



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
QUITOCARBAMATOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

AURORA TREJO BELLIDO

ASESOR: M.C. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

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

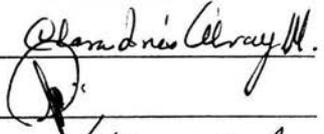
Evaluación de la actividad antibacteriana de quitocarbatos

que presenta la pasante: Aurora Trejo Bellido
 con número de cuenta: 9650994-4 para obtener el título de :
Ingeniera en alimentos

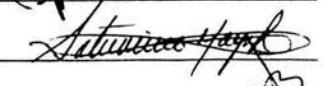
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de diciembre de 2003

PRESIDENTE Dra. Clara Ines Alvarez Manrique 

VOCAL MC. Susana Patricia Miranda Castro 

SECRETARIO IBQ. Saturnino Maya Ramírez 

PRIMER SUPLENTE MC. María Guadalupe Amaya León 

SEGUNDO SUPLENTE MC. María Guadalupe López Palacios 

Dedicatorias

*Con todo mi amor a la persona más valerosa que
Dios me permitió conocer Aurora Bellido López†.*

Agradecimientos

Primero a Dios por ser y existir y por hacerte tangible cuando y como te necesito. Siempre gracias

A mis padres, Papi gracias por ser un apoyo a mi porvenir cuidado con la paciencia de un consejo admirado; Mami todo cuanto soy lo sembraste tú y lo haz hecho crecer....los amo.

A mi hermana por tu ternura, tu amistad y tu paciencia. Hermana, hermana....Mane, mane.

A mis tíos, primos, abuelos, sobrinos mil gracias por siempre estar y confiar en mi, los quiero mucho.

Atulo gracias por hacer de nuevo que el amor me acompañe durante el día y gracias por la gran persona que eres, te amo

A mis amigos , a los que están y a los que estudiaron , todos me enseñaron que soy mejor con uds., Caro gracias.

A la Miss Patty por su apoyo, comprensión y paciencia, pero sobre todo por demostrarme que la sabiduría es una actitud.

A la UNAAM por su gran ayuda en mi formación profesional.

Y finalmente a mis no-amigos por hacerme más fuerte.

1.INTRODUCCIÓN	4
2.ANTECEDENTES	6
2.1GENERALIDADES DE QUITOSÁN	6
2.11ORIGEN DEL QUITOSÁN.....	6
QUITINA.....	6
ESTRUCTURA DE LA QUITINA.....	6
EXTRACCIÓN DE QUITOSÁN.....	7
2.12.DEFINICIÓN DEL QUITOSÁN.....	9
QUITOSÁN.....	9
ESTRUCTURA DEL QUITOSÁN.....	9
2.13.PROPIEDADES DEL QUITOSÁN.....	9
2.14.APLICACIONES DE QUITOSÁN.....	12
EN EL ÁREA DE ALIMENTOS.....	12
EN ÁREAS DIVERSAS.....	13
2.2.SÍNTESIS DE CARBAMATOS	14
2.21.ORIGEN DE LOS CARBAMATOS.....	14
2.22.SÍNTESIS DEL QUITOMETILCARBAMATO.....	14
2.23.SÍNTESIS DE QUITOETILCARBAMATO.....	15
2.3.MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD	
ANTIBACTERIANA	15
2.31.CRECIMIENTO BACTERIANO.....	15
MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	17
2.32.CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO.....	19
ANTIMICROBIANOS.....	19
ANTIMICROBIANOS NATURALES.....	19
EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD.....	21
CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.....	22
EFECTO DE LOS ANTIBACTERIANOS EN EL CRECIMIENTO.....	22

2.4.ANTECEDENTES DE QUITOSÁN COMO	
ANTIMICROBIANO	23
2.41.QUITOSÁN COMO AGENTE ANTIFÚNGICO	24
2.42.QUITOSÁN COMO AGENTE ANTIBACTERIANO	25
2.5.GENERALIDADES DE <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.6.GENERALIDADES DE <i>Escherichia coli</i>	28
3.OBJETIVOS	29
3.1OBJETIVO GENERAL	29
3.2.OBJETIVOS PARTICULARES	29
3.21.OBJETIVO PARTICULAR 1	29
3.22.OBJETIVO PARTICULAR 2	29
4.METODOLOGÍA	30
4.1.ACTIVIDADES	30
4.41.PREPARACIÓN DEL INÓCULO	30
4.42.SOLUCIONES PATRÓN DE QUITOCARBAMATOS Y QUITOSÁN.	
.....	30
4.43.CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.....	31
4.2.CUADRO METODOLÓGICO	32
5.RESULTADOS Y DISCUSION	33
5.1.PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRÓN	33
5.2.MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE	
QUITOCARBAMATOS	34
5.21.CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN <i>S. aureus</i> A DIFERENTES	
pH.....	35
QUITOMETILCARBAMATO VS <i>S. aureus</i> 25922.....	36
QUITOETILCARBAMATO VS <i>S. aureus</i> 25922	38
QUITOSAN VS <i>S. aureus</i> 25922.....	41

5.22.CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>E. coli</i> 8739 A DIFERENTES	
pH.....	44
QUITOMETILCARBAMATO VS <i>E. coli</i> 8739.....	44
QUITOETILCARBAMATO VS <i>E. COLI</i> 8739.....	47
QUITOSAN VS <i>E.coli</i> 8739.....	48
6.CONCLUSIONES	53
7.REFERENCIAS	55
8.APENDICES	58
8.1.Apéndice 1:COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	58
8.2.APÉNDICE 2: ABREVIATURAS.....	60

1.INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas en la industria, incluyendo la industria alimenticia, es la contaminación por bacterias. Para prevenir y atacar estos problemas, se han utilizado diversas metodologías a lo largo del tiempo, algunas tradicionales como el uso de vinagre, cera, humo, aceites, etc o la concentración de solutos, como la salmuera o el almíbar, y otras más actuales como la disminución o aumento de temperaturas como la congelación o la pasteurización.

Sin embargo, debido a la gran diversidad y adaptabilidad de los microorganismos, en ocasiones es necesario la aplicación de múltiples compuestos que tienen propiedades antimicrobianas (esto incluye antifúngicas y antibacterianas) que se pueden utilizar en diversas etapas del procesamiento. Estos compuestos inhiben o detienen el crecimiento de microorganismos e incluso eliminan el desarrollo de los mismos. Dichos compuestos se conocen como agentes antimicrobianos los cuales actúan por diferentes vías, ya que cada compuesto tiene distintos modos de acción y de aplicación, además de que cada microorganismo presenta diferente susceptibilidad a dichos compuestos.

Los antimicrobianos tienen aplicaciones inmensas dentro de la industria para evitar riesgos de contaminación en materia prima, durante el proceso o en el producto terminado. Estos agentes antimicrobianos en ocasiones muestran diversas dificultades para ser utilizados en su dosis, toxicidad, grado de pureza, reacciones secundarias, etc.; además pueden afectar las características del alimento al que se aplican. Es por esto, que el antimicrobiano debe ser inerte, no-tóxico, biocompatible y biodegradable, no sólo en el área de alimentos sino en todas las áreas, puesto que cada una de éstas tendrá exigencias específicas para cada agente. Por ejemplo: propiedades químicas, físicas y/o biológicas, forma y presentación del producto.

En los últimos 15 años, los estudios sobre quitosán han demostrado que posee propiedades antimicrobianas importantes, además de no presentar mayores dificultades como agente antimicrobiano. Dichos estudios no solo abarcan al quitosán

sino también a sus derivados en ocasiones superando el grado de inhibición que presenta el quitosán.

Puesto que cualquier sustancia al ser modificada en su estructura puede afectar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, el quitosán al ser combinado con otros compuestos presenta variaciones en su comportamiento. En la presente investigación se pretende evaluar las propiedades antibacterianas de derivados de quitosán: los quitocarbamatos.

2.ANTECEDENTES

2.1GENERALIDADES DE QUITOSÁN

2.11ORIGEN DEL QUITOSÁN

La principal fuente de obtención del quitosán es su antecesor la quitina, por esto es necesario hacer un pequeño paréntesis para conocer un poco acerca de este compuesto.

QUITINA

La quitina es el biopolímero encontrado de manera más abundante en la naturaleza después de la celulosa. El nombre de quitina deriva de la palabra griega "chiton" que significa malla, túnica o envoltura. En 1811 se describió la quitina por primera vez a partir de las investigaciones realizadas por Braconnot sobre *Agaricus volvaceus*. (7, 21,28,31)

ESTRUCTURA DE LA QUITINA

La quitina es una cadena lineal no ramificada formada de monómeros de N-acetil-D-glucosamina (Fig. 1). Este es un mucopolisacárido, componente estructural de crustáceos, insectos y la pared celular de algunos hongos. La diferencia entre la quitina y la celulosa (Fig. 2) es que el grupo 2-hidroxi de la celulosa se reemplaza por un grupo acetamido en el C-2. La quitina es un homopolímero compuesto de unidades monoméricas de N- acetilglucosamina (NAG) (Fig. 2) unidos con enlaces $\beta(1-4)$.

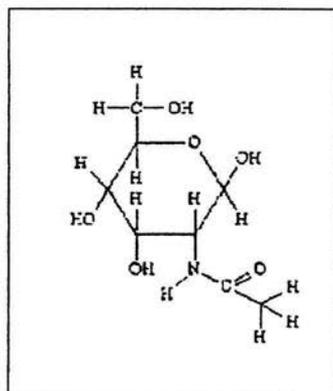


Figura 1. N-acetilglucosamina

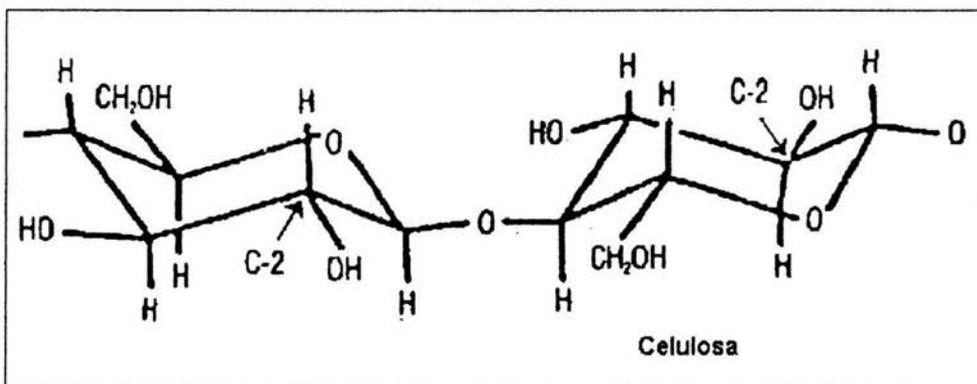
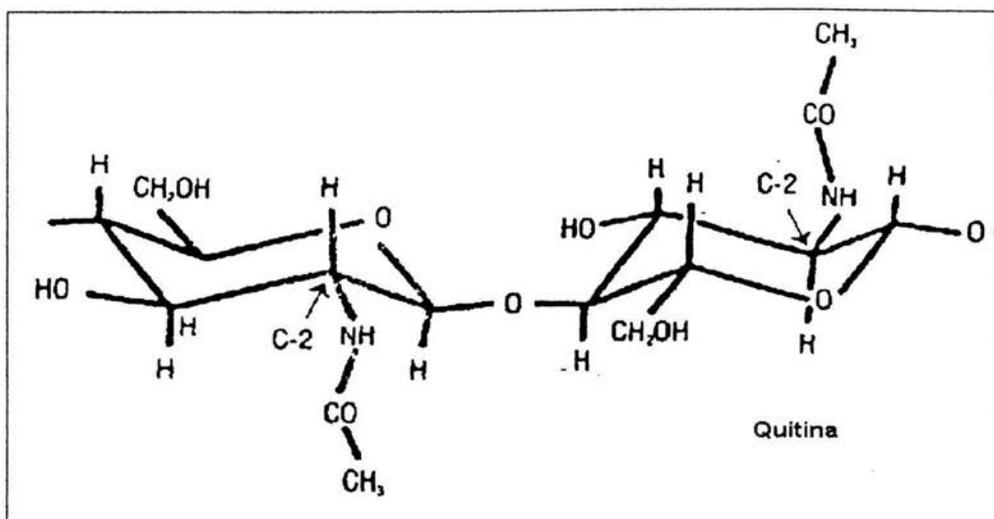


Figura 2 Estructura de Quitina y celulosa⁽²⁷⁾

EXTRACCIÓN DE QUITOSÁN

El proceso general para obtener quitina y quitosán a partir del caparazón de los crustáceos consiste básicamente en tres pasos: desmineralización, desproteínización y desacetilación (Fig. 3).

Durante la extracción de pigmentos se eliminan astaxantinas esterificadas y sin esterificar, ya que éstas son el pigmento más abundante en el cefalotórax del camarón, con casi el 90% del total de los pigmentos. ⁽¹⁹⁾

Por otro lado la desmineralización es necesaria, ya que después de las proteínas (50%), los minerales son el componente principal del cefalotórax con un 27% y los principales minerales son fosfatos y carbonatos de calcio ⁽¹⁹⁾

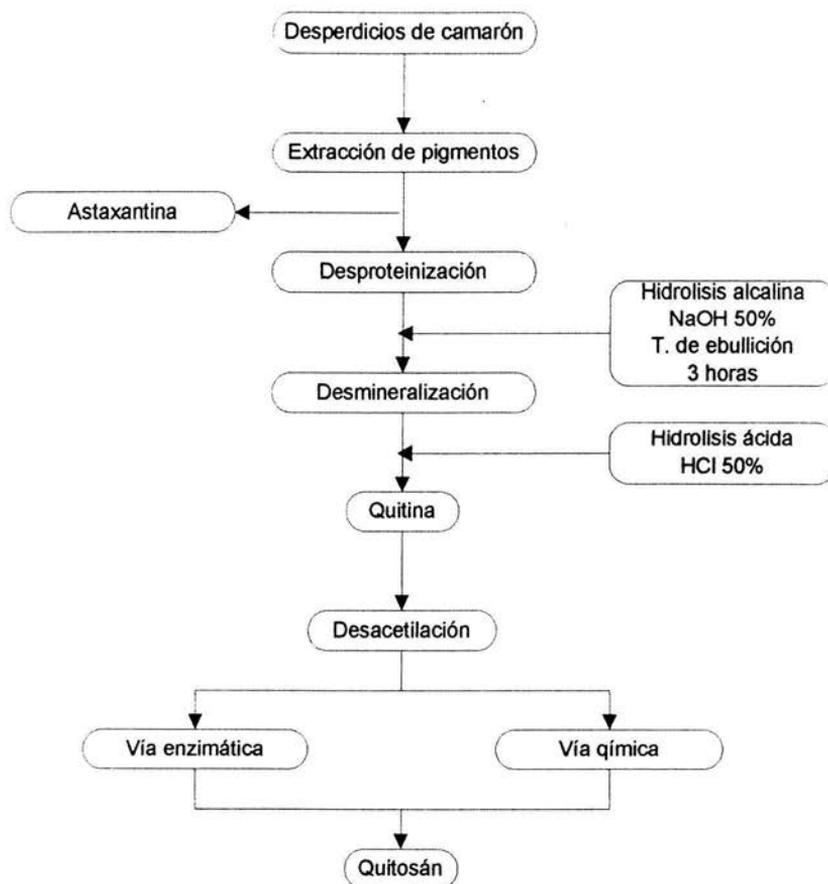


Figura 3. Diagrama de obtención de quitosán. ^(19,23, 27)

Otra forma de obtención del quitosán es la vía enzimática por medio de la quitindeacetilasa (QDA), enzima que desacetila la quitina. Este procedimiento tiene varias ventajas sobre la extracción química, siendo una de las más importantes el

ahorro de energía; aunque por el momento esto no se hace a gran escala, debido a que aún se están realizando estudios para obtener esta enzima.

