



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FUNCIONALIZACIÓN ENZIMÁTICA DE QUITOSANO CON ÁCIDO GÁLICO Y
OCTIL GALATO EMPLEANDO PEROXIDASA DE RÁBANO.**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

CLAUDIA GARCÍA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Víctor Luna Pabello

VOCAL: M. en C. Luciano Hernández Gómez

SECRETARIO: Dr. Míquel Gimeno Seco

1er. SUPLENTE: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

2do. SUPLENTE: Q. Gloria García Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química y Laboratorio de Microbiología Experimental, Edificio A, Facultad de Química. UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Míquel Gimeno Seco

SUSTENTANTE:

Claudia García Pérez

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá:

Por ser mi guía, mi maestra, mi confidente, mi amiga y la mejor.

Por tu esfuerzo y dedicación en mi educación.

Por cuidarme, aconsejarme, bendecirme y regañarme, todo para hacer de mí una mejor persona, y todo lo que soy ahora.

A Dios y a la Virgen por permitirme conocerte, quererte, acompañarte, cuidarte y compartir tantos hermosos momentos de mi vida, a tu lado.

Sin tí jamás hubiera logrado estar aquí, gracias infinitas por existir y compartir conmigo el mismo tiempo, espacio y ese amor tan especial que sólo tú supiste darme.

A mi papá:

Por tu trabajo incansable de toda la vida y procurar que jamás me falte nada. Porque gracias a tu carácter, forjaste en mí una persona responsable y capaz de realizar mis propias metas y sueños. Por darme la oportunidad de expresar mis inquietudes expresándolas en diferentes hechos.

A mis hermanos:

Memo, Javier, y en especial a Armando por tus cuidados desde niña, por transmitirme tus conocimientos y por tu paciencia.

A John: Por creer en mí desde siempre, por apoyarme moralmente en todo momento y levantarme cuando he caído. Por ser incondicional en los momentos más negros.

A Mario: Porque sin ti, la universidad jamás hubiera sido la misma.

A mi asesor de tesis Míquel y profesores que me ayudaron a lo largo de mi formación académica, así como a los compañeros que compartieron un mismo espacio en las instalaciones de la universidad.

A todos mis compañeros y amigos: Que algunos, desde hace años han estado acompañándome en muchos momentos de mi vida; porque sin ustedes, el significado de la amistad y de la vida no sería el mismo y no hubiese aprendido tanto del valor de la amistad y el compañerismo. De una o de otra manera, gracias por estar ahí y por amenizar los tiempos de estrés, echar relajo y ofrecerme su apoyo en muchas ocasiones y tiempos difíciles, por sus palabras de aliento y por muchas otras razones. Porque a pesar a varios factores en la vida, que a veces nos alejan, las personas siempre se recuerdan y se llevan en el corazón:

Antiguos amigos: Alejandra A. Cid, Aline Meza, Brenda L. Rosas, Raúl Ramos, Dante, Miriam Muñoz, Argelia, Víctor Ortega, Braulio Valenzo, José Luis Popoca, Francisco Montes de Oca y Lulú, Carla Italia, Marco A. Gervacio, Alfredo Arjona, Albert, Circe, Sandra Acevedo, Aldo Ambriz, Víctor Hugo Meza, Alberto Sánchez, Carlos Toledo, Agustín Ocampo, Luis Montes de Oca, Marco A. Poblano.

QA's y compañeros: Alejandra Escobar, Alejandra Sánchez, Ángel Salinas, Ariel, Daniela Mongradón, Azalia, Alex Díaz, Brenda Medrano, Mónica Castillo, Karina Hermoso, Cristina Morales, Daniela Mondragón, Daniel Ernesto, David Apodaca, David Hernández, Delia, Diana Macías, Dulce De la Garza, Elisa Mejía, Edgar Polo, Grecia González, Itzel Corona y Tanybeth, Jimena González, Josué Olvera, Joselin, Juan Lama, Liliana Franco, Ma. de Lourdes

González V., Mariel Calderón, Mariel Soto, Priscila Curiel, Miguel Ángel Miñón, Odín García, Paloma Cerrillo, Paloma Álvarez, Rafael Fraustro, Rodrigo de la O, Sergio Matamoros, Anita Ramos, Alan Barragán, Carlos Jair, Javier Galván, Cuahutémoc García, Fernando Ibáñez, Lilian Rentería, Félix Morales, Guillermo Platas, Gerardo Ríos, Hugo López, Jair Esquivel, Kimberly Thompson, Miguel Aguilar, Miguel Ángel Mata, Marisol Rosas, Pablo David Díaz, Miguel A. Sánchez E., Moisés Solano, Ofelia Hernández, Lila Lubianca, Perla Guzmán, Carolina Prado, Gabriela Zarco, Marco Balandrán, René De los Ríos, Ernesto Sánchez, Roberto Gallardo, Ulises Corona, Walter.

INDICE GENERAL DE TEMAS	i
INDICE DE FIGURAS	i
Figura 1. Estructura de la quitina	4
Figura 2. Esquema de la producción de los derivados de la quitina	7
Figura 3. Estructura del quitosano	7
Figura 4. Estructura del quitosano modificado.	10
Figura 5. Posibles mecanismos de inserción de moléculas de antioxidantes en la cadena de quitosano	11
Figura 6. Representación del ciclo catalítico de HRP por un sustrato fenólico y estructura de su sitio activo	15
Figura 7. Estructura del ácido gálico y octil galato	16
Figura 8. Estructura del radical DPPH (compuesto de color morado) y defenilpicrilhidrazina (compuesto de color amarillo)	22
Figura 9. Estructura del radical DPPH	33
Figura 10. Espectro de RMN de incorporación de octil galato	44
Figura 11. Espectro IR del quitosano	46
Figura 12. Espectro IR de quitosano-co-gálico	47
Figura 13. Espectro IR de quitosano-co-octil galato 15mM	48
Figura 14. Espectro IR de quitosano-co-octil galato 30mM	50
Figura 15. Espectro de rayos X de quitosano	52
Figura 16. Espectro de rayos X de quitosano-co-gálico	52
Figura 17. Espectro de rayos X de quitosano-co-octil galato 15mM	53
Figura 18. Espectro de rayos X de quitosano-co-octil galato 30mM	53
Figura 19. Termograma de quitosano	54
Figura 20. Termograma de quitosano-co-gálico	54

Figura 21. Termograma de quitosano-co-octil galato 15mM	55
Figura 22. Termograma de quitosano-co-octil galato 30mM	55
Figura 23. Crecimiento celular en MM + peptona	60
Figura 24. Matraces inoculados en MM + polímeros	60
INDICE DE GRAFICAS	ii
Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de quitosano-co-gálico	58
Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de quitosano-co-octil galato 15mM	59
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de quitosano-co-octil galato 30mM	59
INDICE DE TABLAS	ii
Tabla 1. Rendimiento de los materiales	42
Tabla 2. Bandas de interpretación IR de quitosano	47
Tabla 3. Bandas de interpretación IR de quitosano-co-gálico	48
Tabla 4. Bandas de interpretación IR de quitosano-co-oltil galato 15mM	49
Tabla 5. Bandas de interpretación IR de quitosano-co-oltil galato 30mM	51
Tabla 6. Estabilidad térmica de los materiales	55
Tabla 7. Fotografías del medio mineral con los materiales y el consorcio microbiano de cepas del género <i>Pseudomonas</i> , después de 4 días de incubación a 150rpm y 37°C	61
Tabla 8. Fotografías de lodos activados antes y después de adicionar los materiales	63

RESUMEN	1
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 QUITINA	4
2.1.1 Antecedentes	4
2.1.2 Fuentes y producción de quitina	4
2.1.3 Obtención de quitina	5
2.1.4 Derivados y aplicaciones de la quitina	6
2.2 QUITOSANO	7
2.2.1 Antecedentes	7
2.2.2 Fuentes de producción del quitosano	7
2.2.3 Obtención de quitosano	7
2.2.4 Propiedades	8
2.2.5 Aplicaciones	9
2.2.6 Modificaciones del quitosano	10
2.3 ENZIMAS	12
2.3.1 Antecedentes	13
2.3.2 Peroxidasa de rábano	13
2.3.3 Ciclo catalítico de la peroxidasa	14
2.4 ÁCIDO GÁLICO Y OCTIL GALATO	15
2.4.1 Antecedentes	16
2.4.2 Aplicaciones	16
2.5 POLÍMEROS	17
2.5.1 Clasificación de polímeros	17
2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS	19
2.6.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	19
2.6.2 Espectroscopía Infrarrojo (IR)	19
2.6.3 Rayos X	20
2.6.4 Termogavimetría (TG)	20
2.6.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	20
2.6.6 Espectroscopía Ultravioleta (UV)	21
2.7 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	21
2.7.1 Métodos para determinar la capacidad antioxidante	21
2.8 GÉNERO <i>PSEUDOMONAS</i>	24
2.9 LODOS ACTIVADOS	25
2.9.1 Antecedentes	26
CAPITULO 3. OBJETIVOS, HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y METODOLOGÍA GENERAL	27
3.1 OBJETIVOS GENERALES	27

3.1.1 Objetivos Particulares	27
3.2 HIPÓTESIS	27
3.3 JUSTIFICACIÓN	28
3.4 METODOLOGÍA GENERAL	29
CAPITULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 SÍNTESIS DE POLÍMEROS	30
4.1.1 Preparación de reactivos	30
4.1.2 Equipo utilizado	30
4.1.3 Fundamento de la técnica	30
4.1.4 Procedimiento	31
4.2 PURIFICACIÓN DE POLÍMEROS	31
4.2.1 Reactivos utilizados	31
4.2.2 Equipo utilizado	31
4.2.3 Procedimiento	31
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	32
4.4 DETERMINACIÓN DE PODER ANTIOXIDANTE	33
4.4.1 Preparación de reactivos	33
4.4.2 Equipo utilizado	33
4.4.3 Fundamento de la técnica	33
4.4.4 Procedimiento	33
4.5 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LOS POLÍMEROS EN PRESENCIA DE UN CONSORCIO MICROBIANO DE CEPAS DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	34
4.5.1 Reactivos utilizados	34
4.5.2 Equipo utilizado	35
4.5.3 Fundamento de la técnica	35
4.5.4 Procedimiento	36
4.6 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LODOS ACTIVADOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE LOS POLÍMEROS	37
4.6.1 Equipo utilizado	37
4.6.2 Fundamento de la técnica	37
4.6.3 Procedimiento	38
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE POLÍMEROS	39
5.1.1 Cálculos	39
5.1.2 Rendimiento	42
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	43
5.2.1 RMN	43
5.2.2 IR	46

5.2.3 Rayos X	52
5.2.4 Termogravimetría (TG)	54
5.2.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	55
5.3 DETERMINACIÓN DE PODER ANTIOXIDANTE	56
5.3.1 Cálculos	56
5.4 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LOS POLÍMEROS EN PRESENCIA DE UN CONSORCIO MICROBIANO DE CEPAS DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	60
5.5 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LODOS ACTIVADOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE LOS POLÍMEROS	62
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	66
BIBLIOGRAFÍA	67

RESUMEN

En este proyecto se describe la síntesis de polímeros funcionales mediante la utilización de quitosano, antioxidantes como ácido gálico y octil galato y una enzima peroxidasa de rábano que sirve para la inserción vía radicales libres de estos dos elementos en la cadena de quitosano.

El estudio de los polímeros modificados incluyó técnicas analíticas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR), Rayos X, Termogravimetría (TG) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), con el fin de observar la incorporación de ácido gálico y octil galato en la cadena de quitosano, además de observar la estabilidad térmica y posible cristalinidad de los materiales.

El quitosano modificado enzimáticamente presenta diferentes capacidades antioxidantes que se corroboraron mediante la prueba de DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidracilo); propiedades antimicrobianas, comprobadas con ayuda de un consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*); además de que no producen sustancias tóxicas, lo cual se comprobó con un análisis visual de los polímeros en lodos activados.

Estos materiales podrán utilizarse en distintos sectores de la industria sin un riesgo considerable para la salud. Se ha demostrado que el quitosano modificado ha tenido diversas aplicaciones potenciales en la industria, sin embargo, no se ha estudiado la adición de ácido gálico y octil galato al quitosano, es por ello que la síntesis de estos polímeros permite tener una nueva visión en cuanto a aplicaciones, estudio de su estructura molecular y sus propiedades.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de los polímeros utilizados actualmente son derivados del petróleo y se sintetizan por métodos químicos que no siempre son benéficos para el medio ambiente (Vachoud y col, 2001). Se ha incrementado el interés en el área de reacciones orgánicas catalizadas por enzimas *in vitro* (Kobayashi y col, 2001) con el fin de transformar sustratos naturales en una amplia variedad de materiales útiles. Las peroxidasas han sido utilizadas alternativamente debido a que son capaces de convertir sustratos fenólicos en intermediarios radicalarios, los cuales pueden reaccionar con polisacáridos para producir polímeros funcionales. En estudios anteriores se ha utilizado la peroxidasa para la inserción de dodecil galato en la cadena de quitosano (Vachoud, 2001). Esta polimerización vía radicales libres puede corroborarse mediante análisis de RMN e IR.

En el presente estudio, el quitosano funcionalizado con antioxidantes fenólicos (ácido gálico y octil galato) usando HRP (horseradish preoxidase), se determinó la incorporación de los antioxidantes a la cadena de quitosano, mediante análisis de RMN e IR, así pudieron observarse señales características que dan información acerca del porcentaje de incorporación de ácido gálico y octil galato. Adicionalmente, el estudio de RMN reflejó el porcentaje de deacetilación del quitosano Aldrich, el cual fue de 85% (Gudmun, 1989).

El estudio de rayos X permitió observar que ninguno de los materiales tenía composición cristalina en su estructura, así mismo, se realizaron pruebas de Termogravimetría para determinar las propiedades térmicas de los materiales, siendo el quitosano el más estable, y análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido con el cual no se encontró punto de fusión ni de ebullición para ninguno de los materiales.

La capacidad antioxidante del quitosano se potencializó con la inserción de los antioxidantes, siendo quitosano-co-gálico el polímero con mayor capacidad antioxidante.

El estudio con el consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas*, permitió observar la capacidad antimicrobiana de los polímeros funcionalizados, ya que ninguno de ellos permitió el desarrollo de las bacterias. Se ha reportado que esto ocurre debido a que la cadena de quitosano en medio ácido posee cargas positivas que interactúan con las cargas negativas de la pared celular de las bacterias, así, el quitosano insoluble en agua precipita y es absorbido en la superficie celular, formando una capa que bloquea los canales por los cuales la célula intercambia sustancias con el medio circundante (Quin y col, 2006).

En la prueba visual con lodos activados se observó que ninguno de los polímeros funcionalizados causa daños en la morfología de los protozoarios presentes en los lodos, lo cual demuestra que no se generan sustancias tóxicas para los microorganismos.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 QUITINA

La quitina [β (1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa] es el segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa y que proviene del caparazón de crustáceos, exoesqueleto de insectos, paredes celulares de hongos, levaduras y algas verdes. Se encuentra como agregados de unidades de N-acetil glucosamina que se unen por puentes de hidrógeno. Es insoluble en agua o en medio ácido (Lárez, 2003). En la Figura 1 se muestra la estructura molecular de la quitina.

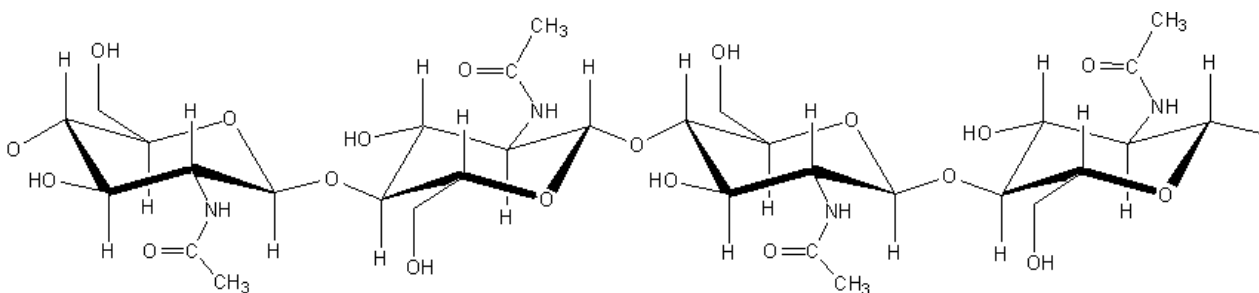


Figura 1. Estructura de la quitina

2.1.1 ANTECEDENTES

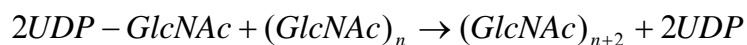
La quitina fue aislada por primera vez en 1811 a partir de hongos superiores por Braconnot, quien le puso el nombre de fúngica. Posteriormente, Odier, en un artículo sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, la llamó “quitina” (del griego *tunic*, envoltura) (Lárez, 2003).

2.1.2 FUENTES Y PRODUCCIÓN DE QUITINA

La quitina se puede obtener a partir de krill, artrópodos, plancton, los cuales, pueden producir hasta 1g de quitina/m² por año. Se estima que aproximadamente el 75% del peso vivo de cada espécimen es desecho. Estos desechos contienen componentes que pueden ser utilizados en las industrias, se calcula que entre el 20 y 58% del peso seco de estos

desechos es quitina (Mármol y col, 2006).

La síntesis de la quitina se da por la enzima quitin-sintasa de un nucleótido que funge como sustrato, uridin-difosfo-N-acetilglucosamina



Esta síntesis ocurre en la membrana plasmática y en vesículas citoplasmáticas. Además requiere la actividad de iones magnesio.

Las patas de cangrejo son fáciles de obtener de las plantas procesadoras de carne de camarón y son la principal fuente de producción industrial de la quitina.

La producción anual de quitina por compañías japonesas es alrededor de 2,000 toneladas.

