Los ácidos teicóicos y teicuróicos se encuentran unidos covalentemente al peptidoglucano y su función principal parece ser la de la captación de "cationes" para aportar un adecuado ambiente a la membrana citoplasmática.

4.- O bien, entrando vía canales de paso como las "porinas", que en el caso de *Escherichia coli* permiten el acceso en forma pasiva, al espacio periplásmico de solutos hidrosolubles de bajo peso molecular.

5.- Existen también porinas específicas que permiten el acceso de solutos de aproximadamente 1,150 daltons , y si se considera que pudieran existir fragmentos de la molécula de quitosán , como los observados en el análisis de masas (Figuras 9 y 11) que tienen pesos moleculares bajos , se podría suponer que operaría el sistema auxiliar asociado con ATPasas, en donde el soluto se une a proteínas formadoras de canales (porinas) en la membrana externa y éste a su vez se une a una proteína que se encuentra en el espacio periplásmico. Como resultado esta proteína en la cual va unido el sustrato (solute), sufre un cambio conformacional que permite unirse a ATPasa de transporte en la membrana plasmática, transfiriendo el soluto activamente a través de la bicapa.

Las proteínas de unión parece que no están presentes en las bacterias Gram (+), que también carecen de la capa externa de la pared y un espacio periplásmico definido.

6.- Pudiera también pensarse que en la pared existen receptores no específicos que permitieran el transporte de la molécula del quitosán (N-acetilglucosamina-glucosamina), colocándola en el espacio periplásmico.

ESTO ES UN DOCUMENTO
SIN EF. RA. AUTENTICA

7.- También que una vez introducida la molécula hasta el espacio periplásmico podría encontrarse así en la condición de ser sustrato de algunas enzimas hidrolíticas, de tal manera que se obtendrían moléculas asimilables a la *Escherichia coli* como N-acetilglucosamina y glucosamina.

Las evidencias de esta molécula se aprecia en el espectro de masas, ya que aparecen los picos 1321, 1221 y 1121, los cuales se tratan de estructuras heptaméricas constituidas de N-acetilglucosamina y glucosamina.

8.- De tal manera que si todas las consideraciones hechas anteriormente se dan, se estaría enfrentando el quitosán o sus unidades hasta el nivel de ARN, coincidiendo de alguna manera con el mecanismo propuesto por Hadwiger y colaboradores en (1985) en hongos patógenos.

De la misma manera que en las gráficas anteriores, podemos observar (Figuras 22, Tabla 13 y Figura 23, Tabla 16) el comportamiento cinético de *Escherichia coli* ante el quitosán a diferentes concentraciones y a pH de 5.5.

El comportamiento es similar, y francamente bactericida. En la Figura 23, se nota una disminución de 6 ciclos logarítmicos de los cultivos a concentraciones de quitosán de 250, 125 y 62.5 ppm en la primera hora, llegando totalmente a inactivar a la bacteria. Para la concentración de 500 ppm solo logró disminuir 3 ciclos logarítmicos a esa misma hora; sin embargo a todas las concentraciones manejadas se obtiene un resultado bactericida a través del tiempo.

Figura 22

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 5.5

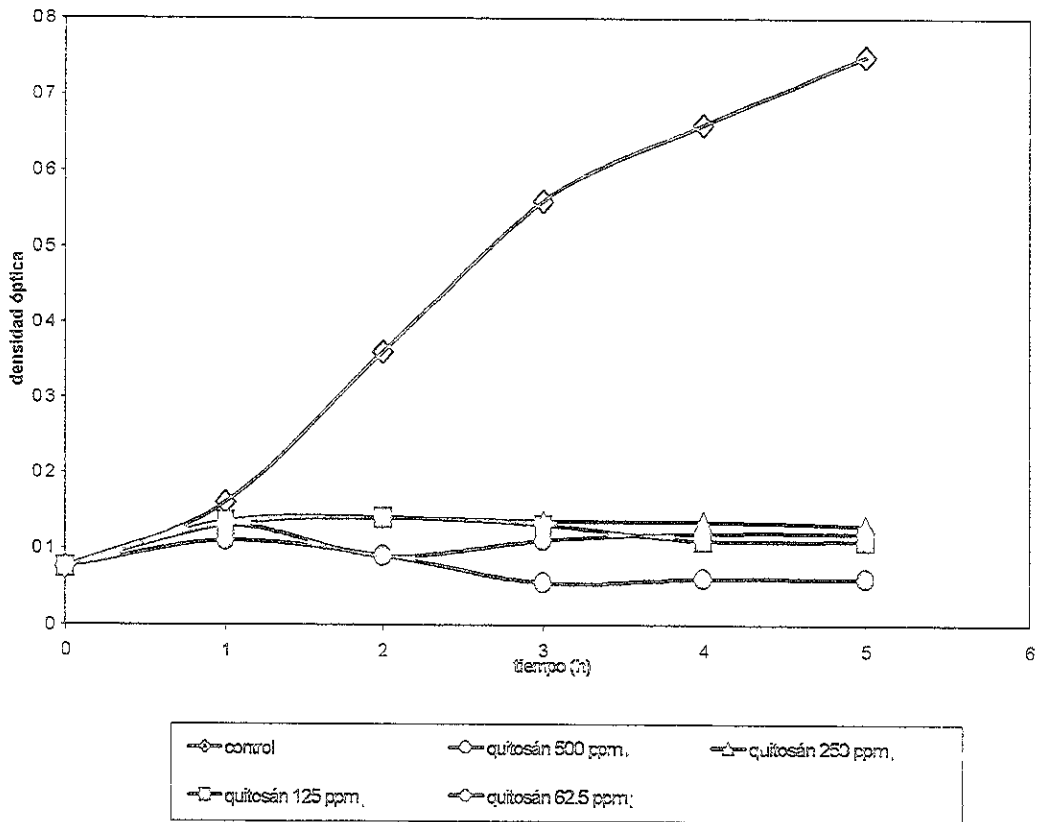


Tabla 13. Valores de densidad óptica de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH de 5.5

0	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
1	0.16	0.13	0.13	0.135	0.11
2	0.36	0.09	0.14	0.14	0.09
3	0.56	0.11	0.135	0.13	0.055
4	0.66	0.12	0.135	0.11	0.06
5	0.75	0.12	0.13	0.11	0.06
tiempo	Control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Figura 23

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 5.5

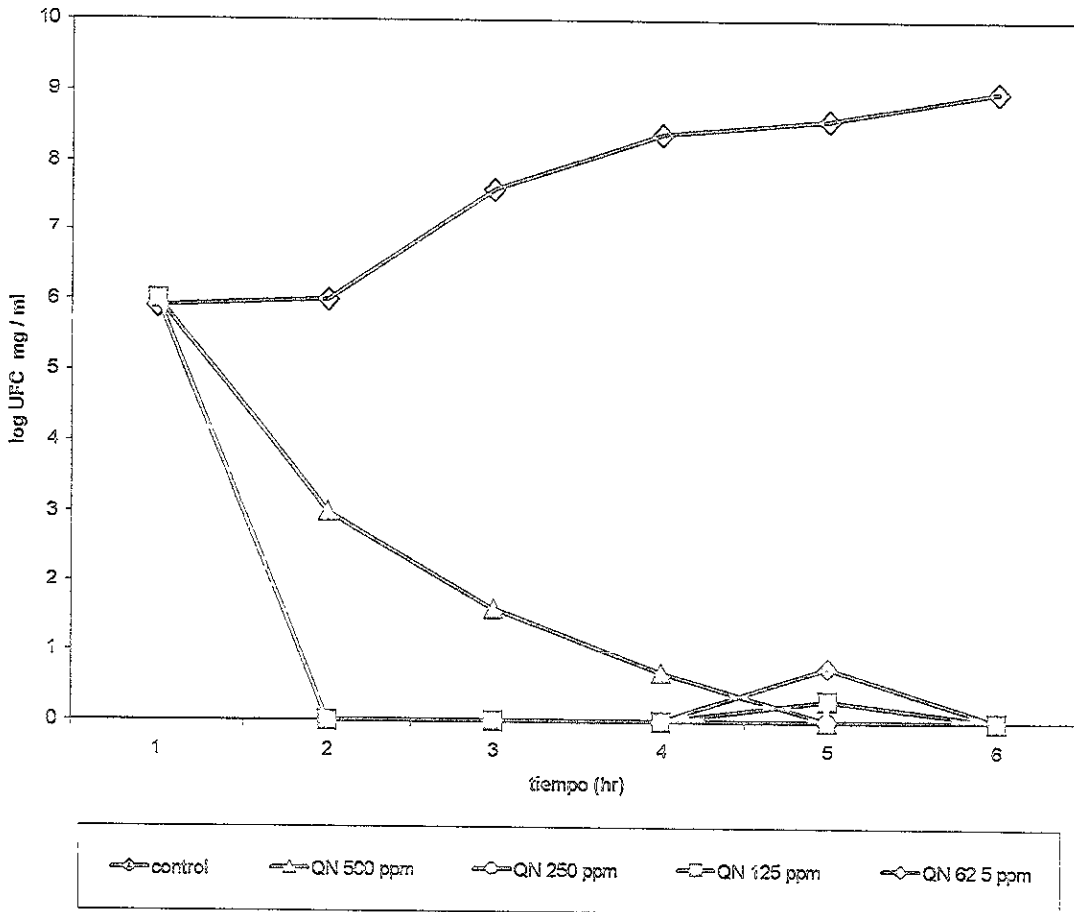


Tabla 14. Log UFC/ ml de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 5.5

0	5.9	6	6	6	6
1	6	3	0	0	0
2	7.6	1.6	0	0	0
3	8.4	0.69	0	0	0
4	8.6	0	0	0.3	0.77
5	9	0	0	0	0
Tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Purnama y Masatoshi en 1994 mencionan la incorporación de quitosán para la preservación de carne y aseguran que a la concentración de 0.01% se inhibe a las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. La concentración de quitosán usada por Purnama está dentro de las concentraciones manejadas en este trabajo, sin embargo no se establece qué cantidad de bacterias son inhibidas por el quitosán. También en ese mismo utilizan concentraciones de 0.1 a 1.0 % de quitosán en la inhibición de cultivos iniciadores en carne, como son *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Micrococcus varians*.