El quitosán, además de obtenerse a través de la quitina, se encuentra en la pared celular de algunos hongos como el *Mucor rouxii*, *Allomyces macrogynus*, *Blastocadiella emersonii*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Aspergillus flavus*, *Phycomyces blakesleanus*, *Coprinus cinereus*, *Mortierella vinacea*, entre otros. Dichos hongos sintetizan la quitina por medio de los quitosomas para la formación del quitosán que, junto con la quitina forman el 40% de la pared celular.^(2,33)

2.12.DEFINICIÓN DEL QUITOSÁN

QUITOSÁN

Las investigaciones sobre nuevos derivados quitinosos son cada vez más importantes y exigen compuestos de mejor calidad. El quitosán es un derivado de la quitina descubierto en 1859 por Rouget.

ESTRUCTURA DEL QUITOSÁN

El quitosán se obtiene por la N-desacetilación de la quitina, es decir, el grupo acetil de la NAG se remueve y se forma la glucosamina. Esta desacetilación nunca es completa (Fig. 4).

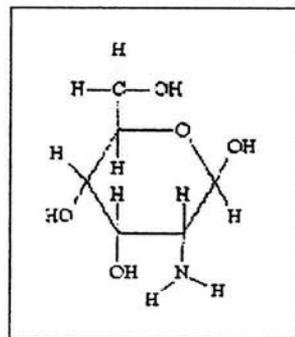


Figura 4. Glucosamina^(2/1)

2.13.PROPIEDADES DEL QUITOSÁN

El quitosán tiene varios grupos funcionales reactivos: un grupo amino, así como grupos hidroxilo primarios y secundarios en el C-2, C-3 y C-6 respectivamente como puede verse en la figura 5.⁽¹⁰⁾ Estos grupos le otorgan diferentes propiedades al quitosán, aumentando el número de puentes de hidrógeno y otorgándole flexibilidad a

la cadena. La conformación depende de la fuerza iónica, lo cual es esencial para la mucoadhesión. ⁽¹¹⁾

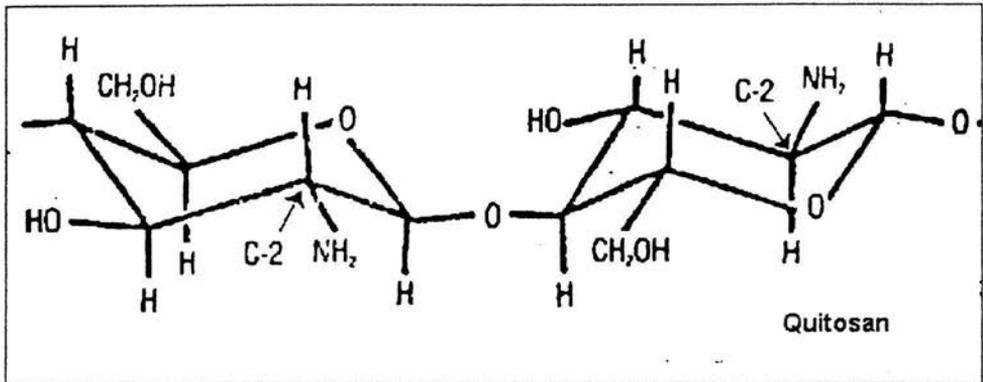


Figura 5. Estructura del quitosán ⁽²⁷⁾

El quitosán es completamente biocompatible, biodegradable y no-tóxico. Esta es la diferencia más notable entre quitina y quitosán. La dosis letal de quitosán es de 16-20 g/Kg del cuerpo en ratas ^(17,30). Disminuye el apetito de gallinas y disminuye la cantidad de huevos que ponen con dosis de 3.6-4.2 g Quitosán/ Kg de peso de la gallina por 189 días debido a que hay una incompleta digestión del quitosán. ⁽¹³⁾ Cabe aclarar que en los pocos estudios que se han realizado sobre la toxicidad del quitosán los que han demostrado cierto grado de toxicidad, han sido en combinación con alguna sal (Quitosán hidrog glutamato, quitosán hidrolactato y quitosán hidroc loruro) y puede causar efectos tóxicos ⁽⁷⁾. Sin embargo el quitosán solo no ha mostrado ningún efecto tóxico; por otro lado, en un estudio sobre la toxicidad del quitosán, se llegó a la conclusión de que quien estaba causando los efectos dañinos fue el ácido acético usado como solvente de las soluciones. ⁽⁵⁾

El quitosán tiene una alta concentración de grupos amino primarios, lo cual lo hace más nucleofílico y básico; además el quitosán es muy estable, poco sensible a la humedad. El quitosán es insoluble en soluciones acuosas neutras o alcalinas, pero es soluble en soluciones acidificadas; la tabla 1 resume algunos solventes para quitosán.

Tabla 1. Solventes para quitosán.⁽²⁷⁾

Solventes para quitosán
Ácido fórmico, agua
Ácido acético
Ácido láctico, agua
Ácido glutámico, agua

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 promueven la coagulación. De aquí que las moléculas de quitosán solvatadas sean policationes y coagulen. Otro hecho importante es que, a medida que el grado de protonación incrementa, hay una solubilización progresiva del quitosán⁽²⁶⁾. Además en medios con pH ácido llega a ser un polielectrolito. Su valor de pK es de 6.5 en ausencia de sal y de 6.4 con una concentración de 0.1M NaCl.⁽²⁶⁾

Tabla 2. Propiedades del Quitosán⁽¹³⁾.

Propiedades catiónicas del Quitosán
Polielectrolito lineal
Formación de polioxisales
Agente floculante
Alta densidad de carga
Excelente agente coagulante
Adherencia a superficies cargadas negativamente
Agente quelante iónico de metales

Este polímero; actúa como floculante catiónico, agente quelante de aniones y metales pesados tales como: $Fe^{+2,+3}$, Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Cr^{+2} , Ni^{+2} , $Pu^{+1,+2}$ y $U^{+1,+2}$.

Puede interactuar con material con carga negativa como: proteínas, polisacáridos aniónicos, ácidos nucleicos, etc. Algunas de sus propiedades se resumen en la tabla 2.

El quitosán es un excelente floculante debido a su gran número de grupos NH_3^+ que pueden interactuar con los coloides cargados negativamente.

El quitosán debe caracterizarse por su:

1. Calidad: Nivel de metales pesados y proteína, toxicidad, claridad, etc.
2. Propiedades intrínsecas: peso molecular, viscosidad, grado de desacetilación, estabilidad, etc.
3. Forma física: Tamaño de partícula, polvo, película, perla, fibra, etc. ⁽²⁷⁾

2.14.APLICACIONES DE QUITOSÁN

Debido a sus propiedades el quitosán tiene una gama muy amplia de usos; además se puede encontrar con diversas formas y con cada una de ellas tiene diferentes aplicaciones. ⁽²¹⁾

Tomando en cuenta esto, el uso del quitosán abarca áreas muy diversas como: medicina, agricultura, alimentos, cosmetología acuicultura, tratamiento de aguas residuales, farmacia, textiles, biotecnología, fotografía, papelería, además el uso y número de áreas de aplicación crece constantemente. A continuación se presentan algunos ejemplos:

EN EL ÁREA DE ALIMENTOS

- ✓ Ayuda al control de textura y estabilidad.
- ✓ Proporciona volumen.
- ✓ Controla la viscosidad.
- ✓ Ayuda en la recuperación de proteínas.
- ✓ Actúa como coagulante en el tratamiento de aguas de desecho provenientes de industrias alimenticias tales como: el procesamiento de vegetales, aves, etc.

- ✓ Activación de lodos de cervecería.
- ✓ Empaquetamiento de carnes.
- ✓ Recubrimiento de frutas y vegetales para aumentar su vida útil
- ✓ Agente antioxidante en carne
- ✓ Ayuda en el control enzimático de frutos
- ✓ Coagulante en el suero de leche para la elaboración de queso.
- ✓ Puede remover sustancias no deseadas (sólidos en suspensión) en algunos productos como jugos, cerveza y bebidas en general. (13, 14,19, 21, 27,28)

EN ÁREAS DIVERSAS

- ✓ Ayuda en la remoción de sustancias indeseables como metales pesados y plaguicidas.
- ✓ Reduce la turbidez y carga microbiana.
- ✓ Reducción de sólidos para el tratamiento de aguas.
- ✓ Agente floculante.
- ✓ Vehículo de liberación de drogas
- ✓ Espermatocida
- ✓ Se utiliza para realizar diálisis como películas o membranas
- ✓ Fabricación de lentes de contacto
- ✓ Fabricación de vendajes
- ✓ Ayuda a reducir los niveles de colesterol en sangre.
- ✓ Estimula el sistema inmunológico.
- ✓ Inmovilización de enzimas o células o para la separación de proteínas.
- ✓ Agente de encapsulamiento (encapsulación de células de mamíferos)
- ✓ Ayuda en el control de sobrepeso
- ✓ Humectante de piel.
- ✓ Recubrimiento de semillas
- ✓ Como ingrediente, incrementa el contenido de fibra dietética
- ✓ Acarrear pigmentos, sabores y nutrimentos (8,11, 19,21,27,28)

2.2.SÍNTESIS DE CARBAMATOS

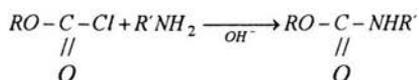
2.21.ORIGEN DE LOS CARBAMATOS

Los carbamatos son ésteres estables del ácido carbámico ($H_2N-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-OH$) el cual es

inestable y es la monoamida de ácido carbónico ($HO-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-OH$). Los carbamatos pueden

sintetizarse a partir de cloroformatos de alquilo($Cl-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-OR$) que reaccionan con amina o amoniaco. ⁽³²⁾

Como muestra la siguiente reacción⁽²⁹⁾:



Los carbamatos tienden a ser sólidos cristalinos y constituyen derivados útiles en la identificación de alcoholes. Se les nombra carbamatos porque se trata de un éster de alcohol y ácido carbámico.

El nitrógeno que contiene el quitosán se encuentra en forma de grupos amino primarios alifáticos; por consiguiente las reacciones que sufre el quitosán son las reacciones típicas de las aminas. ⁽²¹⁾

2.22.SÍNTESIS DEL QUITOMETILCARBAMATO

Se coloca el quitosán en un matraz bola de tres cuellos se le añade metilcloroformato después se añade acetato de sodio al 0.5%.El sistema se satura con nitrógeno gaseoso y la mezcla se agita por 12h a 40°C. ⁽⁶⁾



2.23. SÍNTESIS DE QUITOETILCARBAMATO

Se coloca el quitosán en un matraz bola de tres cuellos se le añaden etilcloroformato después se añade acetato de sodio al 0.5%. El sistema se satura con nitrógeno gaseoso y la mezcla se agita por 12 h a 40°C. (6)



A continuación se muestra la estructura (Fig. 6):

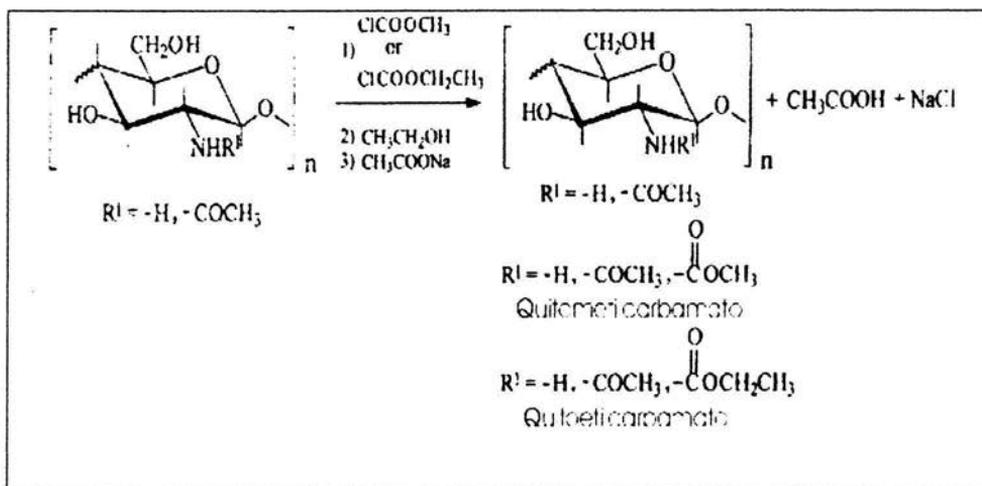


Figura 6. Estructura de los quitocabamatos (6)

2.3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

2.31. CRECIMIENTO BACTERIANO

Crecimiento es el aumento ordenado de todas las estructuras y los constituyentes celulares.

Las bacterias en condiciones ideales, crecen y se dividen continuamente. Después de cada división celular, las dos células hijas inician su ciclo de división celular. El periodo de tiempo necesario para que la bacteria cumpla con un ciclo de división se conoce como tiempo de generación o tiempo de duplicación (t_D).

El crecimiento bacteriano se comporta de manera similar a una reacción catalítica de primer orden, por lo tanto la velocidad de aumento bacteriano es proporcional al número o masa de bacterias.^(3, 20)

$$\text{Velocidad de aumento celular} = \mu \text{ (no./ masa celular)}$$

La constante de proporcionalidad μ es un índice de la velocidad de crecimiento. A menudo para definir la velocidad de crecimiento (VC) se utilizan otros parámetros como el t_D que se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo se incrementen en un factor 2; esto se deduce de la ecuación que se muestra en la siguiente figura (7):

$$\begin{aligned} \ln Z - \ln Z_0 &= \mu(t - t_0) \\ \text{si } (t - t_0) &= t_D \\ \therefore Z &= 2Z_0 \\ \ln 2Z_0 - \ln Z_0 &= \mu(t_D) \\ \ln 2 &= \mu(t_D) \\ t_D &= \frac{\ln 2}{\mu} \end{aligned}$$

Figura 7. Ecuación de t_D .

CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Durante el monitoreo del crecimiento de las bacterias (Fig. 8) se pueden encontrar 7 fases⁽⁴⁾:

1. Fase estacionaria inicial. Durante esta fase el número de bacterias permanece constante y la curva en esta fase es una línea paralela al eje de las X. En esta fase no hay duplicación celular. Esta fase puede o no presentarse.
2. Fase latencia, lag o de aceleración positiva. En esta fase las células se adaptan a las nuevas condiciones del medio; en ocasiones no se presenta esta fase. Éste

retraso puede deberse a que las células agotan diferentes coenzima u otros constituyentes y para su re-síntesis necesitan cierto tiempo.

3. Fase exponencial de crecimiento. En esta fase se lleva a cabo la duplicación celular, la velocidad de tiempo varía según la cepa y las condiciones ambientales. El incremento de los organismos es constante.

4. Fase de aceleración negativa. La duplicación celular se sigue llevando a cabo; aunque el incremento celular decrece.

5. Fase estacionaria. El incremento celular cesa; puede deberse o al agotamiento de nutrientes o a la acumulación de metabolitos tóxicos.

6. Fase acelerada de muerte. En esta fase el número de bacterias comienza a disminuir, al principio es lentamente aunque incrementa rápidamente el número de las bacterias muertas.

7. Fase de muerte. Durante esta fase la disminución celular es constante. En esta fase se presenta un declive que algunas veces se acompaña de lisis celular, cabe aclarar que no siempre se puede ver en el microscopio pero la viabilidad disminuye lentamente.

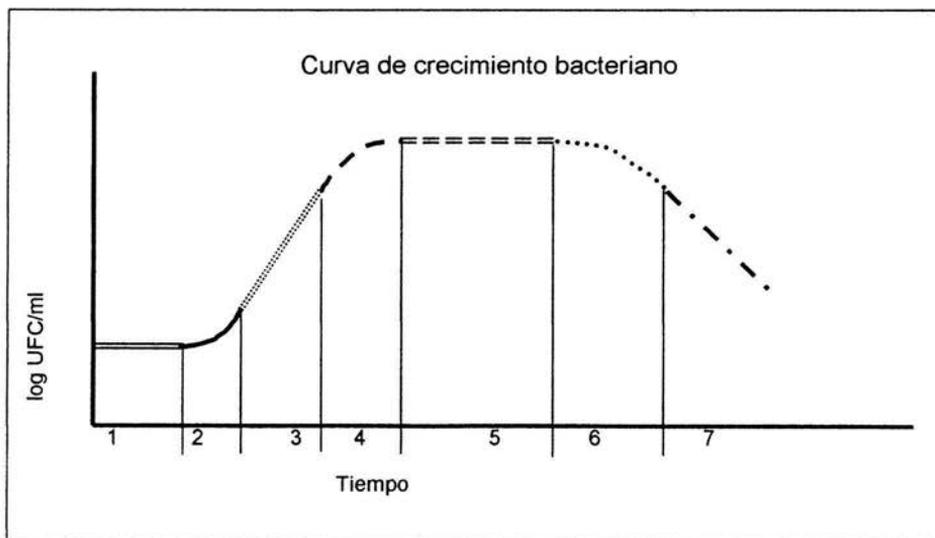


Figura 8. Cinética de crecimiento bacteriano

MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Para evaluar el crecimiento de las bacterias se debe realizar una valoración cuantitativa, las propiedades más medidas son la masa celular o el número de células⁽³⁾.

- Determinación de la masa celular. Ningún método puede diferenciar entre las células vivas y las muertas de la masa total.

1. Determinación por peso seco. Se separan las células del medio, se secan y se pesan; el peso seco suele ser entre el 22-25% del peso húmedo. Desventaja: es difícil de pesar con exactitud menos de 1 mg.

2. Método óptico. Se determina la cantidad de luz que pasa a través de una suspensión de células usando un espectrofotómetro; la reducción de la cantidad de luz transmitida como consecuencia de la difracción es una medida de densidad celular. Ventajas: es rápido.

- Determinación del número de células. Por algunos de estos métodos es posible diferenciar a las células vivas de las muertas.

- 1) Conteo microscópico directo. Se cuenta la cantidad de células individuales con un microscopio, empleando cámaras de recuento como la Petroff-Hausser o el contador de Coulter. Desventaja: es tedioso y poco práctico para una gran cantidad de muestras, es sensible (mínimo 10^6 células presentes).

- 2) Conteo de células viables. Se determina la cantidad de células que son capaces de dividirse y formar colonias. Se utilizan dos métodos:

- a) **conteo de placa servida (vaciado en placa o siembra en profundidad)** el agar se mezcla con la suspensión bacteriana y se sirve. Una desventaja de este método es que los organismos dañados por el leve calentamiento no se pueden contar.

- b) **conteo de placa extendida (de superficie)** una muestra se coloca en una placa con el medio y se extiende.

Ventajas: el conteo en placa es muy sensible, permite la identificación positiva del organismo y puede ser identificado taxonómicamente; desventajas: en suspensiones

muy densas se requiere hacer diluciones puesto que debe haber menos de 300 colonias por placa, además no existe un agar específico para cada bacteria.

2.32. CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

ANTIMICROBIANOS.

Un agente antimicrobiano es una sustancia química que destruye o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los productos naturales que son agentes antimicrobianos se denominan antibióticos y la mayoría son producidos por los microorganismos.

Los agentes que matan a los microorganismos reciben el nombre de agentes "cidas" : bactericidas, fungicidas, etc. Cuando un agente "cida" tiene un amplio espectro de organismos blancos se le llama germicida. Se dividen en antisépticos y desinfectantes; los primeros son suficientemente suaves para ser aplicado a la piel o mucosas y los segundos no es segura su aplicación por lo tanto se aplica a objetos inanimados.

Aquellas sustancias que no matan sino solo inhiben la proliferación se denominan "estáticos": bacteriostáticos, fungistáticos, etc. Un agente "estático" debe estar presente continuamente en el producto y en consecuencia no debe ser tóxico.

Una característica importante de un antimicrobiano es su toxicidad selectiva, es decir; que es más efectivo contra el microbio y no con el huésped ya sea animal y vegetal⁽³⁾.

ANTIMICROBIANOS NATURALES

En la naturaleza existen muchos compuestos que poseen actividad antimicrobiana⁽¹⁾.

Enzimas y proteínas.

- **Conalbuminas** inhibe bacterias gram (+) y gram (-) con menor efectividad en las bacterias gram (-)

- **Lactoferrina** de la leche bovina es capaz de unirse a dos átomos de hierro por molécula por lo que inhibe a *B. stearothermophilus* como resultado de la quelación de iones de hierro, calcio y magnesio.

- La **lisozima** presente tanto en leche como en huevo cataliza la hidrólisis de enlace $\beta(1,4)$ entre la capa de peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. La lisozima es más activa contra bacterias gram (+) particularmente con las termofílicas formadoras de esporas.

- **Lactoperoxidasa**. Se encuentra naturalmente en la leche de bovinos. Cuando se combina con tiocianato y peróxido de hidrógeno, se produce un sistema antimicrobial. El sistema de lactoperoxidasa actúa principalmente contra *Lactobacillus* y *Streptococcus ssp.*

Ácidos orgánicos.

- **Ácido cítrico** se encuentra presente en gran variedad de frutos, especialmente en cítricos. Este es efectivo para bacterias termofílicas. La actividad antibacteriana se debe a la quelación de iones metálicos esenciales para el crecimiento microbiano.

- **Ácido succínico**. Se encuentra en brócoli y espárragos y varios quesos fermentados y vegetales. Inhibe algunas bacterias.

- **Ácido málico**. Se encuentra en frutas y vegetales. Inhibe levadura y algunas bacterias, probablemente actúa por una disminución del pH.

- **Ácido tartárico**. Se encuentra en uvas y piña. Su actividad antibacteriana se atribuye a la reducción del pH.

- **Ácido benzoico**. Se encuentra en arándanos, ciruela, frambuesa y clavos de olor. Es usado como agente antifúngico en bebidas de fruta, productos de fruta, productos de panadería y margarina. La molécula se difunde en la membrana del microorganismo, donde se ioniza, causando la acidificación del interior de la célula

- **Ácido láctico**. Se encuentra en productos fermentados (no se encuentra naturalmente en el alimento) encurtidos, aceitunas y algunas carnes y quesos. Inhibe el crecimiento de bacterias formadoras de esporas a pH de 5, pero no afecta el crecimiento de levaduras y mohos.

- **Ácido propiónico**. Se presenta en el queso suizo. Inhibe principalmente levaduras y mohos.

Ácidos grasos de cadena media.

- Los ácidos grasos de cadena media contienen de 12-18 carbonos, tienen mayor actividad estática que "cida", son más efectivos en bacterias gram (+). El largo de la cadena, el grado de saturación y la configuración geométrica son factores que determinan la toxicidad del ácido. La forma disociada de los ácidos es la responsable de su actividad antimicrobiana. Se inhibe el transporte de la membrana, de lo que resulta un deterioro nutricional en la célula. Se reporta que disminuye la captura de O₂.

Aceites esenciales de plantas

- El ajo, la cebolla y el poro; muestran actividad antimicrobiana. El componente del ajo que muestra actividad bactericida es *allicin*.

Pigmentos y compuestos relacionados.

- **Alcaloides, fenoles, esteroides, taninos** pueden tener actividad antimicrobiana en arándano contra *Saccharomyces boyancis*

- Las **antocianinas** inhiben algunas bacterias; tienen un efecto sobre las enzimas bacterianas.

Humulonas y lupulonas

- Ambos muestran actividad antimicrobiana las bacterias gram (-) y hongos son menos sensibles a sus efectos de lo que son las gram (+).

Cafeína

- Se encuentra en granos de cocoa y café, tiene actividad antimicótica contra *Aspergillus* y *Penicillium ssp*.

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD

Existen varios tipos de pruebas para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana. El efecto de un agente antimicrobiano se puede comparar con otro agente por medio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) . Algunas de las técnicas más utilizadas son:

- **Macrodilución en caldo.** Se preparan diluciones seriadas del antimicrobiano en caldo, después se agrega una suspensión bacteriana. Se inocula cada tubo con una suspensión del microorganismo en estudio y se incuba por 18h a 35 °C. Por este método se examina controlando la turbidez; con las ventajas y desventajas que esto implica.

- **Dilución en agar.** Se inocula una suspensión de bacterias en una serie de placas de agar, cada una con diferentes concentraciones del antimicrobiano.

- **Difusión en discos.** Se impregna el disco con el antimicrobiano e inmediatamente se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua será absorbida por el papel filtro y el antimicrobiano se difunde al medio. La concentración de antimicrobiano difundido en la interfase de crecimiento se conoce como concentración crítica y se aproxima al MIC.

- **Microdilución en caldo.** El procedimiento para microdilución es similar al de macrodilución, pero la susceptibilidad microbiana se determina en unos microtubos en una placa plástica. La ventaja es que se usan pequeños volúmenes de reactivos y se manejan gran número de bacterias; pero la gran desventaja es que se requiere de mucho trabajo para la preparación de las placas.⁽³⁾

Existen ciertos factores que se deben de controlar durante las pruebas de susceptibilidad como:

- Se normaliza a pH fisiológico (7.2 – 7.4)
- El caldo y agar Muller – Hinton ha sido seleccionado para los aislamientos bacteriológicos aerobios y anaerobios facultativos.
- Los cationes divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) afectan los datos de susceptibilidad. Se ha dicho que en *Pseudomonas* se afecta la permeabilidad de la pared celular.
- El pH puede disminuir si se usan incubadoras con CO_2 por la formación de ácido carbónico.
- Se debe incubar a 35 °C

CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.

Un parámetro de comparación entre los diferentes agentes antibacterianos es el MIC (Minimal Inhibitory Concentration) éste valor es la concentración mínima necesaria para la inhibición completa del crecimiento bacteriano. Entre más potente sea el agente es más baja la concentración de éste.

EFECTO DE LOS ANTIBACTERIANOS EN EL CRECIMIENTO.

La manera más precisa de observar el efecto de una sustancia química es agregarla a una concentración inhibitoria en un cultivo y hacer un muestreo en cuanto a su viabilidad⁽³⁾.

En la figura 9 se pueden observar tres tipos de efectos:

1. Bacteriostáticos. Inhibe el crecimiento pero no causa la muerte. Estos agentes regularmente inhiben la síntesis proteica y actúan uniéndose a los ribosomas.
2. Bactericidas. Evitan la proliferación inducen a la muerte pero no producen lisis celular.
3. Bacteriolíticos. Producen lisis celular, regularmente se observa turbidez después de que se agrega dicha sustancia.

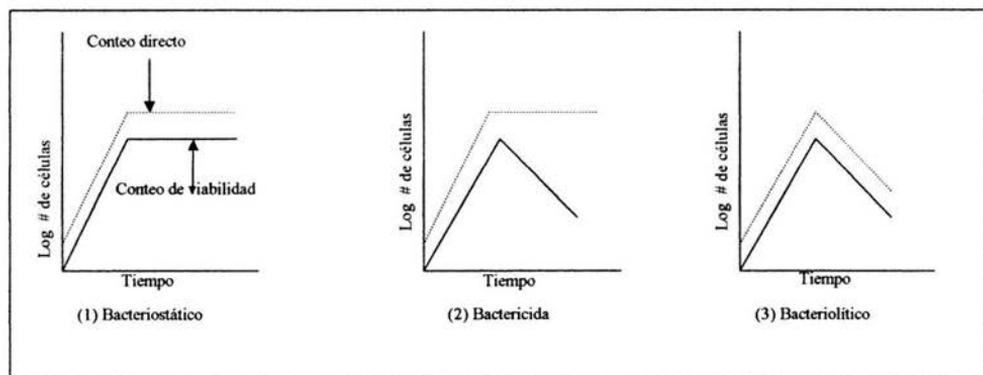


Figura 9. Efecto de agentes antibacterianos. ⁽³⁾

2.4. ANTECEDENTES DE QUITOSÁN COMO ANTIMICROBIANO

La actividad antimicrobiana del quitosán ha sido estudiada desde varios años atrás, el modo de acción definitivo de este polímero, no ha sido determinado aún. La actividad antimicrobiana del quitosán abarca tanto mohos y levaduras como bacterias.

Por sus características el quitosán se puede considerar como un agente antimicrobiano catiónico.