2.1.3 OBTENCIÓN DE QUITINA

El aislamiento de quitina requiere de tres operaciones básicas (Gudmund, 1989):

❁ **Desmineralización:** Se emplean soluciones diluidas de HCl u otros ácidos a fin de eliminar el carbonato de calcio de los caparazones de crustáceos. Se evitan las temperaturas altas porque degradan el polímero, para evitar esto, puede utilizarse EDTA como agente complejante.

❁ **Desproteínización:**

Química: con soluciones de NaOH del 1 al 10% a temperaturas de 65 a 100°C durante 1 a 24 h para disolver la proteína (Mármol y col, 2006).

Enzimática: Digestión enzimática o fermentación con bacterias proteolíticas con actividad no quitinolítica. El proceso enzimático disminuye la degradación química de la quitina, pero no hay una eliminación completa de la proteína.

❁ **Decoloración:** Se realiza con la finalidad de eliminar los pigmentos carotenoides que poseen naturalmente los caparazones de los crustáceos. Se emplea acetona, cloroformo,

éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de disolventes, aunque también se han utilizado agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno del 0.5 al 3%, el hipoclorito de sodio al 0.3% y el permanganato de potasio al 0.02% a 60 °C. Las desventajas del uso de agentes oxidantes es que atacan los grupos amino libres y pueden modificar al polímero.

2.1.4 DERIVADOS Y APLICACIONES DE LA QUITINA

Debido a que la quitina es una fuente natural biológicamente reproducible, no contaminante y con un DL₅₀ muy alto (16g/kg de peso corporal en ratones), se le ha dado diversos usos en la industria, tanto a la quitina comercial como a sus derivados. Algunas de las aplicaciones son la utilización para fertilizantes funcionales y quelante de metales.

Algunos de los derivados de la quitina son:

- Alquil-quitina
- Derivado N-arilidina o N-alquilidina
- Derivado N-acil
- Derivado deoxihalo
- Derivado N-alquil
- Derivado O-carboxi u O-hidroxi-alquil
- Derivado Despolimerizado
- Derivado O-sulfonil
- Derivado Sulfatado, fosforilado o nitrado

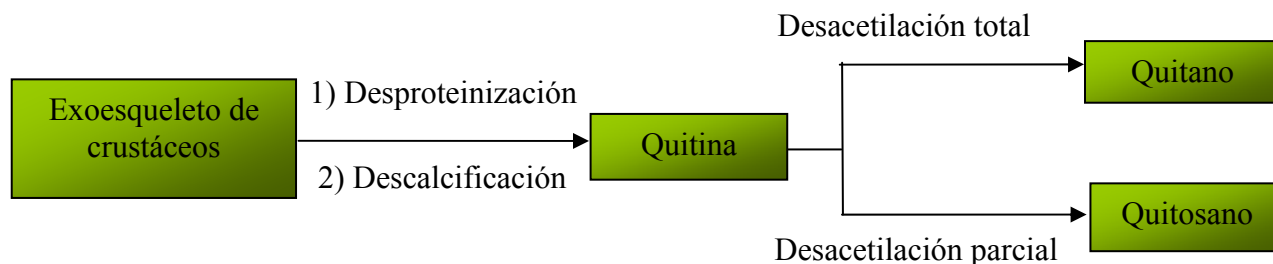


Figura 2. Esquema de la producción de los derivados de la quitina (Lárez, 2003)

2.2 QUITOSANO

El quitosano [poli-β (1→4) N-acetil-D-glucosamina] es un biopoliaminosacárido (Qin y col, 2006) derivado N-deacetilado de la quitina. Su estructura se muestra en la figura 3.

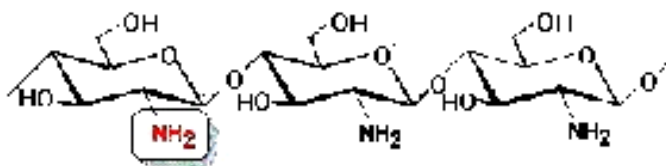


Figura 3. Estructura del quitosano (Mármol y col, 2006).

2.2.1 ANTECEDENTES

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. En el año de 1894 cuando Hoppe-Seyler sometió a la quitina a reflujo a 180°C en hidróxido de potasio y observó que el producto que se formaba era bastante soluble en ácido acético y clorhídrico y lo denominó quitosano (Lárez, 2003).

2.2.2 FUENTES DE PRODUCCIÓN DEL QUITOSANO

El quitosano se encuentra en forma natural en las paredes celulares de algunos hongos como *aspergillus* y *mucor*, y en caparazones de crustáceos como el cangrejo, camarón y langostas (Qin y col, 2006). El rendimiento de quitosano por concha de cangrejo seca es del 20 al 30% aproximadamente (Gudmund, 1989).

2.2.3 OBTENCIÓN DE QUITOSANO

🌟 **Métodos químicos:** Por hidrólisis de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas

por periodos de tiempo cortos. Para evitar la pérdida de peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante para evitar su despolimerización.

❁ **Métodos enzimáticos:** La quitina desacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de quitina a quitosano por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. Por este método se obtiene un material uniforme en cuanto a sus propiedades químicas y físicas, pero se necesita un tratamiento previo debido a que la enzima necesita que la quitina sea soluble (Gudmund, 1989).

2.2.4 PROPIEDADES DEL QUITOSANO

El quitosano es insoluble en pH neutros, alcalinos y en agua, pero es soluble en ácidos diluidos como acético, fórmico, láctico, ácido glutámico y ácido clorhídrico (Lárez, 2003) debido a la protonación de los grupos amino de la cadena de quitosano. Cuando el grupo amino adquiere una carga positiva, el quitosano forma soluciones viscosas y precipita, forma geles con polianiones, es soluble a pH menores de 6.5 (Qin y col, 2006), aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas formando sales, debido a que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6.5

Se ha demostrado que el quitosano posee actividad antimicrobiana sólo en medio ácido, debido a su baja solubilidad a valores altos de pH (Qin y col, 2006) y daña a algunos hongos debido a su amplio espectro de actividad, alta velocidad de reacción y niveles bajos de toxicidad en células de mamíferos. La concentración mínima inhibitoria requerida varía según el microorganismo, siendo también dependiente del pH del medio, grado de polimerización, así como la presencia o no de sustancias tales como lípidos y proteínas que pueden interferir.

Las propiedades antimicrobianas del quitosano pueden deberse a la interacción entre las

cargas positivas presentes en el quitosano en medio ácido y las cargas negativas en la membrana celular de los microorganismos. La interacción puede provocar la degradación de algunos constituyentes celulares como la pared celular, alterando su permeabilidad y causando la muerte del microorganismo.

Otra posible explicación es que el quitosano penetra en la membrana del microorganismo e interactúa con el DNA, inhibiendo la síntesis de RNA mensajero, la síntesis de proteínas y de enzimas (Alonso, 2009).

2.2.5 APLICACIONES

EL quitosano se ha utilizado en la industria textil para evitar el encogimiento de los tejidos, en la elaboración de papeles para aumentar su capacidad de retención de agua y en cosméticos para aumentar las propiedades humectantes. Además, al no ser un compuesto tóxico, biocompatible y biodegradable, ofrece un alto potencial en aplicaciones biomédicas, en la industria de alimentos para el recubrimiento de vegetales, semillas y frutos post-cosecha (Curcio y col., 2009), protección frente a plagas, estimulante del crecimiento, en biotecnología para la inmovilización de enzimas, separación de proteínas, en medicina para suturas y por sus propiedades antimicrobianas, como excipiente farmacéutico (Illum, 1998), ya que se ha reportado que el quitosano puede degradarse en tejidos humanos por enzimas como quitinasa y lisozima, ésta última, es secretada por macrófagos y neutrófilos (Verheul y col, 2009). Como clarificador en bebidas, en la coagulación del queso, como agente espesante en la industria alimentaria, para disminuir la oxidación y como aditivo. En tratamientos de agua, como floculante, quelante de metales pesados y contaminantes, precipitantes de proteínas, partículas en suspensión y pesticidas. Se ha visto que las propiedades del quitosano dependen de su grado de deacetilación (Lavertu y col, 2003).

2.2.6 MODIFICACIONES DEL QUITOSANO

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles y también se han estudiado por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de inserción, obtención de películas entrecruzadas, entre otros, de los cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones en biotecnología, alimentos y medicamentos, entre otras áreas. Las modificaciones químicas del quitosano son generalmente menos preferidas para la aplicación en alimentos, debido a la formación de productos perjudiciales (Curcio y col. 2009).

La inserción de ácido gálico y octil galato ocurre en las posiciones 2 y 5 del anillo aromático de los antioxidantes, empleando la peroxidasa de rábano para obtener los copolímeros en este trabajo experimental, tal como se muestra en la figura 4. La ventaja de utilizar enzimas en la síntesis de materiales poliméricos útiles, es evitar el uso de reactivos tóxicos que puedan dañar el medio ambiente, es así que se ha incrementado el interés en el área de síntesis orgánica catalizada por enzimas *in vitro*, ya que de este modo se favorece la llamada “química verde de polímeros” para disminuir el daño al medio ambiente (Kobayashi y col, 2001).

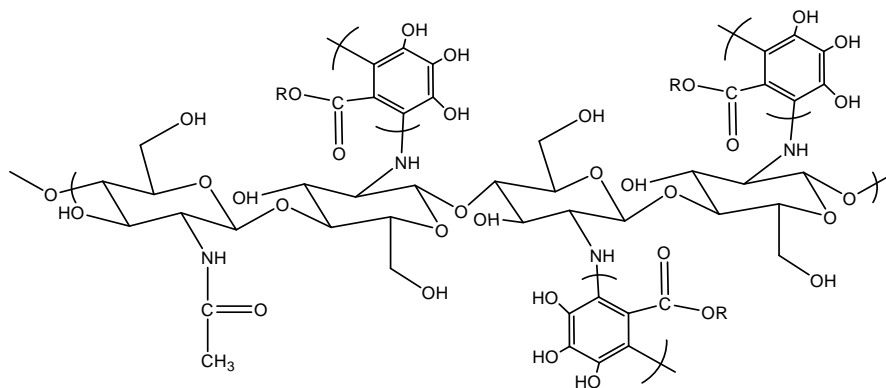


Figura 4. Estructura del quitosano modificado. R corresponde a un H en el caso de ácido gálico y a la cadena alifática $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ en el caso del octil galato.

Los posibles mecanismos para la inserción de los antioxidantes ácido gálico y octil galato se muestran en la figura 5. Los radicales hidroxilo, generados por la interacción entre los componentes del par redox (H_2O_2 /antioxidante), atacan a los átomos de H en alfa metileno (CH_2) o grupos OH del grupo hidroximetileno del quitosano (Curcio y col, 2009).

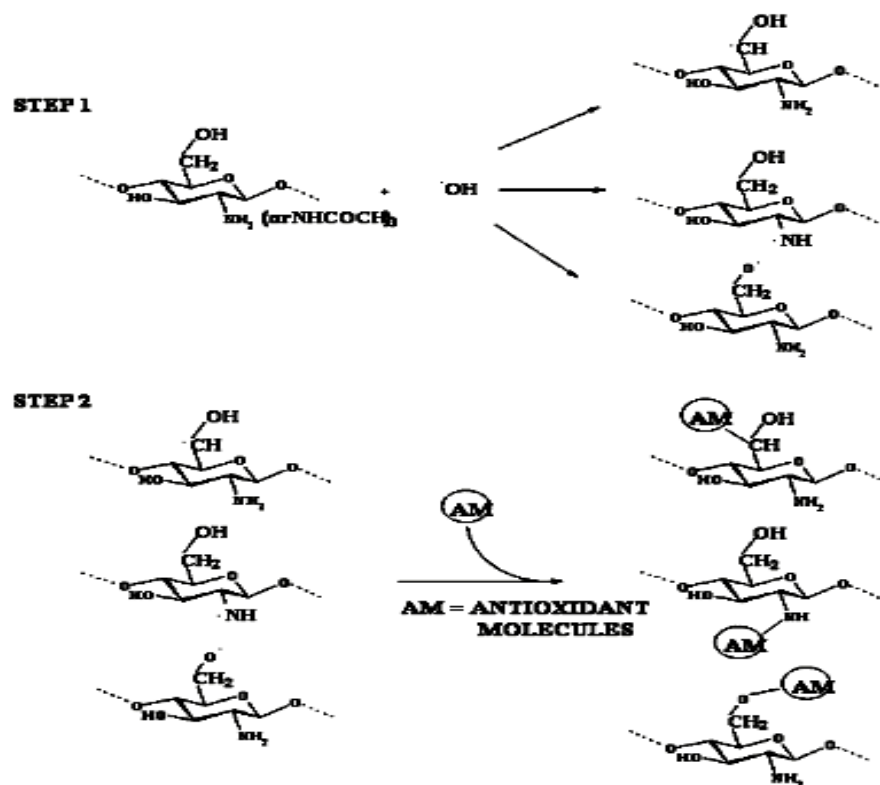


Figura 5. Posibles mecanismos de inserción de moléculas de antioxidantes en la cadena de quitosano.

En la reacción de polimerización vía radicales libres da lugar a varias unidades de repetición del polímero de quitosano modificado estructuralmente. Se han realizado otras reacciones por medios químicos utilizando glutaraldehído y un compuesto natural llamado genipita para la formación de hidrogeles a partir del quitosano y reacciones por medios físicos como el enfriamiento-calentamiento y el que utiliza radiación gamma (Sánchez-Moreno y col, 1998). Una de las modificaciones más frecuentes del quitosano es la adición de compuestos fenólicos que sirven como ramificaciones de la cadena principal lo cual le

confiere al quitosano características físicas y químicas diferentes, entre ellas, el poder antioxidante (Vachoud y col, 2001).

En el caso de los polímeros de quitosano modificados enzimáticamente, se busca que tengan una permeabilidad adecuada para determinados gases como el CO₂, el NO₂, el vapor de agua y otros, incluso del O₂, por ejemplo para el caso de alimentos post-cosecha que requieren “respirar” para conservar una buena apariencia y una mayor vida de anaquel.

2.3 ENZIMAS

Todas las enzimas son proteínas producidas por células vivas, la actividad de las enzimas varía considerablemente dependiendo de la fuente de la enzima.

Las enzimas son altamente específicas en la naturaleza de la reacción catalizada y el sustrato utilizado. Frecuentemente fungen como catalizadores, específicamente cuando se consideran reacciones con un rango de temperatura fisiológica de entre 25 y 37 °C.

Son utilizadas ampliamente en la industria debido a que catalizan un gran número de reacciones químicas. Actualmente, las enzimas son producidas en grandes cantidades utilizando las técnicas de ingeniería genética (Atkinson, 1991).

Las enzimas están clasificadas principalmente en: ligasas, isomerasas, liasas, hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas (Atkinson, 1991); éstas últimas están encargadas de catalizar reacciones de transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro, según la reacción general: $AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$. Una subdivisión de las oxidorreductasas son las enzimas peroxidasas, que juegan un papel importante en procesos de polimerización natural y pueden ser utilizadas en procesos industrialmente benéficos para el medio ambiente (Wade, 2004).

2.3.1 ANTECEDENTES

Los beneficios proporcionados por la utilización de enzimas, se dan cuando se requiere una reacción específica en presencia de especies que requieren de un sustrato y cuando se necesita una conversión en la cual no se desea la formación de subproductos.

En la actualidad, la producción enzimática a escala industrial es relativamente sencilla, ya que se han desarrollado más y mejores métodos de producción, de aislamiento y purificación, los cuales han dado origen a un área interdisciplinaria conocida como “ingeniería enzimática”, como nuevo enfoque de la biotecnología. Se han desarrollado nuevas técnicas para su obtención, así como la manipulación genética, la utilización de reactores utilizando microorganismos, etc. Las enzimas producidas han sido utilizadas en la industria de alimentos, farmacéutica, textil, en medicina, entre otras.

2.3.2 PEROXIDASA DE RÁBANO

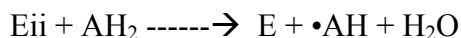
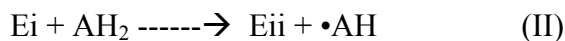
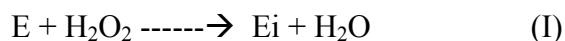
La enzima peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) es una hemoproteína de cadena simple tipo β (Kobayashi y col, 2001) que pertenece a la clase de ferri- (FIII-hemoproteínas) que colectivamente son llamadas “hidroperoxidasa”. Se obtiene principalmente de una planta perenne llamada rábano picante (*Armoracia rusticana*), aunque también se puede obtener de la savia del árbol de higo (Atkinson, 1991).

Es una enzima con un peso molecular aproximado de 40,000 kDa, su actividad óptima está en pH de 7 (Worthington, 2010), aunque otros autores reportan un rango entre 4 y 11. Su punto isoeléctrico está en 7.2. Puede ser almacenada por largos periodos de tiempo si está en refrigeración y liofilizada, es altamente estable y se caracteriza por tener una alta especificidad. Se ha observado que para el desarrollo de la actividad de esta enzima, prefiere peróxido de hidrógeno principalmente, metanol y etanol, aunque también puede utilizar alquilperóxido como sustrato.

Debido a la estabilidad de la enzima, esta se ha utilizado en pruebas inmunohistológicas para la demostración de antígenos en tejido y en determinaciones cuantitativas amplificadas de antígenos solubles y no solubles (Worthington, 2010). Junto con las lacasas, algunas oxidorreductasas han sido empleadas en la polimerización oxidativa de fenoles. De las peroxidadas, la peroxidasa de rábano es la más utilizada en este tipo de polimerizaciones (Puskas, 2009).