Al parecer el modo de inhibición por quitosán en el crecimiento de algunas bacterias de putrefacción y de los cultivos iniciadores, puede ser atribuido a la interacción del quitosán con las membranas y/o los componentes de la pared celular, resultando en un incremento en la permeabilidad de las membranas y la salida del material celular, o debido a que los puentes de hidrógeno con el quitosán inhiben la actividad enzimática por bioabsorción.

Cabe considerar que el planteamiento hecho por Purnama coincide con lo establecido en los puntos del 1 al 8 de la discusión previamente descrita.

La Figura 24, Tabla 15 y Figura 25, Tabla 16 son en resumen la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* frente al quitosán a pH de 6.5 a las cuatro concentraciones manejadas. El efecto es el mismo que las anteriormente estudiadas a pH de 4.5 y 5.5. El quitosán es bactericida y no hay un efecto sobre el crecimiento en el cultivo control por la adición de agua al pH al que se adicionó el agente. También en este caso las cuatro concentraciones de quitosán surten el mismo efecto bactericida y el impacto del pH en la solubilidad del

Figura 24

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 6.5

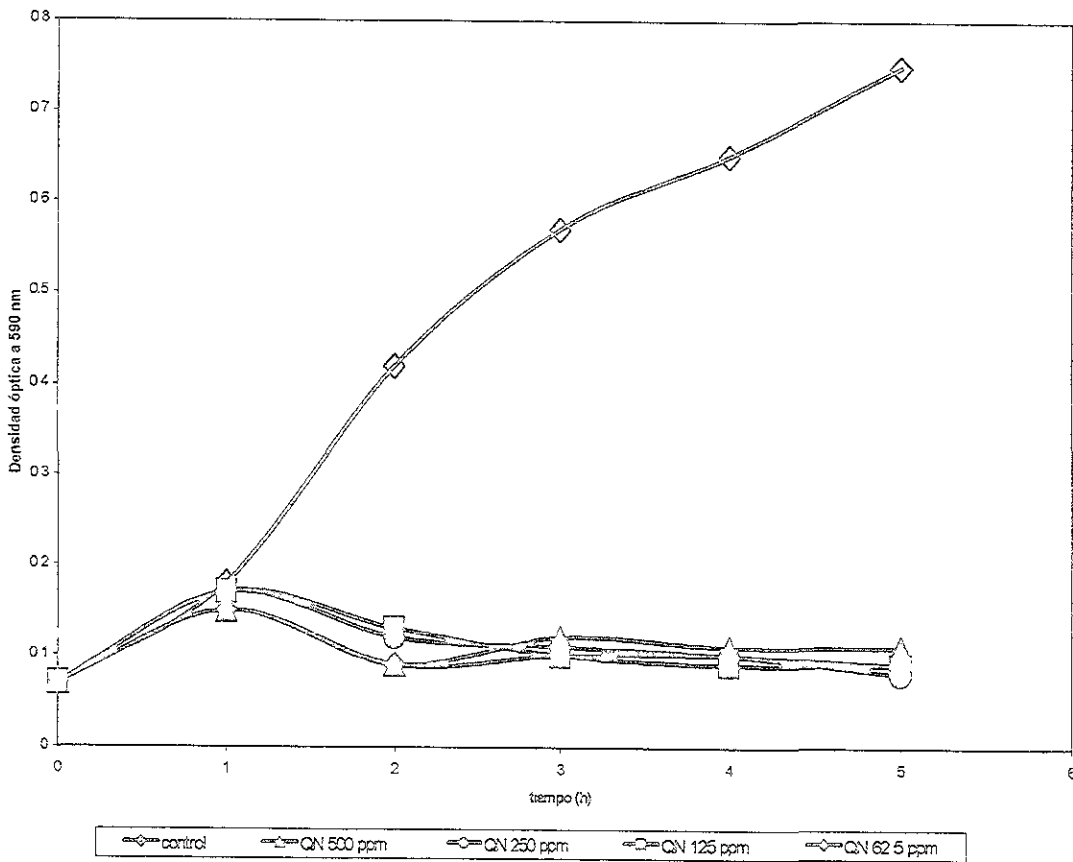


Tabla 15. Valores de densidad óptica de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 6.5

0	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
1	0.18	0.15	0.17	0.17	0.15
2	0.42	0.09	0.12	0.13	0.09
3	0.57	0.12	0.11	0.1	0.1
4	0.65	0.11	0.1	0.09	0.1
5	0.75	0.11	0.08	0.09	0.09
tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

Figura 25

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
a diferentes concentraciones de quitosán
a pH de 6.5

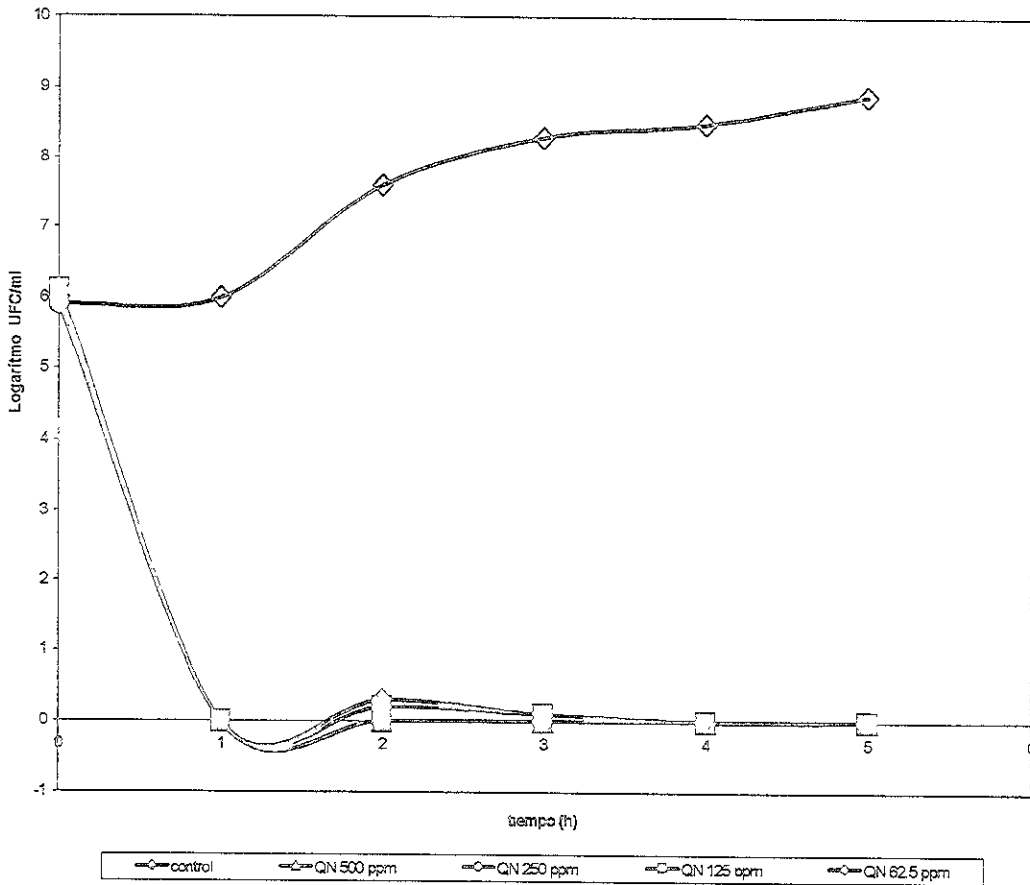


Tabla 16. Log UFC/ ml de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli*
con quitosán a diferentes concentraciones y a pH 6.5

0	5.9	6	5.9	6.1	6
1	6	0	0	0	0
2	7.6	0	0	0.2	0.3
3	8.3	0	0	0.1	0.1
4	8.5	0	0	0	0
5	8.9	0	0	0	0
tiempo	control	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62.5 ppm

4.2.4. Comparación del efecto del quitosán frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* 6538p y *Escherichia coli* 10536

Debido a las diferencias físicas y químicas de ambas bacterias usadas como “tipo” para la evaluación de productos antibacterianos, y considerando antecedentes tanto experimentales (García, 1999), como estadísticos realizados en este laboratorio, es necesario hacer el estudio comparativo para arribar a resultados objetivos y congruentes de la acción del quitosán.

El análisis estadístico infiere que la concentración es altamente significativa ($P < 0.05$) para ambos tipos bacterianos; teniendo formas cuadráticas y cúbicas. En otras palabras esto es el resultado de la participación de las diversas variables (bacterias, tiempo, concentración y pH) a diversos niveles, expresado en Unidades Formadoras de Colonia / ml a través del crecimiento bacteriano (ver apéndice).

A este respecto el tiempo de acuerdo a los resultados obtenidos y analizados es significativo (ver apéndice) para las bacterias estudiadas. En *Escherichia coli* a través del tiempo se ve cómo el quitosán actúa con carácter bactericida.

En *Staphylococcus aureus*, el curso de la acción se manifiesta primero como aglutinante (60 min), seguido de la acción bactericida (240 min), y muy probablemente como nutriente a los 120 minutos, esto visto al final de la cinética (Figura 15).

El pH no tiene efecto significativo, sin embargo cabe aclarar que por si mismo tiene influencia en la solubilidad del quitosán, más no en la solución final del medio de cultivo, en donde los pH's se mantuvieron en el orden de 6.9.

Las superficies de respuesta (ver apéndice)obtenidas de los análisis estadísticos, permiten predecir que a la concentración de 500 ppm de quitosán a pH 4.5 expuesto al medio de cultivo de *Staphylococcus aureus* con un inóculo del orden de 3×10^8 bacterias / ml durante 5 horas, se tendrá una población final de 1×10^2 bacterias / ml.