Al probar su actividad antimicrobiana no solo se han hecho estudios sobre quitosán sino también en algunos derivados.

2.41. QUITOSÁN COMO AGENTE ANTIFÚNGICO

El efecto del quitosán en comparación de Roval^{®1} en la descomposición de la fresa fresca debido a la acción de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus sp.* ⁽¹⁰⁾ Demostró que es más efectivo el quitosán ya que en un periodo de almacenamiento de 29 días con Roval[®] se descomponen un 33% y con quitosán de un 22-19%.

El efecto fungistático del quitosán se puede atribuir a la habilidad de quitosán a inducir a las enzimas como la quitosanasa y β -1,3-glucanasa y fitoalexinas o una combinación de ambas. ⁽¹⁰⁾

Además el quitosán otorga un efecto de firmeza, acidez, y retarda la síntesis de antocianinas de la fresa, almacenadas a 4 °C⁽¹⁰⁾.

Con el tomate también tiene algunos efectos benéficos como la disminución de la producción de etileno y CO₂, además mejora la firmeza y se desarrolla más rápidamente el color, debido a una modificación endógena de O₂, CO₂ y C₂H₄.

Se han propuesto dos modos de acción del quitosán para la inhibición del crecimiento:

1. La naturaleza policatiónica interfiere con la carga negativa de las macromoléculas residuales de la pared celular. El quitosán y otras poliaminas interactúan con la membrana celular alterando su permeabilidad. Estudios sobre absorción de UV indican que el quitosán causa una fuga considerable de material proteico de *Pythium paroecandrum* a pH de 5.8.⁽³⁰⁾

2. El otro mecanismo envuelve la unión de quitosán con DNA inhibiendo la síntesis de mRNA. Se ha propuesto que cuando el quitosán es liberado de la pared celular de

¹ Funguicida comercial: Iprodiona

hongos patógenos, por enzimas hidrolíticas de la planta huésped; el quitosán penetra el núcleo del hongo e interfiere con la síntesis de mRNA y proteínas.⁽³⁰⁾

2.42.QUITOSÁN COMO AGENTE ANTIBACTERIANO

Entre los agentes antibacterianos los cationicos han mostrado ser ampliamente útiles para la desinfección externa y presentan varias ventajas sobre otros agentes desinfectantes, como: gran actividad antibacteriana, espectros de actividad mayores, elevado porcentaje de muerte y menor grado de toxicidad para células mamíferas.⁽¹⁸⁾

“El sitio activo de biocidas de bajo peso molecular es la membrana citoplásmica en las bacterias y el modo de acción es el siguiente:

- a. adsorción en la superficie celular de la bacteria
- b. difusión a través de la pared celular
- c. unión con la membrana citoplásmica
- d. ruptura de la membrana citoplásmica
- e. descarga de constituyentes del citoplasma como K^{+2} , ADN y ARN y
- f. muerte celular”⁽¹⁸⁾

Con polímeros catiónicos mejora la adsorción sobre la superficie celular, ya que la carga de densidad de polielectrolitos de cadena simple aumenta con el peso molecular (PM), lo que favorece la unión con la membrana citoplásmica. De acuerdo con resultados experimentales se mostró que los procesos a, c y d se ven mejorados por el alto PM del quitosán, mientras que el proceso b se ve dañado por el alto PM⁽¹⁸⁾

Los biocidas policatiónicos incluyendo al quitosán pueden interactuar y formar complejos polielectrolitos con polímeros ácidos producidos en la superficie celular de la bacteria.⁽¹⁶⁾

Este efecto sobre la actividad antibacteriana y antifúngica a partir del PM se ha abordado por diferentes autores y se ha concluido que:

- I. El quitosán con PM de 10,000 a 100,000 puede ayudar a retardar el crecimiento bacteriano.

- II. Con un PM de 220 000 la actividad antibacterial es más activa.
- III. Quitosán con PM de 9300 provoca un retraso en el crecimiento de *E. coli*, mientras que quitosán con un peso de 2200 acelera el crecimiento. ⁽¹⁶⁾

Dietilaminoetil-quitosán con un grado de desacetilación de 0.73² fue probado como agente antibacteriano sobre *S. aureus* (ATCC 6538P) y *E. coli* (ATCC 14339) con concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm, se mostró mayor actividad antibacteriana contra *S. aureus* que contra *E. coli*, estas diferencias pueden explicarse por la diferencia en la estructura de las paredes celulares. ⁽¹⁸⁾

Tres sales cuaternarias de amonio derivadas de quitosán: N,N,N- trimetil quitosán, N-N- propil-N,N-dimetil quitosán y N- furfuril- N,N-dimetil quitosán, fueron probadas como agentes antibacterianos, con tres diferentes PM y se determinó la MIC y la concentración mínima bactericida. "La actividad antibacteriana contra *E. coli* de N-N- propil-N,N-dimetil quitosán es mayor que la de N,N,N- trimetil quitosán demostrando que la cadena larga de alquil afecta fuertemente la actividad antibacteriana de los derivados de quitosán concordando con lo dicho en los estudios de Kim ⁽¹⁶⁾ En este caso se muestra una mayor actividad de las sales de quitosán que del mismo quitosán. ⁽¹⁶⁾

La actividad antibacteriana contra *E. coli* fue afectada por el pH; esto puede explicarse por fenómenos de protonación de NH₂, cuando el pH es bajo el grupo amino en el C₂ puede ser protonado, lo cual favorece la interacción con la superficie negativa de la bacteria. ⁽¹⁶⁾

El efecto inhibitorio de quitosán sobre el crecimiento de algunas bacterias presentes en la carne tales como: *Pseudomona fragi*, *S. aureus* y *Bacillus subtilis* fueron inhibidas por 0.01% de quitosán, siendo *E. coli* la más resistente a diferencia de las otras bacterias y se inhibió con 0.1% ⁽⁹⁾

El crecimiento microbiano produce cambios organolépticos indeseables en la carne durante el almacenamiento. Películas basadas en quitosán (quitosán/ácido acético,

² Estimado por áreas relativas de señales de H-NMR (18)

quitosán/ácido acético/ácido laurico y quitosán/ácido acético/cinamaldehído) redujeron el crecimiento de enterobacterias sobre la superficie de pastrami durante con 21 días de almacenamiento; con estas películas en Bologna se llegó a una completa inhibición de los microorganismos.⁽²⁴⁾

Uno de los efectos del quitosán sobre las bacterias es el aglutinamiento. Con bajas concentraciones (0.1mg/ml) de quitosán se une a la carga negativa de la superficie de la bacteria y causa aglutinación. A altas concentraciones (2-5 mg/ml) el gran número de cargas positivas, han impartido una carga neta positiva a la superficie de la bacteria para así mantenerla en suspensión.⁽³⁰⁾

Un estudio sobre *E. coli* donde se midió la pérdida de β -galactosidasa como componente estructura de la bacteria; se encontró que la mayor parte de la pérdida de la enzima fue con una concentración de 0.1 mg/ml de quitosán que coincide con un mayor aglutinamiento y el máximo efecto antibacteriano en el estudio. Esto sugiere que el efecto antibacteriano se debe a la pérdida de material intracelular. A bajas concentraciones el quitosán puede haberse unido a la superficie de la bacteria para distribuirse en la membrana celular y causar la muerte celular.⁽³⁰⁾

El quitosán y tres quitoooligosacáridos hidrolizados de alto, medio y bajo peso molecular mostraron un efecto inhibitorio significativo. El quitosán es muy efectivo en la inhibición de *E. coli* aunque su concentración requerida para la completa inhibición varíe de acuerdo al grado de acetilación, peso molecular y grupos funcionales.⁽¹⁵⁾

En algunos casos el derivado de quitosán puede aumentar o disminuir su efecto antibacteriano, en el caso de los quitoooligosacáridos el efecto se vio disminuido.⁽¹⁵⁾

2.5.GENERALIDADES DE *Staphylococcus aureus*

Es un organismo procarionte, tiene forma esférica por lo que podemos decir que es un coco, en una tinción de gram nos da una coloración violeta por lo que es gram (+). Es una bacteria aerobia facultativa. La coloración de las colonias van del amarillo pálido al naranja dependiendo el agar en el que se encuentren.⁽²⁰⁾

En el caso de intoxicación por los alimentos contaminados con esta bacteria se relaciona directamente con la enterotoxina que produce; cuyas reacciones son: náuseas, vómito y diarrea. Los alimentos que más fácilmente pueden contaminarse son los flanes, pudines y postres horneados rellenos de crema, aves, huevo, carne y sus derivados, salsas y aderezos cremosos.

Para prevenir es recomendable refrigerar los alimentos, ya que la bacteria no se reproduce en frío; pero si la toxina se produjo durante la elaboración ésta no se inactiva ya que es bastante estable al calor.⁽³⁾

2.6.GENERALIDADES DE *Escherichia coli*

Es un organismo procarionte, anaerobio facultativo. Pertenece a la familia *enterobacteriaceae* los cuales son bacilos gram (-), los grupos celulares están solos o en pares y algunas poseen flagelos son peritricos. Es oxidasa negativo, reduce nitratos a nitritos y no requieren, ni en su desarrollo NaCl. Es fermentador de glucosa.

E. coli en el intestino grueso su tiempo de generación es de 12 h (2 duplicaciones por día) y en cultivo de 20-30 min (= 48 duplicaciones por día) Es capaz de crecer en lugares con diversas fuentes de carbono.⁽²⁰⁾

Es poblador del tracto intestinal del hombre y de los animales, la contaminación con esta bacteria en alimentos puede ser en: ensaladas mixtas, carne, aves, pescado o alimentos elaborados con poca higiene.⁽³⁾

3.OBJETIVOS

3.1OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de quitocarbamatos a través de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

3.2.OBJETIVOS PARTICULARES

3.21.OBJETIVO PARTICULAR 1

Evaluación de la actividad antibacteriana de quitometilcarbamato y quitoetilcarbamato, a tres diferentes pH y con cuatro concentraciones diferentes en cultivo líquido contra *Staphyococcus aureus*.

3.22.OBJETIVO PARTICULAR 2

Evaluación de la actividad antibacteriana de quitometilcarbamato y quitoetilcarbamato, a tres diferentes pH y con cuatro concentraciones diferentes en cultivo líquido contra *Escherichia coli*.

4.METODOLOGÍA

4.1.ACTIVIDADES

La parte experimental de la tesis se desarrolló en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Los compuestos utilizados en la experimentación fueron otorgados por el Dr. Galo Cárdenas de la Universidad de Concepción, Chile. Los derivados de quitosán que se utilizaron son quitometilcarbamato y quitoetilcarbamato obtenidos de quitosán con un peso molecular de 58, 000 g/mol y un grado de desacetilación de 84%, los cuales se conservan en los derivados.

Las bacterias que se utilizaron son de colección : *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* 25922

4.41.PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se prepararon 60 ml de caldo nutritivo estéril³. Se inoculó con una colonia de la cepa ; tanto de *E. coli* 8739 como de *S. aureus* 25922. Se mantuvo en un agitador rotatorio New Brunswick a una velocidad de 150 rpm, a 37°C ± 2, por 20-24 h. Este fue el inóculo que se utilizó para iniciar las cinéticas.

4.42.SOLUCIONES PATRÓN DE QUITOCARBAMATOS Y QUITOSÁN.

Se prepararon soluciones de quitosán, quitometilcarbamato y quitoetilcarbamato, en las cuales cada 20 ml de éstas contenían 500 ppm del compuesto, a cada solución se le ajustó el pH a 4.5, 5.5 y 6.5 con cada uno de los compuestos, como lo indica la tabla 5.

³ Véase formulación en apéndice 1

A partir de las soluciones patrón se adicionó a cada uno de los matraces de las cinéticas la cantidad correspondiente a 500, 250, 125 y 62.2 ppm de cada uno de los compuestos para iniciar la cinéticas.

Tabla 3. Ajuste de pH de las diluciones de quitosán y quitocarbamatos.

Concentración Compuesto	500ppm			250 ppm			125 ppm			62.5 ppm		
	Quitosán	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5
Quitometilcarbamato	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
Quitoetilcarbamato	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5

4.43. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante un cinética de crecimiento, evaluándose así el efecto de los derivados, se tomó como control positivo a el quitosán y como control negativo se utilizó agua al pH correspondiente. (véase cuadro metodológico, figura 10)

Las cinéticas se llevaron a cabo de la siguiente manera: En matraces de 500ml con la cantidad correspondiente de la solución de quitosán, quitometilcarbamato y quitoetilcarbamato y 10 ml del inóculo completando un total de 250 ml. La cinética de crecimiento se siguió tomando una muestra de caldo de cultivo cada hora hasta completar 5 horas, a una temperatura de 37°C ±2 con agitación constante dentro de agitador rotatorio New Brunswick a una velocidad de 150 rpm. De las muestras se hicieron diluciones décuples de 1 ml en tubos de ensaye con solución salina fisiológica al 0.85% . Después se sembraron 100 µl por siembra en superficie en placas con agar Müller-Hinton⁴ para *S. aureus* 25922 y agar McConkey⁵ para *E. coli* 8739, éstas se dejaron incubar por 18-24h y se realizó un conteo de células viables, los datos se analizaron y graficaron, para obtener la velocidad de crecimiento de los microorganismos a diferentes condiciones de pH y concentración.