2.3.3 CICLO CATALÍTICO DE LA PEROXIDASA:

La oxidación de un compuesto aromático (AH₂) por pérdida de un electrón catalizada por peroxidasa es usualmente representada de la siguiente manera:



El grupo hemo (co-factor) de la enzima nativa es oxidado en presencia de peróxido de hidrógeno (agente oxidante) a un intermediario enzimático activo llamado compuesto I (E_i). El mecanismo detallado de la formación del compuesto I en la reacción de peróxido de hidrógeno con peroxidadas fue formulado por Poulos and Kraut en las bases del análisis estructural del sitio activo de la peroxidasa del citocromo *c* y ha sido aplicado exitosamente a otras enzimas. (Denisov y col, 2002). El estado de la enzima en el compuesto I aceptará una molécula del compuesto aromático dentro de su sitio activo y llevará a cabo su oxidación, con lo cual se obtiene un radical libre (•AH), y es liberado a la solución dejando a la enzima en un estado llamado compuesto II (E_{ii}). Esta forma de la enzima oxidará a otra molécula del compuesto aromático, liberando un segundo radical libre al seno de la solución y regresando la enzima a su estado nativo (Barba, 1996). Este proceso ocurre rápidamente en soluciones acuosas y en una mezcla de agua y solventes

miscibles en agua como la acetona y el metanol, la peroxidasa puede actuar como un catalizador para la polimerización oxidativa de varios derivados fenólicos, dando como resultado una nueva clase de compuestos poli-aromáticos (Kobayashi y col, 2001).

El ciclo catalítico de la enzima se puede representar esquemáticamente como se muestra en la figura 6, de la siguiente manera (Pukas, 2009):

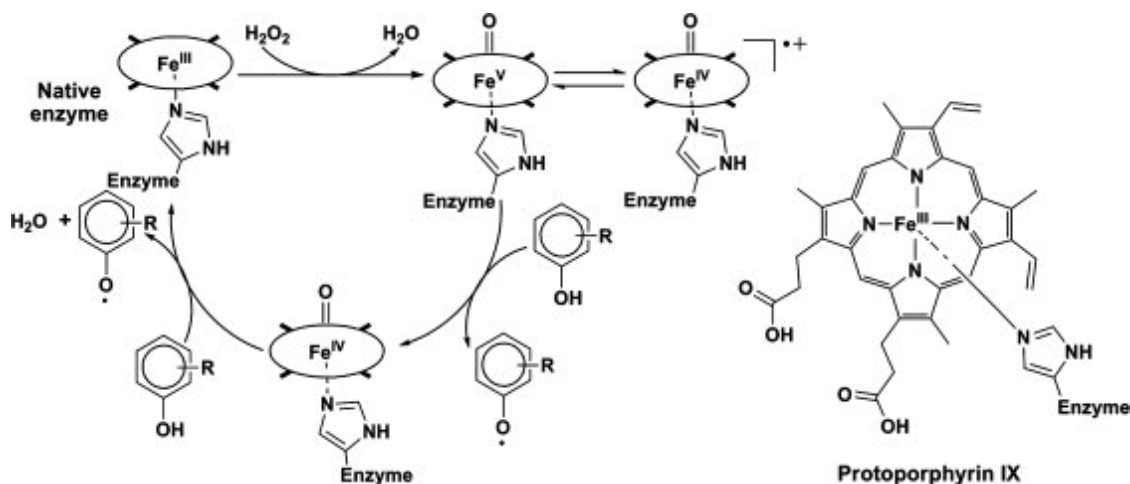


Figura 6. Representación del ciclo catalítico de HRP por un sustrato fenólico y estructura de su sitio activo.

2.4 ÁCIDO GÁLICO Y OCTIL GALATO

El ácido gálico es el nombre con el que se le conoce al ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico monohidrato (figura 7), un ácido orgánico obtenido a partir del fruto o árbol peruano llamado “tara”, el cual contiene una gran cantidad de taninos, que posteriormente se extraen y se aplican en el curtido de pieles.

El ácido gálico es sensible al alcohol y a la acetona, moderadamente soluble en agua fría y en éter, insoluble en cloroformo y benceno, se oscurece al exponerlo a la luz.

El octil galato es conocido también como galato de octilo, n-octilo de 3, 4, 5-ácido trihidroxibenzoico, 3, 4, 5 octil- trihidroxibenzoato (figura 7), es insoluble en agua, soluble en etanol y éter (FAO, 1996).

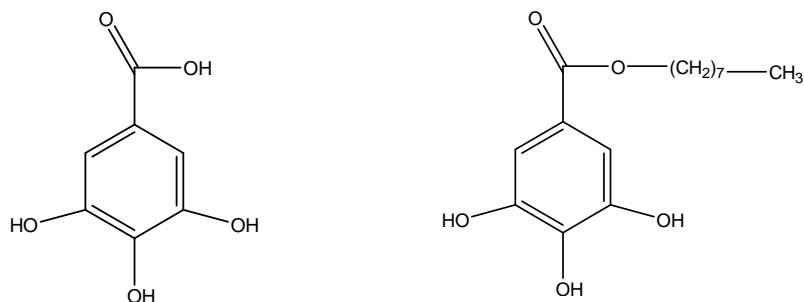


Figura 7. Estructura del ácido gálico y octil galato

2.4.1 ANTECEDENTES

Los antioxidantes, de acuerdo al modo de acción, pueden clasificarse como terminadores de radicales libres (Sánchez-Moreno y col, 1998), cabe destacar que los fenólicos son excelentes donadores de electrones y protones (Kuskoski y col, 2004), además de que forman radicales intermediarios estables debido a su resonancia.

Los galatos son antioxidantes utilizados desde 1947 en diferentes industrias como la cosmética, farmacéutica y alimentaria, con la finalidad de evitar la oxidación de ácidos grasos insaturados que contienen estos productos (García-Melgares, 2007).

Estos compuestos son sólo algunos de los muchos otros que existen para modificar al quitosano y conferirle propiedades antioxidantes y de biodegradación para no contaminar el ambiente.

2.4.2 APLICACIONES

El ácido gálico se utiliza en farmacología como astringente urinario, para la fabricación de tintas, para el curtido de pieles; como antioxidante en alimentos, puede tener un efecto sinérgico con los antioxidantes sintéticos BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado) y palmitato de ascorbilo. Se usa como promotor adhesivo en la fabricación de pegamentos y en la industria cervecera como insumo de coloración. (Somex, 2010).

El octil galato se utiliza ampliamente en el curtido de cuero, la tinción de telas, la fabricación de tintas, como astringente en algunas enfermedades de la piel debido a sus propiedades bacteriostáticas, y como fragancia, en perfumería.

El ácido gálico y el octil galato son derivados fenólicos que se obtienen de taninos de plantas, se han utilizado como antioxidantes en los alimentos a fin de evitar la reacción en cadena de oxidación, eliminar el oxígeno atrapado o disuelto en un producto y fungir como agentes quelantes al eliminar las trazas de ciertos metales pesados como el hierro.

2.5 POLÍMEROS

La denominación de los polímeros se basa en los monómeros que se utilizan en su fabricación, es decir, en sus materias primas (Hernández, 1998).

Las reacciones de síntesis de los polímeros son reacciones que se llevan a cabo a partir de moléculas relativamente sencillas (monómeros) que se combinan para producir moléculas muy grandes, a lo cual, se le llama reacción de polimerización (Hernández, 1998).

La polimerización por radicales libres convencional consiste en un acoplamiento de monómeros, mediante la apertura de dobles enlaces y la consiguiente unión de eslabones individuales para formar cadenas, sin que el proceso desprenda ningún producto secundario. (Hernández, 1998).

Por otra parte, existe la polimerización en solución, en el cual el monómero se diluye en un solvente con el catalizador, debido a ello, se requiere un sistema con agitación. El producto se obtiene como un precipitado que puede recuperarse al evaporar el disolvente.

2.5.1 CLASIFICACIÓN DE POLÍMEROS

Los polímeros se clasifican de la siguiente manera (Sánchez, 1994):

● En función de su origen

▶ Naturales o biopolímeros: Mineral, animal y vegetal

- ▶ Sintéticos: Derivados del petróleo

✿ Por su comportamiento térmico-mecánico

- ▶ Termoplásticos: Pueden suavizarse, procesarse mediante la aplicación de temperatura o presión ya que poseen estructuras reticulares que no se modifican por estos medios. Al aplicar calor continuo a los termoplásticos amorfos sufren una transición a un estado termoelástico, en el cual pequeñas fuerzas provocan grandes deformaciones, si se sigue aumentando la temperatura incrementa la movilidad térmica de las moléculas provocando que las cadenas puedan deslizarse unas frente a otras. (Hernández, 1998).
- ▶ Termofijos: Son quebradizos a lo largo de todo el intervalo de temperatura, no reblandecen y no funden; un poco por debajo de su temperatura de descomposición, se observa una pérdida de rigidez. (Hernández, 1998).

La flexibilidad de los polímeros amorfos disminuye drásticamente cuando su temperatura disminuye por debajo de una temperatura de transición característica denominada vítrea. A temperaturas por debajo de esta temperatura no hay movimiento de los segmentos siendo cualquier cambio dimensional de la cadena del polímero el resultado de distorsiones temporales de los enlaces de valencia primarios (Seymour, 1995). La temperatura de transición vítrea es la temperatura a la cual se produce una absorción o liberación de energía a medida que se aumenta o disminuye la temperatura. Además de determinarse por los métodos de TG y DSC, pueden utilizarse las técnicas de IR y RMN. Se sabe que la temperatura de transición vítrea es relativamente alta para plásticos amorfos duros. (Seymour, 1995).

✿ Por su composición química

- ▶ Poliolefinas

- ▶ Polímeros de cloruro de vinilo
- ▶ Polímeros de estireno
- ▶ Polímeros fluorados
- ▶ Heteropolímeros

✿ En relación producción-costo

- ▶ Polímeros de gran tonelaje
- ▶ Polímeros de ingeniería
- ▶ Polímeros de especialidad

2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.6.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La técnica de RMN es útil para proporcionar la estructura de un compuesto y puede complementarse con otras técnicas como IR. Se usa para estudiar núcleos de átomos como H, C, N, F y P. Al menos que se especifique, cuando se habla de RMN se refiere a resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN).

La espectroscopia de RMN permite determinar el entorno que rodea a los átomos de hidrógeno, y proporciona información sobre la estructura de los grupos alquilo y claves sobre los grupos funcionales.

Por esta técnica se detectan las transiciones nucleares, proporcionando información del entorno electrónico y molecular de los núcleos.

2.6.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (IR)

Se utiliza para corroborar la estructura de un compuesto deseado después de una síntesis.

La espectroscopia infrarroja se debe a las vibraciones de los enlaces y proporciona información de los grupos funcionales presentes en las moléculas y de la naturaleza de sus enlaces.

2.6.3 RAYOS X

Los rayos X son una radiación electromagnética de la misma naturaleza que las ondas de radio, las ondas de microondas, los rayos infrarrojos, la luz visible, los rayos ultravioleta y los rayos gamma. Los rayos X surgen de fenómenos extranucleares, a nivel entre la radiación ultravioleta y los rayos gamma producidos naturalmente.

Los rayos X son una radiación ionizante porque al interactuar con la materia produce la ionización de los átomos de la misma, así que origina partículas con carga.

Los rayos X son producto de la desaceleración rápida de electrones muy energéticos al chocar con un blanco metálico. Una carga acelerada emite radiación electromagnética, de este modo, el choque produce un espectro continuo de rayos X, además, se encuentran líneas características de cada material.

Se utiliza para obtener los porcentajes de cristalinidad de un compuesto, medir las dimensiones de los cristales, estudiar las fases en mezclas poliméricas y agregados moleculares (Sánchez, 1994).

2.6.4 TERMOGRAVIMETRÍA (TG)

Es una técnica basada en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se le somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada que puede ser de nitrógeno. Esta variación puede ser una pérdida o una ganancia de masa. El registro de estos cambios de masa, proporciona información sobre si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes.

2.6.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Es una técnica calorimétrica de desequilibrio en la que se mide el flujo de calor desde y hacia el polímero en función del tiempo o de la temperatura (Seymour, 1995). Las medidas se pueden realizar en condiciones ambientales o bajo una atmósfera controlada. Se trata de

una técnica cualitativa que permite detectar si se dan procesos endotérmicos o exotérmicos en una muestra, e indica la temperatura a la cual tienen lugar estos cambios.

2.6.6 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA (UV)

La espectroscopía ultravioleta se basa en las transiciones electrónicas y proporciona información sobre el tipo y la naturaleza (electrónica) de los enlaces en la molécula de la muestra.

Esta técnica detecta las transiciones electrónicas de los sistemas conjugados y proporciona información sobre el tamaño y la estructura de la parte conjugada de la molécula.

2.7 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante se refiere a la posibilidad que poseen algunas moléculas o compuestos para donar electrones y con ello, retardar o evitar la formación de radicales libres, o intervenir en la formación de los mismos. Dependiendo la cantidad y la posibilidad de los compuestos para liberar electrones, mayor será la capacidad antioxidante que posean. Las moléculas que poseen alta capacidad antioxidante inhiben la oxidación de muchos componentes en alimentos como lo son las grasas, y así, prolongan la vida útil de un producto, es por ello que entre mayor capacidad antioxidante posea un compuesto, mejor utilidad tendrá en la industria. Estudios previos, han revelado que los polifenoles son particularmente importantes por su alta capacidad antioxidante y tienen una contribución considerable en la dieta, así como su efecto en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y neurológicas (Kuskoski y col, 2004).

2.7.1 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Algunos de los métodos para medir la capacidad antioxidante de algunas sustancias son los siguientes:

* DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidracilo) (M_r : 394.33g/mol) (Molyneux, 2004): Se basa en la medición de un barrido de UV-visible de radicales libres de los compuestos que actúan como antioxidantes utilizando el radical DPPH. Se toman lecturas a 520nm después de un tiempo de reacción de 20 minutos. El radical DPPH tiene una absorción máxima alrededor de 515 a 528nm (Curcio y col, 2009). Cuando el antioxidante reduce al radical DPPH, se produce un cambio de coloración de morado a amarillo (Gadow y col, 1997) que corresponde a la difenilpicrilhidrazina, como se muestra en la figura 8, y la extensión de la reacción dependerá de la capacidad que los antioxidantes tengan para donar electrones.

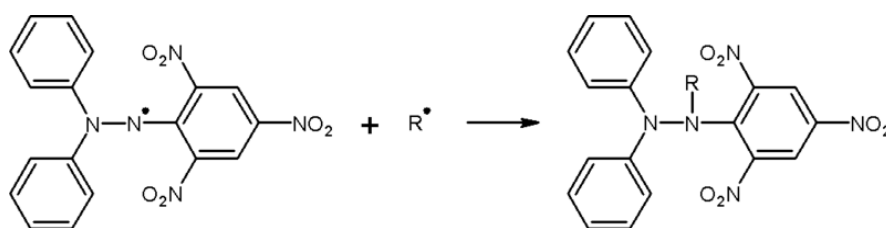


Figura 8. Estructura del radical DPPH (compuesto de color morado) y difenilpicrilhidrazina (compuesto de color amarillo).

El método del DDPH es descrito como una prueba sencilla, rápida y reproducible que puede aplicarse independientemente de la polaridad de la muestra, su principal desventaja es su elevado costo.

* BCB (β -carotene blaching test): Está basado en la decoloración del β -caroteno por acción de radicales. El efecto es medido a una longitud de onda de 470nm después de un tiempo de reacción cercano a los 120 minutos.

* TBARS: El ensayo de especies reactivas a ácidos tiobarbitúricos funciona de manera similar al BCB. Utiliza la producción de un pigmento rosa producido por la reacción de ácido tiobarbitúrico (TBA) con malonaldehído (MDA) y otros productos secundarios de la peroxidación lipídica. Se mide la absorbancia a 532nm como un indicador del grado

de degradación de lípidos (Marxen y col, 2007)

🌿 ABTS [Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]: Es aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, incluyendo flavonoides y carotenoides (Re y col, 1998). Se utiliza ampliamente debido a su estabilidad, sensibilidad y rapidez. El radical monocatión preformado de ABTS puede ser generado mediante reacciones químicas: por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio ó dióxido de magnesio (Re y col, 1998), reacciones enzimáticas: peroxidasa o mioglobina (Kuskoski y col, 2004) ó reacciones electroquímicas. El ABTS es reducido en presencia de un antioxidante donador de electrones, presenta una absorción máxima en la región de infrarrojo de 734nm (Kuskoski y col, 2004, Re y col, 1999).

El ensayo envuelve la generación directa del radical ABTS monocatión no involucrando a un radical intermediario. Es un ensayo de decoloración, este radical es preformado antes de la adición de los sistemas del resto del antioxidante, la velocidad de generación del radical toma lugar continuamente en presencia del antioxidante. Los resultados del ensayo se expresan en actividad antioxidante equivalente al Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), el cual es específico para cada punto de la gráfica de porcentaje de inhibición de absorbancia en función de la concentración del antioxidante en cuestión (Re y col, 1999). También pueden ser expresados en términos de la contribución total de la actividad de la sustancia antioxidante sobre el rango de tiempo estudiado, calculando el área bajo la curva, obtenido de una gráfica de porcentaje de inhibición/concentración en función del tiempo de reacción (Re y col, 1999).

Sánchez-Moreno y col. reportan la eficiencia antiradicalaria (AE) como la más utilizada para medir el poder antioxidante, en comparación con EC_{50} (cantidad mínima necesaria de antioxidante para disminuir el 50% del radical DPPH inicial) (Molyneux, 2004), ya que AE

toma en cuenta el tiempo de la reacción. A valores menores de EC_{50} , los materiales se consideran con mayor poder antioxidante.

2.8 GÉNERO PSEUDOMONAS

Los miembros del género *Pseudomonas* son de los pocos grupos de bacterias patógenas de las plantas verdaderas y de los humanos. Pueden encontrarse a manera de biofilms unido a una superficie o sustrato, o en forma de plancton, como un organismo unicelular de vida libre, que nadan activamente por medio de sus flagelos polares en su estructura.