En el caso de *Escherichia coli* las superficies de respuesta predicen que en el rango de concentración de quitosán de 125 a 200 ppm por expuesto a un cultivo con una población del orden de 3×10^8 por 1.25 hasta 2.5 horas, se logra tener una población del orden de 2 a 6 bacterias / ml.

5.- CONCLUSIONES

- ❖ La quitina obtenida del proceso de extracción propio es similar a la quitina comercial, lo cual se corroboró por Espectrofotometría de Infrarrojo (IR), Espectrometría de masas (EM), Difracción de Rayos X.
- ❖ Existen pequeñas diferencias en los espectros de IR, EM y Rayos X entre la quitina obtenida y la quitina comercial debido al origen de donde provienen y al proceso de extracción.
- ❖ El quitosán obtenido es insoluble en todos los solventes orgánicos y es totalmente soluble en todos los ácidos orgánicos e inorgánicos probados.
- ❖ El quitosán obtenido presenta un 85 % de desacetilación.
- ❖ El efecto inhibitorio del quitosán sobre *Staphylococcus aureus* es de carácter bacteriostático. A altas concentraciones de quitosán (500 y 250 ppm) mayor efecto inhibitorio. A mayor tiempo de exposición (5 horas) mayor efecto inhibitorio.
- ❖ El quitosán presenta efecto aglutinante frente a *Staphylococcus aureus* y es dependiente de la concentración, del tiempo y del pH de la solución.
- ❖ A bajas concentraciones 125 y 62.5 ppm y pH 4.5 el quitosán muestra un efecto nutriente en *Staphylococcus aureus*.
- ❖ El efecto del quitosán frente a *Escherichia coli* es bactericida a todas las concentraciones y pH's estudiadas.

- ❖ Las diferencias en los efectos del quitosán sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se deben a las diferencias en estructura y composición principalmente de su superficie celular.
- ❖ Del análisis estadístico se infiere la multifuncionalidad del quitosán en solución.
- ❖ Las superficies de respuestas derivadas del análisis estadístico permiten predecir el grado de inhibición del quitosán

6.- REFERENCIAS

1. Alimuniar and Zainuddin, An economical technique for producing chitosan. *In advances in chitin and chitosan*, C.J. Brine, P.A. Sandford and J.P. Zikakis (Ed). P. 627, Elsevier Applied Sciences , Essex, UK, (1992)
2. Allan C., and L.A. Hadwiger, The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell composition, *Exp. Mycol.*, 3. 285-287, (1979)
3. Allan G.G. and J.G. Winterowd, The controlled release of a nerve growth factor protein from a matrix, Presentation at the 21st *American Chemical Society National Meeting*, Division of Industrial and Engineering Chemistry, Inc., Symposium on Biopolymers, Atlanta, GA,(1991) .
4. Amano K And E. Ito, The action of lysozyme on partially deacetylated chitin, *Eur. J. Biochem* 85: 97 (1978).
5. Arcidiacono S. and Klapan D.L. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *In Biotechnology and Bioengineering*, 39 (3): 281, (1992).
6. Austin P.R. , Solvents and purification of chitin , U.S. Patent 3,892,731 (1975).
7. Austin P.R., Brine C.J., Castle J.E., and Zikakis J.P., Chitin: New Facets of Research , *In Science*, 212 (15): 749, (1981).
8. Austin P.R. , Solvents and purification of chitin , U.S. Patent 3,892,731 (1975).
9. Berkeley R.C.W., Chitin, chitosan and their degradative enzymes. *In Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*, Society for General Microbiology, p.205-236, (1979).

10. Brine C.J. and Austin P.R., Chitin variability with species and method of preparation, *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B:283, (1981).
11. Broussignac P., Chitosan, a natural polymer not well known by the industry, *Chim.Ind.Genie* , 99:1241, (1968).
12. Brzeski M.M., Concept of chitin/chitosan isolation from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) shells on a technical scale. In *Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan*. S. Hirano and S. Tokura (Eds), p.15, The Japan Society of Chitin and Chitosan, Sapporo Japan, (1982).
13. Bough W.A., Salter W.L., Wu A.C.M., and Perkins B.E., Influence of Manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of Chitosan products.I. Chemical composition, viscosity and molecular weight distribution of chitosan products, *Biotechnology and Bioengineering*, XX: 1931, (1978).
14. Carroad P.A. and Tom R.A. , Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes: Process conception and selection of microorganisms, *Journal of Food Science*, 43:1158, (1978).
15. Capozza R.C., Enzymically decomposable biodegradable pharmaceutical carrier, Ger Patent 2,505,305 (1975).
16. Charalambous G. And Dixastakis G., Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications, *Food Emulsifiers*, Ed Elsevier, (1989).
17. Chitin and Chitosan; An expanding range of markets await exploitation, *Technical Insights*, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.,(1998).
18. Chun-Ho Kim, So-Yeon Kim and Kyu-suk-Choi, Synthesis and antibacterial activity of water soluble chitin derivatives, *Polymers for Advanced Technologies*, Vol 3.: 319-325, (1997).

19. Cosio I.G., Fisher R.A. and Carrood P.A., Bioconversion of shellfish Waste: Waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis, *J. Food Science*, 47: 901, (1982).
20. Domard A., pH and CD measurements on a fully deacetylated chitosan application to copper (II) polymer interactions, *Int. J. Biol. Macromol.* 9 (2): 98 (1987).
21. Domszy J.D. and G.A. F. Roberts, Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan, *Makromol. Chem*, 186: 1671 (1985).
22. Draget K.I., K.M. Varum, and O. Smidsrod, Chitosan crosslinked with Mo (IV) polyoxyanions; effects of chemical composition, *Advances in Chitin and Chitosan* (C.J. Brine, P.A. Sandford, and J.P Zikakis, eds.), Elsevier Applied Science, New york, p. 604, (1991).
23. Franklin T.J. and G.A. Snow, Biochemistry of Antimicrobial Action, Chapman and Hall, London, (1981).
24. Fukada Y., K. Kimura, and Y. Ayaki, Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats, *Lipids*, 26(5):395 (1991).
25. García A. H., Pruebas de actividad antibacteriana de quitosán. Tesis UNAM, 1999.
26. Hadwiger L.A., B. Fristensky, and R.C. Riggleman, Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields. *Chitin, Chitosan and Related Enzymes* (J.P. Zikakis, ed.), Academic Press, New York, p.291, (1984).
27. Hadwiger, L.A., D.F. Kendra, B.W. Fristensky, and W. Wagner, Chitosan both activate genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi; In *Chitin in Nature and Technology*, Muzarelli R.A.A., Jeuniaux, C., Goodday C., (ed), Plenum Press, New York, p. 210, (1985).

28. Hirano S., C. Itakura, and H. Seino, Hypocholesterolemic and hypolipidemic activities of chitosan digestible in hens and rabbits, Presentation at *the International Symposium on Carbohydrate Chemistry*, Ithaca, NY, (1986).
29. Hirano S., H. Tsuchida, and N. Nagao, N-acetylation in chitosan and the rate of enzymic hydrolysis, *Biomaterials* 10: 574 (1989).
30. Hirano S., Production and application of chitin and chitosan in Japan, *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties, and Applications* (C. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sanford, eds.), Elsevier Applied Science, New York, p.37, (1989).
31. Hirano, S., and N. Nagao, Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens, *Agric. Biol. Chem.*, 53 (11) : 3065-3066, (1989).
32. Hirano S., C. Itakura, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, N. Kanbara, and T. Kawakami, Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds, *J. Agric. Food. Chem.* 38:1214 (1990).
33. Hirano S., Yamaguchi R., Fukui N., and Iwata Mamoru, *Biotechnology and Polymers*, Charles O. Gebelein (Ed), Plenum Press, N.Y. and London, (1991).
34. Jeanloz R. and E. Forchielli, Hyaluronic acid and related compounds. 3. Determination of the structure of chitin by periodate oxidation, *Helv. Chim. Acta* 33:1690 (1950).
35. Jeuniaux C., On some biochemical aspects of regressive evolution in animals, *Biochemical Evolution and the Origin of Life* (E. Shoffeniels, ed.), North-Holland, Amsterdam, (1971).
36. Kajiki A., K. Higuchi, M. Nakamura, L. H. Liu, P.J. Pula, and A.M. Dannenberg. Sources of extracellular lysosomal enzymes released in organ-culture by developing and healing inflammatory lesions, *J. Leukocyte Biol.* 43: 104 (1988).

37. Kanazawa, A., T. Ikeda, and T. Endo, *J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem.*, 31, 335, (1993).
38. Kamasashi P.V. and Prabhu P.V., Preparation of chitin and glucosamine from prawn shell waste, *J.Sci. Ind. Res.*, 20D: 466, (1961).
39. Kendra, D.F., and L.A. Hadwiger, Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*, *Exp. Mycol.*, 8.: 276-281, (1984).
40. Knapczyk J., Krowczynski L., Krzek J., Brzeski M., Norberg E, Schenk D., and Struszyk H., Requiriments of chitosan for pharmaceutical and biomedical application. In *Chitin and Chitosan, Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Skjak-Baek G., Anthonsen T., Sandford P., eds., Elsevier Applied Science, 657-663, (1989).
41. Knorr Dietrich, Use of chitinous polymers in food. *Food Tecnology*, 38 (1): 85, (1984).
42. Knorr Dietrich, Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Tecnology*, 45 (1): 114, (1991).
43. Kobeike D.N., By products from crustacean wastes-chitin production, *Food Australia*, 42 (1): 18, (1989).
44. Koshijima T., R. Tanaka , E. Muraki, A. Yamada and F. Yaku, Chelating polymers derived from cellulose and chitin . I. Formation of complexes from metal ions, *Cell. Chem. Technol.* 7: 197 (1973).
45. Kono M., T. Matsui, and C. Shimizu, Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 (1):125 (1987).

46. Kurita K., M. Ishiguro and T. Kitajima, Studies on chitin. 17. Introduction of long chain alkylidene groups and the influence of properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 10 : 124 (1988).
47. Kurita K., Tomita K., Tada T., Ishii S., Mishimura S., and Shimoda K., Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties, *Journal of polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 31 : 485, (1993).
48. Leuba, S., and P. Stossel, Chitosan and other polyamines: Antifungal activity and interaction with biological membranes., *In Chitin in Nature and Technology*, Muzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C., Gooday, C., (ed), Plenum Press, New York, p 217, (1985).
49. Lusena C.V., and Rose R.C., Preparation and viscosity of chitosan. *J. Fish Res. Board Can.*, 10:521, (1953).
50. Madhavan P., and N.K. G. Ramachandran, Utilization of prawn waste. Isolation of chitin and its conversion to chitosan, *Fish. Technol.* 11:50 (1974).
51. Maghami G.G. and G.A. Roberts, Evaluation of the viscometric constants for chitosan, *Makromol. Chem.* 189:195 (1988).
52. Matsunaga A., Chitosan the ultimate health builder, Vantage Press, New York, p.123-126, (1998).
53. McKay G., H. Blair, and A. Findom, Kinetics of copper uptake on chitosan, *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, p.559, (1986).
54. Miima S., Miya M., Iwamoto R., and Yoshikawa S., Highly deacetylated chitosan and its properties, *J. Appl. Polym. Sci.*, 28: 1909, (1983).
55. Miranda C.S.P., Lara S.V., Patente en trámite, UNAM, (1999).
56. Moorjani M.N., Achulha V. And Khasim D.I., Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste, *J. Food Sci. Technol.*, 12: 187, (1975).

57. Muzarelli R.A.A., *Natural chelating polymers*, Pergamosn Press, Oxford, (1973).
58. Muzzarelli R.A.A., *Chitin*, Pergamon Press Ltd., New York, p.45,207,210, (1977).
59. No Hong K. And Meyers Samuel P., Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams, *J. Agric. Food Chem.*, 37(3): 580, (1989).
60. No Hong K., and Meyers Samuei P., Preparation and characterization of chitin and chitosan, *Journal of Aquatic Food Product Tecnology*, vol 4 (2), 27-52 (1995).
61. Nordtveit R.J., K.M. Varum, and O. Smidsrod, Degradation of partially deacetylated chitosan with lysozyme, Presentation at the 5th International Conference on Chitin and Chitosan, Princeton, NJ, p.7, (1991).
62. Ralston, G.B., M.V. Tacey, and P.M. Wrench, The inhibition of fermentation in baker's yeast by chitosan, *Biochem. Biophys. Acta*, 93: 652-655, (1964).
63. Sandford P.A., Biomedical applications of new forms of chitin/ chitosan, *Chitin Derivatives in Life Science* (S. Tokura and I. Azuma, eds.), Japanese Society for Chitin/Chitosan, Sapporo, p.93, (1990).
64. Sandford P.A. and A. Steinnes, Biomedical applications of high- purity chitosan, *Water- Soluble Polymer: Synthesis, Solution Properties and Applications* (S.W. Shalaby, C.L. McCormick and G.B. Butler, eds.), ACS, Washington, DC, p. 430, (1991).
65. Sandford P.A., High purity chitosan and alginate: preparation, analysis and applications, *Frontiers in Carbohydrate Research-2* (R. Chandrasekaran, ed.), Elsevier Applied Science, New York, p.250, (1991).

66. Santos ,P.M., J.G. Winterowd, G.G. Allan, M.A. Bothwell, and E.W. Rubel, Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration, *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 105 (1): 12 (1991).
67. Sashiwa H., Y.Uraki, H. Saimoto, Y. Shigemasa, and S. Tokura, Lysozyme susceptibility and substitution site by chemical modification, *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties, and Applications* (G. Skjak-Braek, T.Anthonsen, and P. Sandford, eds.), Elsevier Applied Science, New York, p 267, (1989).
68. Shimara K. And Takiguchi Y., Preparation of crustacean chitin, *Methods in Enzymology*, 161: 417, (1988).
69. Skjakbraek G.,Anthonsen T, and Sandford P.,*Chitin and chitosan, Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier Applied Science (Ed), London and N.Y. (1988).
70. Stossel, P., and Leuba, J.L., Effects of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soil-borne phytopathogenic fungi, *Phytopath, Z.* 111:82-90, (1984).
71. Sudarshan, V.R., J.G., Hoover and D. Knorr, Antibacterial action of chitosan, *Food Biotechnology*, 6 83), 257-272, (1992).
72. Takemono K. J.,Sunamoto, and M. Akasi, Polymer and Molecular care, Mita, Tokyo, Ch IV (1989).
73. Tokura S. and Azuma I. , Chitin Derivatives in Life Sciences, *Japanese Society for Chitin and Chitosan*, Sapporo, (1990).
74. Varum K.M., M.W. Anthonsen, M.H. Ottoy, H.Grasdalen , and O. Smidsrod, Chemical composition and sequences in chitosans determined by hig-field proton and carbon NMR-spectroscopy- relation to solubility, *Advances in Chitin and Chitosan* (C.J.

- Brine, P.A. Sanford, and J.P. Zikakis, eds.), Elsevier Applied Science, New York, p.127, (1992)
75. Wu A.C.M., and Bough W.A., Study of variables in the chitosan manufacturing process in relation to molecular- weight distribution, chemical characteristics and waste- treatment effectiveness. In Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan, R.A.A. Muzarelli and E.R. Pariser (Eds), p. 88, (1978)
76. Wolfrom, M.L., and T.M., Snerman, The sulfonation of chitosan, *J. Am. Soc.*, 81 : 1764, (1959)
77. Young, D. L., H. Kohle and H. Kauss, Effect of chitosan on membrane permeability of suspension- cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells, *Plant Physiol*, 70: 1449-1454, (1982).
78. Young, D.H., and H. Kauss, Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability, *Plant Physiol*, 73 : 689, (1983).
79. Zikakis J.P., *Chitin , Chitosan and Related Enzymes*, Academic Press Inc., Orlando FL, (1984).

X1 (bacteria)	X1 (bacteria)	X2 (hora)	X3 (PPM)	X4 (pH)	Ab(590 nm)	Log (U.F.C.ml-1)
gram (+)	0	0	0	4.5	0.043	7.5
gram (+)	0	1	0	4.5	0.089	6.3
gram (+)	0	2	0	4.5	0.259	9.71
gram (+)	0	3	0	4.5	0.333	10.01
gram (+)	0	4	0	4.5	0.35	10.36
gram (+)	0	5	0	4.5	0.36	10.22
gram (+)	0	0	500	4.5	0.043	7.5
gram (+)	0	1	500	4.5	0.045	2.48
gram (+)	0	2	500	4.5	0.033	1.3
gram (+)	0	3	500	4.5	0.022	0
gram (+)	0	4	500	4.5	0.018	1.47
gram (+)	0	5	500	4.5	0.018	2.17
gram (+)	0	0	250	4.5	0.043	7.5
gram (+)	0	1	250	4.5	0.058	3.59
gram (+)	0	2	250	4.5	0.027	2.47
gram (+)	0	3	250	4.5	0.018	1.6
gram (+)	0	4	250	4.5	0.007	2.069
gram (+)	0	5	250	4.5	0.007	3.3
gram (+)	0	0	125	4.5	0.043	7.5
gram (+)	0	1	125	4.5	0.039	4.84
gram (+)	0	2	125	4.5	0.063	5.013
gram (+)	0	3	125	4.5	0.133	6.13
gram (+)	0	4	125	4.5	0.232	6.79
gram (+)	0	5	125	4.5	0.275	8.14
gram (+)	0	0	62.5	4.5	0.043	7.5
gram (+)	0	1	62.5	4.5	0.05	5.03
gram (+)	0	2	62.5	4.5	0.145	6.19
gram (+)	0	3	62.5	4.5	0.286	7.14
gram (+)	0	4	62.5	4.5	0.321	8.32
gram (+)	0	5	62.5	4.5	0.336	9.7
gram (+)	0	0	0	5.5	0.048	7.69
gram (+)	0	1	0	5.5	0.141	8.17
gram (+)	0	2	0	5.5	0.29	8.49
gram (+)	0	3	0	5.5	0.335	9.79
gram (+)	0	4	0	5.5	0.354	11.59
gram (+)	0	5	0	5.5	0.356	10.7
gram (+)	0	0	500	5.5	0.048	7.69
gram (+)	0	1	500	5.5	0.066	6.2
gram (+)	0	2	500	5.5	0.064	4.77
gram (+)	0	3	500	5.5	0.06	5.34
gram (+)	0	4	500	5.5	0.062	6.71
gram (+)	0	5	500	5.5	0.06	5.52
gram (+)	0	0	250	5.5	0.048	7.69
gram (+)	0	1	250	5.5	0.011	6.4
gram (+)	0	2	250	5.5	0.006	5.2
gram (+)	0	3	250	5.5	0.004	4.47
gram (+)	0	4	250	5.5	0.007	4.59
gram (+)	0	5	250	5.5	0.04	3.3
gram (+)	0	0	125	5.5	0.048	7.69
gram (+)	0	1	125	5.5	0.07	7.5

gram (+)	0	2	125	5.5	0.062	7.44
gram (+)	0	3	125	5.5	0.076	6.3
gram (+)	0	4	125	5.5	0.141	5.3
gram (+)	0	5	125	5.5	0.147	4.47
gram (+)	0	0	62.5	5.5	0.048	7.69
gram (+)	0	1	62.5	5.5	0.042	6
gram (+)	0	2	62.5	5.5	0.038	6.09
gram (+)	0	3	62.5	5.5	0.031	6.3
gram (+)	0	4	62.5	5.5	0.117	6.92
gram (+)	0	5	62.5	5.5	0.187	6.98
gram (+)	0	0	0	6.5	0.043	6.95
gram (+)	0	1	0	6.5	0.141	6.9
gram (+)	0	2	0	6.5	0.29	8.77
gram (+)	0	3	0	6.5	0.335	10.02
gram (+)	0	4	0	6.5	0.354	11.71
gram (+)	0	5	0	6.5	0.356	12.23
gram (+)	0	0	500	6.5	0.043	6.95
gram (+)	0	1	500	6.5	0.011	5.8
gram (+)	0	2	500	6.5	0.04	4.9
gram (+)	0	3	500	6.5	0.04	3.25
gram (+)	0	4	500	6.5	0.03	3.07
gram (+)	0	5	500	6.5	0.06	2.03
gram (+)	0	0	250	6.5	0.043	6.95
gram (+)	0	1	250	6.5	0.009	6.5
gram (+)	0	2	250	6.5	0.11	5.86
gram (+)	0	3	250	6.5	0.02	5.7
gram (+)	0	4	250	6.5	0.04	5
gram (+)	0	5	250	6.5	0.03	4.43
gram (+)	0	0	125	6.5	0.043	6.95
gram (+)	0	1	125	6.5	0.003	6.8
gram (+)	0	2	125	6.5	0.003	7
gram (+)	0	3	125	6.5	0.162	7
gram (+)	0	4	125	6.5	0.07	6.69
gram (+)	0	5	125	6.5	0.38	10.07
gram (+)	0	0	62.5	6.5	0.043	6.95
gram (+)	0	1	62.5	6.5	0.0025	7.2
gram (+)	0	2	62.5	6.5	0.004	7
gram (+)	0	3	62.5	6.5	0.23	7.4
gram (+)	0	4	62.5	6.5	0.19	7
gram (+)	0	5	62.5	6.5	0.5	6.69
gram (-)	1	0	0	4.5	0.07	5.9
gram (-)	1	1	0	4.5	0.2	6
gram (-)	1	2	0	4.5	0.48	7.6
gram (-)	1	3	0	4.5	0.56	8.4
gram (-)	1	4	0	4.5	0.64	8.6
gram (-)	1	5	0	4.5	0.75	9
gram (-)	1	0	500	4.5	0.07	6.1
gram (-)	1	1	500	4.5	0.13	0
gram (-)	1	2	500	4.5	0.14	0
gram (-)	1	3	500	4.5	0.145	0
gram (-)	1	4	500	4.5	0.14	0
gram (-)	1	5	500	4.5	0.15	0

gram (-)	1	0	250	4.5	0.07	6.1
gram (-)	1	1	250	4.5	0.13	0
gram (-)	1	2	250	4.5	0.13	0
gram (-)	1	3	250	4.5	0.12	0
gram (-)	1	4	250	4.5	0.1	0
gram (-)	1	5	250	4.5	0.085	0
gram (-)	1	0	125	4.5	0.07	6.1
gram (-)	1	1	125	4.5	0.15	2.17
gram (-)	1	2	125	4.5	0.15	1.77
gram (-)	1	3	125	4.5	0.15	1.5
gram (-)	1	4	125	4.5	0.175	1.07
gram (-)	1	5	125	4.5	0.15	0
gram (-)	1	0	62.5	4.5	0.07	5.6
gram (-)	1	1	62.5	4.5	0.07	1.13
gram (-)	1	2	62.5	4.5	0.1	2
gram (-)	1	3	62.5	4.5	0.1	0
gram (-)	1	4	62.5	4.5	0.1	0
gram (-)	1	5	62.5	4.5	0.1	0
gram (-)	1	0	0	5.5	0.075	5.9
gram (-)	1	1	0	5.5	0.16	6
gram (-)	1	2	0	5.5	0.36	7.6
gram (-)	1	3	0	5.5	0.56	8.4
gram (-)	1	4	0	5.5	0.66	8.6
gram (-)	1	5	0	5.5	0.75	9
gram (-)	1	0	500	5.5	0.075	6
gram (-)	1	1	500	5.5	0.13	3
gram (-)	1	2	500	5.5	0.09	1.6
gram (-)	1	3	500	5.5	0.11	0.69
gram (-)	1	4	500	5.5	0.12	0
gram (-)	1	5	500	5.5	0.12	0
gram (-)	1	0	250	5.5	0.75	6
gram (-)	1	1	250	5.5	0.13	0
gram (-)	1	2	250	5.5	0.14	0
gram (-)	1	3	250	5.5	0.135	0
gram (-)	1	4	250	5.5	0.135	0
gram (-)	1	5	250	5.5	0.13	0
gram (-)	1	0	125	5.5	0.075	6
gram (-)	1	1	125	5.5	0.135	0
gram (-)	1	2	125	5.5	0.14	0
gram (-)	1	3	125	5.5	0.13	0
gram (-)	1	4	125	5.5	0.11	0.3
gram (-)	1	5	125	5.5	0.11	0
gram (-)	1	0	62.5	5.5	0.075	6
gram (-)	1	1	62.5	5.5	0.11	0
gram (-)	1	2	62.5	5.5	0.09	0
gram (-)	1	3	62.5	5.5	0.055	0
gram (-)	1	4	62.5	5.5	0.06	0.77
gram (-)	1	5	62.5	5.5	0.06	0
gram (-)	1	0	0	6.5	0.07	5.9
gram (-)	1	1	0	6.5	0.18	6
gram (-)	1	2	0	6.5	0.42	7.6
gram (-)	1	3	0	6.5	0.57	8.3

gram (-)	1	4	0	6.5	0.65	8.5
gram (-)	1	5	0	6.5	0.75	8.9
gram (-)	1	0	500	6.5	0.07	6
gram (-)	1	1	500	6.5	0.15	0
gram (-)	1	2	500	6.5	0.09	0
gram (-)	1	3	500	6.5	0.12	0
gram (-)	1	4	500	6.5	0.11	0
gram (-)	1	5	500	6.5	0.11	0
gram (-)	1	0	250	6.5	0.07	5.9
gram (-)	1	1	250	6.5	0.17	0
gram (-)	1	2	250	6.5	0.12	0
gram (-)	1	3	250	6.5	0.11	0
gram (-)	1	4	250	6.5	0.1	0
gram (-)	1	5	250	6.5	0.08	0
gram (-)	1	0	125	6.5	0.07	6.1
gram (-)	1	1	125	6.5	0.1	0
gram (-)	1	2	125	6.5	0.13	0.2
gram (-)	1	3	125	6.5	0.1	0.1
gram (-)	1	4	125	6.5	0.09	0
gram (-)	1	5	125	6.5	0.09	0
gram (-)	1	0	62.5	6.5	0.07	6
gram (-)	1	1	62.5	6.5	0.15	0
gram (-)	1	2	62.5	6.5	0.09	0.3
gram (-)	1	3	62.5	6.5	0.1	0.1
gram (-)	1	4	62.5	6.5	0.1	0
gram (-)	1	5	62.5	6.5	0.09	0

WORK.PATY1

OBSERVATIONS (N=180): all

ANALYSIS: Multiple regression and ANOVA

RESPONSE: LOGUFC

FACTORS: X1(bacteria); X3(concentración); X2(tiempo); X4(pH)

CLASSES: X1

Model: X1, X3, X2, X3*X3, X2*X2, X3*X3*X3, X2*X2*X2, X1*X2,
X1*X3, X1*X4, X1*X2*X2, X1*X3*X3, X1*X3*X3*X3, X1*X2*X2*X2,
X1*X3*X2

USER-EXCLUDED OBSERVATIONS: none

Constant Variance Assumption

The efficiency of regression analysis depends on the assumption that LOG UFC variation is the same for all observations. This assumption is checked by testing the significance of the linear relationship between the squared residuals from the analysis and the predicted LOG UFC values. In this instance 1.06% of the variation in the squared residuals is associated with variation in the predicted LOGUFC values. This constitutes not much statistical evidence that LOGUFC variation is not the same for all observations.

Response: LOGUFC

R-square 0.8447 Root MSE 1.4484
Adj R-square 0.8284 C.V. 32.452

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	17	1848	108.7	51.83	0.0000
Error	162	339.9	2.098		
Total	179	2188			

Overall Fit

Analysis of Variance: ANOVA Table
 Type III Sum of Squares

Response: LOGUFC

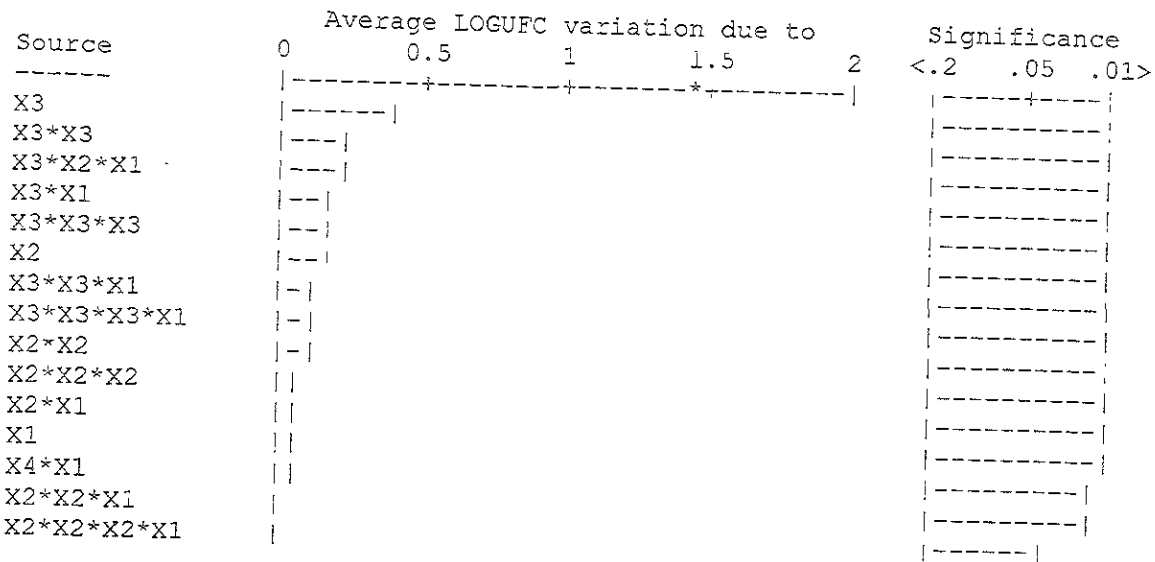
Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
X3	1	213.2	213.2	101.6	0.0000
X3*X3	1	118.9	118.9	56.68	0.0000
X3*X2*X1	2	103.6	51.80	24.69	0.0000
X3*X1	1	84.17	84.17	40.12	0.0000
X3*X3*X3	1	80.18	80.18	38.22	0.0000
X2	1	76.51	76.51	36.47	0.0000
X3*X3*X1	1	68.15	68.15	32.49	0.0000
X3*X3*X3*X1	1	57.37	57.37	27.35	0.0000
X2*X2	1	56.15	56.15	26.76	0.0000
X2*X2*X2	1	36.44	36.44	17.37	0.0000
X2*X1	1	25.62	25.62	12.21	0.0006
X1	1	16.71	16.71	7.963	0.0054
X4*X1	2	18.40	9.202	4.386	0.0140
X2*X2*X1	1	12.64	12.64	6.026	0.0152
X2*X2*X2*X1	1	9.253	9.253	4.411	0.0373

Analysis of Variance

This analysis is used to detect which model effects have an effect on the expected value of LOGUFC that is significantly greater than the background level of noise. In this case, the use of type III sums of squares indicates that all model effects have a significant effect on the expected value of LOGUFC. Type I sums of square are appropriate for polynomial regression, i.e., all model terms are sequential powers of one predictor variable. In other cases type III sums of squares are preferred.

Analysis of Variance: Pareto Chart
 Type III Sum of Squares

Response: LOGUFC



Analysis of Variance

This analysis is used to detect which model effects have an effect on the expected value of LOGUFC that is significantly greater than the background level of noise. In this case, the use of type III sums of squares indicates that all model effects have a significant effect on the expected value of LOGUFC. Type I sums of square are appropriate for polynomial regression, i.e., all model terms are sequential powers of one predictor variable. In other cases type III sums of squares are preferred.

Analysis of Variance: ANOVA Table
 Type I Sum of Squares

Response: LOGUFC

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
X1	1	695.3	695.3	331.5	0.0000
X3	1	386.1	386.1	184.0	0.0000
X2	1	53.08	53.08	25.30	0.0000
X3*X3	1	246.4	246.4	117.5	0.0000
X2*X2	1	80.03	80.03	38.15	0.0000
X3*X3*X3	1	80.18	80.18	38.22	0.0000
X2*X2*X2	1	36.44	36.44	17.37	0.0000
X2*X1	1	35.82	35.82	17.07	0.0001
X3*X1	1	2.510	2.510	1.197	0.2756
X4*X1	2	18.40	9.202	4.386	0.0140
X2*X2*X1	1	10.46	10.46	4.986	0.0269
X3*X3*X1	1	33.31	33.31	15.88	0.0001
X3*X3*X3*X1	1	57.37	57.37	27.35	0.0000
X2*X2*X2*X1	1	9.253	9.253	4.411	0.0373
X3*X2*X1	2	103.6	51.80	24.69	0.0000

Analysis of Variance

This analysis is used to detect which model effects have an effect on the expected value of LOGUFC that is significantly greater than the background level of noise. In this case, the use of type I sums of squares indicates that only the following model effects do *not* have a significant effect on the expected value of LOGUFC: X3*X1. Type I sums of square are appropriate for polynomial regression, i.e., all model terms are sequential powers of one predictor variable. In other cases type III sums of squares are preferred.

Parameter Estimates

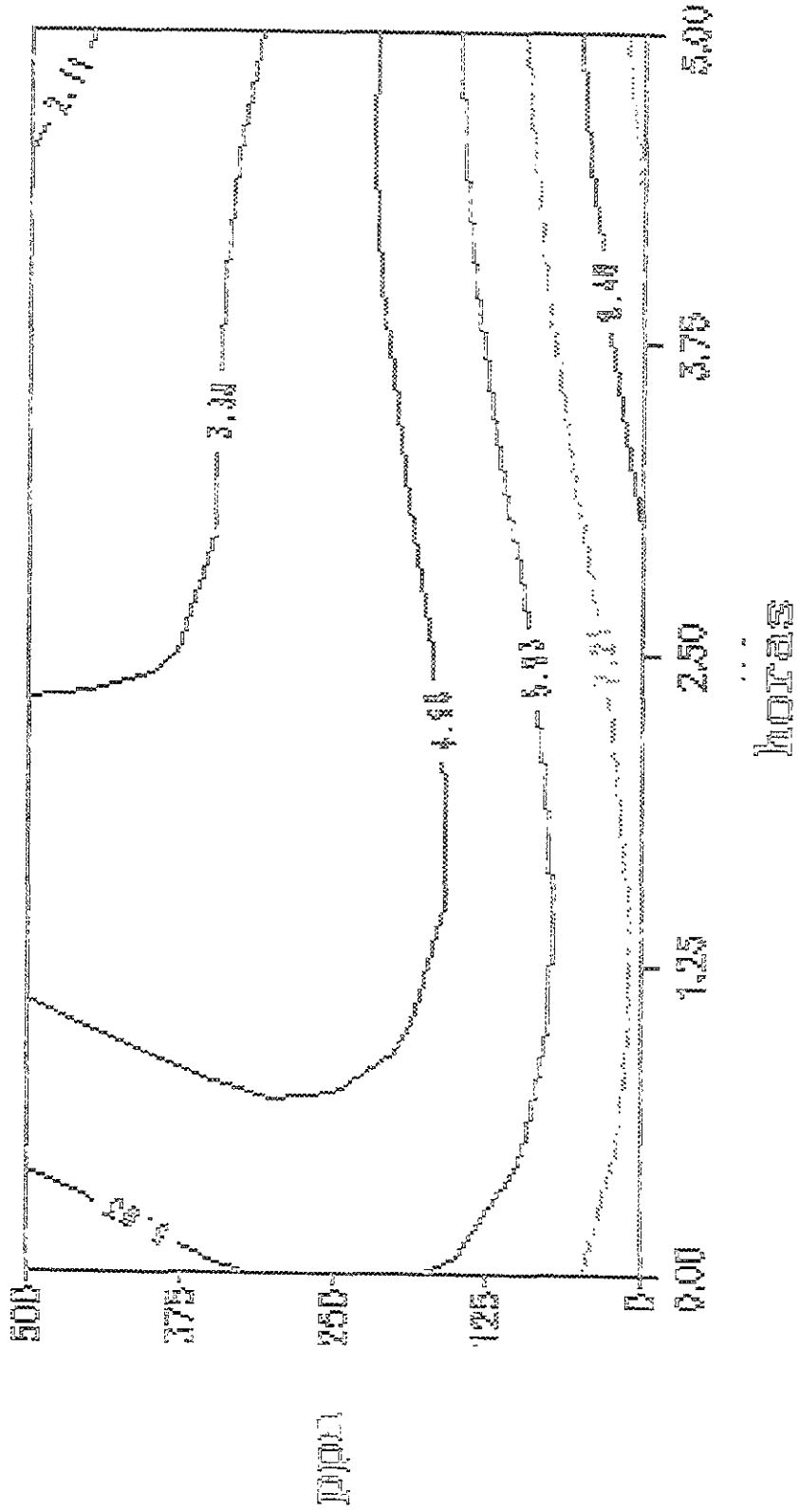
Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	10.34	1.155	8.953	0.0000
(X1='gram(+)')	1	-4.611	1.634	-2.822	0.0054
(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
X3	1	-0.097	0.0084	-11.61	0.0000
X2	1	-4.841	0.718	-6.741	0.0000
X3**2	1	0.0004	477E-7	9.354	0.0000
X2**2	1	1.908	0.354	5.394	0.0000
X3**3	1	-53E-8	66E-9	-8.069	0.0000
X2**3	1	-0.206	0.0465	-4.432	0.0000
X2*(X1='gram(+)')	1	3.549	1.016	3.495	0.0006
X2*(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
X3*(X1='gram(+)')	1	0.0748	0.0118	6.334	0.0000
X3*(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
X4*(X1='gram(+)')	1	0.532	0.187	2.848	0.0050
X4*(X1='gram(-)')	1	-0.152	0.187	-0.815	0.4165
(X2**2)*(X1='gram(+)')	1	-1.228	0.500	-2.455	0.0152
(X2**2)*(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
(X3**2)*(X1='gram(+)')	1	-38E-5	0.0001	-5.700	0.0000
(X3**2)*(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
(X3**3)*(X1='gram(+)')	1	488E-9	93E-9	5.229	0.0000
(X3**3)*(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
(X2**3)*(X1='gram(+)')	1	0.138	0.0657	2.100	0.0373
(X2**3)*(X1='gram(-)')	0	0	.	.	.
X3*X2*(X1='gram(+)')	1	-0.003	0.0005	-5.783	0.0000
X3*X2*(X1='gram(-)')	1	-0.002	0.0005	-3.992	0.0001

Parameter Estimates

The predicted model is $LOGJFC = 10.34 + 1*(X1='gram(+)) - 0.097*X3 - 4.841*X2 + 0.0004*X3**2 + 1.908*X2**2 - 53E-8*X3**3 - 0.206*X2**3 + 1*X2*(X1='gram(+)) + 1*X3*(X1='gram(+)) - 1*X4*(X1='gram(+)) + 1*X4*(X1='gram(-)) + 1*(X2**2) + 1*(X3**2) + 1*(X3**3) + 1*(X2**3) + 1*X3*X2*(X1='gram(+)) + 1*X3*X2*(X1='gram(-))$.

RESPUESTA: Log (U.F.C./ml)

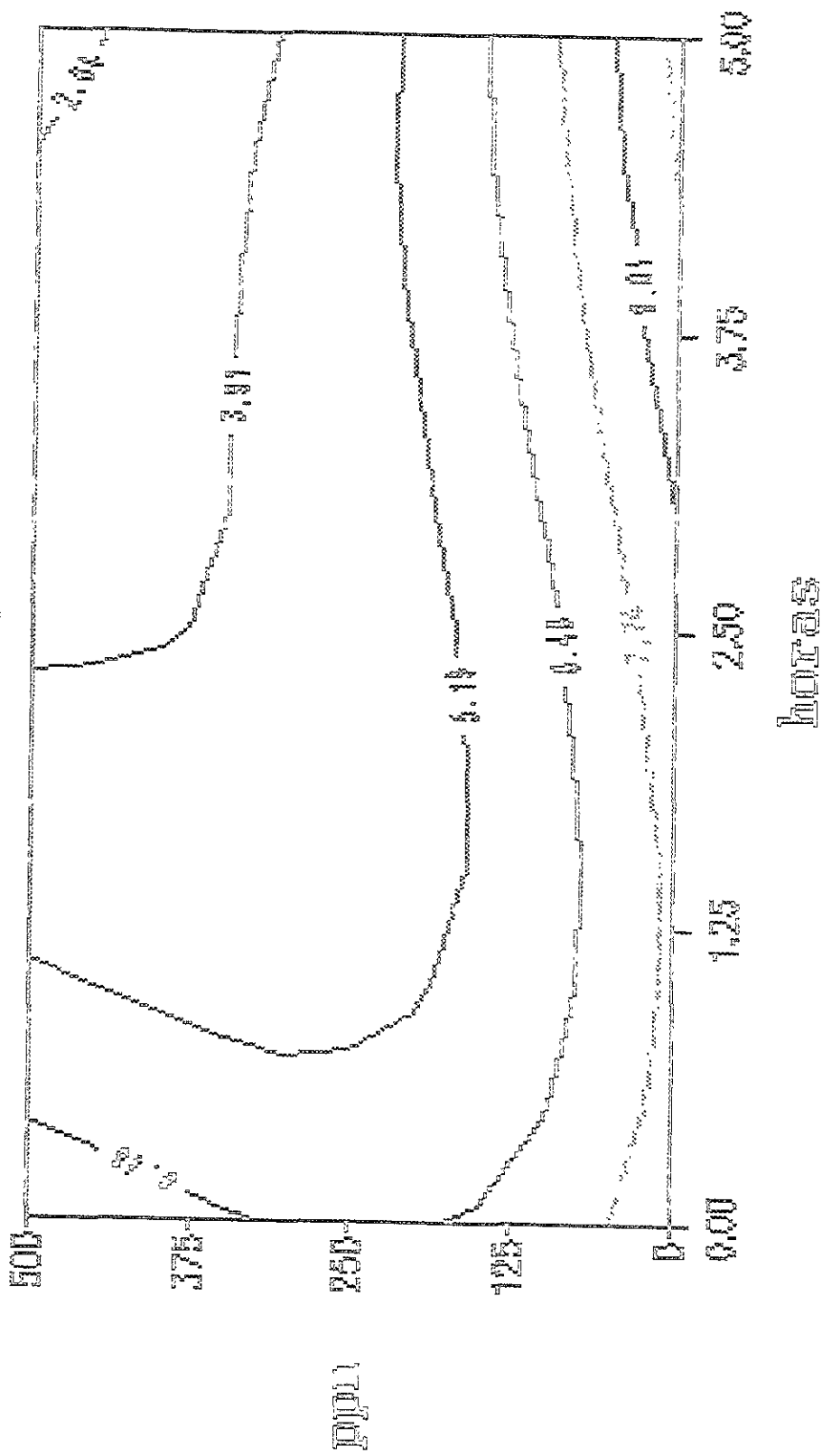
pH = 4.5 gram(+)



SUPERFICIE DE RESPUESTA DE *Staphylococcus aureus* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSÁN Y A pH 4.5

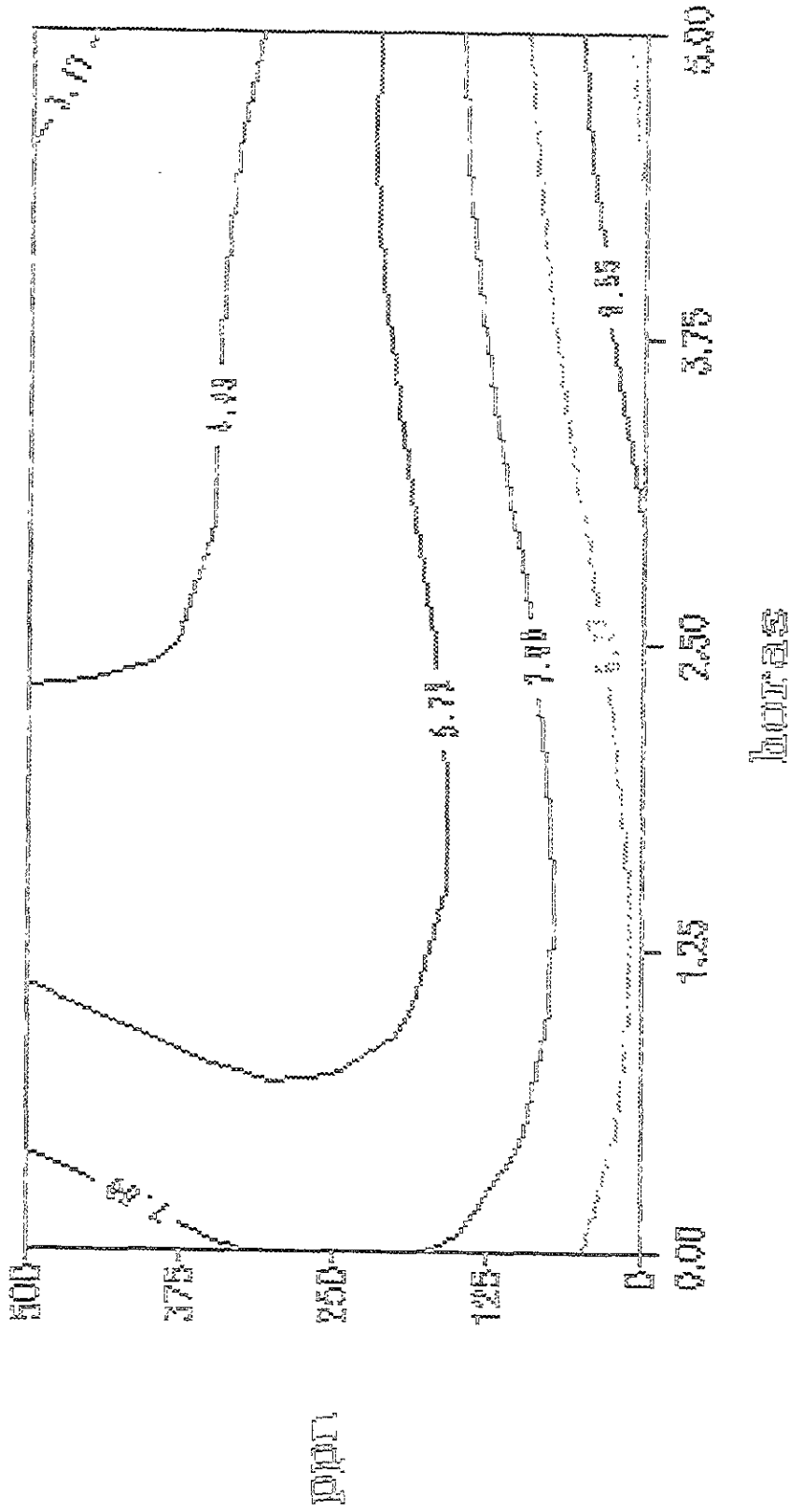
RESPUESTA: Log (U.F.C./ml)

pH = 5.5 gram(+)



SUPERFICIE DE RESPUESTA DE *Staphylococcus aureus* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSÁN
Y A pH 5.5