⁴ Véase formulación en apéndice 1

⁵ Véase formulación en apéndice 1

4.2. CUADRO METODOLÓGICO

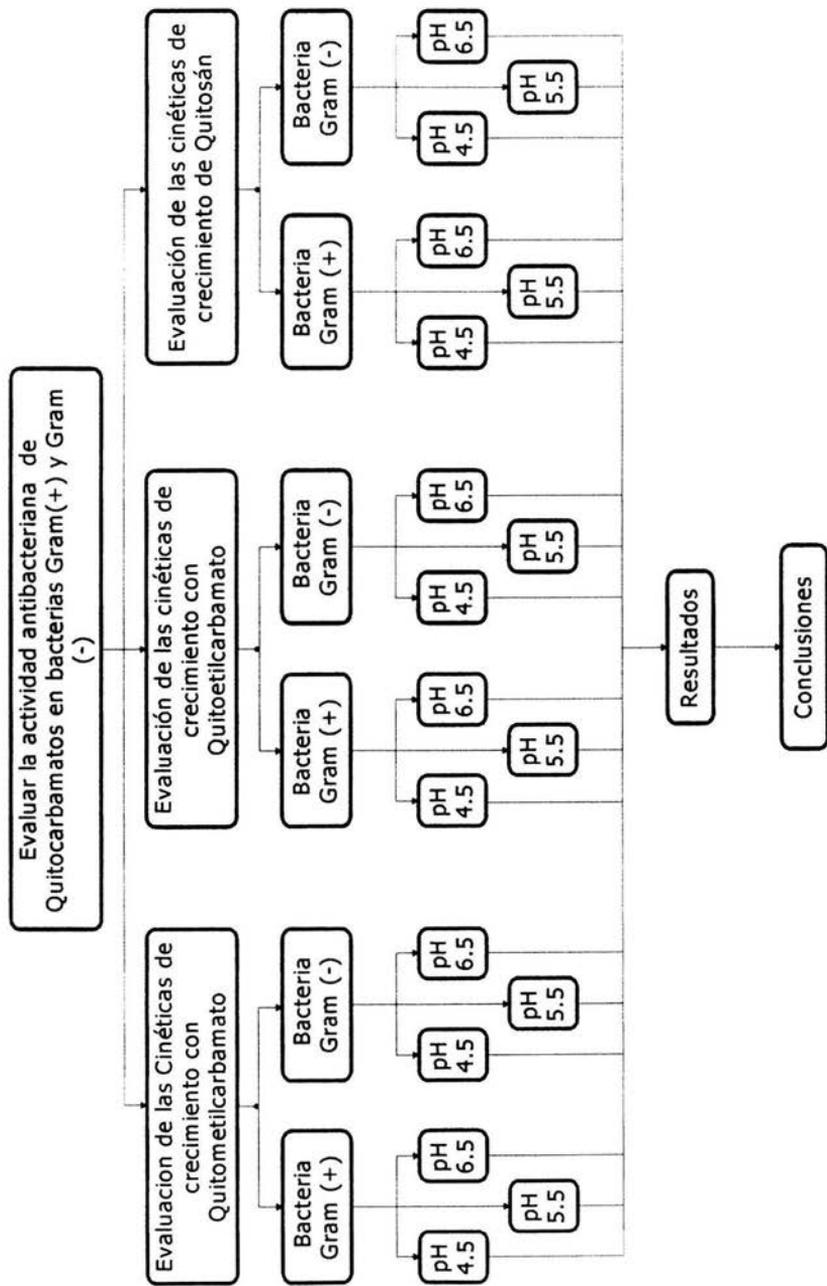


Figura 10. Cuadro metodológico

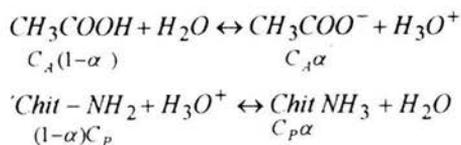
5.RESULTADOS Y DISCUSION

Fueron utilizadas dos bacterias pertenecientes tanto al grupo de los gram positivos, como al de los negativos; estas bacterias tienen diferencias básicas en su pared celular; el propósito de haber elegido estas bacterias fue ver el comportamiento de los quitocarbamatos con cada una de ellas.

5.1.PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRÓN

Los quitocarbamatos utilizados en la experimentación son derivados de quitosán con un grado de desacetilación (GD) de 84% y un peso molecular (PM) de 58000 g/mol. ⁽⁶⁾ La modificación de las propiedades del quitosán por medio de radiaciones provocaron el mejoramiento de su actividad antimicrobiana, cuando este fue irradiado a 100 KGy. La disminución de la viscosidad del quitosán indica la degradación del polímero y una disminución en su PM.⁽²²⁾ Se ha comprobado que las características físicas, químicas y biológicas del quitosán influyen en sus propiedades; y el PM y GD son de los aspectos más importantes ^(6,27,31). Además el grado de acetilación tiene un papel clave en la adhesión y proliferación celular; ya que con un mayor grado de acetilación sobre películas de quitosán menor es la proliferación celular ⁽⁸⁾.

Para la preparación de las soluciones de quitometilcarbamato y el quitoetilcarbamato solo fue necesario agitación para disolverlos en agua con un pH de 2.52 y 2.86 respectivamente; pero en el caso de quitosán fue necesario adicionar 1 ó 2 gotas de ácido acético para la completa disolución hasta obtener un pH de 4.0. El efecto del ácido acético es un incremento progresivo del grado de protonación, envolviendo así, una solubilización progresiva hasta llegar a un equilibrio:



Donde α' es el grado de disociación del ácido acético, α es el grado de protonación del quitosán; C_A y C_P es la concentración total de ácido acético y polímero, respectivamente.⁽²⁶⁾

No fue necesario agregar grandes cantidades de ácido acético ya que con un grado de desacetilación tan alto hay varios grupos amino disponibles para protonarse⁽²³⁾

5.2.MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE QUITOCARBAMATOS

La medición de la actividad antibacteriana se determinó mediante un conteo de células viables en placa extendida. En los matraces con el caldo de cultivo se observó lo siguiente:

1. El quitosán y los quitocarbamatos por sí, generaban turbidez en el caldo
2. Durante la cinética de crecimiento se presentaron floculaciones y/o precipitados en la diversas concentraciones

Dichos aglomerados fueron sembrados y se encontró que las bacterias no estaban muertas, por lo tanto con la metodología se consiguió comprobar que tanto en las floculaciones como en los aglomerados la bacteria aún estaba viva.

Algunos autores^(15,22,25) han medido la actividad antibacteriana del quitosán a través de la absorbancia y la turbidez. Con esta metodología se puede correr el

riesgo de una lectura errónea, si los aglomerados no son dispersados homogéneamente en la solución.

Por este motivo el trabajo aquí realizado muestra el comportamiento antibacteriano del quitosán y sus derivados por medio de una cinética de crecimiento

5.21. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN *S. aureus* A DIFERENTES pH.

En la figura 11 se muestra la cinética de crecimiento de *S. aureus* 25922 en el caldo de cultivo por la adición de diferentes volúmenes de agua a pH de 5.5. Como puede observarse el efecto no muestra un cambio significativo en el crecimiento del microorganismo.

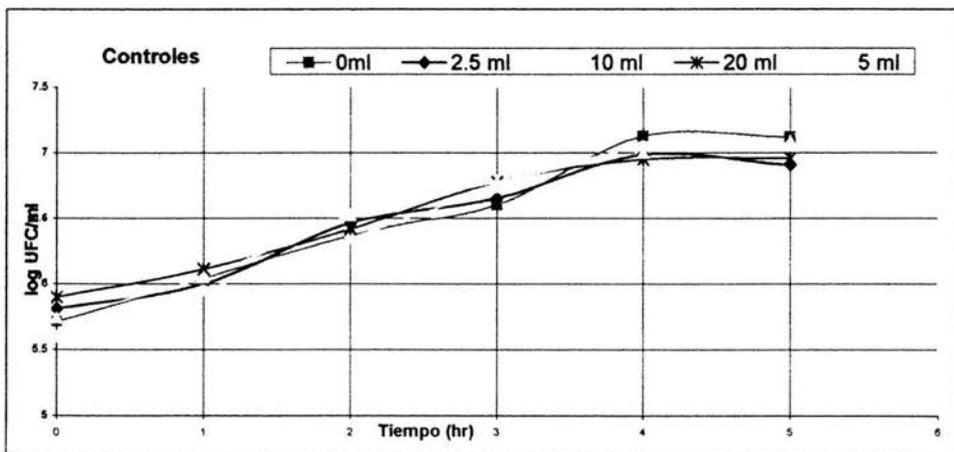


Figura 11. Cinética de crecimiento de *S. aureus* 25922 con diferente volumen de agua a pH 5.5.

La desviación estándar (DE) que se obtuvo a partir de estos datos en cada hora se reportan en la tabla 6. Como puede verse la mayor desviación estándar se presentó en la hora cero, es posible que se deba a que la bacteria se adaptó a las

diferentes condiciones ambientales, sin embargo esta desviación no se tomó como considerable.

Tabla 4. Desviación estándar.

Hora	DE
0	0.11
1	0.06
2	0.06
3	0.07
4	0.06

QUITOMETILCARBAMATO VS *S. aureus* 25922.

En la figura 12 se graficaron la variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con pH 4.5 con distintas concentraciones de quitometilcarbamato (QMC); así como su control negativo.

Durante las primera hora se puede observar que el crecimiento se ve disminuido, sin embargo a partir de la segunda hora se comenzaron a presentar floculaciones. Con las concentraciones más bajas (62.5 y 125 ppm) no hubo precipitación, con la concentración de 500 ppm las floculaciones precipitaban en aproximadamente 10 min.; a ésta concentración no es posible responder si efectivamente existe algún tipo de inhibición. En el caso de las concentraciones menores se aprecia una disminución de hasta casi un ciclo logarítmico en la quinta hora con respecto al crecimiento del control negativo (control), como se puede observar en el gráfico (Fig. 12). Sin embargo, las bacterias que se floculan no estaban muertas es por esto el comportamiento irregular con 500 ppm de QMC.

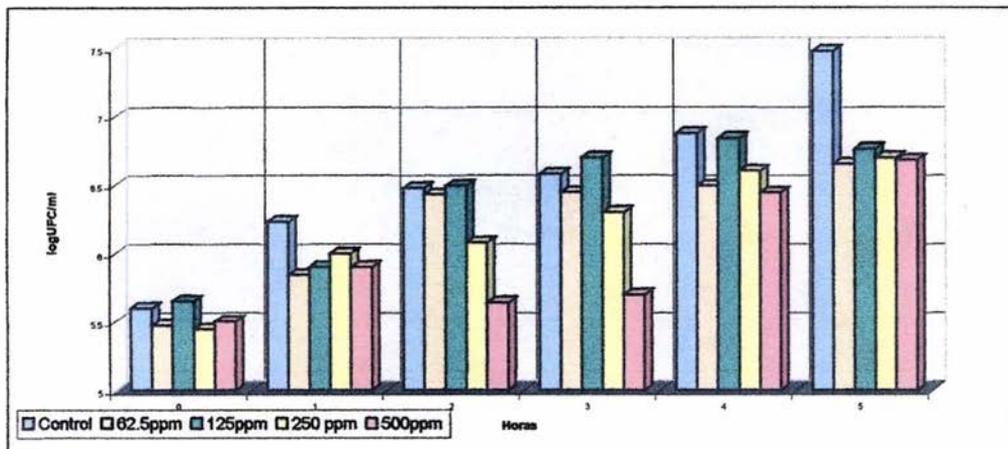


Figura 12. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con QMC a pH de 4.5

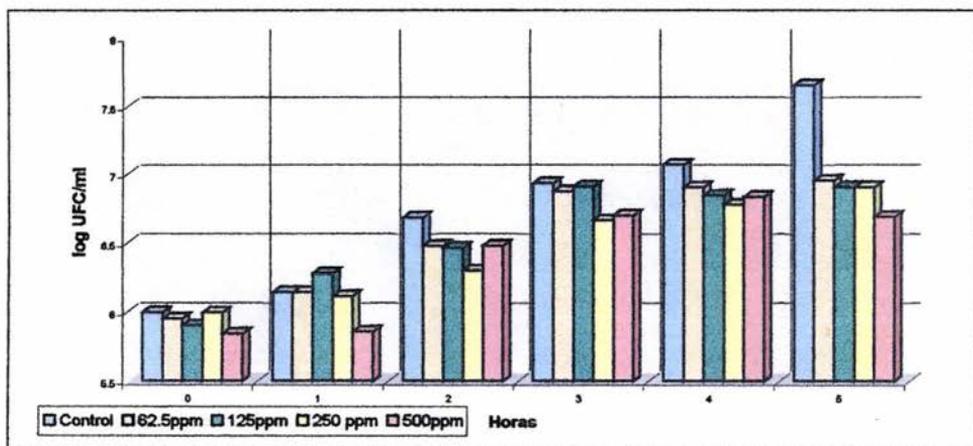


Figura 13. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con QMC a pH 5.5

La figura 13 representa el crecimiento de QMC a pH de 5.5, a pesar de que en esta ocasión, también se presentaron floculaciones. La formación del floculo fue más perceptible a pH de 4.5; sin embargo estos flóculos eran de menor tamaño y no precipitaban y la alícuota contenía floculos. También en este caso se pudo observar que existió una inhibición del crecimiento en las diferentes concentraciones; aunque de solo 0.5 ciclo logarítmico en las concentraciones más bajas.

En el caso de pH 6.5 (Fig. 14) el crecimiento bacteriano durante las primeras dos horas disminuye en las concentraciones más altas, sin embargo a partir de la tercera hora su crecimiento es incluso mas acelerado que el control negativo con las concentraciones de 125, 250 y 500 ppm y no así con la concentración de 62.5 ppm en donde si se observa un crecimiento, pero es similar a el control.

En este caso, por el contrario el crecimiento de la bacteria se vió favorecido por el QMC claro que durante las primeras hora se adapta a las nuevas condiciones ambientales.

A diferencia del pH de 4.5 y 5.5, con pH de 6.5 las floculaciones no fueron perceptibles, aunque el caldo estaba turbio y si se notó mayor claridad con la concentración más alta.

Con este compuesto las floculaciones cuanto más bajo era el pH las floculaciones precipitaban más fácilmente.

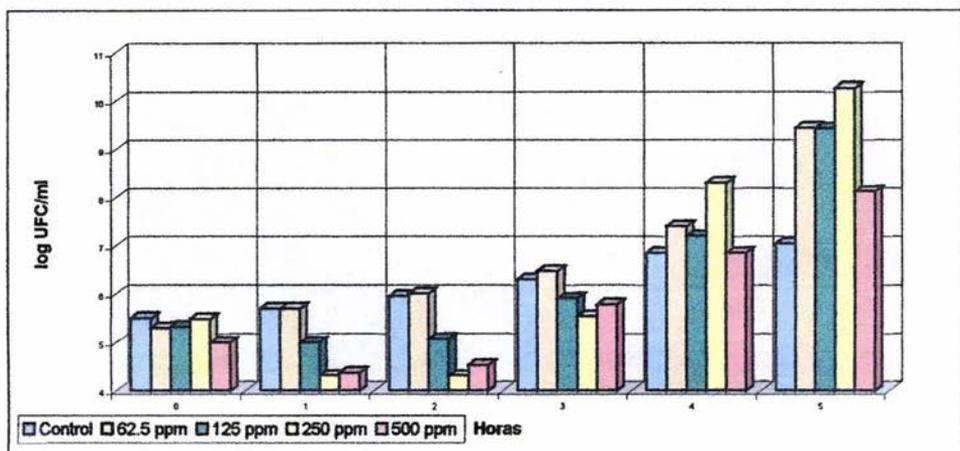


Figura 14. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con QMC a pH 6.5

QUITOETILCARBAMATO VS *S. aureus* 25922

Quando se utilizó quitoetilcarbamato (QEC) con las cuatro concentraciones y pH 4.5 (Fig. 15) las floculaciones fueron finas y precipitaban en aproximadamente 5min, aunque no quedaba el caldo completamente claro.