El género *Pseudomonas* se destaca por su diversidad metabólica y son a menudo aislados de enriquecimiento diseñado para identificar las bacterias que degradan los contaminantes como el estireno, TNT (trinitrotolueno) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (DOE, 2010), por ello es que también se han utilizado en la bioremediación de los diferentes compuestos orgánicos en suelos y el control biológico de patógenos en agricultura.

❁ *Pseudomonas fluorescens*

Es una bacteria Gram negativa, aerobia no fermentativa que abarca un grupo de saprófitos comunes no patógenos que colonizan los suelos, el agua y los ambientes de superficie de la planta. Se trata de un aerobio estricto, a excepción de algunas cepas que pueden utilizar NO_3 como aceptor de electrones en lugar de O_2 . Sus requerimientos nutricionales son simples y crece bien en medios con sales minerales complementado con cualquiera de un gran número de fuentes de carbono.

❁ *Pseudomonas alcaligenes*

Es una bacteria Gram negativa, aerobia no fermentativa, de vida libre, ya que cuenta con un flagelo que le permite desplazarse. En el laboratorio, generalmente toma más tiempo identificarla de otras bacterias. Puede colonizar e infectar a humanos produciendo fibrosis

quística, sobrevive en agua y se ha descubierto que se desarrolla bien en soluciones desinfectantes contaminadas (Haglund, 2010).

✿ ***Pseudomonas aeruginosa***

Es una bacteria Gram negativa, con flagelo polar, reconocido como un patógeno oportunista de relevancia clínica. Causa infecciones del tracto urinario, infecciones de las vías respiratorias, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, infecciones óseas y articulares, infecciones gastrointestinales y una variedad de infecciones sistémicas.

Sus necesidades nutricionales son simples, se ha observado que crece a menudo en agua destilada. En el laboratorio, el método más sencillo para el crecimiento de *P. aeruginosa* se compone de acetato como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. (Kenneth, 2008)

✿ ***Pseudomonas stutzeri***

Es una bacteria ampliamente distribuida en el ambiente, además de ser un patógeno oportunista en humanos. Ha sido propuesta como modelo de estudios de desnitrificación, muchas cepas tienen propiedades de transformación naturales como la transferencia de genes dentro de su ambiente, particularmente en la degradación de metales tóxicos (Lalucat, 2006).

2.9 LODOS ACTIVADOS

Los lodos activados son sistemas ecológicos formados por microorganismos de diferentes tipos (principalmente heterótrofos) junto con materiales inertes, orgánicos e inorgánicos que se utiliza para evaluar la toxicidad de algunas sustancias. La población microbiana de los lodos está normalmente dominada por microorganismos heterótrofos que requieren materia orgánica biodegradable como fuente de energía y para la síntesis de nuevas células.

Los factores que afectan el proceso son la temperatura, pH, nutrientes y oxígeno molecular (Flores, 1998).

2.9.1 ANTECEDENTES

El proceso de lodos activados fue desarrollado en Inglaterra en 1914 por Fowler, Arden, Mumford y Lockett quienes presentaron los beneficios de retener organismos adaptados al sustrato para un tratamiento eficiente. Ellos inventaron el término “lodo activado” para describir la masa biológica resultante (Flores, 1998).

Se han realizado estudios de toxicidad de una sustancia determinada y se ha clasificado de diversas formas para su estudio, una de ellas es de acuerdo al tiempo de exposición que un ser vivo permanece en contacto con el compuesto en estudio. (León y col, 2007).

Así, la toxicidad puede ser aguda, una sola exposición o periodos cortos; subaguda, con un tiempo de exposición menor a un mes; o subcrónica, con un tiempo de exposición de 1 a 3 meses.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS, HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y METODOLOGÍA GENERAL

3.1 OBJETIVOS GENERALES

- Sintetizar nuevos materiales funcionales basados en la modificación enzimática de quitosano con ácido gálico y octil galato empleando una peroxidasa (HRP).

3.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar los materiales sintetizados mediante la utilización de las técnicas de RMN, IR, Rayos X, TG y DSC.
- Evaluar y comparar el poder antioxidante del quitosano modificado con octil galato y con ácido gálico.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas de los polímeros con un consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas*
- Evaluar la supervivencia de los microorganismos presentes en lodos activados.

3.2 HIPÓTESIS

Los polímeros de quitosano modificados enzimáticamente con ácido gálico y octil galato tendrán poder antioxidante. Al ser expuestos a un consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas* se corroborará las propiedades antimicrobianas de los polímeros, y al ser expuestos a microorganismos presentes en lodos activados, se comprobará que no afectan la supervivencia los microorganismos.

3.3 JUSTIFICACIÓN

La síntesis de quitosano modificado mediante la utilización de peroxidasas se ha preferido ante las modificaciones químicas que se han realizado, debido a que estos procedimientos enzimáticos son más limpios y no generan compuestos tóxicos para la salud, así mismo, se pueden utilizar ampliamente en la industria alimentaria y en otras áreas.

Se optó por ácido gálico y octil galato debido a que se han realizado estudios con otros tipos de fenoles que igualmente polimerizan y confieren propiedades diferentes a la cadena de quitosano, además de que estos antioxidantes han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a sus propiedades antimicrobianas, y han dado buenos resultados para mejorar la vida útil de los alimentos y retardar su descomposición.

Se evaluaron las propiedades antioxidantes de los materiales funcionalizados por la técnica de DPPH para tener una comparación y saber cuál de los polímeros confiere mejores propiedades antioxidantes al quitosano.

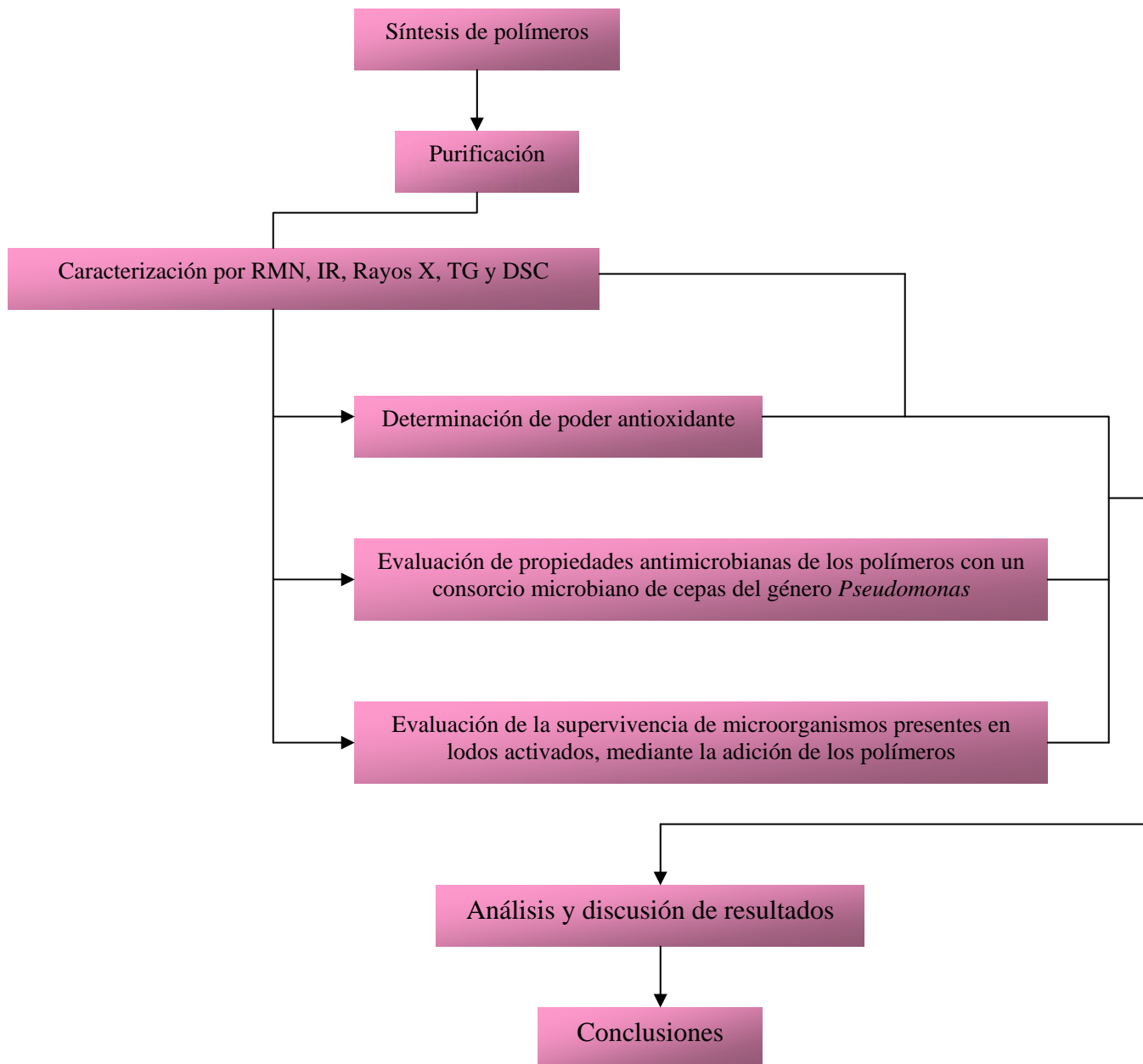
Se evaluaron los parámetros moleculares con técnicas de RMN e IR para saber qué porcentaje del antioxidante se une al quitosano, dependiendo del grado de deacetilación del mismo, de la misma manera, los estudios de TG y DSC se realizaron para determinar las propiedades térmicas de los compuestos sintetizados.

Se evaluaron las propiedades antimicrobianas de los polímeros sintetizados, mediante la utilización de un consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*) para posteriormente aplicar los polímeros en la conservación de alimentos.

Un estudio nuevo acerca de los polímeros, fue la evaluación de la supervivencia de microorganismos heterótrofos, principalmente protozoarios presentes en muestras de lodos activados obtenidas de una planta de tratamiento de aguas residuales, para comprobar que

los polímeros no generan sustancias tóxicas.

3.4 METODOLOGÍA GENERAL



CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SÍNTESIS DE POLÍMEROS (Vachoud y col, 2001)

4.1.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Quitosano (Aldrich, E.U.A.).
- Ácido gálico (Sigma, China) 30mM disuelto en acetona (Química Barsa, grado analítico).
- Octil galato (Fluka Analytical, grado HPLC, China) 30mM disuelto en acetona (Química Barsa, grado industrial).
- Octil galato (Fluka Analytical, grado HPLC, China) 15mM disuelto en acetona (Química Barsa, grado industrial).
- Buffer de fosfatos pH 5.5 (KH_2PO_4 , Reactivo Baker Analyzed, México).
- HCl (J. T. Baker, 36.5-38%, México).
- NaOH (Reactivo Baker, México).
- Peroxidase, Type II From Horseradish (Sigma-Aldrich, E.U.).
- H_2O_2 (Sigma-Aldrich, E.U.A.) al 5%

4.1.2 EQUIPO UTILIZADO

- Parrilla de agitación Dataplate PMC
- Liofilizadora Heto FD 1.0 CT 60e
- Bomba. Vacuubrand GMBH, Type: RZ 2
- REVCO Ultracongelador (-80°C)
- Material de vidrio diverso

4.1.3 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Los polímeros de quitosano modificados enzimáticamente con peroxidasas se sintetizan a partir de una reacción vía radicales libres, en donde la enzima es activada con peróxido de

hidrógeno y la cadena de quitosano interactúa con el ácido gálico y el octil galato para dar lugar a quitosano-co-gálico y quitosano-co-octil galato, respectivamente.

4.1.4 PROCEDIMIENTO

- ▶ Se preparó una solución de quitosano 1.6% a pH 2.5 con HCl (2M)
- ▶ Se agitó durante 24 horas
- ▶ Se llegó a una concentración final de quitosano de 0.3% ajustando con buffer de fosfatos pH 5.5
- ▶ Se ajustó el pH a 4.5 con NaOH
- ▶ Se adicionó ácido gálico (y octil galato disueltos en acetona a la concentración de 30mM y 15mM según sea el caso).
- ▶ Se adicionó la enzima (por la relación de peso).
- ▶ Se adicionó H₂O₂ al 5% (por la relación v/v).
- ▶ Se agitó durante 1hora

4.2 PURIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS (Vachoud y col, 2001)

4.2.1 REACTIVOS UTILIZADOS

- ✿ NaOH (Reactivo Baker, México)

4.2.2 EQUIPO UTILIZADO

- ✿ Centrífuga Rotixa 50RS

4.2.3 PROCEDIMIENTO

- ▶ Los polímeros se precipitaron con NaOH 2M a pH 7
- ▶ Se centrifugaron a 4,000rpm durante 30minutos.
- ▶ Se filtraron y luego se desechó el sobrenadante.
- ▶ Se almacenaron en congelación durante 24horas (-80°C).
- ▶ Se liofilizaron los polímeros durante 24horas.

► Finalmente, los polímeros se pulverizaron y se obtuvieron en polvo.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

Tanto el quitosano solo como los polímeros sintetizados se enviaron a análisis en el laboratorio USAI de la Facultad de Química para ser analizados por las técnicas analíticas de RMN, IR, Rayos X, TG y DSC.

- ✿ El análisis de RMN se realizó con un espectrómetro Varian Innova operando a 400MHz utilizando cloroformo deuterado.
- ✿ El análisis estructural por infrarrojo fue realizado con un Espectrómetro de Infrarrojo de Fourier con un intervalo de longitudes de 400 a 4000cm⁻¹ FT-IR, Perkin Elmer 1605. El análisis se llevó a cabo en estado sólido.
- ✿ El análisis de Rayos X de polvos se realizó con el polímero pulverizado y se analizó en un equipo Siemens D-5000, K α radiación de Cu a $\lambda = 1.5406$ Amstrongs.

Se utilizó en un grado de rotación de 3 a 80, durante un periodo de 30 minutos y un tamaño de paso de 0.02

- ✿ El análisis térmico y la determinación de la temperatura de transición vítrea se realizó mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en un analizador térmico Du Pont Instruments, 910 Differential Scanning Calorimeter el cual aplica un flujo de calor a la muestra, el equipo detecta la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión y la entropía de fusión. Las pruebas realizadas por este equipo se realizaron en un rango de temperatura de 0 a 350°C.

4.4 DETERMINACIÓN DE PODER ANTIOXIDANTE

4.4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- DPPH radical (Sigma, Alemania) al 0.0025% disuelto en metanol (Química Barsa, grado industrial).

4.4.2 EQUIPO UTILIZADO

- Espectro UV/Visible. Perkin Elmer. Lambda 2S

4.4.3 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Se basa en la medición de un barrido de UV-visible de radicales libres de los compuestos que actúan como antioxidantes utilizando el radical DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidracilo) (Ramírez, 1998) (figura 9) que es un radical orgánico estable con una absorción máxima alrededor de 515 a 528nm (Curcio y col, 2009).

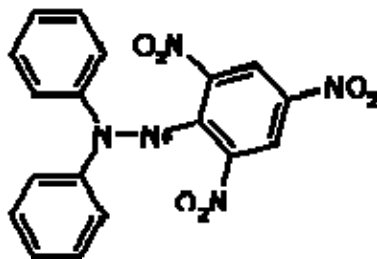


Figura 9. Estructura del radical DPPH

4.4.4 PROCEDIMIENTO

Se tomó 0.1mL del polímero en solución, se colocó en celdas de cuarzo y se añadieron 2.9mL de solución DPPH 0.1mM (Molyneux, 2004). Se leyó la absorbancia a 517nm en un espectrofotómetro UV-Visible, a intervalos de 5 y 10 segundos, y se dejó correr durante 20min. Se graficaron los datos y se observó el comportamiento de la capacidad antioxidante a través del tiempo. Se determinó la capacidad antioxidante de los polímeros dependiendo de su capacidad para inhibir al radical DPPH.

4.5 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LOS POLÍMEROS EN PRESENCIA DE UN CONSORCIO MICROBIANO DE CEPAS DEL GÉNERO *Pseudomonas*

4.5.1 REACTIVOS UTILIZADOS

✿ Preparación de medios de cultivo:

► **Medio líquido BHI (Becton, Dickinson, USA)**

Para la preparación de 1000mL de medio:

✿ Infusión de sólidos de cerebro corazón	6g
✿ Péptido digerido de tejido animal	6g
✿ Cloruro de sodio	5g
✿ Dextrosa	3g
✿ Digerido pancreático de gelatina	14.5g
✿ Fosfato disódico	2.5g

► **Medio Mc Conkey (Bioxon, México)**

Para la preparación de 1000mL de medio:

✿ Peptonas	20g
✿ Lactosa	10g
✿ Sales biliares	5g
✿ NaCl	5g
✿ Rojo neutro	0.075g

► **Medio sólido BHI (Bioxon, México)**

Para la preparación de 1000mL de medio:

✿ Infusión de cerebro de ternera	200g
✿ Infusión de corazón de res	250g

Mezcla de peptonas	10g
K ₂ HPO ₄	5g
NaCl	2g
Dextrosa	2g
Agar	15g

pH final 7.4 ± 0.1

Modo de preparación: Suspender 52g del polvo en 1L de agua destilada. Dejar remojar durante 10 a 15min. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15libras de presión) durante 15min.

► Medio mineral

Para la preparación de 1000mL de medio:

NH ₄ NO ₃	5g
K ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄	2.0g
CaCl ₂	0.1g
H ₂ O	1000mL

pH final 7

Se adicionan diferentes fuentes de carbono o peptona al 1% en lugar de NH₄NO₃

4.5.2 EQUIPO UTILIZADO

- Incubadora reciprocante New Brunswick Scientific. Edison, M. J., USA)
- Material de vidrio diverso

4.5.3 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Se considera que los polímeros afectan la actividad microbiana, inhibiendo el desarrollo de los microorganismos, dependiendo de la concentración y forma en que se presenten los

materiales. La capacidad antimicrobiana de los polímeros de quitosano funcionalizados consiste en la interacción de cargas positivas presentes en la cadena de quitosano, con las cargas negativas de la pared celular de las bacterias, formándose así, una capa que envuelve a la pared celular e impide el acceso de solutos hacia fuera y al interior de la célula.