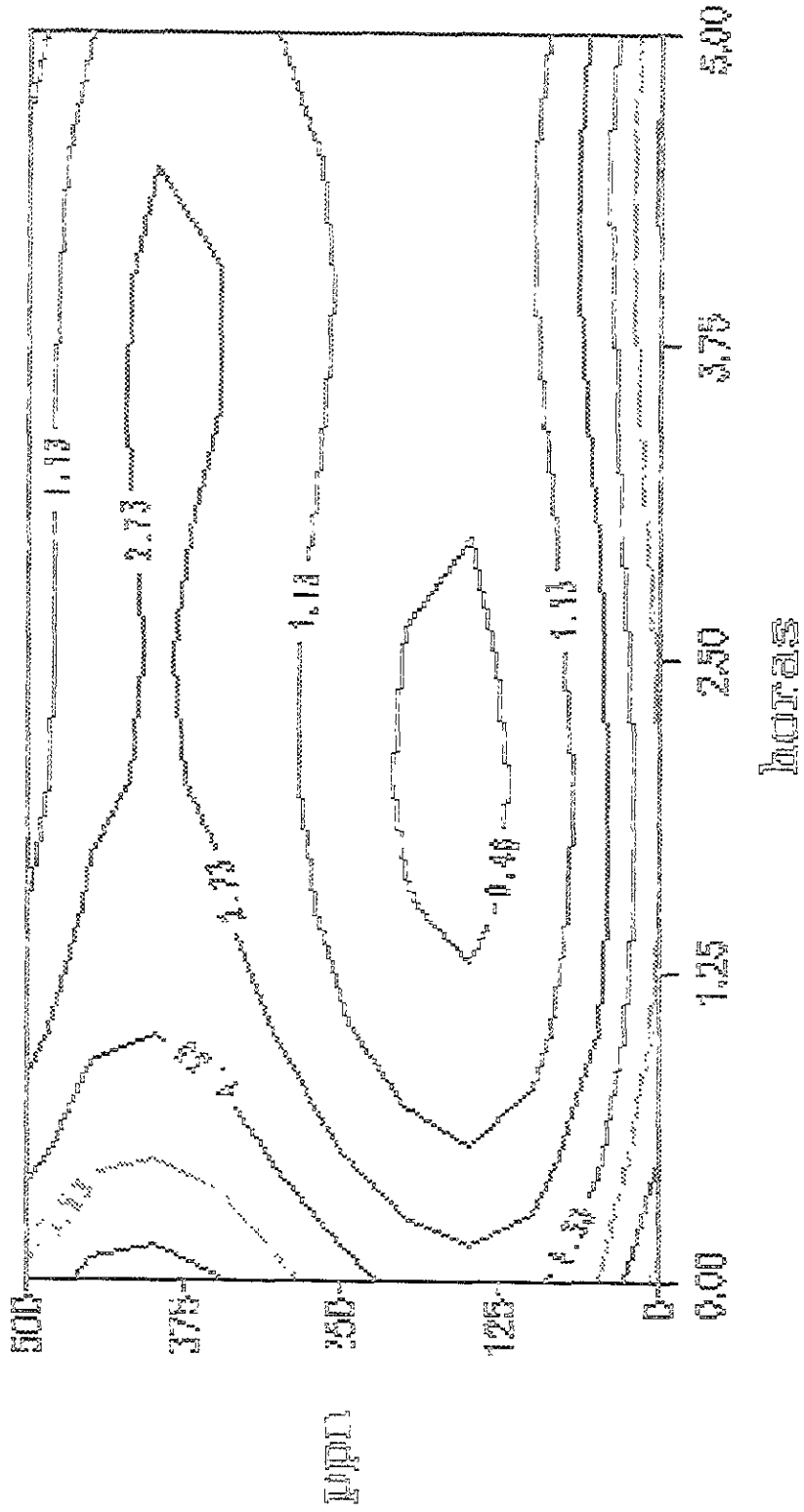
RESPUESTA: Log (U.F.C./ml)
pH = 6.5 gram(+)



SUPERFICIE DE RESPUESTA DE *Staphylococcus aureus* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSAN Y A pH 6.5

RESPUESTA: Log (U.F.C./ml)

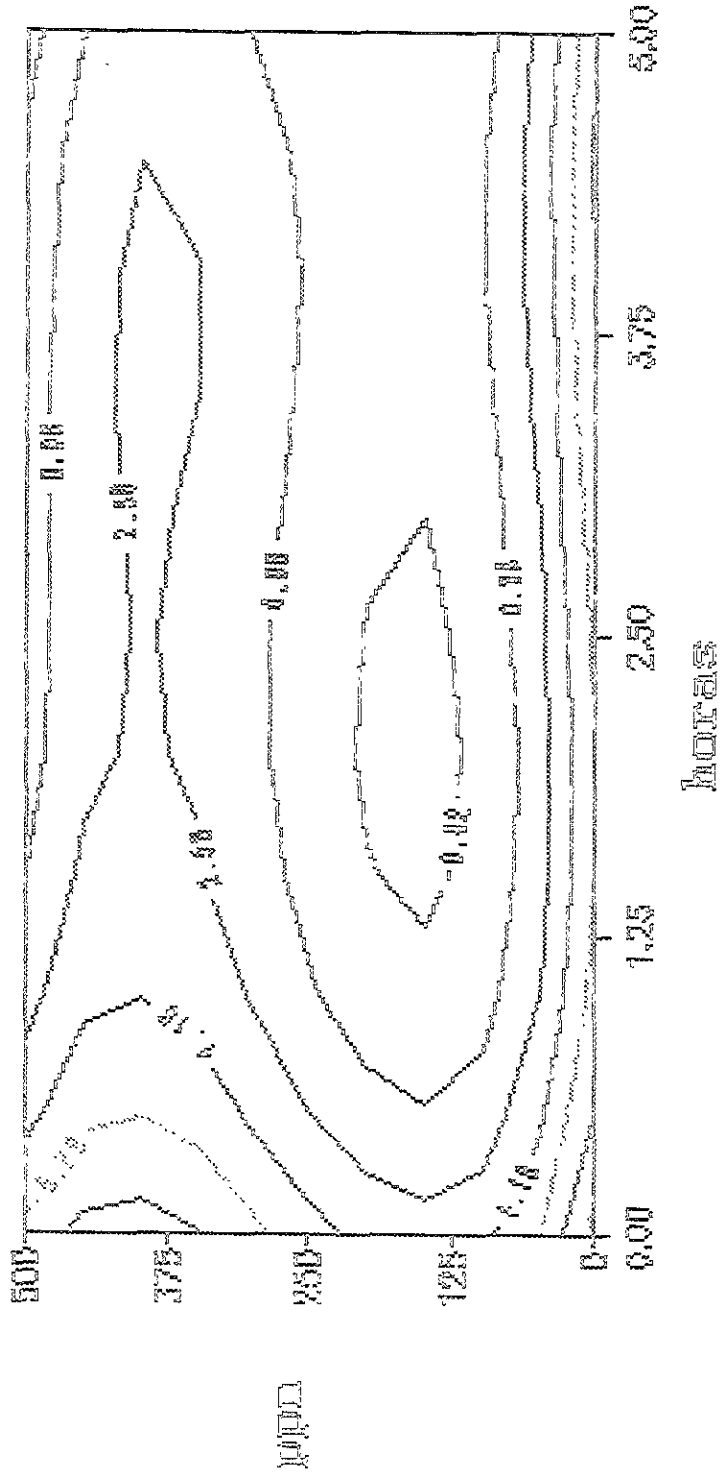
pH = 4.5 gram (-)



SUPERFICIE DE RESPUESTA DE *Escherichia coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSAN
Y A pH 4.5

RESPUESTA : Log (U.F.C./ml)

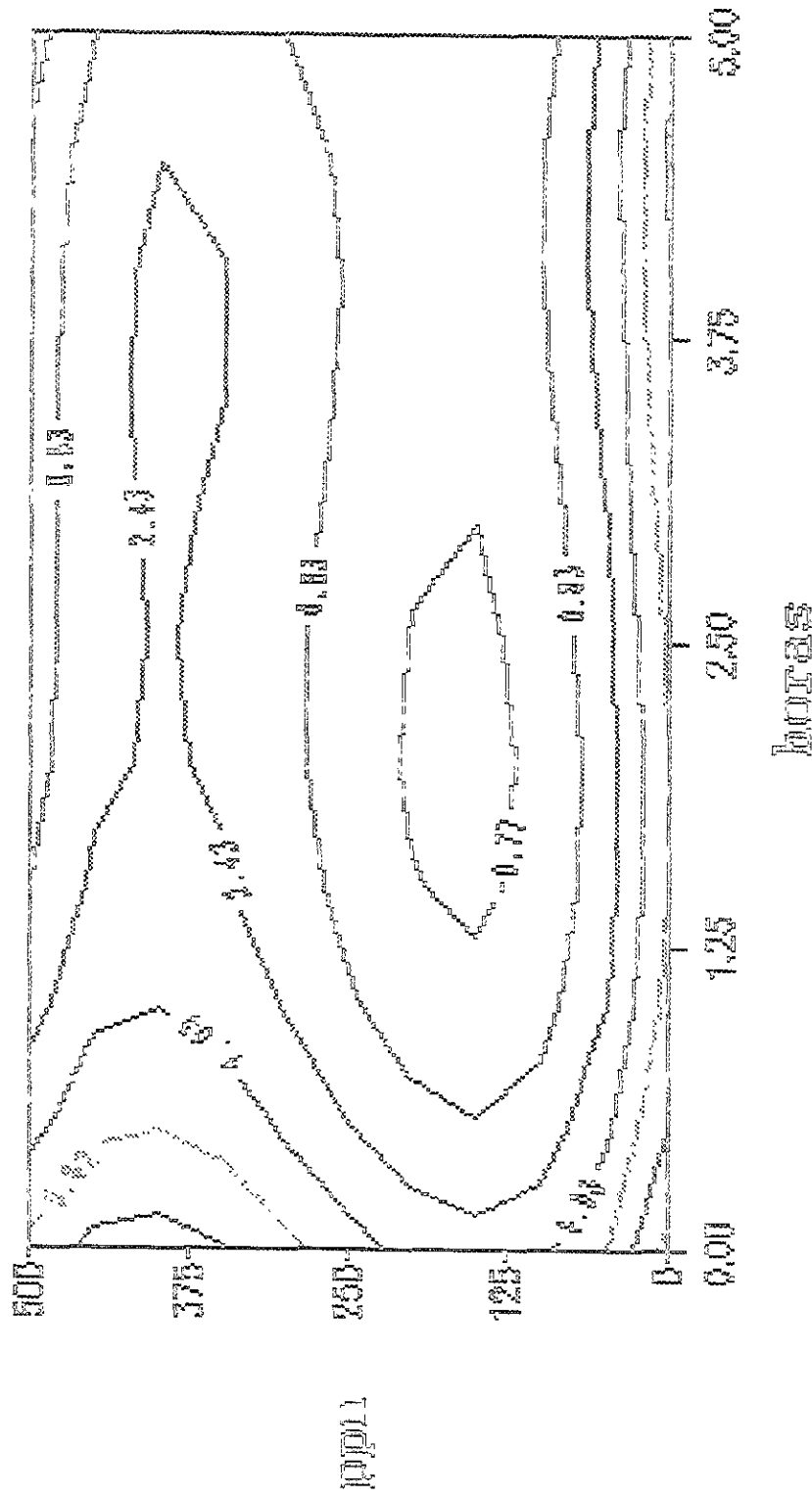
pH = 5.5 gram (-)



SUPERFICIE DE RESPUESTA DE *Escherichia coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSÁN Y A pH 5.5

RESPUESTA: Log(U.F.C./ml)

pH = 6.5 gram(-)



SUPERFICIE DE RESPUESTA DE *Escherichia coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSAN Y A pH 6.5