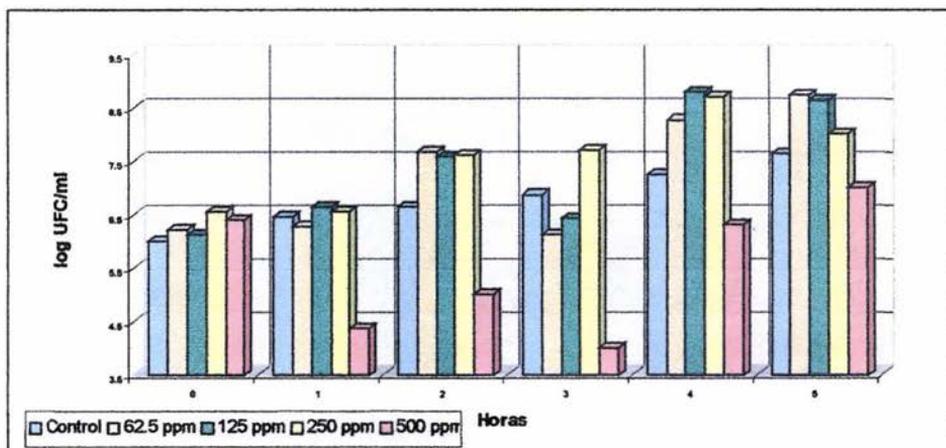


Figura 15. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con QEC a pH 4.5

Como puede observarse el comportamiento es irregular y no se observa inhibición en el crecimiento a excepción de la mayor concentración (500 ppm). Por el contrario se ve mayor crecimiento, sin embargo en este caso no se puede asegurar que se vea favorecido el crecimiento ya que cuando se sembró el precipitado se presentó crecimiento bacteriano. Además y nuevamente la bacteria esta viva en el floculo.

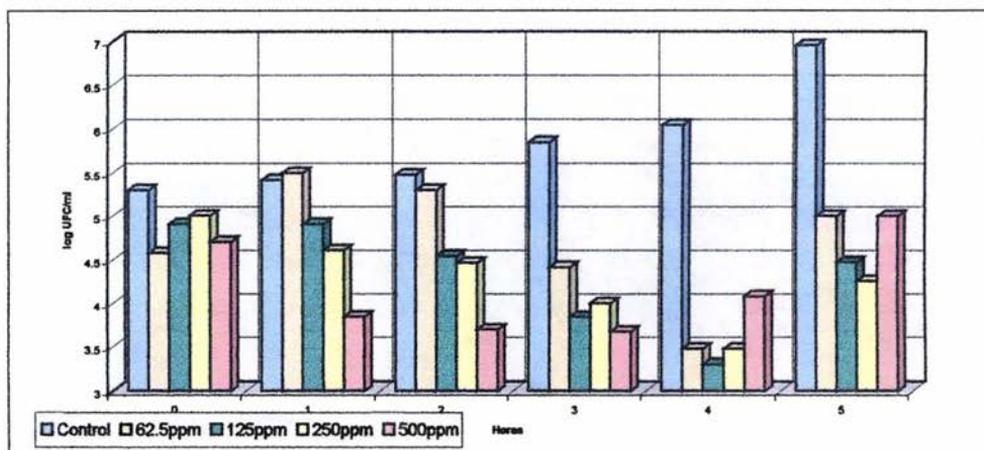


Figura 16. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con QEC a pH 5.5

La figura 16 muestra el crecimiento de *S. aureus* 25922 con QEC a pH de 5.5.

El crecimiento de *S. aureus* 25922 como se muestra en la gráfica continuó siendo irregular, se presentaron aglomerados que precipitaban sino había agitación y también hubo flóculos que permanecían en suspensión, pero en este caso si se pudo observar inhibición del crecimiento durante la cinética.

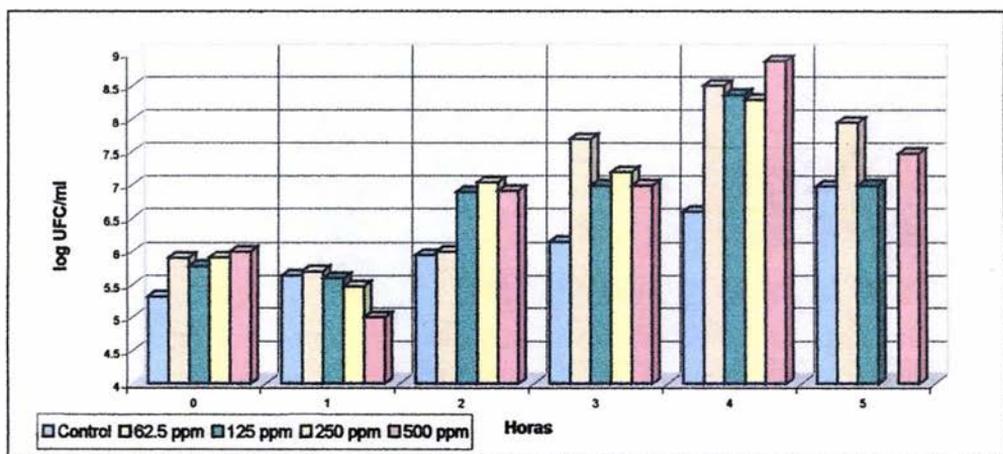


Figura 17. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con QEC a pH 6.5

En la figura siguiente (Fig. 17) podemos ver que lejos de existir un efecto inhibitorio hay un mayor crecimiento del microorganismo a partir de la tercera hora esto pudo deberse a que la bacteria primero degrado los azucares del medio y después comenzó degradar al QEC, de cualquier forma en este caso también hubo precipitación de las floculaciones.

Y a diferencia del flóculo formado con el QMC en los diferentes pH, éstos si llegaban a precipitar aunque después de estar más de 10 min sin agitación, debido a esto; para procurar evitar un comportamiento irregular debido a la captura de uno de los aglomerados en la alícuota que se plaqueaba, se dejaron precipitar los aglomerados y se tomo una alícuota sin el precipitado. Aunque cuando los aglomerados eran muy finos tardaban más de 15 min. en precipitar y eran succionados al tomar las alícuotas. Existió una peculiar característica en la formación de los aglomerados, ya que mientras mayor fue el pH la precipitación de los mismos era más ágil y además éstos eran más gruesos; y por esta causas el comportamiento a pH de 4.5 tuvo mayor irregularidad

En otro estudio ⁽³⁰⁾ de derivados: quitosan-glutamato y quitosan-lactato se obtuvo un comportamiento bacteriostático disminuyendo 1 ciclo logarítmico en el crecimiento, en este mismo estudio se obtuvieron aglomerados y se adjudica su formación a la posible carga negativa en la pared celular de la bacteria y como consecuencia la unión del quitosan que es un polication. Por otro lado quitooligosacaridos ⁽¹⁵⁾ tuvieron un efecto bactericida sobre *S. aureus* con un MIC de 0.06%.

QUITOSAN VS *S. aureus* 25922

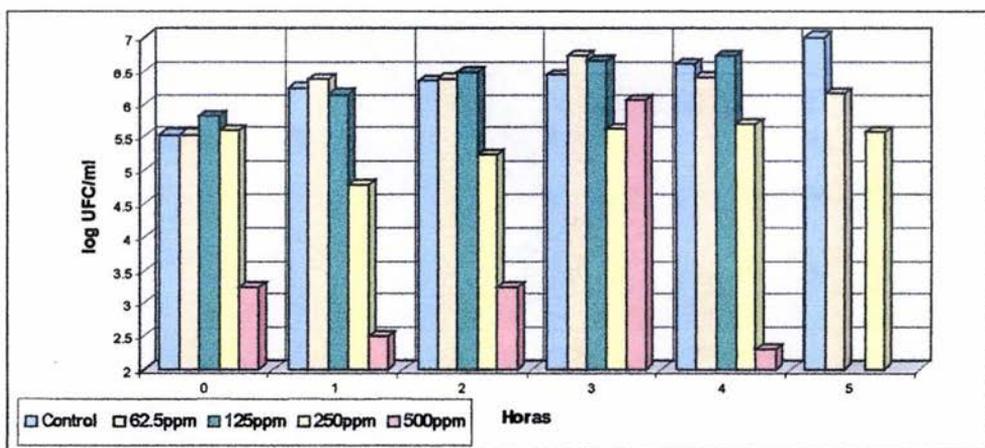


Figura 18. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con Q a pH 4.5

La figura 18 muestra el comportamiento durante la cinética de crecimiento de *S. aureus* 25922 con quitosan. Como puede observarse hay menor crecimiento mientras mayor es la concentración; sin embargo no podemos decir que existe algún tipo de comportamiento inhibitorio, ya que se formaron aglomerados los cuales precipitaban y dejaban el caldo de cultivo claro, pero dichos aglomerados al ser sembrados presentaron crecimiento por lo que se mostró que la bacteria aún esta viva. Mientras más alta era la concentración, los aglomerados eran más grande y al precipitar el caldo era más claro.

En el siguiente caso (Fig. 19) también se formaron aglomerados que causaron comportamiento irregular, pero en este caso el caldo al precipitar los aglomerados dejaban el caldo completamente claro, aunque los aglomerados eran más finos.

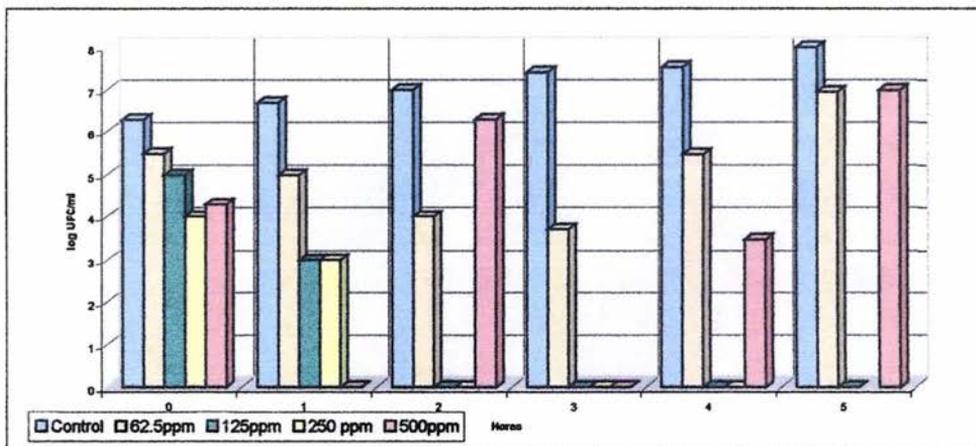


Figura 19. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con Q a pH 5.5

Este comportamiento fue muy similar para el pH de 6.5 (véase figura 20).

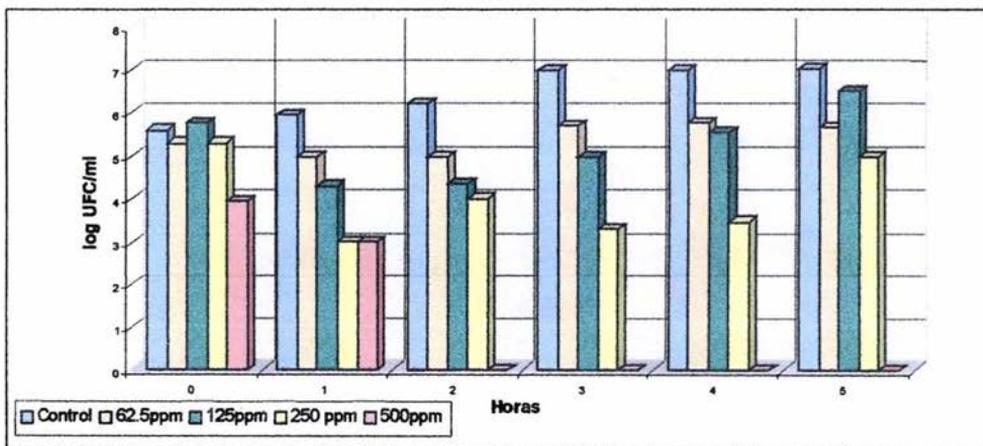


Figura 20. Variación del crecimiento de *S. aureus* 25922 con Q a pH 6.5

Comparando al QEC con su control positivo el quitosán, el comportamiento es similar, aunque con QEC caso los aglomerados son más gruesos y por el comportamiento podría decirse que actúa como bacteriostático; pero llegamos a la

misma situación: la bacteria en el aglomerado está viva; sin embargo en el sembrado del aglomerado la formación de colonias fue mayor con las concentraciones más bajas pero esto puede deberse a dos causas: primero, a medida que la concentración aumentaba los aglomerados eran más finos y el aglomerado tomado por el asa de menor tamaño y segundo que en realidad exista un efecto bacteriostático del quitosán mientras más alta fue la concentración de este.

Tabla 5. Velocidades de crecimiento de *S. aureus* 25922.

Velocidad de crecimiento (h^{-1})									
Sustancia	QMC			QEC			Quitosan		
pH	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
Conc.									
Control	0.326	0.322	0.327	0.308	0.300	0.326	0.306	0.323	0.317
62.5 ppm	C ⁶	C	C	Aglom ⁷	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom
125 ppm	C	C	C	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom
250 ppm	C	C	C	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom
500 ppm	Aglom	C	C	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom	Aglom

Por último se muestra en la tabla (No. 5) siguiente la velocidad de crecimiento de *S. aureus* 25922 obtenidas durante las cinéticas de crecimiento de los tres compuestos, las cuatro concentraciones y los tres distintos pH. De esta manera se observa que el efecto del QMC con pH de 4.5 y 5.5 es bacteriostático y a pH 6.5 prácticamente no tiene un efecto inhibitorio.

Cuando *S. aureus* fue probada en carne adicionada con quitosán por Darmadji⁽⁹⁾ se observó disminución en el crecimiento con concentraciones de 0.001%, 0.001%, 0.01%, 0.1% y 1% siendo inhibida con 0.01% de quitosán.

6 Existió crecimiento, pero no hubo aumento celular

7 Se presentaron aglomeraciones durante la cinética de crecimiento

Se observó que autores como Wang observaron que con 1-1.5% de quitosán *S. aureus* fue completamente inhibida en dos días de incubación con pH de 5.5 y 6.5. Mientras que Chang encontró que con ≥ 0.005 de quitosán fue suficiente para la completa inhibición de la bacteria⁽²⁸⁾.

Los resultados obtenidos con el Q son similares a los datos de Chang como Darmadji además coinciden en que se utilizan concentraciones cercanas a las utilizada durante la experimentación.

La diferencia en las concentraciones de la respuesta inhibitoria, puede deberse a los distintos grados de acetilación y PM del quitosán.⁽²⁸⁾

El comportamiento de QEC es semejante al del quitosán, aunque el comportamiento es más bien como un agente floculante, que puede limitar el crecimiento del microorganismo, de esta manera también se puede considerar bacteriostático.