4.5.4 PROCEDIMIENTO

- ▶ Se prepararon medios de cultivo BHI (Infusión cerebro corazón) para el desarrollo de las cepas del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*).
- ▶ Se prepararon 3.5mL de medio líquido para el desarrollo de los microorganismos y su acondicionamiento.
- ▶ Las cepas se dejaron incubar a 37°C durante dos días.
- ▶ Se prepararon placas con medio Mc Conkey.
- ▶ Se utilizó una caja para inocular cada cepa, las cuales se incubaron a 37°C/24horas.
- ▶ Se prepararon placas con medio BHI
- ▶ Se utilizó una caja para inocular cada cepa, las cuales, fueron obtenidas de medio Mc. Conckey.
- ▶ Las placas inoculadas se incubaron a 37°C/24horas.
- ▶ Se prepararon matraces con medio mineral (MM).

Se prepararon 11 matraces Erlenmeyer con 100mL de medio mineral cada uno.

- Control de crecimiento (+): MM + cepas + Peptona de carne
- Control de crecimiento (-): MM + cepas
- Control de medio: MM
- Problemas con cepas

- MM + quitosano
 - MM + quitosano-co-gálico
 - MM + quitosano-co-octil galato 15mM
 - MM + quitosano-co-octil galato 30mM
- Problemas sin cepas
 - MM + quitosano
 - MM + quitosano-co-gálico
 - MM + quitosano-co-octil galato 15mM
 - MM + quitosano-co-octil galato 30mM

Todos los matraces se metieron a incubación recíproca a 150rpm y 37°C durante 4 días.

4.6 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LODOS ACTIVADOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE LOS POLÍMEROS

Se recolectó una muestra de lodos activados obtenidos de la Planta de tratamiento de aguas residuales de la Facultad de Ingeniería, UNAM.

4.6.1 EQUIPO UTILIZADO

- Microscopio óptico. Iroscope
- Fuente de poder: Epi-fluorescence INALH

4.6.2 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

En este proceso se emplea una suspensión de microorganismos agregados floculentos formado principalmente por bacterias, hongos, protozoarios y metazoarios, los cuales se emplean para el tratamiento de aguas residuales y otros materiales (Flores, 1998).

El grupo de microorganismos predominante en los lodos activados depende del tipo de proceso que las aguas residuales hayan recibido previamente. El mecanismo básico del proceso está representado por la siguiente reacción biológica:

Materia orgánica + Microorganismos \rightarrow Microorganismos + CO₂ + H₂O – Energía

(Flores, 1998).

4.6.3 PROCEDIMIENTO

✿ Determinación de la supervivencia de los microorganismos presentes en los lodos activados (León y col, 2007).

- ▶ Se tomó una muestra del cultivo y se observó a 40x los microorganismos en el microscopio para ver su viabilidad.
- ▶ Se extrajeron protozoarios del lodo activado con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocaron en un portaobjetos, en ocasiones se adicionó una o dos gotas de agua destilada para evitar la deshidratación.
- ▶ Se adicionó al portaobjetos con los lodos activados, 0.0025g de quitosano y de los polímeros.
- ▶ Se realizaron observaciones a diferentes tiempos de la disminución de movilidad y/o muerte de los microorganismos del lodo activado. Tiempo total de exposición a los polímeros: 20 minutos.
- ▶ Se determinó la supervivencia de los microorganismos de los lodos activados, mediante la adición de los polímeros.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
5.1 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE POLÍMEROS.**5.1.1 CÁLCULOS****• Blanco:**

(Vachoud y col, 2001) hicieron las siguientes consideraciones, las cuales ayudaron a realizar los cálculos para la síntesis de los polímeros funcionalizados:

$$80\text{mL quitosano} = 20\text{mL galatos}$$

$$\text{Relación de enzima/sustrato: } \frac{0.5\text{gsustratototal}}{0.0015\text{gHRP}} = 333.33\text{g}$$

$$\text{Concentración de la enzima: } \frac{0.015\text{g}}{100\text{mL}} = 0.015\%$$

$$\text{Relación H}_2\text{O}_2/\text{enzima: } 3.2\text{mLH}_2\text{O} \rightarrow 1.5\text{mgHRP}$$

Para la síntesis del blanco, se utilizó la misma metodología, solo que sin la adición del quitosano.

Inicialmente se utilizó un volumen de 100mL de buffer pH 5.5

$$\rightarrow \text{Cantidad de galatos: } \frac{100\text{mLbuffer}}{80\%} \times 20\% = 25\text{mL octil galato } 30\text{mM}$$

$$\frac{0.030\text{mol}}{\text{L}} \times 25\text{mL octil} \times \frac{\text{L}}{1000\text{mL}} \times \frac{282.33\text{goctil}}{\text{mol}} = 0.2117\text{goctil}$$

$$\rightarrow \text{Cantidad de sustrato total: } 0.2117\text{g octil galato}$$

$$\rightarrow \text{Cantidad de enzima: } \frac{0.0015\text{gHRP}}{0.5\text{gsustrato}} \times 0.2117\text{goctil} = 0.000635\text{gHRP}$$

$$\frac{0.000635\text{gHRP}}{0.015\text{gHRP}} \times 100\text{mL} = 4.3\text{mLHRP}$$

$$\rightarrow \text{Cantidad de H}_2\text{O}_2 \text{ al } 5\%: \frac{0.635\text{mgHRP}}{1.5\text{mgHRP}} \times 3.2\text{mLperóxido} = 1.35\text{mLperóxido}$$

❁ Síntesis de quitosano-co-gálico 30mM

$$\text{Solución de quitosano al 1.6\%: } \frac{1.6g\text{quitosano}}{100mL} \times 100mL = 1.6g\text{quitosano}$$

$$\text{Solución de quitosano al 0.3\%: } \frac{0.3g\text{quitosano}}{100mL} \times 1.6g\text{quitosano} = 533.33mL\text{quitosano}$$

➤ Cantidad de buffer pH 5.5: $533.33mL\text{quitosano} - 100mL\text{totales} = 433.33mL\text{buffer}$

➤ Cantidad de ácido gálico 30mM:

$$\frac{533.33mL\text{quitosano}}{80\%} \times 100\% = 666.66mL\text{quitosano} + \text{ácido gálico}$$

$$(666.66mL\text{quitosano} + \text{ácido gálico}) - 533.33mL\text{quitosano} = 133.33mL\text{ácido gálico } 30mM$$

$$\frac{0.030mol}{L} \times 133.33mL\text{ácido gálico} \times \frac{L}{1000mL} \times \frac{170.1g\text{ácido gálico}}{mol} = 0.6804g\text{ácido gálico}$$

➤ Cantidad de sustrato total: $0.6804g\text{ácido gálico} + 1.6g\text{quitosano} = 2.28g$

➤ Cantidad de enzima: $\frac{0.0015g\text{HRP}}{0.5gsustrato} \times 2.28gsustrato = 0.00684g\text{HRP}$

$$\frac{0.00684g\text{HRP}}{0.015g\text{HRP}} \times 100mL = 45.61mL\text{HRP}$$

➤ Cantidad de H₂O₂ al 5%: $\frac{6.84mg\text{HRP}}{1.5mg\text{HRP}} \times 3.2mL\text{peróxido} = 14.59mL\text{peróxido}$

Producto obtenido: 1.6133g

Rendimiento: 70.76%

❁ Síntesis de quitosano-co-octil galato 15mM

$$\text{Solución de quitosano al 1.6\%: } \frac{1.6g\text{quitosano}}{100mL} \times 200mL = 3.2g\text{quitosano}$$

$$\text{Solución de quitosano al 0.3\%: } \frac{0.3g\text{quitosano}}{100mL} \times 3.2g\text{quitosano} = 1066.66mL\text{quitosano}$$

➤ Cantidad de buffer pH 5.5: $1066.66mL\text{quitosano} - 200mL\text{totales} = 866.66mL\text{buffer}$

➤ Cantidad de octil galato 15mM:

$$\frac{1066.66mL\text{quitosano}}{80\%} \times 100\% = 1333.32mL\text{quitosano} + \text{octil}$$

$$(1333.32mL\text{quitosano} + \text{octil}) - 1066.66mL\text{quitosano} = 266.66mL\text{octil}30mM$$

$$\frac{0.015mol}{L} \times 266.66mL\text{octil} \times \frac{L}{1000mL} \times \frac{282.33g\text{octil}}{mol} = 1.129g\text{octil}$$

➤ Cantidad de sustrato total: $1.129g\text{octil} + 3.2g\text{quitosano} = 4.329g$

➤ Cantidad de enzima: $\frac{0.0015g\text{HRP}}{0.5g\text{sustrato}} \times 4.329g\text{sustrato} = 0.0129g\text{HRP}$

$$\frac{0.0129g\text{HRP}}{0.015g\text{HRP}} \times 100mL = 86mL\text{HRP}$$

➤ Cantidad de H₂O₂ al 5%: $\frac{12.9mg\text{HRP}}{1.5mg\text{HRP}} \times 3.2mL\text{peróxido} = 27.52mL\text{peróxido}$

Producto obtenido: 3.3680g

Rendimiento: 77.57%

🌿 Síntesis de quitosano-co-octil galato 30mM

$$\text{Solución de quitosano al 1.6\%: } \frac{1.6g\text{quitosano}}{100mL} \times 200mL = 3.2g\text{quitosano}$$

$$\text{Solución de quitosano al 0.3\%: } \frac{0.3g\text{quitosano}}{100mL} \times 3.2g\text{quitosano} = 1066.66mL\text{quitosano}$$

➤ Cantidad de buffer pH 5.5: $1066.66mL\text{quitosano} - 200mL\text{totales} = 866.66mL\text{buffer}$

➤ Cantidad de octil galato 30mM:

$$\frac{1066.66mL\text{Quitosano}}{80\%} \times 100\% = 1333.32mL\text{Quitosano} + \text{octil}$$

$$(1333.32mL\text{Quitosano} + \text{octil}) - 1066.66mL\text{Quitosano} = 266.66mL\text{octil} \text{ } 30mM$$

$$\frac{0.030mol}{L} \times 266.66mL\text{octil} \times \frac{L}{1000mL} \times \frac{282.33g\text{octil}}{mol} = 2.258g\text{octil}$$

➤ Cantidad de sustrato total: $2.258g\text{octil} + 3.2g\text{quitosano} = 5.428g$

➤ Cantidad de enzima: $\frac{0.0015g\text{HRP}}{0.5g\text{sustrato}} \times 5.428g\text{sustrato} = 0.0163g\text{HRP}$

$$\frac{0.0163g\text{HRP}}{0.015g\text{HRP}} \times 100mL = 108.66mL\text{HRP}$$

➤ Cantidad de H₂O₂ al 5%: $\frac{16.3mg\text{HRP}}{1.5mg\text{HRP}} \times 3.2mL\text{peróxido} = 34.77mL\text{peróxido}$

Producto obtenido: 5.033g

Rendimiento: 92.45%

5.1.2 RENDIMIENTO

Polímero	Rendimiento (%)
Quitosano-co-gálico 30mM	70.76%
Quitosano-co-octil galato 15mM	77.57
Quitosano-co-octil galato 30mM	92.45

Tabla 1. Rendimiento de los materiales.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

5.2.1 RMN: Para obtener la proporción molecular en porcentaje de incorporación del octil galato al quitosano se empleó la siguiente fórmula (Hirai, 1991):

$$\% \text{Incorporación} = \frac{\frac{I_{\text{alquímica}}}{15}}{\frac{I_{\text{H2-H6}}}{6} - \frac{(2)(I_{\text{alquímica}})}{15}} \times 100$$

Donde:

$I_{\text{alquímica}}$ representa la intensidad medida de la cadena alquímica del octil galato, y al dividirla entre 15 (número de protones en la cadena alquímica del octil galato) se obtiene la contribución a la señal de un solo protón de octil galato.

$I_{\text{H2-H6}}$ representa la intensidad de la señal de los 6 protones del quitosano, teniendo en cuenta la corrección del CH₂ alfa al carbonilo que tiene una señal solapada en 4ppm.

Así, el denominador de la ecuación representa la contribución a la señal de un solo protón del quitosano.

$$\% \text{Incorporación} = \frac{\frac{0.119}{15}}{\frac{1.011}{6} - \frac{(2)(0.119)}{15}} \times 100 = 5.19\% \text{Incorporación}$$

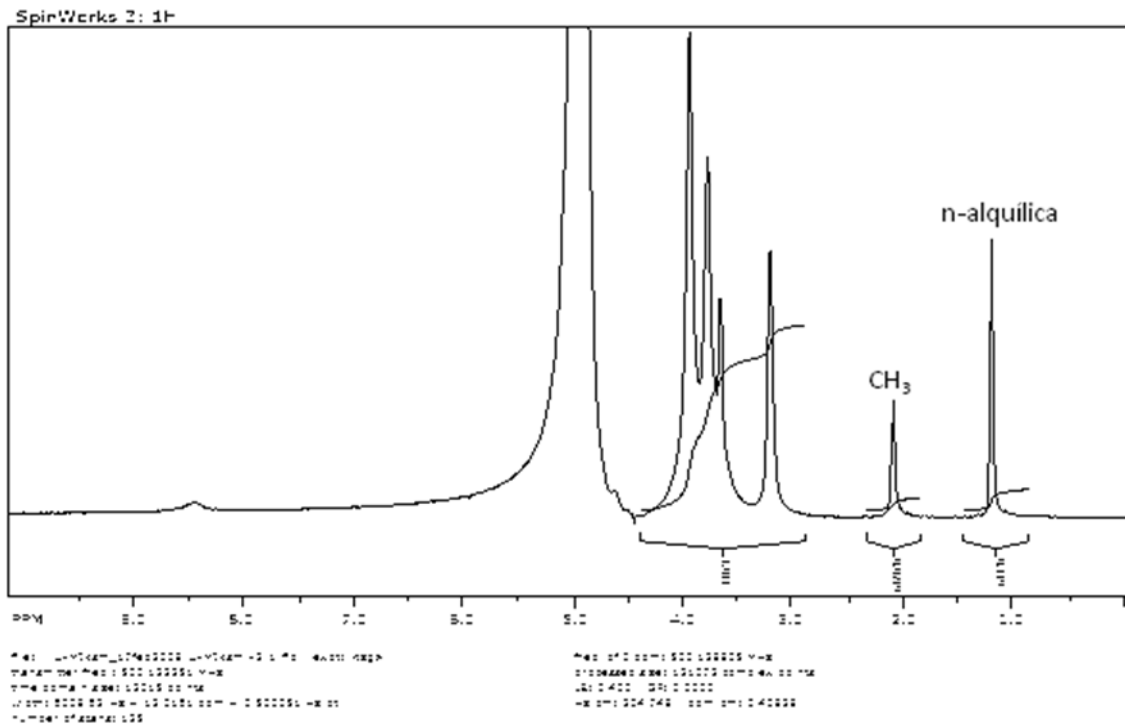


Figura 10. Espectro de RMN de incorporación de octil galato

Se han propuesto algunos métodos para medir el grado o porcentaje de deacetilación del quitosano, como ejemplo está la espectroscopía IR, UV, el análisis elemental y la cromatografía de permeación en gel (GPC) (Lavertu y col, 2003), en este trabajo se utilizó RMN por ser un método preciso, reproducible y que requiere poca cantidad de material, y para calcular del grado de deacetilación del quitosano Aldrich, se empleó la ecuación propuesta por (Hirai, 1991):

$$\% Deacetilación = \left[1 - \frac{\frac{1}{3} I_{CH3}}{\frac{1}{6} I_{H2-H6}} \right] \times 100$$

$$\% Deacetilación = \left[1 - \frac{\frac{1}{3} 0.0719}{\frac{1}{6} 1.011} \right] \times 100 = 85.78\%$$

El porcentaje de deacetilación del quitosano Aldrich obtenido fue de 85.78%, el cual, es un buen porcentaje para la inserción de algunos polifenoles como lo son el ácido gálico y el octil galato. Entre mayor sea el grado de deacetilación del quitosano es más fácil que ocurran las reacciones de co-polimerización ya que éstas se dan por medio de enlaces covalentes con el grupo amino libre del quitosano. Un buen porcentaje de deacetilación del quitosano es un 75% o mayor para que suceda exitosamente la formación de co-polímeros funcionales que le proporcionan características diferentes al quitosano para sus posteriores aplicaciones industriales (Gudmund, 1989).

En el espectro de RMN se observó que el metileno tuvo una señal solapada en 4ppm.

La cadena alquílica del octil galato tuvo una señal en 1ppm y el metilo terminal de la cadena presentó una señal en 2ppm aproximadamente.

Aplicando las ecuaciones para el cálculo del porcentaje de incorporación del octil galato en el quitosano, se obtuvo un 5.18%, por lo que se pensaría que lo restante pudo perderse en el proceso de purificación del polímero. Sin embargo, se confirmó la presencia de la cadena alquílica y la cadena lateral de poli-octil galato, el cual presenta baja solubilidad en agua y permitió que precipitara y se lograra recuperar en el proceso de purificación, tanto en el blanco sin quitosano, como en la síntesis del polímero.

El quitosano-co-gálico no permitió encontrar una relación de incorporación en un espectro de RMN, es por ello que no se obtuvieron señales por esta técnica, se obtendría una señal aproximadamente en 7ppm debido a los H aromáticos, pero esto indicaría que hay cadenas laterales de poligálico, lo cual no se observó al momento de la síntesis del blanco con ácido gálico y sin quitosano. Así, como el ácido poligálico es soluble en agua, entonces aunque se haya obtenido, éste se separó en el proceso de purificación, específicamente en la centrifugación, ya que no se observó precipitación del polímero.

5.2.2 IR

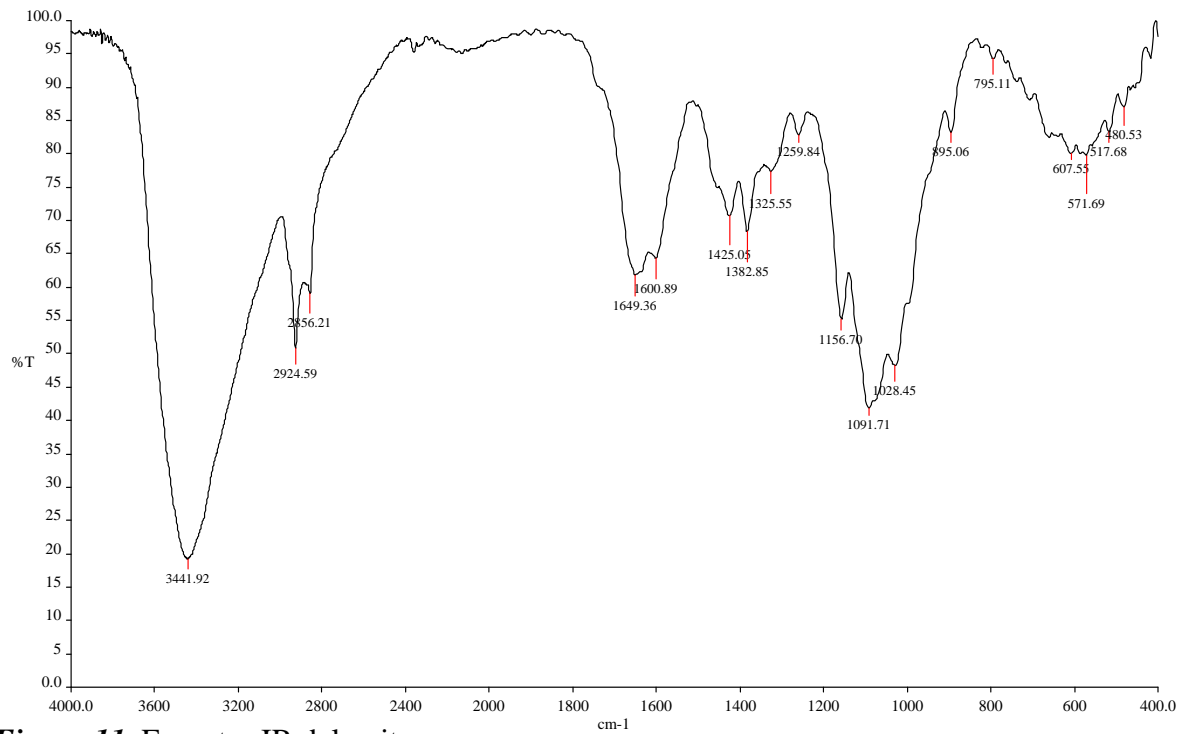


Figura 11. Espectro IR del quitosano

- **Quitosano:** Bandas de intensidad media corresponden a las vibraciones de estiramiento del grupo -NH ubicadas en la región 3,500-3,300 cm⁻¹ y la banda de absorción de intensidad media a fuertes relativa a vibraciones de deformación del grupo amino a una frecuencia entre 1,640 a 1,500 cm⁻¹.

Bandas características (cm^{-1})	Rango reportado (cm^{-1}) (Lavertu y col, 2003)	Interpretación
3,434.87	3,000-3,700 3,500-3,400 (Mármol y col, 2006)	-OH -NH
1,655.77	1,650-1,580 (Mármol y col, 2006) Alrededor de 1,700	-NH -CO-
1,155.59	1,300-1,100	Banda confirmativa -OH

Tabla 2. Bandas de interpretación IR de quitosano

• Quitosano-co-gálico:

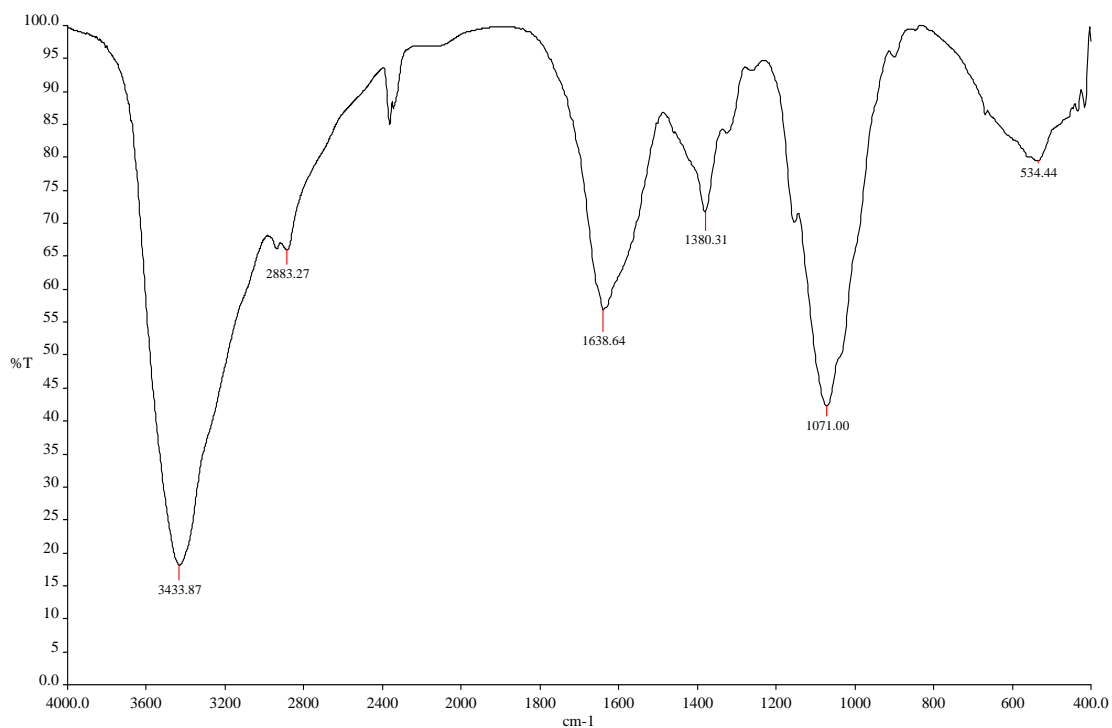


Figura 12. Espectro IR de quitosano-co-gálico

Bandas características (cm^{-1})	Rango reportado (cm^{-1})	Interpretación
3,433.87	3,000-3,700	-OH
2,883.27	-----	Ausencia de grupos metilo y metileno
1,638.64	Alrededor de 1,700	-CO-
1,380.31	-----	Conserva una señal similar al quitosano
1,071.00	-----	Señal menos intensa que en el quitosano

Tabla 3. Bandas de interpretación IR de quitosano-co-gálico

🌿 Quitosano-co-octil galato 15mM:

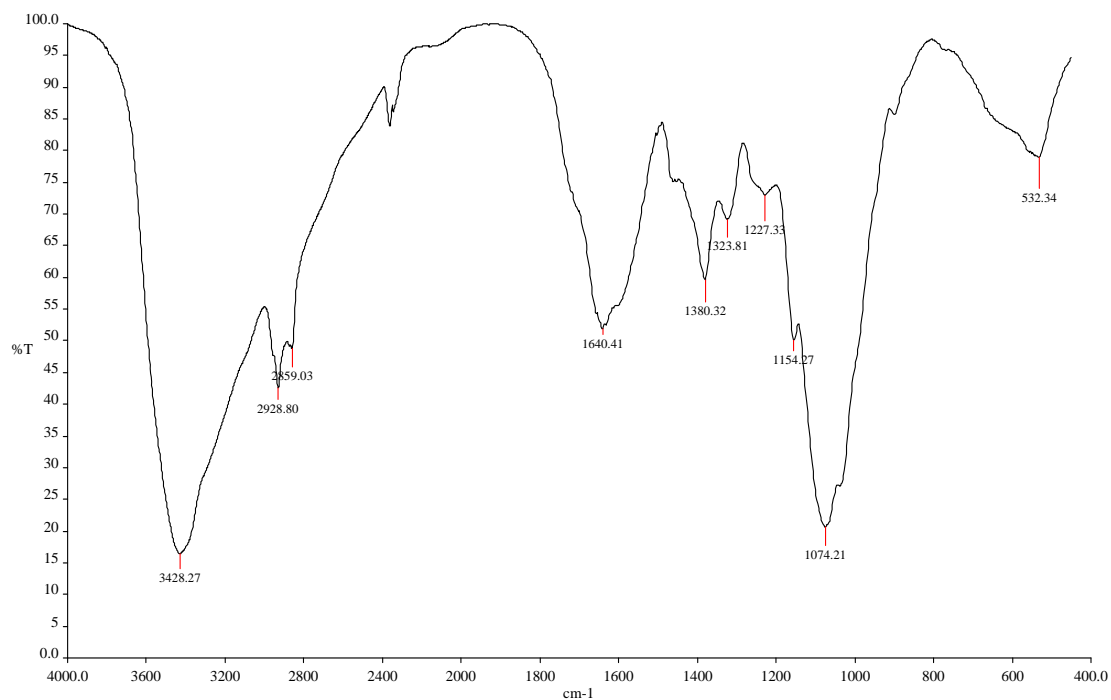


Figura 13. Espectro IR de quitosano-co-octil galato 15mM

Además de las señales características del polímero, debería de observarse una señal entre 1,720-1,725 cm^{-1} y otra aproximadamente en 1,460 cm^{-1} . Debido a que no estuvieron estas dos señales en el espectro, pudo confirmarse que no se incorporó todo el octil galato, lo cual es confirmativo con el cálculo de incorporación obtenido por la técnica de RMN.

Bandas características (cm^{-1})	Rango reportado (cm^{-1})	Interpretación
3,428.27	3,000-3,700	-OH
2,928.80	Alrededor de 2,925	-CH ₂
2,859.03	Alrededor de 2,850	-CH ₂
1,640.41	Alrededor de 1,700 1,800-1,650	-CO-
1,154.27	1,300-1,100	Señal confirmativa de -OH
1,074.21	-----	Señal más intensa que en el quitosano

Tabla 4. Bandas de interpretación IR de quitosano-co-octil galato 15mM

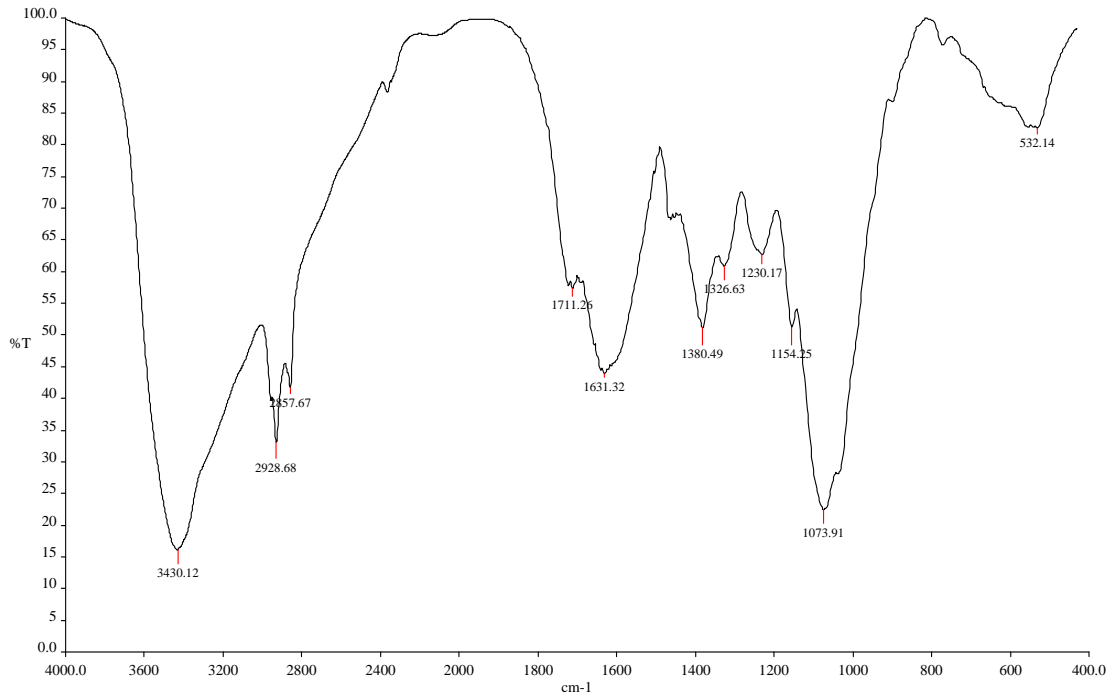


Figura 14. Espectro IR de quitosano-co-octil galato 30mM

- **Quitosano-co-octil galato 30mM:** La señal en $1,711.26 \text{ cm}^{-1}$ es la que mostró una mejor incorporación del octil galato al quitosano, a diferencia del octil galato con una concentración de 15mM.

Bandas características (cm ⁻¹)	Rango reportado (cm ⁻¹)	Interpretación
3,430.12	3,000-3,700	-OH
2,928.68	Alrededor de 2,925	-CH ₂
2,867.03	Alrededor de 2,850	-CH ₂
1,711.26	1,720-1,725 Cadena alifática de 4 o más - CH ₂	Confirma la incorporación de octil galato al quitosano.
1,631.32	Alrededor de 1,700 1,800-1,650	-CO-
1,461.90	Alrededor de 1,460	Señal confirmativa de -CH ₃
1,154.25	1,300-1,100	Señal confirmativa de -OH
1,073.91	-----	Señal ligeramente menos intensa que en el quitosano

Tabla 5. Bandas de interpretación IR de quitosano-co-octil galato 30mM

5.2.3 Rayos X

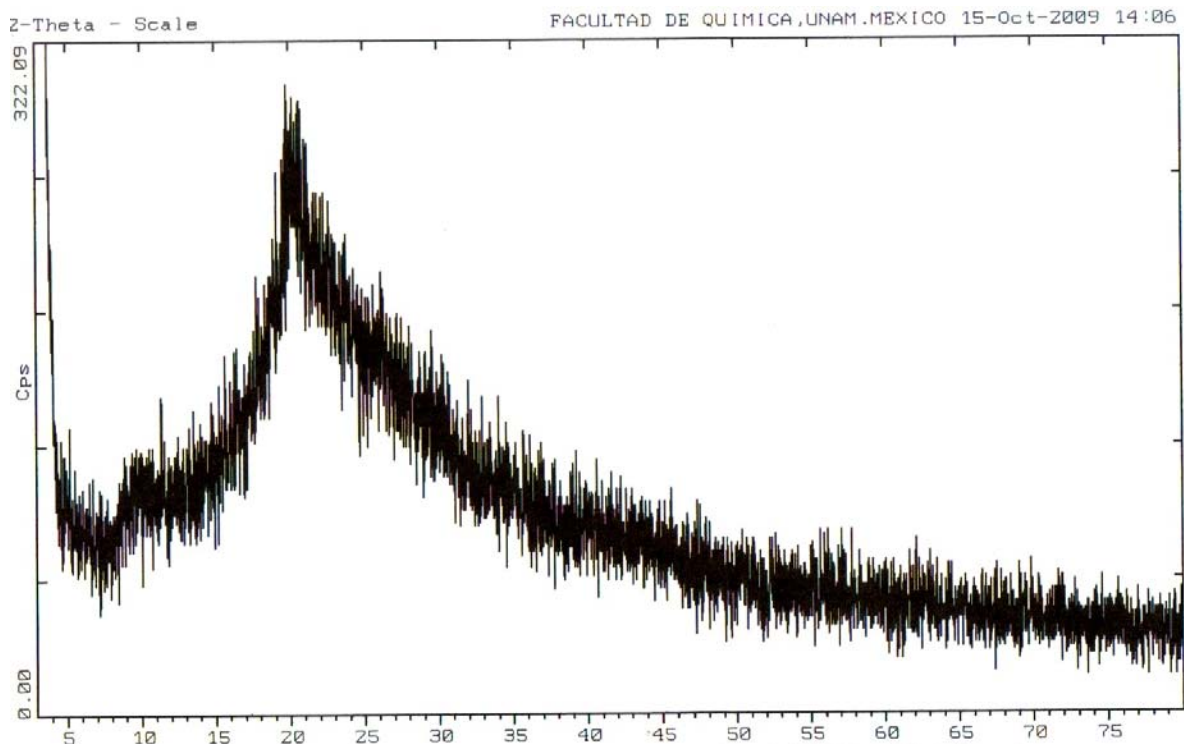


Figura 15. Espectro de rayos X de quitosano

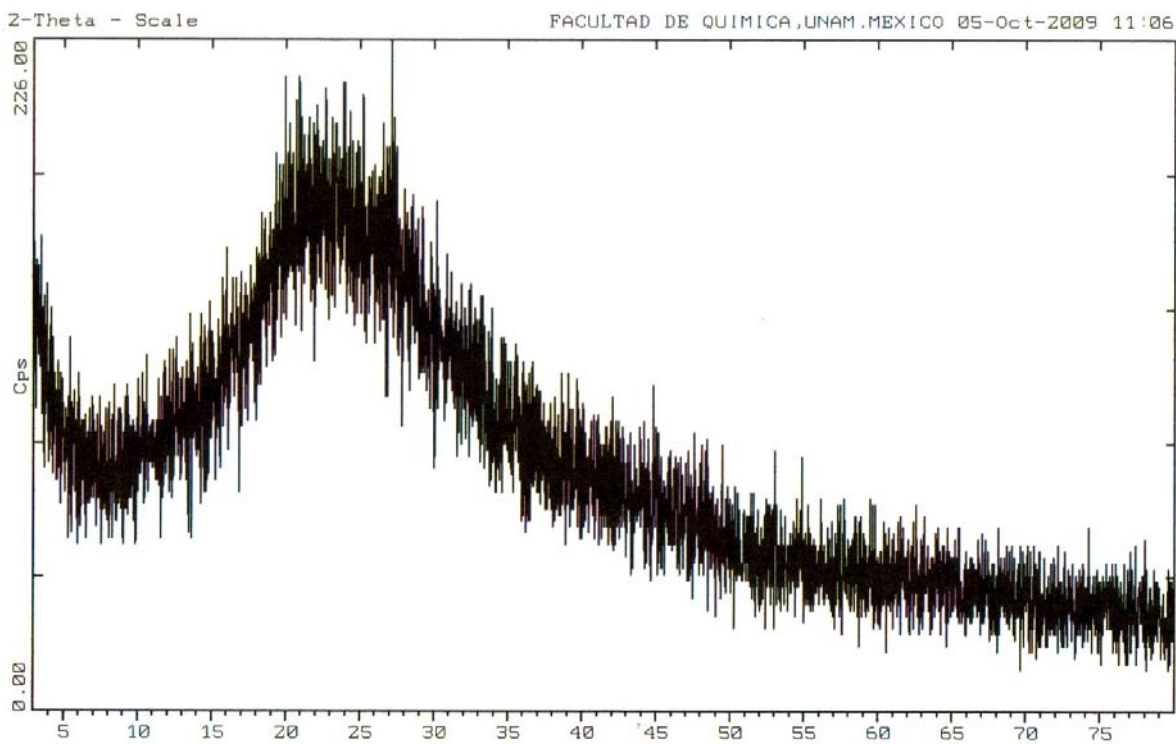


Figura 16. Espectro de rayos X de quitosano-co-gálico

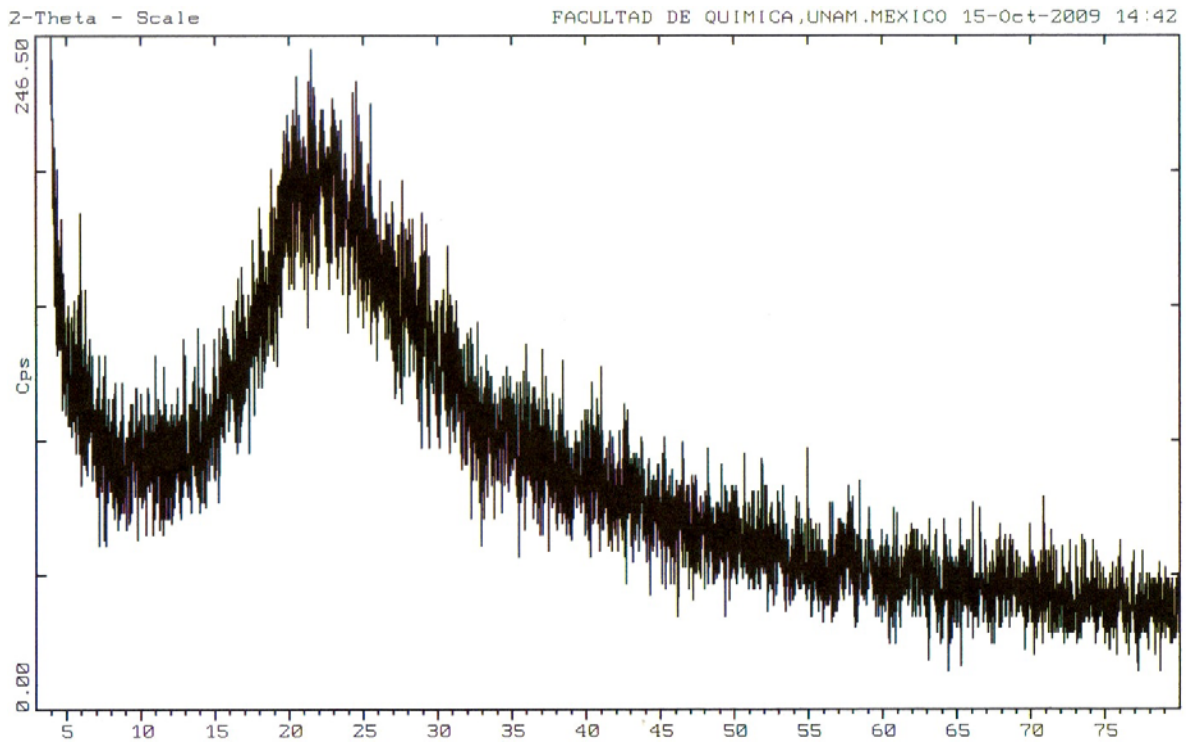


Figura 17. Espectro de rayos X de quitosano-co-octil galato 15mM

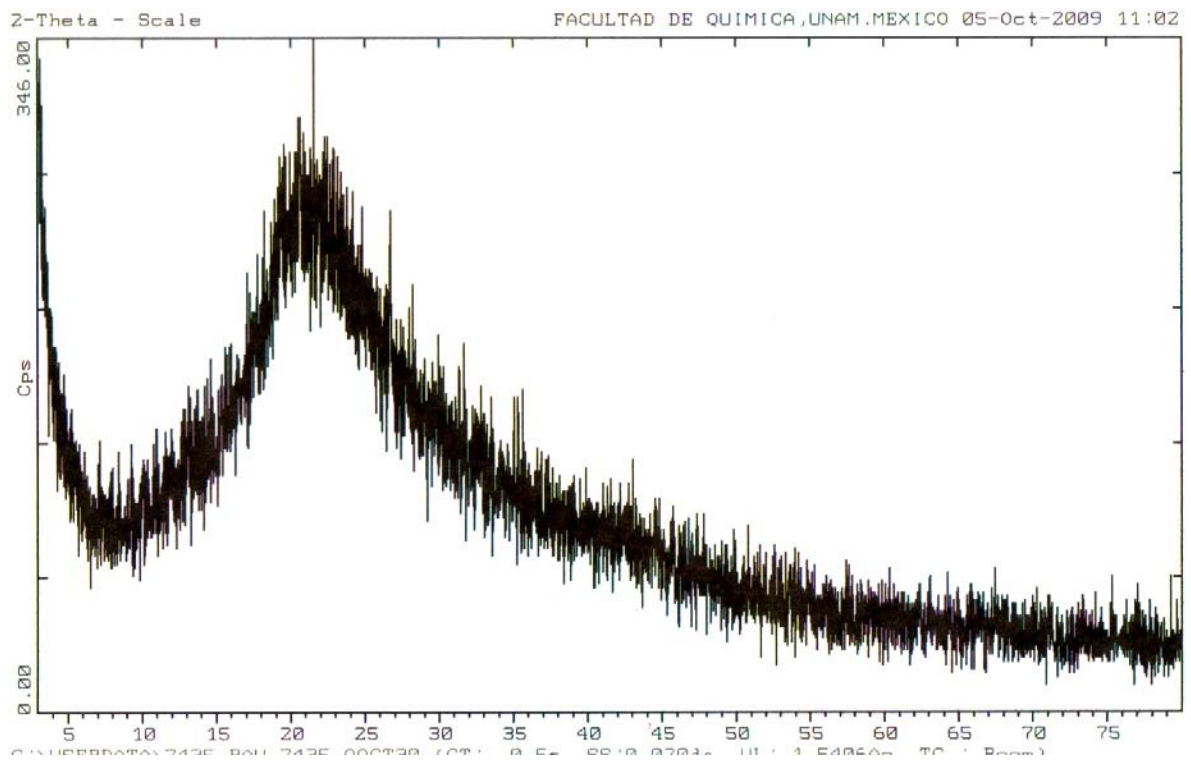


Figura 18. Espectro de rayos X de quitosano-co-octil galato 30mM

Los espectros de Rayos X demostraron que el quitosano y los materiales sintetizados no poseen una estructura cristalina y son completamente amorfos. Sin embargo, sí se notó una diferencia en cuanto a los polímeros con respecto al quitosano, en la única prolongación de pico que tienen las señales del espectro, se observó que en el caso del quitosano-co-gálico hubo una variación mayor en la señal, siendo menor en el caso del quitosano-co-octil galato 30mM y siguiéndole el polímero con octil galato 15mM, el cual, se distorsiona menos con respecto al quitosano nativo, esto quizás también debido a la menor incorporación de octil galato 15mM que octil galato 30mM.

5.2.4 Termogravimetría

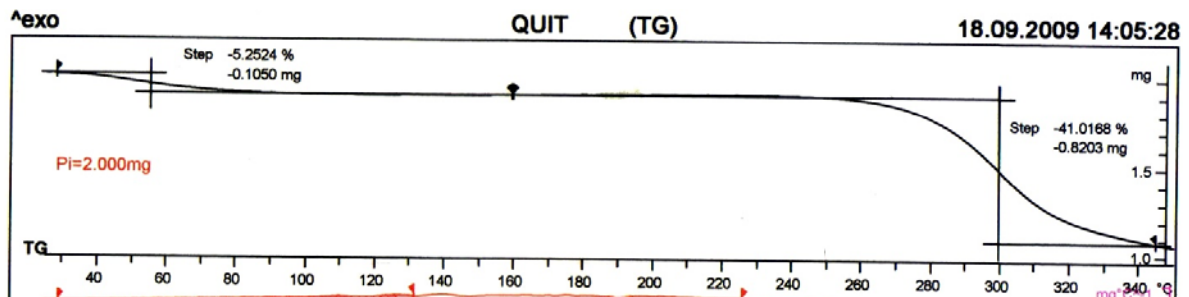


Figura 19. Termograma de quitosano

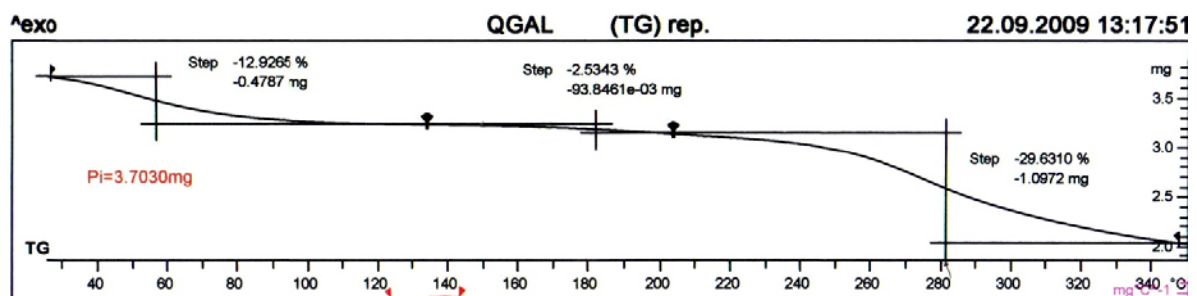


Figura 20. Termograma de quitosano-co-gálico

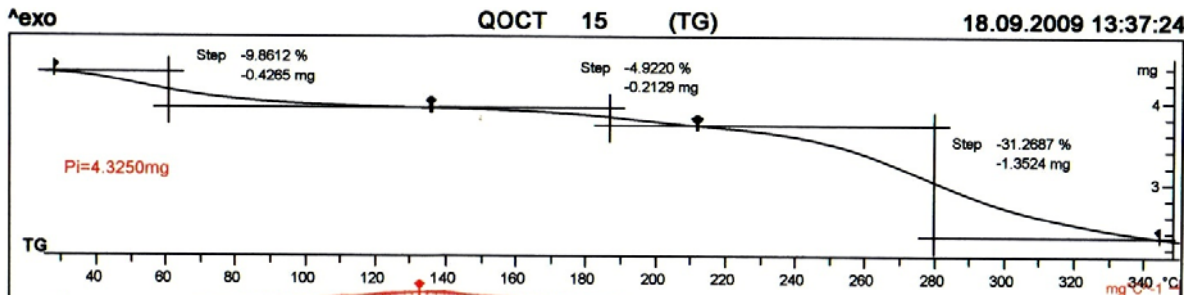


Figura 21. Termograma de quitosano-co-octil galato 15mM

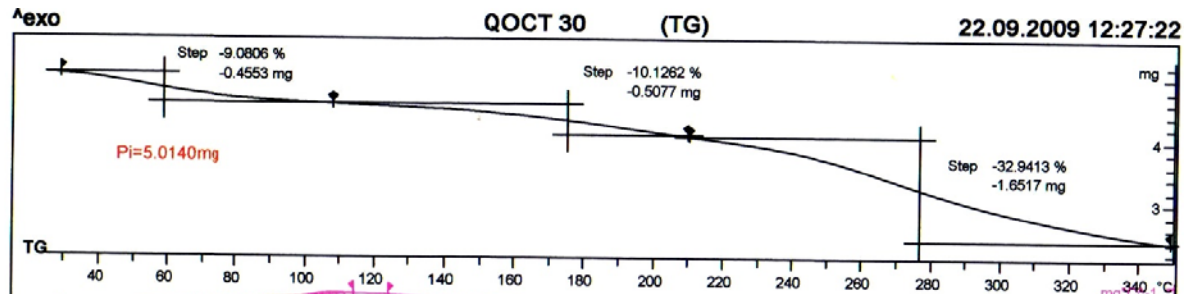


Figura 22. Termograma de quitosano-co-octil galato 30mM

El análisis termogravimétrico se realizó en un rango de 0 a 350°C, con lo cual se pudo comprobar la estabilidad térmica de los materiales analizados, tomando en cuenta las temperaturas aproximadas a las cuales se descomponen.

En la tabla 6 se muestran los materiales en orden de estabilidad según sus temperaturas de descomposición:

Material	Temperatura de descomposición (°C)
Quitosano	268.03
Quitosano-co-gálico	240.34
Quitosano-co-octil galato 15mM	231.89
Quitosano-co-octil galato 30mM	222.56

Tabla 6. Estabilidad térmica de los materiales

5.2.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Tanto en el quitosano como los materiales sintetizados, no se detectaron procesos endotérmicos ni exotérmicos al exponerlos a temperaturas de hasta 350°C, así mismo, no

poseen punto de fusión, punto de ebullición ni temperatura de transición vítrea definidos, puesto que los materiales no se deformaron a altas temperaturas ni se alteraron en su estructura molecular.

5.3 DETERMINACIÓN DE PODER ANTIOXIDANTE

5.3.1 CÁLCULOS

Se partió de preparar 100mL de una solución de DPPH de 0.025g/L (Sánchez-Moreno y col, 1998), aunque se pudieron utilizar concentraciones de DPPH de entre 0.415g/L a 0.025g/L (Sánchez-Moreno y col, 1998).

Se calcularon los moles contenidas en 2.9mL de la solución de DPPH adicionados en la celda de cuarzo: $\frac{0.025gDPPH}{L} \times \frac{1mol}{394.33gDPPH} = 63.40\mu M$ lo cual está dentro de lo

establecido en el rango de 50-100 μ M

Para conocer la cantidad de DPPH contenida en 2.9mL contenidos en la celda:

$$\frac{0.025gDPPH}{1000mL} \times 2.9mL = 7.25 \times 10^{-5} gDPPH$$

Se partió de 100mL de una solución de DPPH de tal concentración para que al utilizar 0.1mL de ella, se mantuviera la relación 171, 100, 50, 17 y 10g antioxidante/kg DPPH respectivamente. Por lo tanto, las cantidades necesarias de quitosano y polímeros para las respectivas relaciones se calcularon como sigue:

$$\frac{171gPolímero}{1000gDPPH} \times 7.25 \times 10^{-5} gDPPH = 1.24 \times 10^{-5} gPolímero$$

$$\frac{1.24 \times 10^{-5} gPolímero}{0.1mL} \times 100mL = 0.0124gPolímero \dots \text{Solución A}$$

La solución A, que se diluyó en metanol de grado industrial para la preparación de las otras concentraciones. A esta solución se le adicionaron 24 gotas de HCl 2M/100mL para ayudar

a disolver los polímeros.

$$\frac{100\text{gPolímero}}{1000\text{gDPPH}} \times 7.25 \times 10^{-5} \text{ gDPPH} = 7.25 \times 10^{-6} \text{ gPolímero}$$

$$\frac{50\text{gPolímero}}{1000\text{gDPPH}} \times 7.25 \times 10^{-5} \text{ gDPPH} = 3.63 \times 10^{-6} \text{ gPolímero}$$

$$\frac{17\text{gPolímero}}{1000\text{gDPPH}} \times 7.25 \times 10^{-5} \text{ gDPPH} = 1.23 \times 10^{-6} \text{ gPolímero}$$

$$\frac{10\text{gPolímero}}{1000\text{gDPPH}} \times 7.25 \times 10^{-5} \text{ gDPPH} = 7.25 \times 10^{-7} \text{ gPolímero}$$

Para determinar la capacidad antioxidante de los materiales poliméricos, se midió como el decremento de absorbancia del DPPH, y fue expresada en porcentaje de inhibición de los radicales DPPH de la siguiente manera (Curcio y col. 2009, Molyneux, 2004, Gadow y col, 1997):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Donde A_0 es la absorbancia del estándar corregido que se preparó en las mismas condiciones, sin muestra de polímeros, y A_1 es la absorbancia de las muestras de polímeros. Cada medida se hizo por triplicado.

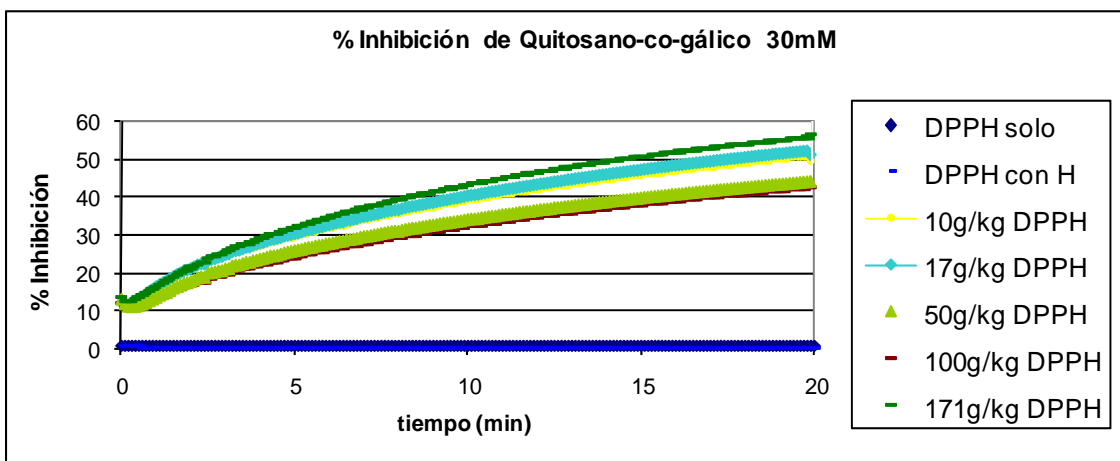
La accesibilidad del centro del radical libre DPPH de cada polímero, puede también influir en el orden de poder antioxidante obtenido (Sánchez-Moreno y col, 1998).

La buena actividad antioxidante mostrada por los materiales funcionalizados provee la eficiencia del método de reacción (Curcio y col., 2009).

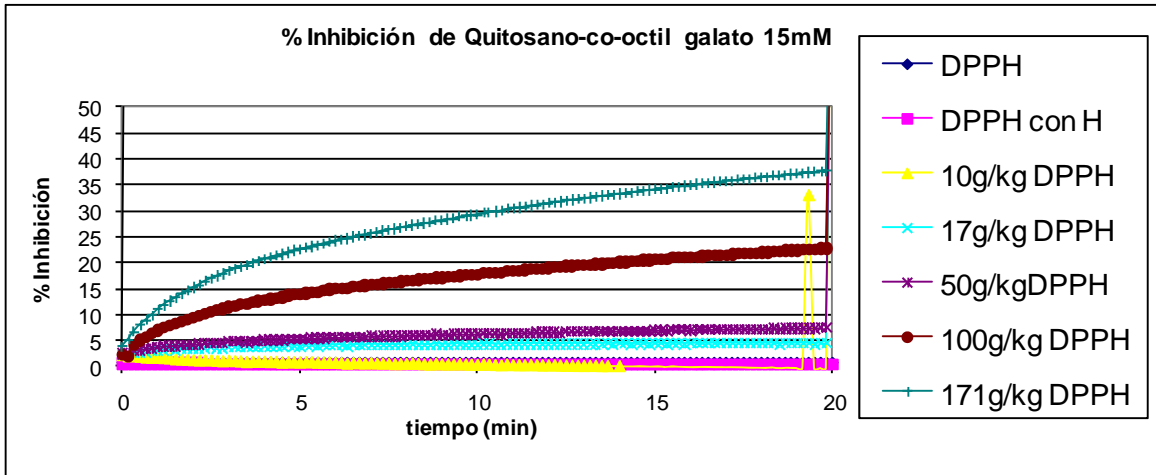
En las pruebas de poder antioxidante de los polímeros, se esperaba una tendencia a que las concentraciones más bajas de polímero, inhibiera menos que las concentraciones más altas, sin embargo, se obtuvieron resultados que no sólo dependían de la concentración de las

soluciones preparadas de polímeros al momento de realizar las pruebas.

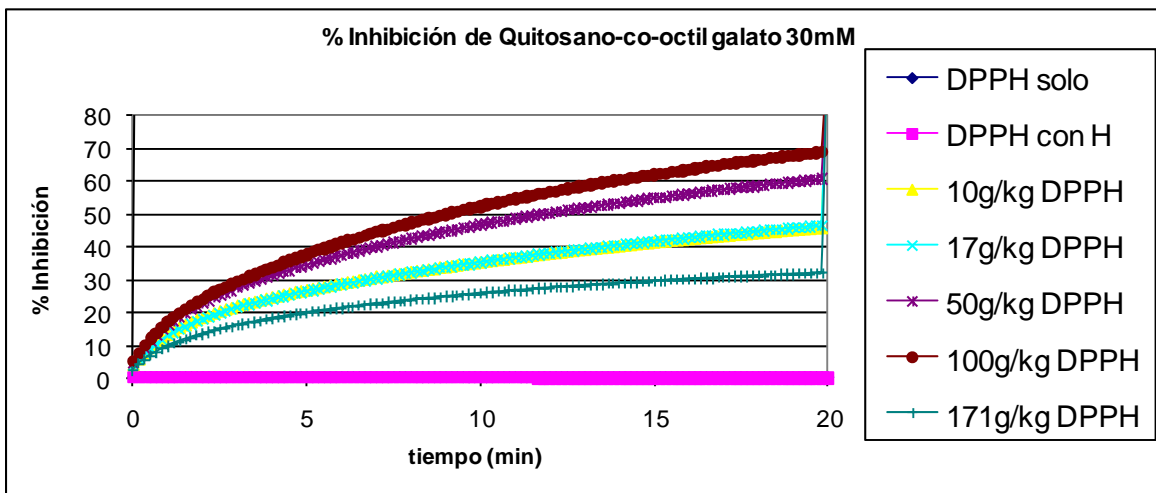
El polímero con ácido gálico tuvo mayor poder antioxidante, debido a que a concentraciones más bajas, presentó una capacidad superior para inhibir el radical DPPH a comparación de los otros polímeros. En el caso del quitosano-co-octil galato 15mM, la concentración de 10g polímero/kg DPPH no fue suficiente para degradar al radical DPPH, debido a que quizás no estuvo tan concentrado el octil galato, pese a ello, este polímero presentó la tendencia de inhibición esperada para el radical. En el caso del quitosano-co-octil galato 30mM, la concentración de 171g polímero/kg DPPH reflejó que el octil galato estuvo muy concentrado y es por ello que no presentó una inhibición considerable, de hecho, inhibió aún menos que la concentración más baja de 10g polímero/kg DPPH.



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de quitosano-co-gálico



Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de quitosano-co-octil galato 15Mm



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de quitosano-co-octil galato 30mM

5.4 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LOS POLÍMEROS EN PRESENCIA DE UN CONSORCIO MICROBIANO DE CEPAS DEL GÉNERO *PSEUDOMONAS*

El control positivo con medio mineral, cepas y peptona de carne presentó crecimiento microbiano, a diferencia del control negativo que se tenía con medio mineral y cepas solamente, donde no hubo desarrollo microbiano. Esto se debe a que la peptona proporciona la fuente de carbono adecuada para el buen desarrollo de los microorganismos. Debido a que en presencia de ninguno de los materiales hubo crecimiento microbiano, todos los polímeros tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*), después de 4 días de incubación

Como no hubo crecimiento microbiano, puesto que los polímeros no presentaron alteraciones y solamente precipitaron, se dice que tienen propiedades antimicrobianas efectivas.



Figura 23. Crecimiento celular en MM + peptona



Figura 24. Matracas inoculados en MM + polímeros





Material	Después de 92 horas
<p style="text-align: center;">Qitosano</p>	
<p style="text-align: center;">Qitosano-co-gálico</p>	
<p style="text-align: center;">Qitosano-co-octil galato 15mM</p>	
<p style="text-align: center;">Qitosano-co-octil galato 30mM</p>	

Tabla 7. Fotografías del medio mineral con los materiales y el consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas*, después de 4 días de incubación a 150rpm y 37°C.

5.5 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LODOS ACTIVADOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE LOS POLÍMEROS

La microbiota observada en los lodos activados consistía en boricellas, flagelados y flagelados coloniales principalmente, aunque también se encontraron algunas bacterias.

La observación al microscopio de los polímeros y del quitosano se realizó por triplicado a intervalos de 2 minutos durante un tiempo total de exposición de 20 minutos, y con ello se observó que en ninguno de los casos se mostró deformación en la morfología de los microorganismos, así también se mantuvo intacta su membrana celular. Con esta evidencia cualitativa puede inferirse que, tanto el quitosano solo como los polímeros no liberan ninguna sustancia tóxica que pueda dañar a los microorganismos, por lo tanto, estos materiales no se consideran tóxicos.

Cabe resaltar que entre más fino es el polvo del polímero, más fácilmente se dio la hidratación del mismo, al momento de adicionarlo al portaobjetos con lodos activados.

➤ Finura de los gránulos de polímeros:

Quitosano < Quitosano-co-gálico < Quitosano-co-octil galato 15mM < Quitosano-co-octil galato 30mM

➤ Grado de hidratación:

Quitosano < Quitosano-co-gálico < Quitosano-co-octil galato 15mM < Quitosano-co-octil galato 30mM

El quitosano no se hidrató.


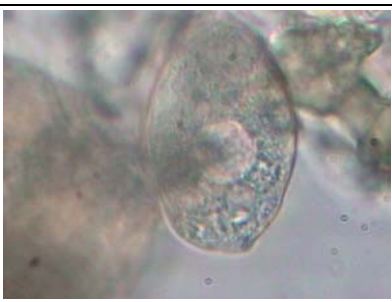






	Sin material	Con material
Quitosano		
Quitosano-co-gálico		
Quitosano-co-octil galato 15mM		
Quitosano-co-octil galato 30mM		

Tabla 8. Fotografías de lodos activados antes y después de adicionar los materiales

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

El mayor rendimiento de los polímeros se obtuvo con el quitosano-co-octil galato 30mM, siendo el rendimiento de un 92.45%, en segundo término el quitosano-co-octil galato 15mM con un 77.57% de rendimiento y por último el quitosano-co-gálico con un rendimiento de 70.76%

El porcentaje de incorporación de octil galato al quitosano, obtenido por RMN fue de 5.18% y se utilizó un quitosano Aldrich con un porcentaje de deacetilación de 85.78%

El análisis de IR fue complementario para la corroboración del porcentaje de incorporación de ácido gálico y octil galato en el quitosano, resultando una mayor incorporación de octil galato 30mM, octil galato 15mM y ácido gálico, respectivamente.

En el análisis de rayos X se comprobó que todos los materiales son estructuralmente amorfos.

El análisis termogravimétrico permitió comprobar la mayor estabilidad la tiene el quitosano, seguida de quitosano-co-gálico, quitosano-co-octil galato 15mM y el menos estable fue quitosano-co-octil galato 30mM

El análisis de DSC comprobó que los materiales no presentan punto de fusión, punto de ebullición ni temperatura de transición vítrea.

Tomando como referencia que el quitosano tiene mayor capacidad antioxidante, los

polímeros con mayor capacidad antioxidante fueron: quitosano-co-gálico, quitosano-co-octil galato 30mM y quitosano-co-octil galato 15mM, respectivamente.

En el estudio microbiológico con el consorcio microbiano de cepas del género *Pseudomonas* no se observó crecimiento de los microorganismos, por lo tanto se corroboraron las propiedades antimicrobianas de los materiales.

En el estudio con lodos activados se observó la supervivencia de los microorganismos y la ausencia de alteraciones morfológicas al adicionar los polímeros. Así, se pudo comprobar que los materiales no generan sustancias tóxicas que alteren a los microorganismos. Solamente se observó una mayor hidratación de los materiales entre más finos eran.

PERSPECTIVAS

- ❁ Determinar las propiedades reológicas de los polímeros para su aplicación en alimentos.
- ❁ Implementar el uso de biopelículas para el recubrimiento de frutos post-cosecha.
- ❁ Determinar *in vivo* la toxicidad de los materiales, utilizando animales de experimentación, a los cuales se les suministre dieta con alimento protegido con los polímeros.







BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, S. D. “Estudio de la funcionalización textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quitooligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas”. Tesis de Doctorado en Biotecnología, México. UAM, 2009. pp. 7-9
- Atkinson, B. S. “Biochemical engineering and biotechnology handbook”. Second Edition. USA, 1991.
- Barba, S. B. “Participación de peroxidasa en sistemas de tratamiento de aguas de la industria química”. Tesis de Licenciatura. México. UNAM, 1996. pp. 17
- Curcio, M., Pouci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., Picci, N. *Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57 (2009) 5933-5938.
- Denisov, I., Makris, T., Sligar, S. *Formation and decay of hydroperoxo-ferric heme complex in horseradish peroxidase studied by cryoradiolysis*. Journal of Biological Chemistry. 277 (2002) 42706-42710.
- Flores O. P. “Efecto de la carga orgánica sobre la eliminación biológica de nutrientes en agua residual doméstica con alto contenido de fósforo, empleando un sistema de lodos activados modificado”. Tesis de Maestría en Ingeniería. México. UNAM, 1998. pp. 33-35, 37, 41-43.
- Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C. *Comparison of the activity Aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (Aspalathus linearis), α -tocopherol, BHT and BHA*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45 (1997) 632-638.

- García-Melgares, M. L., De la Cuadra, J., Martín, B., Laguna, C., Martínez, L., Alegre, V. *Sensibilización por galatos. Revisión de 46 casos. Actas Dermosifiliográficas.* 98 (2007) 688-693. Revista en línea: http://www.doyma.es/revistas/ctl_servlet?_f=7012&articuloid=13112412. Google. Fecha de consulta: 25 de enero de 2010, 2:45pm
- Gudmund, S., Sandford, P. "Chitin & Chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications". Elsevier applied science. England, 1989. pp. 5, 29, 37-43, 51-56, 61-67.
- Hernández, G. H. "Polímeros biodegradables a base de almidón". Trabajo monográfico de actualización, UNAM, 1998.
- Hirai, A., Odani, H., Nakajima, A. *Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy.* Polymer Bulletin 26 (1991) 87-94.
- Illum, L. *Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.* Pharmaceutical Research. 5 (1998) 1326-1331.
- Kobayashi, S., Uyama, H., Kimura, S. *Enzymatic polymerization.* Chemical Reviews. 101 (2001) 3793-3818.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, C., Troncoso, A. M. Fett, R. *Actividad antioxidante de pigmentos antiocianicos.* Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas, 24 (2004) 691-693.
- Lalucat, J., Bennesar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N. *Biology of Pseudomonas stutzeri.* Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70 (2006) 510-547.
- Lárez, V. C. *Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos.* Revista Iberoamericana de Polímeros. 4 (2003) 91-108.

- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A., Berrada, M., Rodríguez, A., Wang, D., Buschmann, M., Gupta, A. *A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 32 (2003) 1149-1158.
- León, K., Santiago, J. *Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado*. Revista de la Sociedad Química de Perú 73 (2007) 158-165.
- Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J., Rincón, M. *Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón*. Multiciencias. 4 (2004) 1-10.
Responsable de la página: Red de Revistas Científicas de América Latina y del Caribe, España y Portugal. Sistema de Información Científica Redalyc.
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/904/90440203/90440203.html>. Google.
Fecha de consulta: 10 de marzo de 2010, 3:15pm
- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U. *Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements*. Sensors. 7 (2007) 2080-2095.
- Molyneux, P. *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant*. Journal of Science and Technology. 26 (2004) 211-219.
- Puskas, J. E., Sen, M. Y., Seo, K. S. *Green polymer chemistry using nature's catalysts, enzymes*. Journal of Polymer Science. Part A: Polym Chem. 47 (2009) 2959-2976.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., Du, Y. *Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity*. Carbohydrate Polymers. 63 (2006) 367-374.

- Ramírez, L. S. “Depuración de aguas residuales de una refinería de petróleo empleando un reactor de flujo cerrado”. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. México. UNAM, 1998. pp.34, 35, 72
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. *Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorization assay.* Free Radical Biology and Medicine. 26 (1999) 1231-1237.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.* Journal of the Science of Food and Agriculture. 76 (1998) 270-276.
- Sánchez, Angulo. “Caracterización fisicoquímica de polímeros”. Ed. Limusa, México, 1994.
- Seymour, R. “Introducción a la química de los polímeros”. Ed. Reverté, S.A., Barcelona, 1995.
- Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F., Vazquez-Duhalt, R. *Peroxidase catalized grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan.* Enzyme and Microbial Technology. 29 (2001) 380–385.
- Verheul, R., Amidi, M., Steenbergen, M., Riet, E., Jiskoot, W. *Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and in vitro biological properties of trimethylated chitosans.* Biomaterials. 30 (2009) 3129-3135.
- Wade, L. G. Jr. Química Orgánica. Quinta edición. Ed. Prentice Hall. España, 2004, pp. 355-356, 1184-1185.
- Responsable de la página: Biblioteca digital de la universidad de Chile. Sistema de Servicios de Información y Bibliotecas. SISIB.

- http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidh02/parte04/01.html. Google. Fecha de consulta: 25 de enero de 2010, 2:32pm
-  Responsable de la página: Von Worthington. Worthington Biochemical Corporation. <http://www.worthington-biochem.com/HPO/default.html>. Google. Fecha de consulta: 26 de enero de 2010, 12:40am
-  Responsable de la página: Food and Agricultura Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-300.pdf>. Google. Fecha de consulta: 25 de enero de 2010, 1:40pm
-  Responsable de la página: Sociedad Mercantil (Exportación) S.A. http://www.somerex.net/PA_acidogalico.html. Google. Fecha de consulta: 25 de enero de 2010, 4:45pm
-  Responsable de la página: Kenneth, Todar. Online Textbook of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>. Google. Fecha de consulta: 23 de enero de 2010, 11:30pm
-  Responsable de la página: DOE Joint Genome Institute. <http://genome.jgi-psf.org/psefl/psefl.home.html>. Google. Fecha de consulta: 25 de enero de 2010, 2:35pm
-  Responsable de la página: Lisa A. Haglund. University of Cincinnati. The Ohio State university. Case Western Reserve University. Net Wellness. Consumer Health Information. <http://www.netwellness.org/question.cfm/62795.htm>. Google. Fecha de consulta: 27 de enero de 2010, 2:03pm