Jeon y Park utilizaron quitooligosacaridos a partir de quitosán y encontraron que mientras el efecto bactericida del quitosán fue de 99% el de los quitooligosacaridos fue de 97-93% contra *S. aureus*.⁽¹⁵⁾ Al igual que los datos obtenidos durante la experimentación se nota un mayor efecto antibacteriano en el quitosán.

5.22.CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *E. coli* 8739 A DIFERENTES pH.

QUITOMETILCARBAMATO VS *E. coli* 8739

Al igual que con *S. aureus* 25922; el caldo de cultivo comenzó a presentar floculación desde la primera hora pero los aglomerados no precipitaron inmediatamente con todas las concentraciones; con 62.5 ppm no hubo precipitación y pudo verse un crecimiento de la bacteria relativamente regular y a partir de la tercera hora no hay aumento celular, lo que parece un comportamiento

bacteriostático por lo menos durante las 5 horas que se estuvo monitoreando la cinética (Fig. 21). Con las concentraciones mayores el comportamiento es irregular, aunque con 500 ppm, se observó un menor crecimiento desde la hora cero. Esto pudo deberse a dos causas, primero que el QMC realmente hay inhibido el crecimiento o que debido a que los flóculos precipitaban más fácilmente se hayan tomado menos microorganismos en la alícuota.

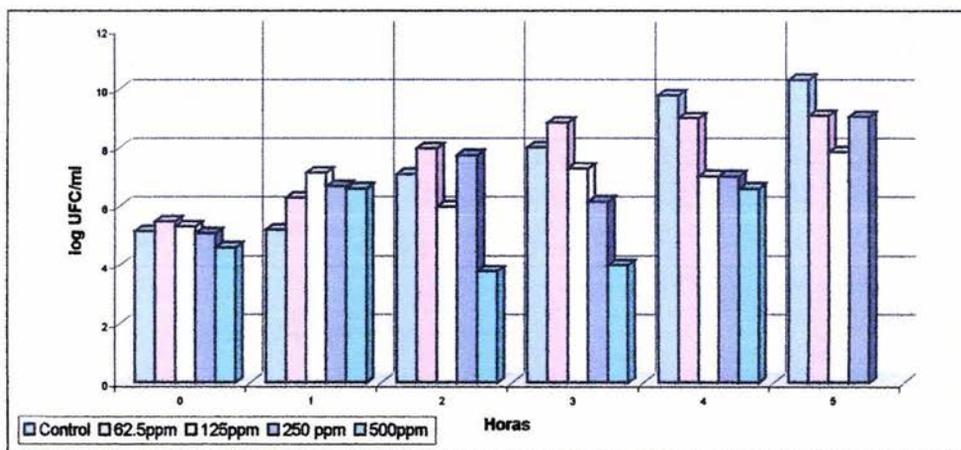


Figura 21. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con QMC a pH de 4.5

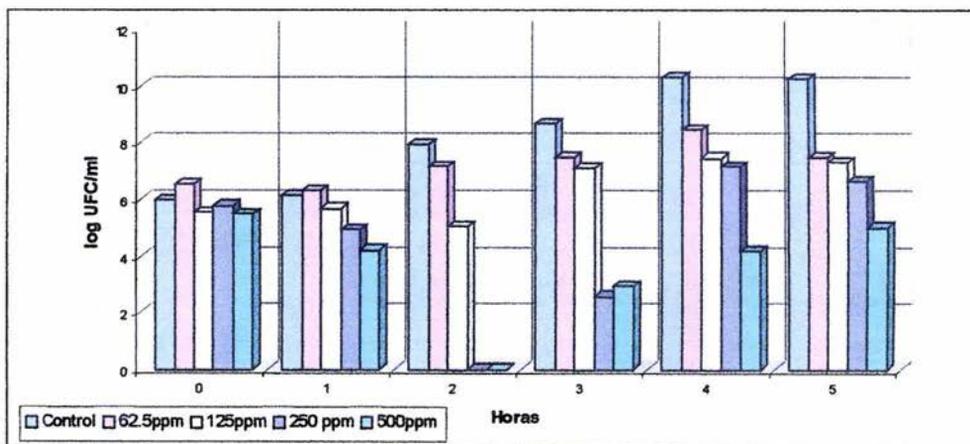


Figura 22. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con QMC a pH de 5.5

Con pH de 5.5 (Fig. 22) tanto 62.5 y 125 ppm no precipitaron. Con las concentraciones más altas el QMC tuvo un comportamiento irregular y aunque en el gráfico pareciera que existe una disminución en el crecimiento esto no puede asegurarse ya que al resembrar los aglomerados estos si proliferaron y al igual que con *S. aureus* 25922, mientras menor fue la concentración la proliferación fue mayor.

En la figura 23 se observa que con las concentraciones más altas existe una disminución en el crecimiento en las concentraciones de 250 y 500 ppm particularmente, pero al sembrar los aglomerados precipitados, se obtuvo proliferación de la bacteria ; así que no es posible asegurar que se estuvo presentando inhibición del crecimiento.

En el caso de pH de 5.5 y 6.5 la formación de aglomerados que precipitaban rápidamente no provocó tantas variaciones en el crecimiento, sin embargo asegurar que existe algún tipo de inhibición ya que no sabemos si al saturarse el QMC de la cantidad de bacteria que aglomera esta crezca en las horas siguientes.

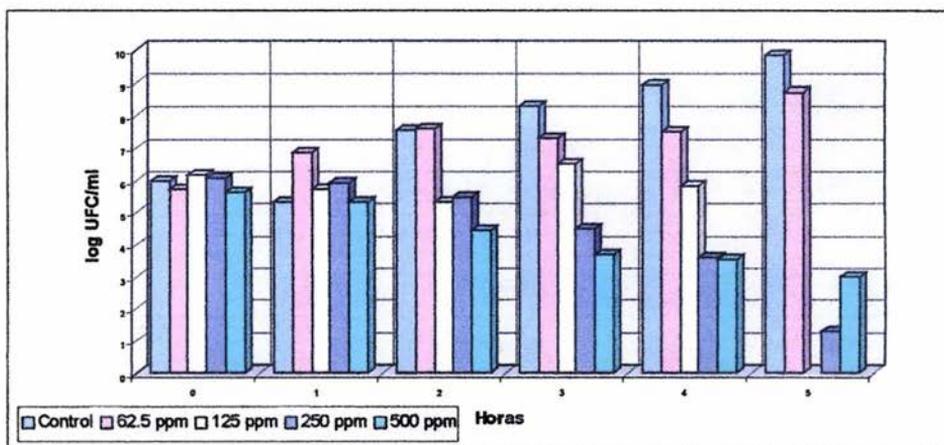


Figura 23. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con QMC a pH de 6.5

Por otro lado tampoco sabemos si la bacteria al estar aglomerada puede llevar a cabo todas sus funciones de duplicación o por cuanto tiempo puede permanecer viva, lo único que sabemos es que en los aglomerados aún esta viva.

QUITOETILCARBAMATO VS E. COLI 8739

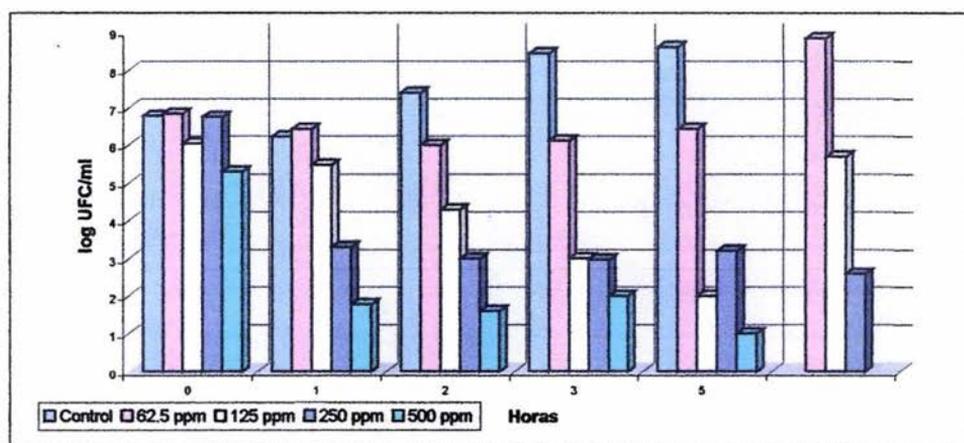


Figura 24. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con QEC a pH de 4.5

En el caso de QEC con pH de 4.5 (Fig. 24) no se presentaron ni floculaciones, ni aglomerados, haciendo más fácil el monitoreo del crecimiento. Como se puede observar hubo una disminución paulatina de la proliferación de *E. coli* 8739 al transcurrir las horas, lo que dio valores ilógicos en la μ (negativos); a partir de los datos (Tabla 8) obtenidos de la cinética de crecimiento.

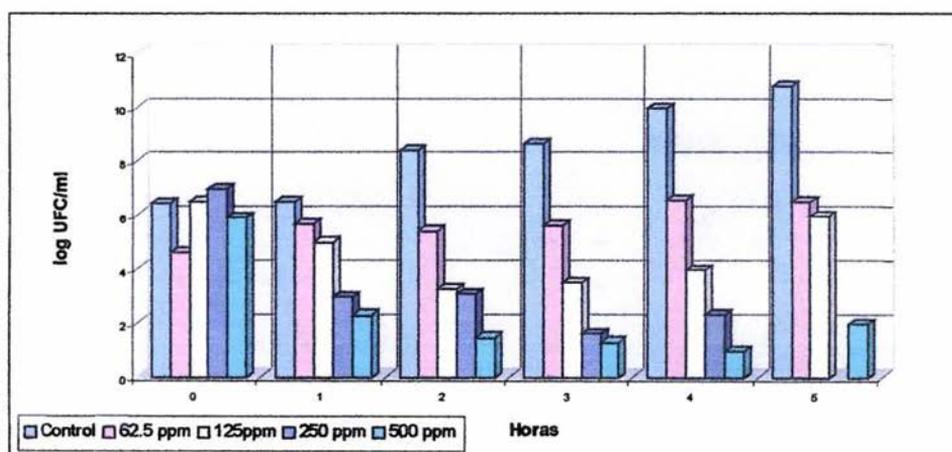


Figura 25. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con QEC a pH de 5.5

En el caso de pH 5.5 (Fig. 25) exceptuando la concentración de 62.5 ppm ninguna de las demás concentraciones presentó aumento celular y aún así en este caso el crecimiento se ve notablemente disminuido, en este caso si se puede asegurar que el QEC tiene un efecto bacteriostático, por lo menos durante el periodo que duró la cinética.

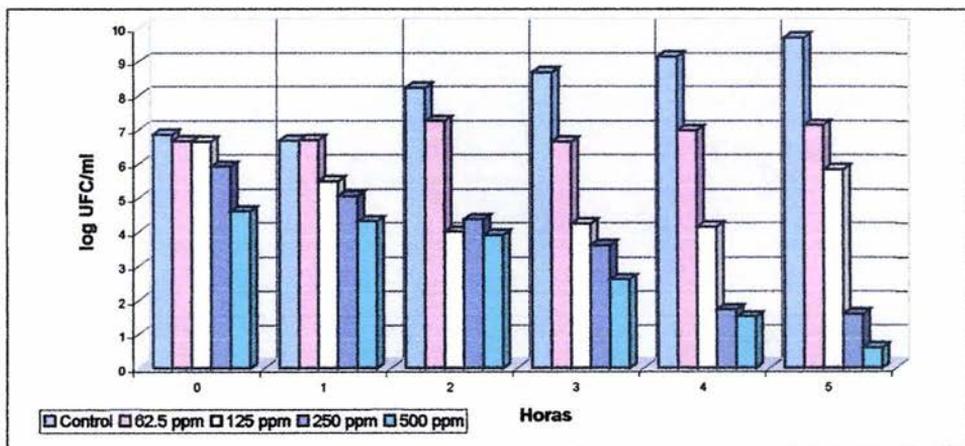


Figura 26. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con QEC a pH de 6.5

En el caso de pH 6.5 (Fig. 26) el comportamiento fue muy similar al pH 5.5 y al igual la concentración menor fue la única en no disminuir el desarrollo bacteriano pero la diferencia es que durante las cinco horas de cinética no hay aumento celular solo se mantiene, por lo tanto el comportamiento es bacteriostático.

Con QEC el aumento celular es mayor cuando el pH es más alto y la concentración menor; mientras que en las demás concentraciones el efecto es bactericida durante el tiempo de duración de la cinética.

QUITOSAN VS *E.coli* 8739

El comportamiento del control positivo, es decir del quitosán contra *E. coli* 8739 a pH de 4.5 se muestra en la figura 27. El efecto fue completamente bactericida desde la hora cero.

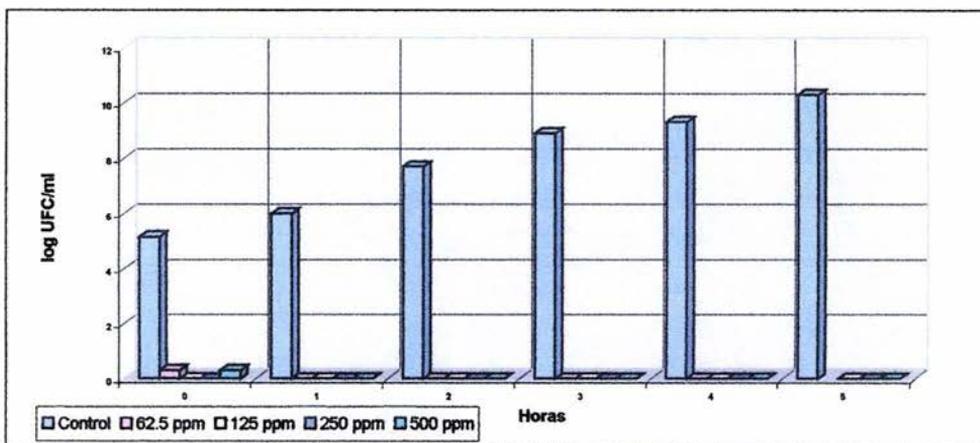


Figura 27. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con Q a pH de 4.5

El comportamiento del quitosán con pH de 5.5 y pH de 6.5 (Fig. 28 y 29) fue bactericida.

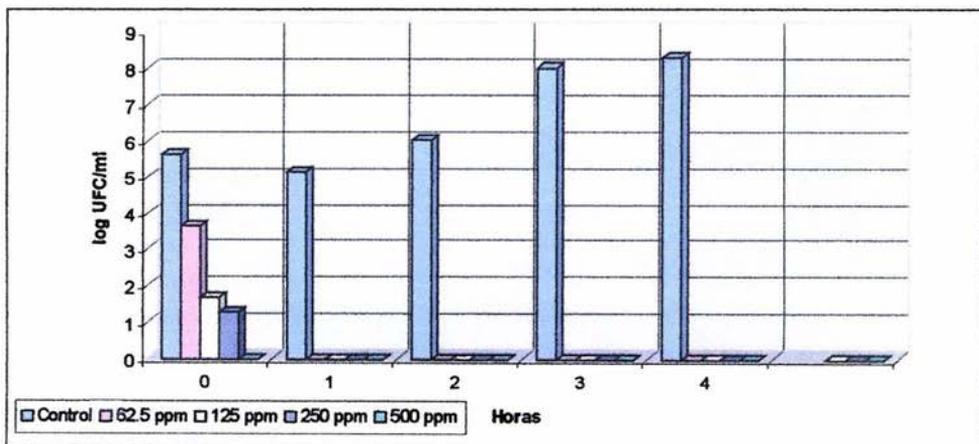


Figura 28. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con Q a pH de 5.5

Con respecto a los quitocarbamatos, el quitosán sobre *E. coli* tiene un comportamiento completamente bactericida y podemos observar que mientras más bajo fue el pH el efecto bactericida fue más drástico.

Otra diferencia notable es que su efecto "cida" es desde el momento en que se aplica, ya que desde la hora 0 el crecimiento se ve radicalmente disminuido, sino es que totalmente inhibido según la concentración; siendo las más baja las únicas que presentaron bajas proliferaciones; esto, sobre todo al pH mayor.

En otras palabras, mientras más concentrado esta el quitosán fue más drástico el efecto bactericida y a menor pH el efecto se mejoró.

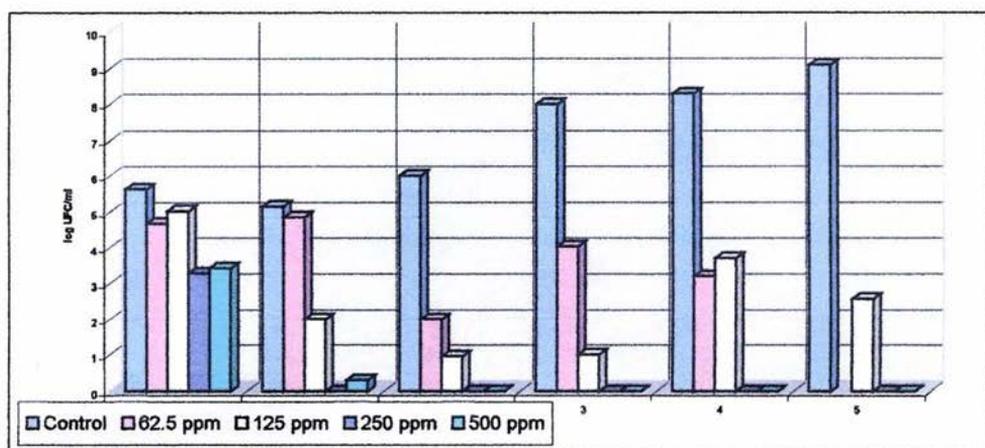


Figura 29. Variación del crecimiento de *E. coli* 8739 con Q a pH de 6.5

Darmadji encontró que *E. coli* fue más resistente a la acción del quitosán y fue inhibida al 0.1%, en comparación con *S. aureus* que se inhibió a 0.01%.⁽⁹⁾

Mientras que los datos de Wang expresaron que mientras que *S. aureus* para una completa inactivación fue de 1.0-1.5% de quitosán con *E. coli* fue de 0.5-1.0%.⁽²⁸⁾

Estos últimos datos coinciden con los obtenidos en la experimentación en cuanto a que *E. coli* es menos resistente al quitosán que *S. aureus*.

Los quiooligosacáridos sobre la *E. coli* utilizados por Jeon y Park inhibieron el crecimiento al 0.1% de quitosán; aunque para una inhibición efectiva la concentración depende del grado de acetilación, peso molecular y grupos funcionales. La actividad bactericida fue de nuevo mayor con el quitosán ya que este tuvo un 99% y los quitoologosacaridos de 98-51%⁽¹⁵⁾.

La reducción en el actividad de *E. coli* después de una hora con quitosán (2 mg/ml, pH 5.8) fue de 1 ciclo logarítmico. La máxima inhibición del crecimiento así como la mayor formación de aglutinamiento fue con una concentración de 0.1 mg/ml (30).

Simpson reportó que para una completa inhibición se requiere una concentración de $\geq 0.0075\%$ de quitosán. La variación de la concentración del quitosán existente en los diversos estudios se debe a el grado de acetilación y el peso molecular del quitosán utilizado^(15,28).

En la siguiente tabla (8) se muestra las velocidades de crecimiento que se obtuvieron en las cinéticas.

Tabla 6. Velocidad de crecimiento de *E. coli* 8739

Velocidad de crecimiento (h^{-1})									
pH Conc.	QMC			QEC			Quitosán		
	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5	4.5	5.5	6.5
Control	1.290	1.057	1.041	1.025	1.017	0.971	1.021	1.014	1.014
62.5 ppm	C ⁸	C	Aglom ⁹	C	C	NP ¹⁰	NP	NP	NP
125 ppm	Aglom	Aglom	Aglom	NP	NP	NP	NP	NP	NP
250 ppm	Aglom	Aglom	Aglom	NP	NP	NP	NP	NP	NP
500 ppm	Aglom	Aglom	Aglom	NP	NP	NP	NP	NP	NP

Jeon y Park afirman que tiene mayor efectividad el quitosán y los quitooligosacaridos sobre bacterias gram positivas que sobre las negativas⁽³¹⁾, sin embargo si se toma en cuenta que lo que se midió en dicho estudio fue la absorbancia (640 nm) y no un conteo y lo que implicó esto (por la formación de aglomerados), dicha afirmación no resulta ser tan válida. También cuando el

8 Existió crecimiento, pero no hubo aumento celular

9 Se presentaron aglomeraciones durante la cinética de crecimiento

10 No hay proliferación

quitosan fue probado con carne ⁽⁹⁾ por Darmadji la *E. coli* presentó más resistencia al quitosan (0.1%) que *S. aureus* (0.01%), pero la situación es la misma no se realizó un conteo y no se menciona si se formaron aglomerados.

La actividad de inhibición de quitosán sobre los gram (-) se debe a su estructura y propiedades químicas; ya que como un macromolécula, el quitosán es incapaz de pasar la membrana externa de los gram (-), puesto que la función de esta es servir de barrera. El rasgo distintivo de que el quitosán en su grupo amino del C-2 tenga carga positiva, le da un carácter policationico y puede suponerse la interacción con los componentes aniónicos de la superficie de los gram(-). ⁽¹²⁾

En un estudio sobre derivados de quitina concluyeron que ésta era más efectiva contra *S. aureus* que contra *E. coli* y basaron esto en las diferencias básicas que existen en las paredes celulares de ambas bacterias por ser gram positiva y negativa, respectivamente. La pared celular de las gram positivas esta compuesta de una sola capa de peptidoglicanos, es relativamente gruesa, sin embargo las redes que la forman son bastante porosas, lo que permite que moléculas extrañas penetren sin mayor dificultad. Mientras que las gram negativas tienen una membrana externa con una estructura similar a la membrana citoplásmica y esta estructura de bicapa es una barrera contra moléculas extrañas ⁽¹⁸⁾

6.CONCLUSIONES

Con el uso de la metodología para medir la actividad antibacteriana de los quitocarbamatos se encontraron ventajas:

- Primero se aplica un método más confiable en la recolección de datos en la cinética de crecimiento bacteriano; esto es el conteo directo por sembrado en superficie.
- Además se elimina el error de lectura si se midiera la turbidez en el medio donde se desarrolla la bacteria, debido a que los quitocarbamatos y el quitosán promueven la floculación de los microorganismos.

Como un primer acercamiento para evaluar la actividad antibacteriana de los quitocarbamatos se encontró que:

- los quitocarbamatos no provocan mejoran la inhibición bacteriana del quitosán. Esto confirma que la carga eléctrica que porta el grupo amino es la que actúa sobre la membrana de las bacterias.
- Mientras mayor fue el pH de la solución esta actividad se ve disminuida. Ya que nos acercamos al pK de polímero y su carga neta se neutraliza.
- El comportamiento del quitometilcarbamato es más bien "bacteriostático" con ambas bacterias, mientras que el comportamiento de quitoetilcarbamato es bacteriostático con *S. aureus* y bactericida con *E. coli*, siendo este último el más semejante al comportamiento del quitosán.

Para futuras estudios sobre los compuestos se pueden sacar varias propuestas sobre este tema:

- Alargar la medición para ver todas las fases de la curva de crecimiento y así obtener la velocidad de crecimiento desde que inicia la fase logarítmica.

- Estudiar con mayor profundidad los aglomerados obtenidos a partir del uso de los quitocarbamatos y así comprobar si existe un comportamiento antibacteriano y no sólo como floculante.
- Comprobar si el efecto que tuvieron con *E. coli* lo tienen con otras bacterias del mismo grupo e igualmente con las gram positivo.
- Proponer al quitosán para una certificación de S.S.A. para uso alimentario

7.REFERENCIAS

1. Beuchat, L.R.,D. A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technology. Jan:134-142.
2. Bom, I., S. Brul. Patent No. US 6,280,725 B1. 2001.
3. Brock, T.D.,D. W. Smith. Microbiología 4ta Ed, Prentice Hall Hispanoamericana, 1987, México.
4. Buchanan, R.E.1918. Life phases in a bacterial culture.J. Infec. Dis. 23: 109-125.
5. Bullock, G. ,V. Blazer, S. Tsukuda, S. Summerfelt. 2000. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 185:273-280.
6. Cárdenas , G., G.Cabrera B. 2002Síntesis and characterization of chitosan alkyl carbamates fungicides properties. Journal of applied polymerscience. 86(11): 2742-2747.
7. Carreño-Gómez,B. ,R. Duncan. 1997. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. International Journal of Pharmaceutics. 148 :231-240.
8. Chatelet,C., O. Damour, A. Domard. 2001.Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials. 2: 261-268.
9. Darmadji, P., M. Izumimoto. 1994. Effect of chitosan in meat preservation. Meat Science. 38: 243-254.
- 10.El Ghaouth,A., J.Arul, R. Ponnampalam and M. Boulet. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. Journal of Food Science. 56:1618-1631.
- 11.He,P., S. S. Davis, L. Illum. 1998. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. International Journal of Pharmaceutics. 166:68-75.
- 12.Helander,I.M., E.L. Nurmiaho- Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller. 2001 Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology. 71:235-244.

13. Hirano, S., C. Itakura, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, N. Kanbara, T. Kawakami. 1990. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 38: 1214-1217.
14. Imeri, A. G., D. Knorr. 1988. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *Journal of food science*. 53 (6):1707-1709.
15. Jeon, Y.J., P.J. Park, S. K. Kim. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*. 44: 71-76.
16. Jia, Z., D. Shen, W. Xu. 2001. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*. 333: 1-6.
17. Kim, S.E., P.J. Park, H.P. Yang. Adverse effect of chitosan. In: <http://wos5.isiknowledge.com/CIW.Cgi>
18. Kim, C., K. S. Choi. 1997. Synthesis and antibacterial activity of water-soluble chitin derivatives. *Polymers for Advanced Technologies*. 8:319-325.
19. Knorr, D., 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food technology*. Jan:114-122.
20. Lennete, E. H., A. Ballows, W. J. Shadomy. *Manual de microbiología clínica*. 4a Ed. Editorial Médica Panamericana, 1987, Argentina.
21. Majeti, N.V., R. Kumar. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functionals Polymers*. 46:1-27.
22. Matsushashi, S., T. Kume. 1997. Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation. *Journal of Science Food Agriculture*. 73: 237-241.
23. Miranda Castro, Susana Patricia. Evaluación de la actividad antibacteriana de quitosan caracterizado física y químicamente. UNAM. FES Cuautitlan (Tesis maestría) 2000
24. Ouattara, B., R. E. Simard, G. Piette, A. Bégin, R. A. Holley. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 62.: 139-148.
25. Rhoades, J. and S. Roller. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms and laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:80-86.
26. Rinaudo, M., G. Pavlov, J. Desbrieres. 1999. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*. 40:7029-7032.

27. Sandford, P. A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications. In: Skjak--Brík, G., T. Anthonsen, P.A. Sandford. (Eds.), Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. Elsevier science publisher. N. York. pp. 51-69.
28. Shahidi, F., J. K. V. Arachchi, Y.J. Jeon. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*. 10:37-51.
29. Solomons, T.W. *Química Organica*, 2ª Ed. Limusa. 2000. México D.F
30. Sudarshan, N. R., D.G. Hoover, D. Knorr. 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 6 (3):257-272.
31. Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos, V. Bouriotis. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in biotechnology*. 18(7):305-312.
32. Wade, L.G. *Química organica*. 2ª Ed. Pearson (Prentice Hall) 1993, México.DF.
33. Zhang, D., P. C. Quantick. 1988. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *Journal of horticulture science & biotechnology*. 73 (6):763-767.

8. APENDICES

8.1. Apéndice 1: COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Estos fueron los medios de cultivo utilizados durante la experimentación:

Agar Müller Hinton marca Merck

Para 1000 ml de agua destilada	
Componente	Gramos
Extracto de carne de res	2.000
Ácido de caseína hidrolizada	17.500
Almidón	1.500
Agar	17.000

Agar Mac conkey marca Bioxon

Para 1000 ml de agua destilada	
Componente	Gramos
Peptonona de gelatina	17.000
Mezcla de peptonas	3.000
Lactosa	10.000
Mezcla de sales biliares	1.500
Cloruro de sodio	5.000
Agar	13.500
Rojo neutro	0.030
Cristal violeta	0.001

Caldo nutritivo marca Bioxon

Para 1000 ml de agua destilada	
Componente	Gramos
Pepetona de gelatina	5.000
Extracto de carne de res	3.000

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

8.2.APÉNDICE 2: ABREVIATURAS

NAG = N-acetilglucosamina

tD = Tiempo de duplicación o tiempo de generación

μ = Índice de la velocidad de crecimiento

VC = Velocidad de crecimiento

MIC = Concentración mínima inhibitoria (Minimal Inhibitory Concentration)

PM = Peso molecular

GD = Grado de desacetilación

DE = Desviación estándar

QMC = Quitometilcarbamato

QEC = Quitoetilcarbamato

Q = Quitosán

DO = Densidad óptica

QDA = Quitindeacetilasa

ONPG=o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido