



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
INGENIERÍA**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES  
ANTIMICROBIANAS Y ANTIOXIDANTES DE QUITOSANOS  
FUNCIONALIZADOS ENZIMÁTICAMENTE CON GALATO  
DE OCTILO.**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN INGENIERÍA**  
INGENIERÍA QUÍMICA – BIOSEPARACIONES

P R E S E N T A :

**I.Q. I. LIDIA ESTHER ITZINCAB MEJÍA**



TUTOR:  
**DR. MIQUEL GIMENO SECO**

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: DR. ALBERTO TECANTE CORONEL  
Secretario: DR. MODESTO JAVIER CRUZ GÓMEZ  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE  
1<sup>er</sup>. Suplente: DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO  
2<sup>do</sup>. Suplente: DR. MIQUEL GIMENO SECO

Lugares donde se realizó la tesis:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM  
LABORATORIO 314 CONJUNTO E

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UAM – I  
LABORATORIO DE BIOPOLÍMEROS 157 EDIFICIO “S”

**TUTOR DE TESIS.**

---

DR. MIQUEL GIMENO SECO

*“La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante.”*

*Paulo Coelho*

*A mis padres y mi hermana  
quienes siempre me han apoyado  
y por quienes valió la pena el esfuerzo.*

# AGRADECIMIENTOS

*A mi Padre Celestial por permitirme estar en esta época y poder conocer a personas tan especiales que me han ayudado en mi progreso personal y profesional.*

*A mis padres Lidia y José por su amor y comprensión, que a pesar de las épocas más difíciles en mi vida siempre me apoyaron y me ayudaron a seguir adelante. Por su preocupación y sacrificio para que yo tuviera una mejor educación, quienes siempre me han impulsado a dar lo mejor de mí y a quienes nunca podré pagarles todo lo que me han dado, por eso y más... gracias, los amo.*

*A mi hermana Gaby que a pesar de desarrollarnos en campos diferentes siempre ha sido mi ejemplo a seguir, ya que siempre me ha mostrado que cuando luchamos y nos esforzamos podemos lograr nuestras metas.*

*A mi abuelita Luisa (†) que siempre me mostró su cariño, amor y preocupación y que donde quiera que estés sé que siempre te seguirás preocupando por cada uno de tus nietos. Te extraño.*

*A mis tíos que siempre me mandaban sus mejores deseos y me animaban a seguir adelante.*

*A mis primos quienes siempre que regresaba de vacaciones a Mérida me tenían preparada una bienvenida sorpresa y que con sus risas y travesuras me alegran la vida, les amo peques y no tan peques.*

*A Miquel, por asesorarme, apoyarme y compartir su conocimiento conmigo a lo largo de este proyecto, por su paciencia y sobre todo por su valiosa amistad.*

*A Keiko, por asesorarme en la parte microbiológica de este proyecto, por tu paciencia y que a pesar del poco tiempo de conocernos me brindaste tu amistad, gracias.*

**A Alberto**, por sus valiosos consejos y apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

**A los investigadores miembros del jurado** por la revisión y sus amables comentarios y sugerencias en este trabajo.

**A Rosy, Aracely y Rafa** por motivarme y sembrar en mí esa inquietud por la búsqueda del conocimiento.

**A María y Carlos**, porque desde la licenciatura siempre estuvieron apoyándome y motivándome a continuar cuando estaba a punto de desertar, por sus consejos en la tesis, por su apoyo durante todo el proceso de titulación, pero sobre todo por brindarme su amistad.

**A mis amigos y “compatriotas”** Ricardo, Teddy y Santiago por haber hecho más amena mi estadía en la maestría y en la ciudad.

**A Elena** por enseñarme que no podemos saber todo, pero siempre existe un libro o un artículo en donde encontrar la respuesta.

**A mis compañeros de la maestría** porque cada uno aprendí algo valioso y por hacer que las clases fueran más divertidas.

A todo aquel que pudiera llegar a olvidar y que han sido parte importante para lograr la meta de esta aventura... Muchas gracias.

**—ESTETRABAJO FUE FINANCIADO POR EL  
CONACYT A TRAVÉS DE LOS PROYECTOS  
APOYO A CONSOLIDACIÓN SNI - 1  
CONVOCATORIA 2009 Y SEP – BÁSICA  
MODALIDAD J3 CONVOCATORIA 2011. SE  
AGRADECE A CONACYT POR LA BECA DE  
MAESTRÍA”**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
2.1. QUITINA .....	5
2.1.1. <i>Obtención de la quitina</i> .....	6
2.1.2. <i>Aplicaciones de la quitina</i> .....	7
2.2. QUITOSANO.....	8
2.2.1. <i>Obtención del quitosano</i> .....	8
2.2.2. <i>Caracterización del quitosano</i> .....	9
2.2.2.1. Solubilidad del quitosano .....	9
2.2.2.2. Grado de N-acetilación (DA) .....	9
2.2.2.3. Peso molecular.....	10
2.2.2.4. Actividad antimicrobiana del quitosano. ....	10
2.2.3. <i>Usos y aplicaciones del quitosano</i> .....	11
2.2.4. <i>Modificación de quitosano</i> .....	12
2.3. ENZIMAS .....	14
2.3.1. <i>HRP</i> .....	14
2.4. ANTIOXIDANTES.....	16
2.4.1. <i>Galatos</i> .....	18
2.4.1.1. Galato de Octilo.....	18
2.5. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) .....	19
2.6. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	20
2.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	21
2.7.1. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i> .....	21
2.7.2. <i>Espectroscopía Infrarroja</i> .....	21
2.7.3. <i>Termogravimetría</i> .....	22
2.7.4. <i>Cromatografía de exclusión molecular SEC</i> .....	22
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. HIPÓTESIS:.....	25
3.2. OBJETIVO GENERAL: .....	25
3.3. OBJETIVOS PARTICULARES:.....	25
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>26</b>
4.1. MODIFICACIÓN QUITOSANO.....	26
4.1.1. <i>Materiales</i> .....	26
4.1.2. <i>Equipos</i> .....	26
4.2. REACCIÓN.....	26
4.2.1. <i>Purificación de los polímeros</i> .....	27
4.3. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL MODIFICADO: .....	27
4.3.1. <i>Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR –ATR)</i> .....	27

4.3.2.	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i> .....	28
4.3.3.	<i>Termogravimetría</i> .....	29
4.3.4.	<i>Determinación de pesos moleculares</i> .....	29
4.4.	DETERMINACIÓN PODER ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH .....	29
4.5.	DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	30
4.5.1.	<i>Reactivos y microorganismo</i> .....	30
4.5.2.	<i>Preparación del inóculo</i> .....	30
4.5.3.	<i>Ensayo para la determinación de MIC</i> .....	31
4.5.4.	<i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i> .....	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1.	MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO .....	33
5.2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	34
5.2.1.	<i>Espectrofotometría FTIR empleando la técnica de ATR</i> .....	34
5.2.2.	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i> .....	37
5.2.3.	<i>Termogravimetría</i> .....	39
5.2.4.	<i>Determinación de pesos moleculares</i> .....	41
5.3.	DETERMINACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE .....	43
5.4.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	44
5.4.1.	<i>Determinación de MIC</i> .....	44
5.4.2.	<i>Determinación del efecto de los quitosanos nativos y modificados sobre la actividad bacteriana</i> .....	46
5.4.3.	<i>Determinación del efecto de los quitosanos nativos y modificados sobre el porcentaje de inhibición</i> .....	49
5.4.4.	<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i> .....	49
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO</b> .....	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>59</b>
9.1.	ANEXO A: CROMATOGRAMAS DE DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES DE LOS QUITOSANOS NATIVOS Y MODIFICADOS .....	60
9.2.	ANEXO B: ANÁLISIS ESTADÍSTICO (ANOVA) DE LOS MATERIALES EMPLEADOS PARA LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	66

# ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA QUITINA	5
FIGURA 2 ESTRUCTURA DEL QUITOSANO	8
FIGURA 3 MECANISMO DE INSERCIÓN DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES AL QUITOSANO <sup>6</sup>	13
FIGURA 4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HRP EN LA FORMACIÓN DE RADICALES <sup>33</sup>	15
FIGURA 5 REACCIÓN DE REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH	17
FIGURA 6 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL GO	19
FIGURA 7 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UN CROMATÓGRAFO PARA SEC	23
FIGURA 8 ESPECTRÓMETRO DE IR (ATR-FTIR)	28
FIGURA 9 ESQUEMA PARA LA REACCIÓN DEL MATERIAL MODIFICADO CON EL RADICAL DPPH.	30
FIGURA 10 ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE MODIFICACIÓN DE QUITOSANO CON GO.	33
FIGURA 11 ESPECTRO ATR - FTIR DEL QUITOSANO NATIVO.	34
FIGURA 12 ESPECTRO ATR - FTIR DEL QUITOSANO MODIFICADO (QOG20B)	35
FIGURA 13 ESPECTROS DE TRANSMITANCIA DE ATR – FTIR A) MUESTRAS DE QUITOSANOS DE PESO MOLECULAR BAJO Y B) MUESTRAS DE QUITOSANOS DE PESO MOLECULAR MEDIO.	36
FIGURA 14 ESPECTRO <sup>1</sup> H RMN DEL QUITOSANO NATIVO. R CORRESPONDE A UN H EN EL CASO DE LA FORMA DESACETILADA O A –CO-CH <sub>3</sub> EN EL CASO DE LA FORMA ACETILADA	37
FIGURA 15 ESPECTRO <sup>1</sup> H RMN DEL QUITOSANO MODIFICADO QOG10B. AMPLIACIÓN DE LA SEÑAL CORRESPONDIENTE A LOS PROTONES DE LA CADENA ALQUÍLICA.	38
FIGURA 16 TERMOGRAMAS — QM, ---- QB, ● QOG20M ○ QOG10M, ▲ QOG20B Y Δ QOG10B	40
FIGURA 17 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH CON EL MATERIAL POLIMÉRICO.	43
FIGURA 18 PRUEBA ANTIMICROBIANA DE MATERIALES BASADOS EN QUITOSANOS DE PESO MOLECULAR MEDIO A 1, 2, 3, 4 Y 5 G/L DE CONCENTRACIÓN AL TIEMPO CERO.	44
FIGURA 19 PRUEBA ANTIMICROBIANA DE MATERIALES BASADOS EN QUITOSANOS DE PESO MOLECULAR MEDIO A 1, 2, 3, 4 Y 5 G/L DE CONCENTRACIÓN DESPUÉS DE 24 H DE INCUBACIÓN.	45
FIGURA 20 EFECTO DEL MATERIAL QOG20M EN DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> . EL BLANCO SE REFIERE A SOLO MEDIO DE CULTIVO SIN MICROORGANISMO. EL CONTROL SE REFIERE AL MEDIO DE CULTIVO CON MICROORGANISMO PERO SIN LA ADICIÓN DE QUITOSANO.	46
FIGURA 21 CUENTA BACTERIANA DE <i>E. COLI</i> CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSANOS NATIVOS Y MODIFICADOS DESPUÉS DE 24 H DE INCUBACIÓN. SE PRESENTA EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA. LETRAS IGUALES NO SON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE A A ≤ 0.05.	47
FIGURA 22 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUITOSANOS NATIVOS Y MODIFICADOS A 24 H DE INCUBACIÓN. SE PRESENTA EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA. LETRAS IGUALES NO SON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE A A ≤ 0.05.	49
FIGURA 23 MICROSCOPIAS ELECTRÓNICAS DE BARRIDO DE A) CONTROL ( <i>E. COLI</i> EN CALDO NUTRITIVO), B) CON ADICIÓN DE QOG20M, C) QOG10B Y D) QOG10M	50
FIGURA 24 CROMATOGRAMA QOG20B	60
FIGURA 25 CROMATOGRAMA QOG20M	61
FIGURA 26 CROMATOGRAMA QOG10B	62
FIGURA 27 CROMATOGRAMA QOG10M	63
FIGURA 28 CROMATOGRAMA QB	64
FIGURA 29 CROMATOGRAMA QM	65

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 PRINCIPALES CAMPOS DE APLICACIÓN Y USOS DEL QUITOSANO <sup>14, 28</sup> .....	11
TABLA 2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO. ....	27
TABLA 3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL CÁLCULO DE MIC.....	31
TABLA 4 BANDAS CARACTERÍSTICAS DEL QUITOSANO NATIVO.....	34
TABLA 5 BANDAS CARACTERÍSTICAS DE QOG20B .....	35
TABLA 6 PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN OBTENIDOS DEL RMN.....	39
TABLA 7 TEMPERATURAS DE DESCOMPOSICIÓN (T <sub>D</sub> ).....	40
TABLA 8 PESO MOLECULAR PROMEDIO NUMÉRICO, POLIDISPERSIDADES Y % DE ÁREA DE QUITOSANOS MODIFICADOS Y NATIVOS .....	41
TABLA 9 CURVA DE CALIBRACIÓN DE PESOS MOLECULARES. ....	42
TABLA 10 ANOVA EMPLEANDO LOG (UFC/ML) COMO VARIABLE DE RESPUESTA Y EL PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO COMO FUENTE DE VARIACIÓN.....	66
TABLA 11 ANOVA EMPLEANDO LOG (UFC/ML) COMO VARIABLE DE RESPUESTA Y LA CONCENTRACIÓN DEL GO COMO FUENTE DE VARIACIÓN. ....	66
TABLA 12 ANOVA EMPLEANDO LOG (UFC/ML) COMO VARIABLE DE RESPUESTA Y LA CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL COMO FUENTE DE VARIACIÓN. ....	66
TABLA 13 ANOVA EMPLEANDO LOG (UFC/ML) COMO VARIABLE DE RESPUESTA INTERACTUANDO LOS 3 FACTORES DE VARIACIÓN, MATERIAL (QUITOSANO – GO) VS CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL.....	67
TABLA 14 ANOVA EMPLEANDO EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN COMO VARIABLE DE RESPUESTA Y EL PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO COMO FUENTE DE VARIACIÓN. ....	67
TABLA 15 ANOVA EMPLEANDO EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN COMO VARIABLE DE RESPUESTA Y LA CONCENTRACIÓN DE GO COMO FUENTE DE VARIACIÓN. ....	67
TABLA 16 ANOVA EMPLEANDO EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN COMO VARIABLE DE RESPUESTA Y LA CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL COMO FUENTE DE VARIACIÓN.....	67
TABLA 17 ANOVA EMPLEANDO EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN COMO VARIABLE DE RESPUESTA INTERACTUANDO LOS 3 FACTORES DE VARIACIÓN, MATERIAL (QUITOSANO – GO) VS CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL.....	68

# LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS*	2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)
ATP*	Adenosin trifosfato
ATR - FTIR*	Attenued Total reflection Fourier transform Infrared
BCB*	Prueba de blanqueo del $\beta$ -caroteno
CUPRAC*	Capacidad antioxidante por reducción cúprica.
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada u Óxido de deuterio.
DA*	Grado de acetilación
DCI	Ácido Clorhídrico deuterado
DP*	Grado de polimerización
DPPH*	1,1, Difenil-2-picrilhidracil
EDTA*	Ácido etilendiaminotetraacético
ET*	Transferencia de Electrones
FRAP*	Poder antioxidante por reducción del ion Férrico
GlcNAc*	Acetilglucosamina
GPC*	Cromatografía de permeación en gel
HAT*	Transferencia de átomos de Hidrógeno
HPLC*	Cromatografía líquida de alta resolución.
HRP*	Peroxidasa de rábano
IR	Infrarrojo
$\lambda$	longitud de onda
MIC*	Concentración mínima inhibitoria
mM	milimolar
M <sub>w</sub>	Peso molecular promedio
GO	Galato de octilo u OG*
ppm	partes por millón
QB	Quitosano de peso molecular bajo
QM	Quitosano de peso molecular medio.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SEM*	Microscopía electrónica de barrido

SEC*	Cromatografía de exclusión molecular o de tamaño.
T <sub>d</sub>	Temperatura de degradación
TEAC*	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox.
TGA	Termogravimetría
UDP*	Uridin difosfato
UFC	Unidades formadoras de colonias

\* Por sus siglas en inglés

## RESUMEN

Existe un interés considerable en el uso de los polímeros naturales o biopolímeros para obtener productos comerciales de interés. Sin embargo, para obtener una funcionalidad deseada de éstos, en algunos casos es necesario injertar ciertos compuestos a la cadena principal del polímero. En los últimos años el interés en quitosano y su modificación se ha incrementado, ya que posee propiedades biológicas versátiles (es biodegradable, biocompatible y con actividad antibacteriana). Sin embargo, la mayoría de las modificaciones de este polímero se ha llevado a cabo con reactivos potencialmente perjudiciales para el medio ambiente o salud humana, lo que impide el uso de estos materiales en alimentos o aplicaciones médicas.

En esta tesis se llevó a cabo la modificación enzimática de quitosanos, de peso molecular medio y bajo, con la inserción de galato de octilo (GO) utilizando peroxidasa de rábano (HRP) en medio acuoso. Se estudió el efecto de esta modificación en las propiedades del quitosano, variando las concentraciones del GO. Los polímeros obtenidos fueron caracterizados mediante  $^1\text{H}$  RMN, ATR – FTIR, SEC y TGA, además se evaluaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los materiales funcionales. Se encontró que la inserción de GO al quitosano llevada a cabo enzimáticamente le proporcionaba actividad antioxidante, la cual aumentó proporcionalmente a la concentración de galato injertado. Para un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 16.3% la incorporación de GO fue de 8.2% y para un porcentaje de inhibición de 5.7% la incorporación del galato fue de 4.8%. A pesar de que la inserción del GO a la molécula del quitosano pudo llevarse a cabo en el grupo  $-\text{NH}_2$ , éste no perdió su actividad antimicrobiana y se encontró que para todos estos materiales una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.5 g/L.

## ABSTRACT

There is considerable interest in exploiting natural biopolymers for commercial products. However, a desired functionality is often attained by grafting compounds of interest onto the polymer backbone. In recent years, the interest for chitosan and its modified forms has increased since it has versatile biological properties, such as biodegradability, biocompatibility and antibacterial activity. However, most of the modifications of this polymer have been reported using toxic procedures, which prevent the use of these materials in food or medical applications.

Herein, enzymatic modification of two commercial chitosans of low and medium average molecular weights has been carried out by grafting octyl gallate (OG) using horseradish peroxidase (HRP) biocatalyst in aqueous media. The polymers were characterized by  $^1\text{H}$  NMR, ATR – FTIR, SEC and TGA and also, the antimicrobial and antioxidant properties of functional materials were evaluated. It was found that grafting of OG onto chitosan was carried out enzymatically to provide antioxidant activity in chitosan, which increases as the concentration of OG increased, as reflected in the percentage of incorporation of the antioxidant to the chitosan molecule. Therein, an inhibition percentage of 16.3% was achieved with an 8.2% incorporation of OG and that of 5.7% inhibition with an OG incorporation of 4.8%. Despite the inclusion of OG on the chitosan molecule could take place in the group –  $\text{NH}_2$ , its antimicrobial activity remained with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.5 g/L.

# 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los polímeros comerciales se obtienen a partir de materias primas derivadas del petróleo con procesos químicos que no siempre son seguros y amigables con el medio ambiente.<sup>1</sup>

Debido a esto, se han realizado investigaciones para el desarrollo de materiales “ambientalmente amigables”, obtenidos de fuentes alternativas, con menor consumo de energía, biodegradables y no tóxicos para el medio ambiente. Dentro de estas alternativas se encuentran los biopolímeros, que son macromoléculas que se encuentran en la naturaleza formadas por unidades de repetición de glucosa o fructosa principalmente.<sup>2</sup> Los más comunes son la celulosa, el almidón y la quitina, los cuales son biodegradables y las producciones principales se obtienen de fuentes renovables, por lo que representan una ruta alternativa interesante a los polímeros no-degradables para aplicaciones de vida corta (empaques, material quirúrgico, higiene, agricultura).<sup>3</sup>

En la actualidad la quitina, y el quitosano, uno de sus principales derivados, están siendo estudiados en aplicaciones en farmacéutica, cosméticos, biomedicina, biotecnología, agricultura, alimentos y la industria no alimentaria (tratamiento de aguas, papelera y textil). Estos polímeros han emergido como una nueva clase de materiales fisiológicos de alta funcionalidad debido a su actividad biológica, excelente biocompatibilidad y completa biodegradabilidad.<sup>4</sup>

Se han empleado una gran variedad de métodos químicos para modificar al quitosano. Específicamente, aldehídos, cloruros de ácido, anhídridos de ácido y epóxidos se han utilizado para reaccionar con los grupos amino o hidroxilo del quitosano.<sup>5</sup> Sin embargo, las modificaciones químicas no son preferidas para aplicaciones en alimentos debido a que se pone en entredicho la inocuidad de los productos.<sup>6</sup> Es por eso que la modificación enzimática es una alternativa atractiva, ya que las enzimas promueven reacciones más limpias y seguras a las prácticas actuales del uso de reactivos perjudiciales y de condiciones severas. Además, la selectividad de las enzimas tiene el potencial para el control de una mejor estructura macromolecular.<sup>7,8</sup>

El uso de enzimas oxidativas representa un método atractivo para la modificación de biopolímeros. Las oxidoreductasas son enzimas con la habilidad de poder injertar compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes a la cadena principal de algunos

polímeros por medio de la formación de radicales libres, ya que se cree que están involucradas en varios procesos naturales de polimerización, tales como la de la lignina y la suberina.<sup>1,8</sup>

En el presente trabajo se lleva a cabo la modificación enzimática del quitosano con GO, con el fin de obtener materiales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes que puedan ser una alternativa en la conservación de alimentos así como su uso en otras áreas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Quitina

La quitina fue descubierta en 1811 por el químico francés Henri Braconnot cuando aisló una fracción llamada "fungine" de las membranas celulares de las setas. Posteriormente Odier en un artículo sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola "quitina" (del griego *tunic*, envoltura). El uso creciente de la quitina, así como de sus derivados, ha sido motivado por el hecho de que, al contrario de los derivados del petróleo, ésta se obtiene de los subproductos de las industrias pesqueras, fuente naturalmente renovable, no tóxica y no alergénica además de antimicrobiana y biodegradable.<sup>9,10</sup>

La quitina es el segundo polisacárido natural más abundante derivado de los exoesqueletos de crustáceos y también de las paredes celulares de hongos e insectos.<sup>4</sup> Es representada generalmente como un polisacárido lineal con estructura molecular compuesta de unidades de *N*-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glucosa con enlaces  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , como se muestra en la Figura 1.

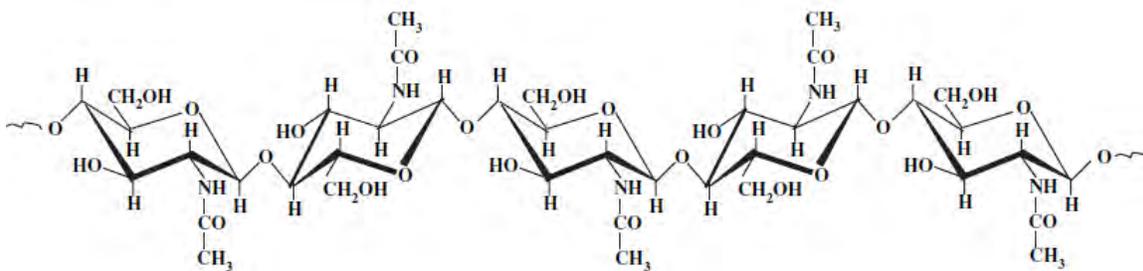
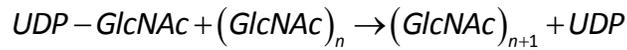


Figura 1 Estructura química de la quitina

La quitina es sintetizada de acuerdo a una ruta de reacción común que termina con la polimerización de la *N*-acetilglucosamina (NAG) del precursor activado uridin difosfato-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), en este proceso, el nitrógeno proviene de la glutamina. La ruta de reacción incluye la acción de la quitina dentro de la matriz extracelular. En crustáceos, el aparato de Golgi es el involucrado directamente con la

síntesis y secreción de la quitina<sup>11</sup>. La ecuación de la síntesis de reacción para la quitina es:



### **2.1.1. Obtención de la quitina**

Los crustáceos son la mayor fuente de quitina a nivel industrial con una producción aproximada de 2,200 Ton. El contenido de quitina en crustáceos varía entre 2 y 12% del total de masa corporal, el contenido de ésta, así como proteína, minerales y carotenoides en el exoesqueleto de crustáceos varía dependiendo de la especie, parte del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo. El exoesqueleto contiene alrededor del 15 a 40% de quitina.<sup>12</sup>

Para el aislamiento de la quitina se requieren tres operaciones básicas:<sup>13,14</sup>

- Desmineralización: En esta etapa se utilizan mayormente 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 para no degradar el polímero, también puede utilizarse el EDTA como agente acomplejante para evitar esa degradación. Alternativamente existen procesos biotecnológicos basados en fermentaciones lácticas que proponen condiciones más suaves, y por ende ambientalmente benignos, para la preservación de las características del material además de fomentar la recuperación de otras sustancias de alto valor agregado como pigmentos y proteínas.<sup>12,16</sup>
- Desproteínización: puede llevarse a cabo de dos maneras:
  - ♦ 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.
  - ♦ Enzimática: se realiza una digestión enzimática o fermentación con bacterias proteolíticas con actividad no quinolítica. Este proceso disminuye la degradación química de la quitina, pero no hay una eliminación completa de la proteína.<sup>12</sup>
- Decoloración: Este paso se realiza con la finalidad de eliminar 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 el polímero.

### **2.1.2. Aplicaciones de la quitina**

La quitina tiene baja toxicidad y es inerte en el tracto intestinal de los mamíferos; es biodegradable debido a la presencia de quitinasas distribuidas ampliamente en la naturaleza y se encuentra en bacterias, hongos, plantas y en el sistema digestivo de muchos animales. La quitina ha sido utilizada para preparar columnas de cromatografía de afinidad para aislar lectinas y determinar su estructura. La quitina y la 6-O-carboximetilquitina activan los macrófagos peritoneales *in vivo*, suprimen el crecimiento de tumores celulares en ratones y también acelera la curación de heridas. La quitina ha sido utilizada ampliamente para inmovilizar enzimas y células enteras. Los materiales basados en quitina también son utilizados para el tratamiento de contaminantes industriales y absorber complejos de tiosulfato de plata y actínidos.<sup>14</sup>

La quitina puede ser procesada en forma de películas y fibras, éstas son no alergénicas, pero si pueden ser desodorantes, antibacteriales y controlan la humedad. Pero su principal aplicación es en medicina y farmacéutica como materiales de vendaje de heridas y para liberación controlada de fármacos. Otra aplicación interesante está en un compuesto hidroxipatita-quitina-quitosano como material de relleno de huesos, el cual forma una pasta de auto endurecimiento para la regeneración tisular guiada en el tratamiento de defectos óseos periodontales. Los oligómeros de quitina, los cuales tienen también una importancia relevante, han sido afirmados como fármacos anticáncer, y el oligómero con DP5 es activo en el control de la fotosíntesis del maíz y la soya, entre otros ejemplos.<sup>14</sup>

## 2.2. Quitosano

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quién encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto más soluble en ácidos orgánicos, y la llamó quitina modificada. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó «quitosano». El quitosano también se encuentra de forma natural como un componente presente en las paredes celulares de algunos hongos.<sup>17</sup> Siendo un polisacárido lineal consistente en  $\beta$  - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - amino - 2 - deoxy -  $\beta$  - D - glucosa desde una desacetilación parcial (>70%) de la quitina, figura 2, es no tóxico, biodegradable, biofuncional, biocompatible, y con actividades antimicrobianas y antifúngicas superiores a las del biopolímero precursor.<sup>18</sup>

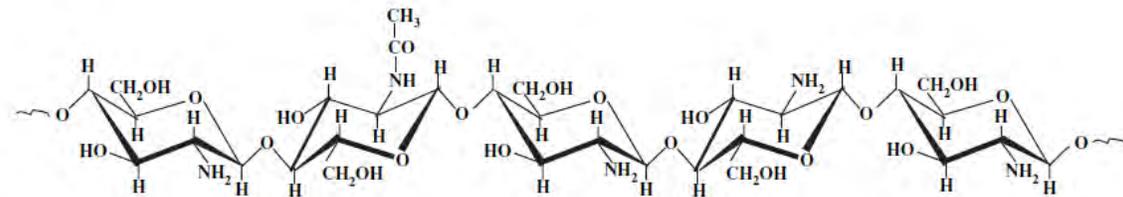


Figura 2 Estructura del quitosano

### 2.2.1. Obtención del quitosano

El quitosano puede obtenerse por desacetilación química o enzimática de la quitina:

- Desacetilación química: este se lleva a cabo en medio alcalino, puede ser a temperatura bajas o incluso ambiente durante largos períodos de tiempo con lo que se asegura la uniformidad de la reacción y la distribución de los grupos acetil resultante es arbitraria.<sup>19</sup> O también es posible llevarla a cabo a altas temperaturas (100 – 140 °C) los cuales favorecen la velocidad de la reacción, sin embargo la desacetilación se da con mayor rapidez en las regiones amorfas que en las áreas cristalinas lo que proporcionan una distribución de bloque e impide una mayor desacetilación. Las condiciones a las que se realice la desacetilación deben ser estrictamente controlados (temperatura, concentración del medio alcalino y tiempos de reacción) ya que influyen en el grado de acetilación, peso molecular,

distribución molecular y por consiguiente en las propiedades y aplicaciones del biopolímero resultante.<sup>20</sup>

- Desacetilación enzimática: en este método se utiliza las enzimas desacetilasas, que favorecen a que el proceso sea controlado y no degradativo. Las enzimas catalizan la conversión de la quitina a quitosano mediante hidrólisis de los residuos de NAc se denomina quitina desacetilasas.<sup>13</sup> 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.<sup>21</sup>

## **2.2.2. Caracterización del quitosano**

### **2.2.2.1. Solubilidad del quitosano**

El quitosano es insoluble en disolventes orgánicos puros, pero es soluble en ácidos acuosos, los cuáles pueden convertir las unidades de glucosamina en su forma soluble protonada ( $R-NH_3^+$ ) que precipita en soluciones alcalinas o con polianiones y forma geles a pH bajos.<sup>22</sup>

Algunos ácidos orgánicos como el fórmico, acético, láctico, pirúvico y ácidos oxálicos con frecuencia son usados para su disolución. Ácidos minerales como ácidos hidroclicóricos y nítricos también solubilizan al quitosano, sin embargo al ácido sulfúrico no es conveniente debido a las atracciones iónicas entre la cadena producida por el anión divalente del sulfato.<sup>12</sup>

### **2.2.2.2. Grado de N-acetilación (DA)**

El contenido de grupos N – acetil y la repartición de los residuos a lo largo de la cadena, dependen de las condiciones de desacetilación y las fuentes de la quitina de origen.<sup>23</sup> DA es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de este polímero debido al rol que juega en la solubilidad. Al incrementar el DA del quitosano acercándose al límite de 50%, el intervalo de pH en el que pueda ser soluble aumenta, lo cual se debe a la variación del pKa ocasionada por las propiedades polielectrolíticas del mismo.<sup>24, 25</sup>

Existen diferentes métodos para determinar el DA del quitosano como la titulación potenciométrica, espectroscopía de IR, UV, cromatografía gaseosa de pirólisis, análisis

térmicos, hidrólisis ácida y HPLC, GPC-SEC y RMN de protón y carbono.<sup>14, 26</sup> Éste último presenta la ventaja de la utilización de una pequeña cantidad de muestra y pueden analizarse muestras en forma líquida o sólida una de sus desventajas es su elevado costo.

#### **2.2.2.3. Peso molecular**

Distintos factores durante la extracción de la quitina y la preparación del quitosano pueden influenciar en el  $M_w$  del polímero final. Altas temperaturas y concentraciones de ácidos y álcalis así como largos tiempos de reacción, pueden degradar y ocasionar depolimerización de las cadenas. Diferentes autores han observado que el  $M_w$  del quitosano tiene una influencia en su actividad biológica.<sup>12</sup> Las distribuciones de los pesos moleculares del quitosano han sido obtenidas utilizando SEC. Los  $M_w$  se determinan por viscosimetría empleando para tal fin las ecuaciones de Mark-Houwink con sus correspondientes parámetros para el caso del quitosano.<sup>26</sup>

#### **2.2.2.4. Actividad antimicrobiana del quitosano.**

En los últimos años, la actividad antimicrobiana del quitosano sobre diferentes grupos de microorganismos ha sido motivo de muchos estudios. Esta característica solo se presenta en medios ácidos. Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana del quitosano es dependiente de su peso molecular y del DA.<sup>22</sup>

No se conoce la manera exacta en la que el quitosano y sus derivados actúan, aún así varios mecanismos han sido propuestos, uno de ellos se basa en la interacción entre la carga positiva de las moléculas de quitosano y las cargas negativas de las membranas celulares alterando su permeabilidad y permitiendo la pérdida de constituyentes intracelulares. Se cree que el quitosano en bajas concentraciones actúa en la superficie de bacterias interactuando con la carga negativa ocasionando aglutinación, mientras que a altas concentraciones el gran número de cargas positivas podrían impartir una carga neta positiva manteniéndolas en suspensión. También puede actuar como agente quelante que se une selectivamente con trazas de metales inhibiendo la producción de toxinas de los microorganismos,<sup>15</sup> en plantas puede ser capaz de activar distintos mecanismos de defensa en el tejido del hospedero, funciona como un agente enlazante de agua inhibiendo a varias enzimas. Existe la posibilidad de que quitosanos de muy bajo

peso molecular lleguen a enlazarse con el ADN e inhibir la síntesis de ARN y por consiguiente de proteínas.<sup>12, 27</sup>

### 2.2.3. Usos y aplicaciones del quitosano

Por las propiedades fisicoquímicas así como antimicrobianas del quitosano permite que éste sea utilizado en la industria de alimentos y fármacos, así como en diferentes ámbitos de la investigación y proyectos ambientales y agrícolas.

**Tabla 1 Principales campos de aplicación y usos del quitosano<sup>14, 28</sup>**

Agricultura	Como mecanismo de defensa en plantas Como estimulación de crecimiento de plantas Como recubrimiento de semillas Para liberación controlada de fertilizantes y nutrientes dentro del suelo
Tratamiento de aguas y residuales	Como floculante para clarificar agua (agua bebible y piscinas) Para remover iones metálicos Elimina polímeros sintéticos Reduce olores
Alimentos y bebidas	Fibra dietética Reductor de colesterol Como conservador Adelgazante y estabilizador de salsas Como recubrimiento protector, fungistático y antibacterial para frutas
Cosméticos y artículos de tocador	Mantiene la humectación en la piel Para tratamiento de acné Para mejorar la flexibilidad del cabello Reduce la estática en el cabello En higiene bucal (pasta de dientes, goma de mascar)
Biofarmacéuticos	Inmunológico, antitumoral Hemostático y anticoagulante Cicatrizante y como bacteriostático Liberación controlada de fármacos Elaboración de hilos para sutura

#### 2.2.4. Modificación de quitosano

Lo que se pretende al modificar el quitosano es que el polímero tenga una permeabilidad adecuada para determinados gases como el CO<sub>2</sub>, el NO<sub>2</sub>, el vapor de agua e incluso del O<sub>2</sub>, como es para el caso de alimentos post – cosecha que requieren “respirar” para conservar una buena apariencia y una mayor vida de anaquel. Por otro lado, en la mayoría de los casos se busca el mejorar las propiedades mecánicas del mismo añadiendo plastificantes, ya que el quitosano suele ser poco flexible. También se sabe que para algunos productos poliméricos específicos, especialmente para aplicaciones biomédicas y de alimentos, como pueda ser en empaques, la esterilización vía radiación es necesaria lo que conlleva al riesgo de degradación, es decir, escisión de cadena y/o enlaces cruzados, dando lugar a la decoloración, formación de grietas en la superficie, rigidez y pérdida de propiedades mecánicas. Estos serios inconvenientes pueden controlarse por el desarrollo de modificaciones químicas en la cadena del polímero.<sup>6</sup>

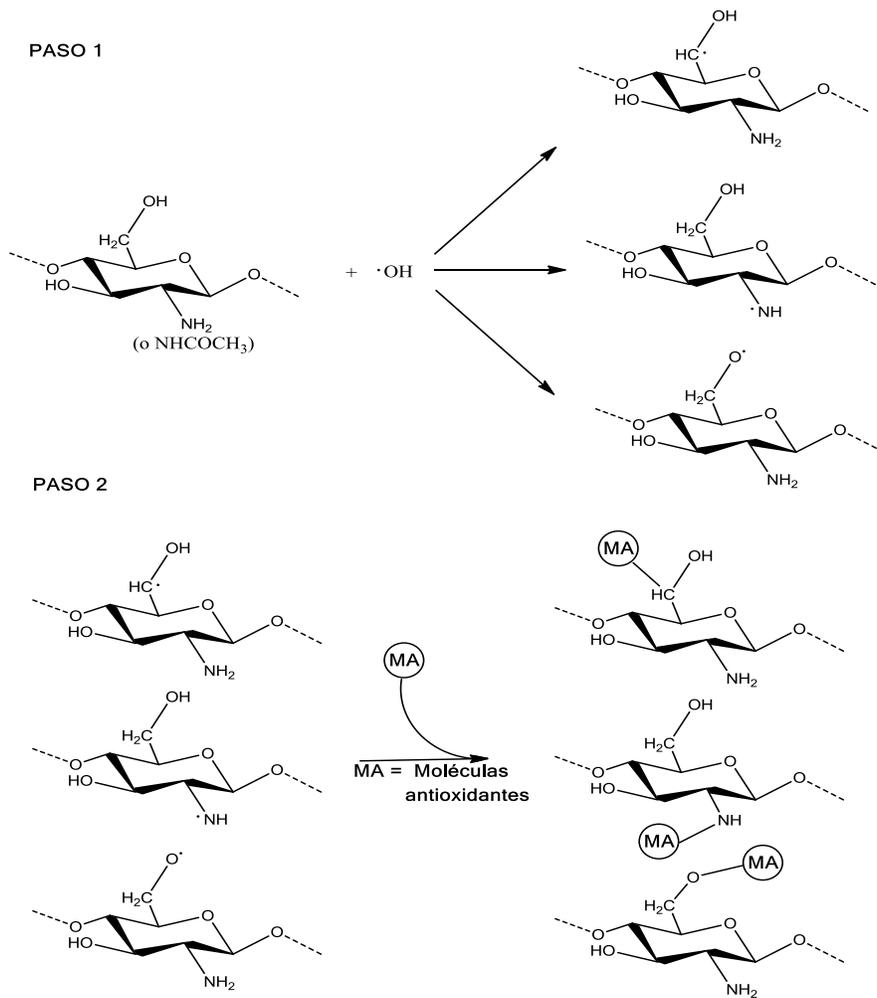
Específicamente, por sus propiedades se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la modificación de quitosano vía química o enzimática, para obtener materiales basados en polisacáridos avanzados con propiedades bioactivas únicas.<sup>5,6</sup>

Un nuevo enfoque para mejorar la funcionalidad de quitosano es la de incorporar el principio activo de los extractos de plantas naturales y sus derivados en la red troncal de polisacáridos.<sup>7</sup> Uno de esos casos es la inserción 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.<sup>1</sup>

Además se reporta que los antioxidantes pueden funcionar como aditivos para polímeros, ya que en algunos procesos de extrusión el antioxidante retarda la degradación oxidativa y/o térmica. A pesar de que los antioxidantes de bajo peso molecular son menos efectivos a causa de su pobre estabilidad térmica, el uso de estas moléculas en la unión covalente dentro de una matriz polimérica mejora su estabilidad y reduce los efectos de migración y floreciente (blooming). Esto puede causar que los antioxidantes sean fáciles de remover del polímero hospedador por frotación mecánica, volatilización o lixiviación.<sup>6</sup>

Para introducir antioxidantes en el quitosano se han utilizado macromoléculas tóxicas y químicos irritantes para la piel, los más utilizados son la carbodiimida, persulfato de amonio o formaldehído.<sup>7</sup> Por esto, las modificaciones químicas no son preferidas generalmente para aplicaciones en alimentos o en biomedicina debido a la formación de productos potencialmente perjudiciales.<sup>6</sup> La modificación enzimática es una alternativa atractiva, debido a la alta especificidad de la catálisis enzimática, a ser amigable con el ambiente y el usar procesos de baja toxicidad.<sup>7</sup>

En la literatura se encuentra que la inserción de la molécula del antioxidante al quitosano se lleva a cabo por una reacción de incorporación inducida por radicales libres.<sup>1, 7</sup> Un posible mecanismo de inserción vía enzimática de antioxidante al quitosano se presenta en la Figura 3.



**Figura 3** Mecanismo de inserción de Moléculas antioxidantes al quitosano<sup>6</sup>

En donde los radicales hidroxilo, generados por la interacción de par redox de los componentes, involucra a los átomos de H en  $\alpha$  - metileno ( $\text{CH}_2$ ) o el del grupo hidroxilo del grupo hidroximetileno del quitosano. Además, el grupo amino libre del quitosano pueden verse también involucrados en la formación del macroradical.<sup>6</sup>

## **2.3. Enzimas**

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica. Son altamente específicas, tanto en la reacción que cataliza como en la elección de sustratos. La gama de reacciones catalizadas por enzimas es muy general (reacciones hidrolíticas, esterificaciones, amidaciones, poliesterificaciones, oxido-reducciones, aldo condensaciones, entre otros).<sup>29-32</sup>

Algunas enzimas del género oxidoreductasas, como peroxidasas y laccasas, han sido empleadas para la polimerización oxidativa de derivados fenólicos y anilina resultando compuestos poliaromáticos.<sup>33</sup>

### **2.3.1. HRP**

Las peroxidasas pertenecen a la categoría de las oxidoreductasas y están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser extraídas fácilmente de la mayoría de las células de las plantas, algunos órganos y tejidos animales. Esta enzima utiliza como cofactor el grupo hemo. Estas oxidoreductasas usan el peróxido de hidrógeno o alquil peróxidos como oxidantes. Las peroxidasas se caracterizan por catalizar la oxidación de uno o dos electrones de varios sustratos orgánicos e inorgánicos principalmente en la presencia de peróxido de hidrógeno.<sup>34</sup>

Las peroxidasas tienen amplio potencial en diferentes campos de aplicación. A diferencia de otras enzimas puras comerciales como las lipasas, son mucho más económicas y generalmente sus tiempos de reacción son más cortos y similares a los procesos catalíticos no enzimáticos. Además, el hecho de ser de origen vegetal exenta a ésta de los controles y regulaciones obligatorios en aquellas enzimas de origen microbiano o animal. Estas encuentran uso por ejemplo en el tratamiento peroxidativo de aguas residuales a fin de remover fenoles aromáticos y aminas de soluciones acuosas

usando el sistema peroxidasa/peróxido. Pero su mayor aplicación se encuentra en el campo de diagnóstico analítico, donde las peroxidasas son usadas como un componente clave de biosensores y en inmunoensayos; en bioelectródos y en producción de fármacos. A pesar del valor de las peroxidasas, su uso comercial actual está limitado, principalmente por la baja estabilidad de la peroxidasa en presencia de su sustrato natural, el peróxido de hidrógeno, ya que la presencia de altas concentraciones de éste último lleva a la inactivación de hemoproteínas, incluyendo las peroxidasas.<sup>34</sup>

Se ha reportado que la HRP en presencia de  $H_2O_2$  cataliza la polimerización por radicales libres de fenoles, aunque solo cataliza la oxidación inicial de los sustratos fenólicos, el crecimiento de la cadena polimérica ocurre de manera no enzimática, y la reacción transcurre en cuestión de minutos siendo considerada como rápida.<sup>35</sup>

Puskas *et al* reportan un posible mecanismo de acción de la peroxidasa. En el cual el sitio activo de la enzima, o grupo hemo hierro – protoporfirina como se muestra en la figura 4. El mecanismo de reacción involucra la oxidación del  $Fe^{+3}$  a un derivado oxo-hierro a expensas del  $H_2O_2$ ; seguido por la sustracción de un electrón precedente de un sustrato rico en electrones.<sup>33</sup>

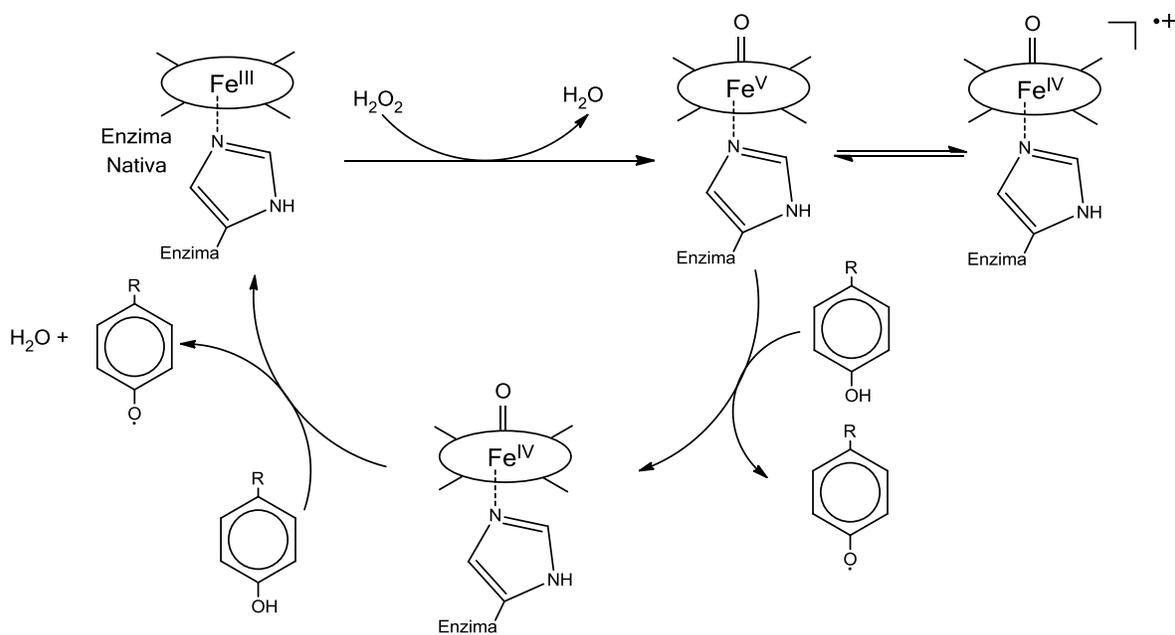


Figura 4 Mecanismo de acción de la HRP en la formación de radicales<sup>33</sup>

Por estas características se ha estudiado la habilidad de la HRP, entre otras cosas para injertar fenoles a polisacáridos.<sup>1</sup>

## 2.4. Antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser clasificados como un "terminador" de radicales libres, queladores de iones metálicos capaces de catalizar la oxidación lipídica, o como "secuestrador" (scavenger) de los radicales, como por ejemplo el oxígeno. La oxidación es uno de los procesos más importantes en el deterioro de alimentos porque puede afectar la inocuidad, el color, sabor y textura de éstos. Los antioxidantes pueden proteger la calidad de los alimentos previniendo la deterioración oxidativa de los lípidos o pigmentos.<sup>36</sup>

Se han hecho diferentes ensayos para determinar la capacidad antioxidante de alimentos y muestras biológicas, entendiéndose como la capacidad antioxidante a la habilidad de moléculas redox en alimentos y sistemas biológicos para retardar o evitar la formación de radicales libres.<sup>37</sup>

Los métodos para la determinación de capacidad antioxidante se clasifican básicamente en dos grupos, dependiendo del mecanismo de reacción: métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y métodos basados en la transferencia de electrones (ET). La mayoría de los ensayos basados en HAT aplican un esquema competitivo, en el cual el antioxidante y el sustrato compiten por generar, térmicamente, radicales peroxilo mediante la descomposición de compuestos azo. Los ensayos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce.<sup>38</sup>

Algunos métodos para la determinación de capacidad antioxidante son los siguientes:

- *TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox)*

La prueba TEAC o prueba ácido 2,2' – azinobis (3-ethyl benzothiazoline – 6 – sulfonic acid) (ABTS) está basado en la terminación (scavenging) del catión radical ABTS<sup>•+</sup> por los antioxidantes presentes en la muestra. El radical tiene un color verde azulado con absorbancias máximas de 645, 734 y 815 nm. Cuando hay compuestos antioxidantes en el medio de reacción, ellos capturan al radical libre, lo cual se

traduce en pérdida de color y por lo tanto en una reducción de la absorbancia, correspondiendo cuantitativamente a la concentración de antioxidantes presentes.<sup>37</sup>

- *DPPH (1,1 - Diphenyl – 2 – picrylhydrazyl)*

La molécula de 1,1 - Diphenyl – 2 – picrylhydrazyl o DPPH es caracterizada como un radical libre estable debido a la deslocalización. El DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados estables y comercialmente disponibles. Este método se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH<sup>•</sup> por antioxidantes en el cuál la solución de DPPH pasa del púrpura a amarillo.<sup>39</sup>



Figura 5 Reacción de reducción del radical DPPH

- *FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power)*

Este método ocurre por reducción directa, simple operacionalmente y reproducible. Consiste en la formación de un complejo férrico con el reactivo TPTZ (2, 4,6 – tripyridyl-s-triazine), el cual en la presencia de antioxidantes forma un complejo azul de máxima absorción a 593 nm. Es similar al método TEAC a diferencia de que éste se realiza en pH neutros y el FRAP se lleva a cabo en condiciones ácidas (pH 3.6). Los resultados se expresan en unidades FRAP, una unidad FRAP está definida arbitrariamente como la reducción de 1 mol de Fe (III) a Fe (II).<sup>40</sup>

- *BCB ( $\beta$ -carotene blaching test)*

Está basado en la decoloración del  $\beta$  – caroteno por acción de radicales libres. El efecto es medido a una longitud de onda de 470 nm después de un tiempo de reacción cercano a los 120 minutos.<sup>21</sup>

- **CUPRAC** (*Cupric reducing antioxidant capacity*)

Este método se basa en la reducción de Cu (II) a Cu(I) para el fondo de la cuestión de la reducción de sustancias de la muestra que es objeto de análisis, la detección de los iones Cu (I) se realiza mediante la medición de la formación de los complejos dada por el Cu (I) y el quelante batocuproína (2,9 – dimetil – 4, 7 – difenil – 1,10 – fenantrolina), éste complejo tiene un absorción del espectro con máximo a 480 – 490 nm. La evaluación se realiza comparando a los valores de absorbancia ( $\lambda = 490$  nm), de análisis de la muestra con la curva de calibración obtenida con una concentración de ácido úrico conocido, utilizado como agente reductor.<sup>40</sup>

#### **2.4.1. Galatos**

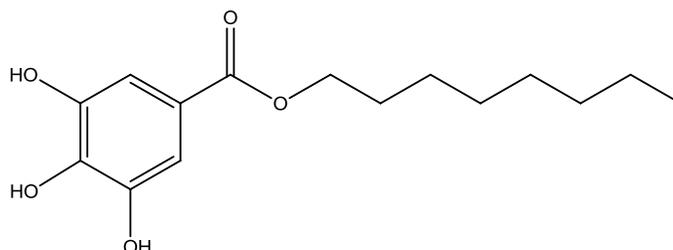
Los galatos son usados primordialmente como antioxidantes en grasas y aceites para prevenir la rancidez y el deterioro. También se utilizan en cosméticos y materiales de embalaje y como aditivos alimentarios en la manteca vegetal, productos horneados, dulces, goma de mascar y leche en polvo. Pueden utilizarse solos o combinados con Butil hidroxitolueno (BHT) y/o Butil hidroxianisol (BHA). El término “galato” usualmente se refiere a los ésteres del ácido gálico, propil, octil y dodecil (lauril).<sup>41</sup>

##### **2.4.1.1. Galato de Octilo**

El GO es conocido como octil galato, n-octilo de 3, 4, 5 – ácido trihidroxibenzoico, o 3, 4, 5, octil – trihidroxibenzoato, figura 6. Es un antioxidante utilizado en grasas animales y en aceites vegetales. Es un polvo cristalino, sin sabor y olor, blanco, insoluble en agua pero soluble en aceites vegetales, etanol y éter. Es inestable en presencia de humedad y puede producir un color indeseado en presencia de iones metálicos, por lo que a menudo se utiliza frecuentemente con un secuestrante como el ácido cítrico.<sup>42</sup>

Se obtiene a partir de la esterificación del ácido gálico con el n – octanol. También se utiliza ampliamente en el curtido de cuero, la tinción de telas, la fabricación de tintas, como astringente en algunas enfermedades debido a sus propiedades bacteriostáticas y como fragancia en perfumería.

El OG se ha utilizado como antioxidante 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 agente quelante al eliminar las trazas de ciertos materiales pesados como el hierro.<sup>21</sup> Además, después de que los galatos son consumidos, son hidrolizados, por lo que su uso como aditivo antioxidante en alimentos es seguro.<sup>43</sup>



**Figura 6 Estructura química del GO**

## **2.5. Concentración mínima inhibitoria (MIC)**

MICs están consideradas como el “estándar de oro” para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a antibiótico o antimicrobianos.<sup>44</sup>

La MIC se define como la concentración más baja (en mg/L) de un agente antimicrobiano que pueda inhibir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones definidas

Existen varios métodos para la determinación de MIC pero las más comunes son los métodos de dilución en agar y de dilución en caldo.<sup>45</sup>

- Dilución en agar: En este método las soluciones con un número de bacterias definido son inoculadas directamente sobre placas de agar nutritivo que tienen incorporado diferentes concentraciones de antibiótico o antimicrobiano. Después de la incubación, la presencia de colonias de bacterias sobre las placas indica el crecimiento del organismo.
- Dilución en caldo: éste método utiliza el medio de cultivo líquido que contiene una creciente concentración (por lo general una serie de diluciones) del agente antimicrobiano, que se inocula con un número determinado de células bacterianas. El volumen final de la prueba determina si el método se denomina macrodilución, cuando se utiliza un volumen total de 2 mL, o microdilución, si se realiza en placas

de microtitulación con  $\leq 500$  mL por pocillo. Después de la incubación, la presencia de turbidez o sedimento indica un crecimiento del organismo.

Para el presente estudio se empleó el método por dilución en caldo en microdilución.

## **2.6. *Escherichia coli*.**

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodore Escherich, la cual denominó *Bacterium coli commune*. Es el microorganismo facultativo más predominante hallado en el intestino del hombre y es el bacilo entérico más frecuentemente aislado en el laboratorio.<sup>46</sup>

Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la familia *Escherichieae* la cual incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*. El género *Escherichia* comprende las especies de *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*. Pero es la especie *E. coli* que mejor se conoce en relación a su capacidad patogénica.<sup>47</sup>

Es un bacilo corto, gran negativo, no esporulado, oxidasa negativo, catalasa positivo y reducen el nitrato a nitrito, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Es un anaerobio facultativo, que crece a temperaturas desde 2.5 – 45 °C y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración congelación. Puede crecer en un intervalo de pH de 4.4 – 9.0. Es capaz de fermentar una gran cantidad de carbohidratos obteniendo como productos tanto ácidos como gases. En medio sólido forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos.<sup>48, 49</sup>

Sus cepas forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de animales y humanos, eliminándose por las heces al exterior. Por esto, es frecuente que se encuentren en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal.<sup>48</sup>

## 2.7. Técnicas analíticas

### 2.7.1. Resonancia Magnética Nuclear

Es la herramienta más poderosa de la que se dispone para la determinación de una estructura molecular. En RMN se utilizan una amplia variedad de isótopos con número atómico impar como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ . Los más usados en química orgánica son la de protón ( $^1\text{H}$ ) y la de carbono  $^{13}\text{C}$ , ya que el carbono y el hidrógeno son los componentes mayoritarios de las moléculas orgánicas.<sup>50</sup>

Ciertos átomos al igual que los electrones, tienen núcleos con espín. El giro de estas partículas cargadas – la circulación de la carga - genera un momento magnético a lo largo del eje de espín, de modo que estos núcleos actúan como minúsculos imanes de barra. De esta manera la espectroscopía de RMN permite determinar el entorno que rodea a los átomos ya que sometidos a un campo magnético externo, se alinean bien en el sentido del campo o en el contrario. Mientras están bajo la influencia del campo magnético, los núcleos se irradian con una frecuencia que pueden absorber, lo que les permite cambiar la orientación relativa de un espín nuclear con respecto al campo externo. Si los núcleos estuvieran aislados, todos absorberían a la misma frecuencia, proporcional al campo magnético. Sin embargo los átomos en cuestión de una molécula están parcialmente apantallados por el campo magnético inducido de la nube electrónica que los envuelve, este apantallamiento depende del entorno de cada núcleo; por lo tanto, los núcleos en estudio de una molécula, con diferentes entornos, expuestos a una radiofrecuencia constante, absorben la radiación e intensidades de campo magnético diferentes. Las cuales son recogidas en el espectro en función de un estándar interno de referencia, que suele ser, para el caso de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , el tetrametilsilano (TMS).<sup>50, 51</sup>

### 2.7.2. Espectroscopía Infrarroja

Una molécula vibra constantemente; sus enlaces se alargan (y contraen) y se comban recíprocamente. La absorción de la luz infrarroja por parte de las moléculas orgánicas produce cambios en las vibraciones de éstas. El espectro IR es una propiedad característica de un compuesto orgánico y puede emplearse para establecer la identidad de dos compuestos y revelar la estructura de uno nuevo, ya que, brinda información de los grupos que se encuentran en una molécula, o que no están y de la naturaleza de sus enlaces.<sup>51</sup>

### **2.7.3. Termogravimetría**

La TGA se utiliza para evaluar el cambio en la masa de una muestra en función de la temperatura. Para este análisis se usa una balanza muy sensible para seguir la variación de peso de un polímero en función del tiempo y la temperatura.<sup>52</sup>

### **2.7.4. Cromatografía de exclusión molecular SEC**

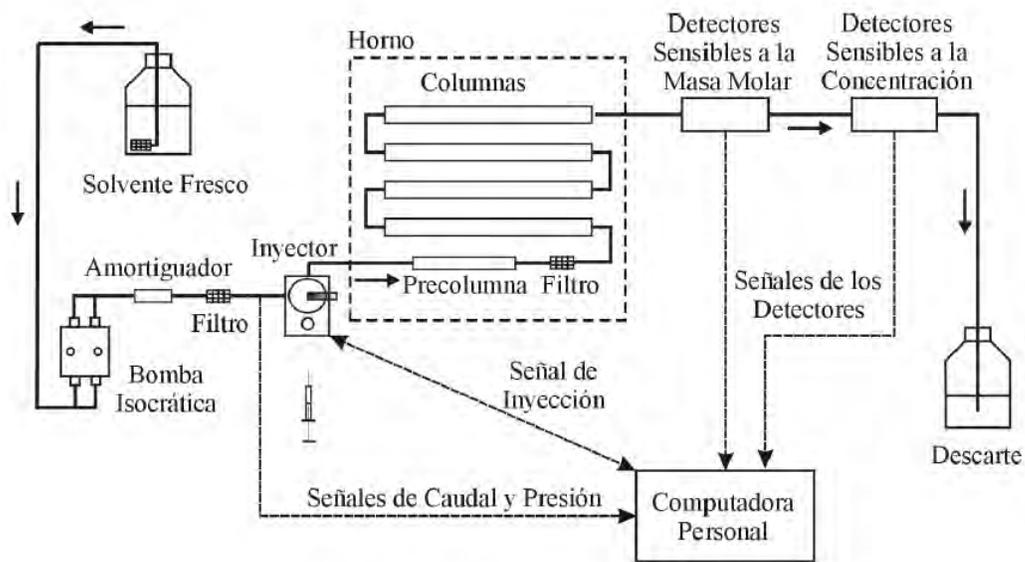
La cromatografía de exclusión molecular (SEC; del inglés *Size Exclusion Chromatography*) es un método que se utiliza para separar, purificar y analizar las mezclas de sustancias. Se emplea, principalmente, en la determinación de pesos moleculares y polidispersidades.<sup>53</sup> Anteriormente este método se denominada cromatografía de permeación por geles (GPC), ya que los rellenos de las columnas originales eran geles orgánicos blandos.<sup>54</sup>

En este método, el proceso de separación dentro de las columnas empacadas con el material poroso es el resultado de las diferencias en tamaño y, consecuentemente, en el grado de penetración de las moléculas en solución a los poros del empaque. Las moléculas de tamaño superior al del poro del gel no tienen acceso a éste y pasan a través de la columna por el espacio que ocupa el disolvente en el gel en un grado mayor o menor, dependiendo de su tamaño. Por consiguiente las moléculas más grandes emergerán de la columna antes que las pequeñas, con lo que es posible determinar la curva de distribución de pesos moleculares de la muestra.<sup>53</sup>

Un sistema de SEC es esencialmente un cromatógrafo líquido de alta resolución con columnas conteniendo un relleno poroso cuyo tamaño de poro se encuentra en el orden del volumen hidrodinámico de las moléculas de polímero analizadas. En la figura 7 se muestra un esquema típico. El solvente filtrado y desgasificado circula desde el reservorio hacia una bomba isocrática de alta presión. La bomba impulsa a la fase móvil a través de una serie de capilares hacia el inyector, columnas y detectores. El inyector introduce la solución de polímero en la corriente de alta presión. Una precolumna y un filtro (con diámetros de poro entre 0.5 y 2  $\mu\text{m}$ ) evitan el ingreso de partículas en las columnas. El relleno de las columnas analíticas consiste en partículas porosas con diámetros entre 5 y 30  $\mu\text{m}$ , que permiten separar el analito de acuerdo a su tamaño, eluyendo primero las moléculas más grandes y finalmente las más pequeñas. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: sensibles a la concentración, y

sensibles a la masa molar. Finalmente la muestra y la fase móvil luego de pasar por los detectores, son transportadas hacia el reservorio de descarte.

La operación del sistema cromatográfico se efectúa con una computadora, que permite monitorear las variables del proceso (caudal, presión, temperatura, etc.), sincronizar la inyección con el tiempo de adquisición, digitalizar y almacenar las señales de los detectores; y visualizar los resultados del análisis.<sup>54</sup>



**Figura 7 Diagrama esquemático de un cromatógrafo para SEC**

Los parámetros más importantes en la caracterización de polímeros son el peso molecular y la polidispersidad; mediante el SEC se pueden determinar: el peso molecular promedio numérico ( $M_n$ ), el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) y el índice de polidispersidad (PDI).

El Peso molecular promedio numérico se define como el peso molecular en gramos del polímero, dividido por el número de moléculas, se expresa como:<sup>55</sup>

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i}$$

El peso molecular promedio en peso, se determina a través de experimentos en los que cada molécula o cadena contribuye a la medida final de acuerdo a su tamaño y se expresa como:<sup>55</sup>

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i^2 N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i}$$

La relación de  $\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$  es una medida de la polidispersión en los sistemas

heterodispersos y se denomina el índice de polidispersidad. Las relaciones entre los valores de los pesos moleculares se utilizan a menudo para dar una idea de la heterogeneidad del peso molecular en las muestras de polímeros, ya que entre más grande sea el PDI, hay mayor dispersión entre los pesos moleculares y mientras, el valor se acerque más a uno, el polímero es más homodisperso.<sup>55</sup>

### **3. Hipótesis y Objetivos**

#### **3.1. Hipótesis:**

La modificación enzimática del quitosano con GO dará nuevos materiales poliméricos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

#### **3.2. Objetivo general:**

Sintetizar enzimáticamente nuevos materiales funcionales basados en la modificación de quitosano con GO empleando HRP.

#### **3.3. Objetivos particulares:**

- Establecer una metodología adecuada para injertar galato de octilo en la cadena de quitosano en función de concentraciones de sustratos y enzima, así como tiempo de reacción y medio acuoso.
- Caracterizar los materiales sintetizados mediante el uso de técnicas de  $^1\text{H}$  RMN, ATR-FTIR, SEC y TGA
- Evaluar el poder antioxidante del quitosano modificado con GO mediante la metodología de estabilidad de radical DPPH.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas de los polímeros vía tratamiento con *E. coli*.

## **4. Metodología**

### **4.1. Modificación quitosano**

#### **4.1.1. Materiales**

Se utilizaron dos quitosanos, uno de peso molecular bajo (20,000 cps determinado por un viscosímetro de Brookfield) y otro de peso molecular medio (200,000 cps determinado por un viscosímetro de Brookfield), ambos de Aldrich. GO de Fluka Analytical (99%, HPLC). Fosfato de sodio monobásico de Sigma – Aldrich, fosfato de sodio dibásico de Reasol. Como biocatalizador se utilizó HRP tipo II de Sigma. Peróxido de Hidrógeno al 50% de Sigma – Aldrich. Acetona grado técnico de Química Barsa. Hidróxido de Sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl), ambos de J.T. Baker.

#### **4.1.2. Equipos**

Entre los equipos utilizados para la modificación del quitosano se encuentran: Balanza Analítica (marca Ohaus, modelo AP2105, Suiza), potenciómetro (marca Beckman, modelo PHI 41, EUA), agitador magnético en forma de cruz, parrilla con agitación (marca Thermo Scientific, modelo Cimarec, EUA), embudo de adición, sistema de filtración Millipore® con filtro membrana de 0.45 µm, congelador REVCO a – 78 °C, liofilizador (marca HETO modelo FD1.0).

### **4.2. Reacción**

Se preparó una solución de quitosano al 1.6 % (p/p) ajustando el pH a 2.5 con HCl (2 M) para solubilizar al quitosano; a partir de ésta en un matraz de bola se preparó una solución 0.3% con buffer de fosfatos (pH 5.5) y se ajustó el pH a 4.5 con NaOH (1 M). A esta solución se le agregó el GO 10 mM o 20 mM, según fuera el caso; luego se le agregó la enzima. A esta mezcla se le agregó, gota a gota, peróxido de hidrógeno al 5% para que la reacción, por radicales libres, se pudiera llevar a cabo. Después de terminar de adicionar el peróxido, se esperó 1 hora más para detener la reacción.

Se utilizó una relación en peso de 80:20 de quitosano:GO y la enzima se adicionó con la relación en peso de 1.5:500 de HRP: sustrato total. El volumen de disolución (5%) de peróxido de hidrógeno tuvo la relación 0.6 ml disolución por mg de enzima.

Se utilizó el siguiente diseño experimental para realizar las reacciones:

**Tabla 2 Diseño Experimental para la modificación del quitosano.**

Muestra	Quitosano (Q)	Concentración (GO)
QOG20M	Peso molecular medio (M)	20 mM
QOG20B	Peso molecular bajo (B)	20 mM
QOG10M	Peso molecular medio (M)	10 mM
QOG10B	Peso molecular bajo (B)	10 mM
QOGB20-S	Peso molecular bajo (B)	20 mM
QOGB10-S	Peso molecular bajo (B)	10 mM
QOGM20-S	Peso molecular medio (M)	20 mM
QOGM10-S	Peso molecular medio (M)	10 mM
OG20	Sin quitosano	20 mM

S: significa que la reacción se llevó a cabo sin enzima

#### **4.2.1. Purificación de los polímeros**

Para la precipitación de los polímeros desde el medio se ajustó el pH de la reacción a 7 con una disolución de NaOH (2M), se dejó en reposo durante 1 hora para su sedimentación, luego se filtró y se lavó con H<sub>2</sub>O destilada, se dejó secar, se congeló a –78°C durante 2 horas y posteriormente fue liofilizado durante 24 horas.

#### **4.3. Caracterización de material modificado:**

##### **4.3.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR –ATR)**

Se utilizó un espectrómetro de IR (marca Perkin Elmer ATR – FTIR, modelo Spectrum 100, EUA), en el cual se colocó la muestra en polvo sobre el diamante y se obtuvieron los espectros correspondientes a un intervalo de número de onda desde 650 cm<sup>-1</sup> hasta los 4000 cm<sup>-1</sup>.



Figura 8 Espectrómetro de IR (ATR-FTIR)

#### 4.3.2. Resonancia Magnética Nuclear

Se pesaron 10 mg del polímero y se disolvieron en 700  $\mu$ l de agua deuterada adicionado con 10  $\mu$ l de ácido clorhídrico deuterado. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  fueron realizados en un espectrómetro Broker AC 200 a 200Mhz para  $^1\text{H}$  a 298 °K. El grado de acetilación y el de incorporación fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones 1 y ecuación 2, respectivamente <sup>56</sup>

##### Ecuación 1

$$\% DA = \frac{\frac{1}{3} I_{CH_3}}{\frac{1}{6} I_{H_2-H_6}} \times 100$$

##### Ecuación 2

$$\% Incorporación = \frac{\frac{I_{alquímica}}{15}}{\frac{I_{H_2-H_6}}{6} - \frac{2 * (I_{alquímica})}{15}} * 100$$

Donde:

$I_{alquímica}$  representa la intensidad medida de la cadena del GO, y al dividirla entre 15 número de hidrógenos de la cadena alquímica del GO) se obtiene la contribución a la señal de un solo protón de GO.

$I_{H_2 - H_6}$  representa la intensidad de la señal de los 6 protones del quitosano, teniendo en cuenta la corrección del  $CH_2$  en posición beta al carbonilo que tiene una señal solapada con el macizo de los protones anulares del quitosano entre 3-5 ppm.

$I_{CH_3}$  representa la intensidad de la señal de los protones del grupo metilo de la parte acetilada del quitosano.

#### **4.3.3. Termogravimetría**

Para el análisis termogravimétrico fue utilizado un equipo TA Instruments Hi – Res TGA 2950 (EUA) en un atmósfera de nitrógeno usando una rampa de calentamiento de  $10^\circ C/min$ . El intervalo de temperatura donde se analizaron las muestras fue de 25 a  $500^\circ C$ . Este análisis fue realizado por la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI)

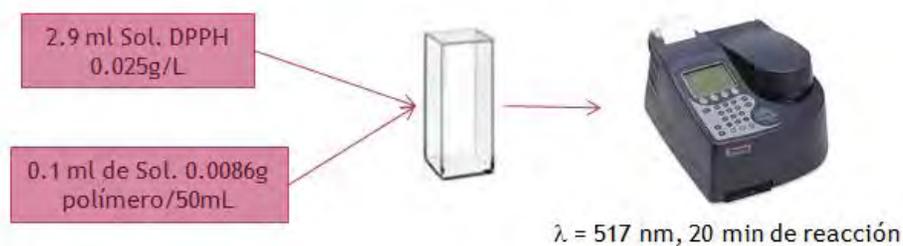
#### **4.3.4. Determinación de pesos moleculares.**

Para la determinación de los pesos moleculares de los materiales se utilizó un equipo GPC con un detector refractómetro diferencial (Waters 410, Millipore, EUA) con una columna Ultrahydrogel™ 500 7.8mm x 300 mm (Waters, Japón) a  $25^\circ C$ , 15 bar, con una rapidez de flujo de 0.3 mL/minuto, utilizando ácido acético 0.25 M como fase móvil. Para la curva de calibración se utilizaron estándares de polímero Pululano (Varian) de PDI estrecha.

Las muestras fueron disueltas en ácido acético 0.25 M y, antes de inyectar las muestras en el GPC, se filtraron con filtros de membrana ( $0.45\ \mu m$ ).

#### **4.4. Determinación poder antioxidante con el método del DPPH**

Se prepararon una solución de  $DPPH^\cdot$  0.025g/L en metanol y una solución 0.172 g/L de cada uno de los materiales obtenidos en ácido acético 0.1 M. En una celda de plástico se colocaron 2.9 mL de  $DPPH^\cdot$  y 0.1 mL de la solución del polímero modificado. Se dio seguimiento a la reacción durante 20 min en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S a una longitud de onda de 517 nm.



**Figura 9 Esquema para la reacción del material modificado con el radical DPPH.**

La capacidad antioxidante fue expresada como porcentaje de inhibición del radical DPPH calculada con la ecuación 3: <sup>57</sup>

**Ecuación 3**

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia al tiempo = 0

$A_t$  es la absorbancia al tiempo = t

#### **4.5. Determinación actividad antimicrobiana**

##### **4.5.1. Reactivos y microorganismo.**

Se utilizó caldo nutritivo y agar bacteriológico (Bioxon, México), cloruro de sodio y ácido acético glacial (J. T. Baker, México). Se empleó *Escherichia coli*, NRRLB – 14218 de la colección de USDA - ARS como microorganismo para evaluar la actividad antimicrobiana.

##### **4.5.2. Preparación del inóculo**

Se inoculó *Escherichia coli* en 50 mL de caldo nutritivo y se incubó a 30°C durante 24 horas. Se repitió este proceso por segunda ocasión pero tomando 5 mL del cultivo anterior, esto con el fin de tener a la cepa activa.

#### 4.5.3. Ensayo para la determinación de MIC

Para la determinación de la MIC se utilizó la técnica de microdilución en placas de microtitulación. Se utilizaron diferentes concentraciones de quitosano 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 g/L. Para esto se preparó 2 mL de una solución madre (10 g/L) de cada material y las preparaciones se realizaron en microtubos para homogeneizar las muestras, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 Diseño experimental para el cálculo de MIC.

Solución madre (µL)	Caldo Nutritivo (µL)	Concentración final de material polimérico (g/L)
5	895	0.05
10	890	0.1
25	875	0.25
50	850	0.5
100	800	1
200	700	2
300	600	3
400	500	4
500	400	5

Se inoculó 100 µl del microorganismo,  $1 \times 10^8$  UFC/mL, en caldo nutritivo adicionado con el quitosano modificado, se incubó durante 24 h a 30 °C. Después de este tiempo se realizó la determinación de crecimiento del microorganismo por un método modificado de siembra sobre superficie, en el cual se depositaron 5 µl de cada dilución (hasta  $10^{-8}$ ) en una caja petri con agar nutritivo. Para obtener el número de unidades formadoras por mililitro (UFC/mL) se contaron las colonias de la dilución mayor y se multiplicó por 200 (para obtener 1 mL) y por el inverso de la dilución.

El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación 4:

$$\% \text{Inhibición} = \left[ \frac{UFC_c - UFC_t}{UFC_c} \right] \times 100 \quad (4)$$

Donde:

UFC<sub>c</sub>: Se refiere a las unidades formadoras de colonias que se contabilizaron en el medio de cultivo sin la presencia del material modificado después de 24 h de incubación.

UFC<sub>t</sub>: Se refiere a las unidades formadoras de colonias que se contabilizaron en el medio de cultivo adicionado con el material modificado después de 24 h de incubación.

#### ***4.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)***

Para la SEM se utilizó un microscopio electrónico JEOL JSM – 5900LV (Japón). Para la observación del microorganismo en el microscopio, se fijaron las células con glutaraldehído, seguido de un lavado con buffer de fosfato (pH 7) para retirar el glutaraldehído, seguido de la adición de tetraóxido de osmio, OsO<sub>4</sub>, posteriormente se procedió a deshidratarlas con etanol y posteriormente se secaron con CO<sub>2</sub> al punto crítico.<sup>27</sup>

## 5. Resultados

### 5.1. Modificación del Quitosano

Un bosquejo de la reacción enzimática del galato de octilo con el quitosano y sus posibles lugares de inserción se presenta en la figura 10.

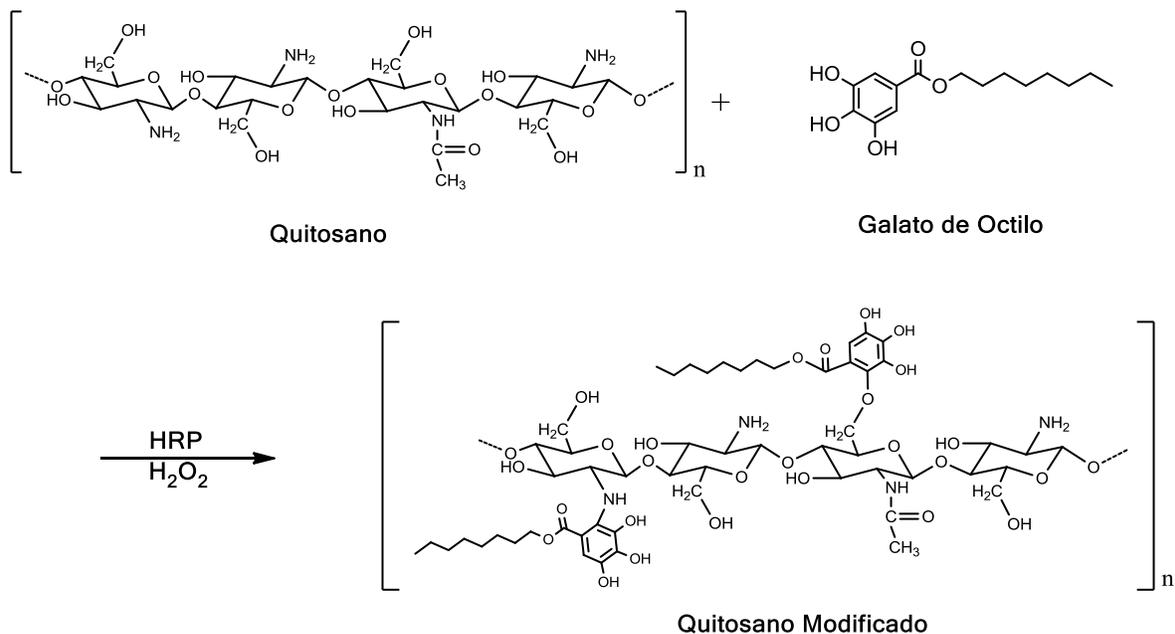


Figura 10 Esquema de la reacción de modificación de quitosano con GO.

También se realizó una prueba en la que se utilizó solo GO sin el quitosano, esto con la finalidad de descartar la posibilidad de obtener poli – GO; y se pudo comprobar que esta reacción no se llevaba a cabo, ya que no se observó precipitado alguno y al filtrar la reacción no se obtuvo polímero.

Los porcentajes de incorporación se determinaron por medio de  $^1\text{H}$  RMN y los resultados de presentan más adelante.

## 5.2. Caracterización de las muestras

### 5.2.1. Espectrofotometría FTIR empleando la técnica de ATR

Está técnica se utilizó para demostrar que el GO si se injertó en el quitosano.

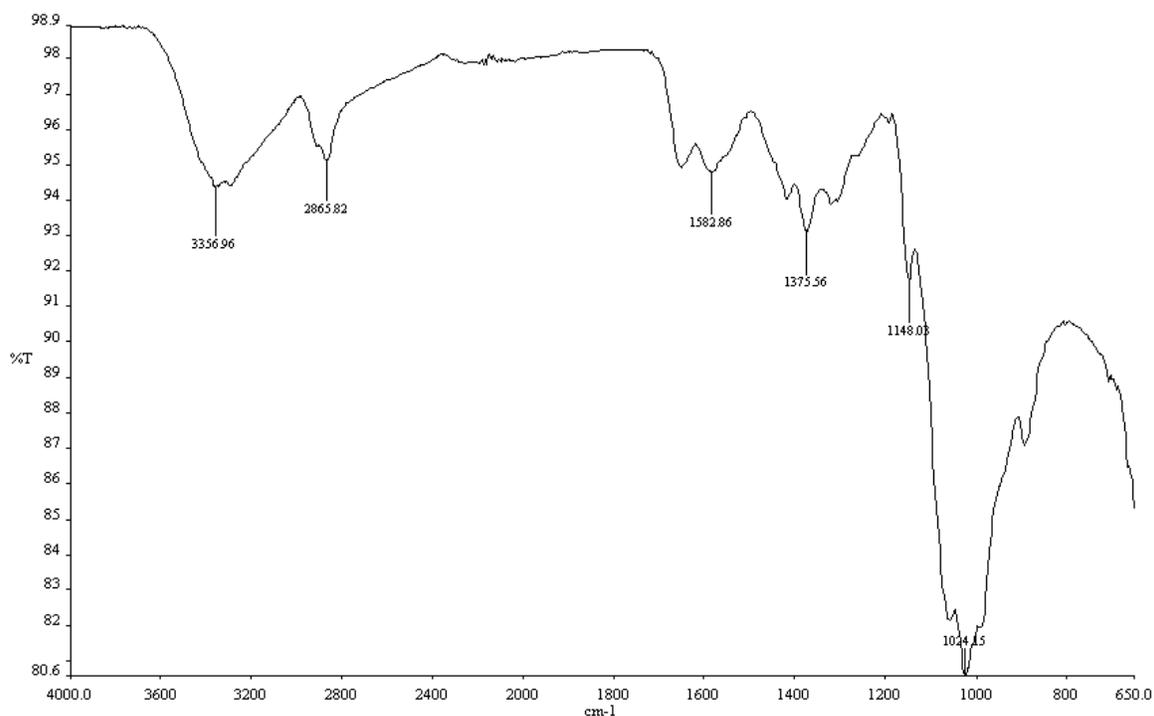


Figura 11 Espectro ATR - FTIR del quitosano nativo.

Para ambos quitosanos (peso molecular medio y peso molecular bajo) se presentaron bandas similares. En la tabla 4 se resumen las bandas características para el espectro de quitosano de la figura 11.

Tabla 4 Bandas características del quitosano nativo.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Vibración	Grupo funcional
3356.96	O - H N - H	Hidroxilo Amina primaria.
2865.82	C - H	Alcanos
1582.86	N - H	Vibraciones de deformación del grupo NH
1148.03	C - O - C	Éter cíclico
1024.15		Confirmación del grupo éter

En la figura 12 se presenta el espectro para el quitosano modificado enzimáticamente con GO.

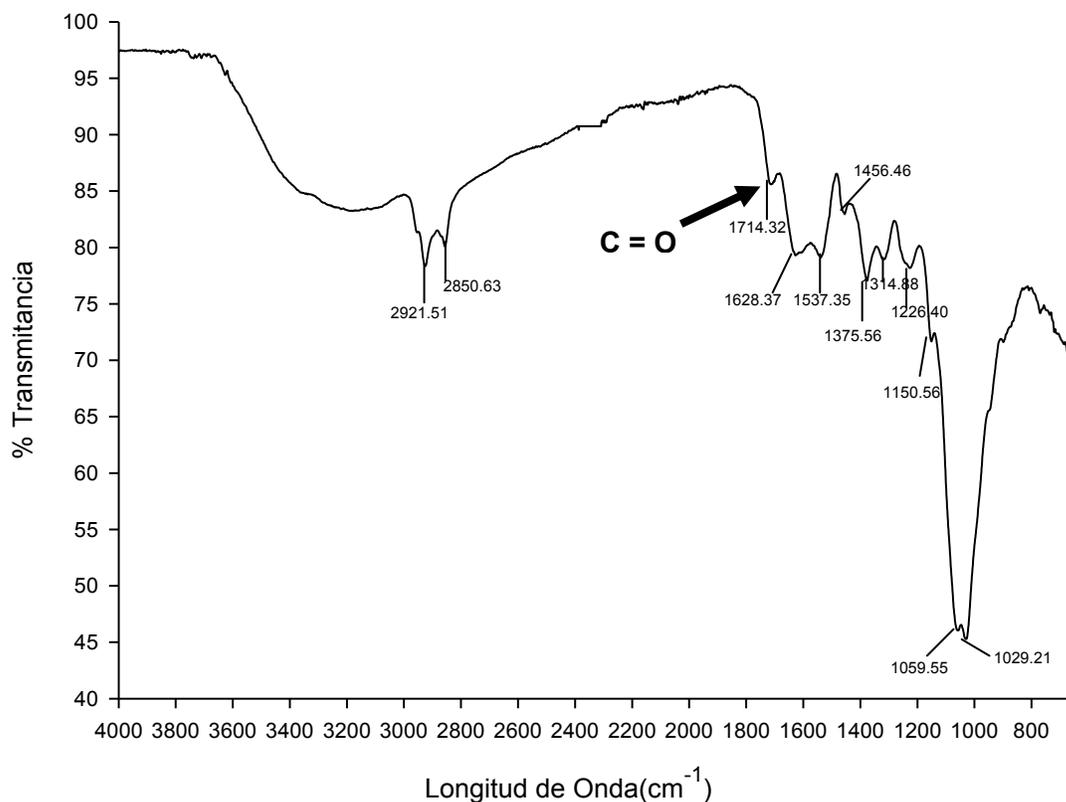


Figura 12 Espectro ATR - FTIR del quitosano modificado (QOG20B)

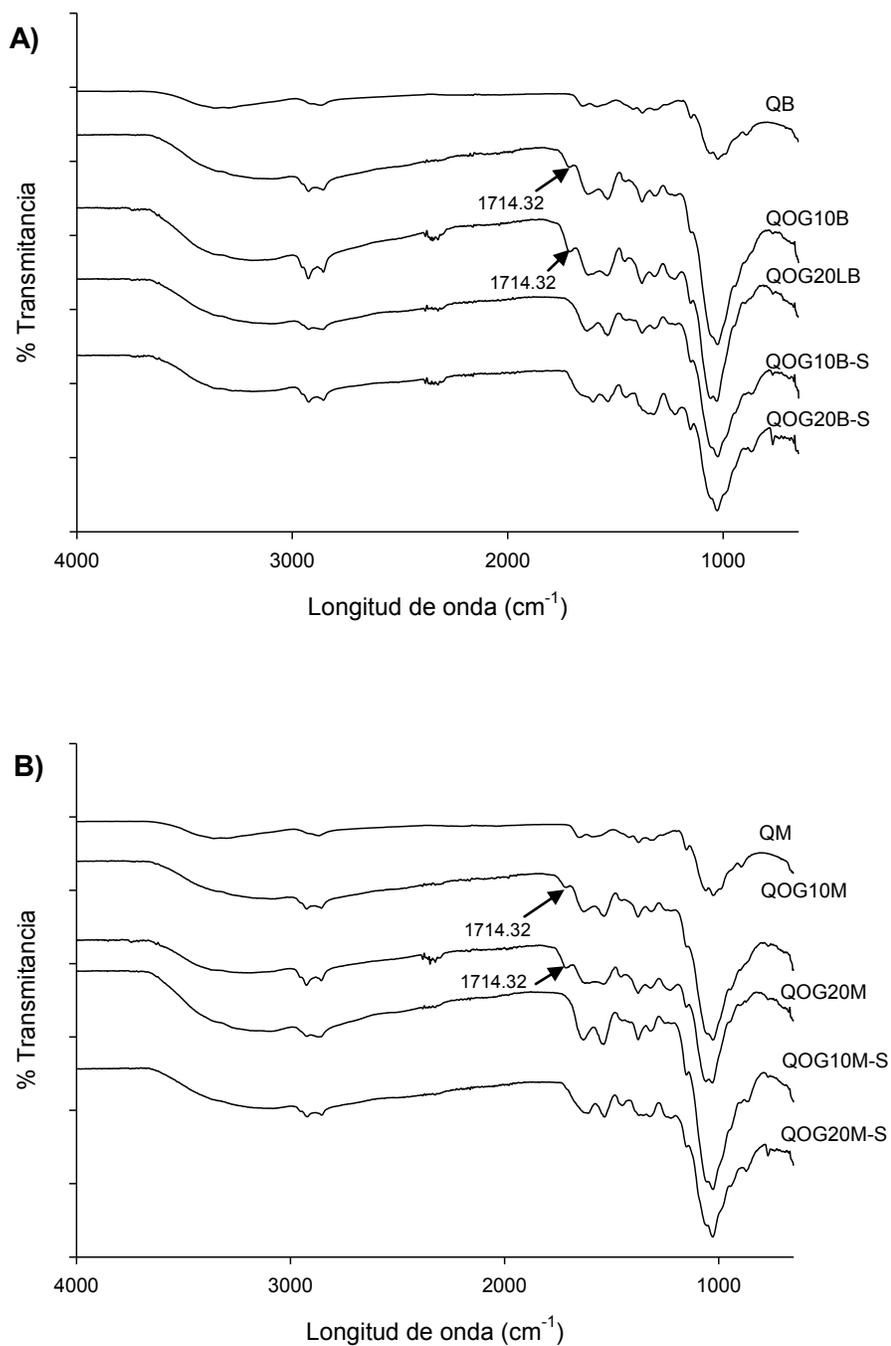
Las bandas características para este espectro se resumen en la tabla 5.

Tabla 5 Bandas características de QOG20B

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Vibración	Grupo funcional
2921.51	C – H	Alcanos
1714.32	C = O	carbonilo
1628.37, 1537.35	N – H	Vibraciones de deformación del grupo NH
1456.46	C – H	Señal confirmativa – CH <sub>3</sub>
1150.56	R – O – R	Éter cíclico
1029.21		Confirmación del grupo éter.

La presencia de la banda en la longitud de onda de 1714.32 cm<sup>-1</sup> correspondiente al éster del grupo galato nos indica que la modificación del quitosano con GO se pudo llevar a cabo.

En la figura 13 se muestra la comparación de los espectros de transmisión del ATR – FTIR del quitosano de bajo peso molecular y del quitosano de peso molecular medio.



**Figura 13** Espectros de transmitancia.de ATR – FTIR A) Muestras de quitosanos de peso molecular bajo y B) Muestras de quitosanos de peso molecular medio.

En las figuras anteriores se puede observar que la inserción del GO al quitosano se lleva a cabo enzimáticamente ya que en las reacciones que se realizaron sin enzima no presentaron la banda característica del grupo carbonilo de un enlace tipo éster.

### 5.2.2. Resonancia Magnética Nuclear

Esta prueba se realizó con la finalidad de cuantificar la inserción del GO en el quitosano en aquellas muestras que presentaron la banda característica en la prueba de ATR – FTIR. Además con esta prueba se calculó el porcentaje de acetilación de los quitosanos utilizados. Muestras de reacciones control realizadas sin enzima no dieron señal de incorporación de GO, lo que señala que se necesita de la enzima para que la reacción tenga lugar. En la figura 14 se presenta el espectro de resonancia para el quitosano nativo y en la figura 15 el espectro del quitosano modificado.

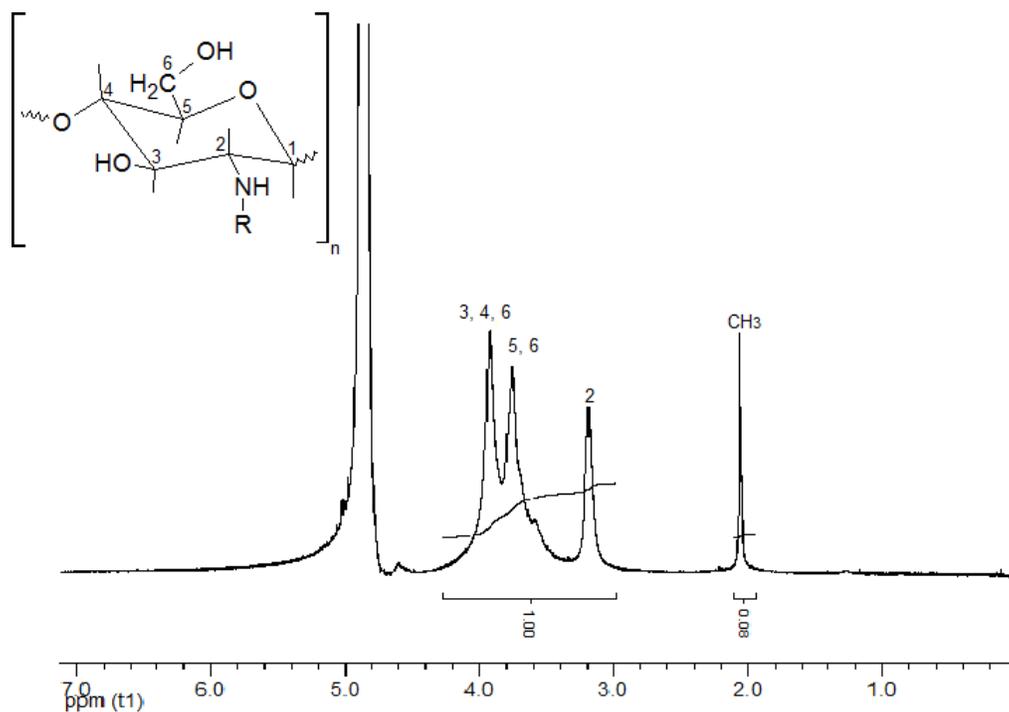
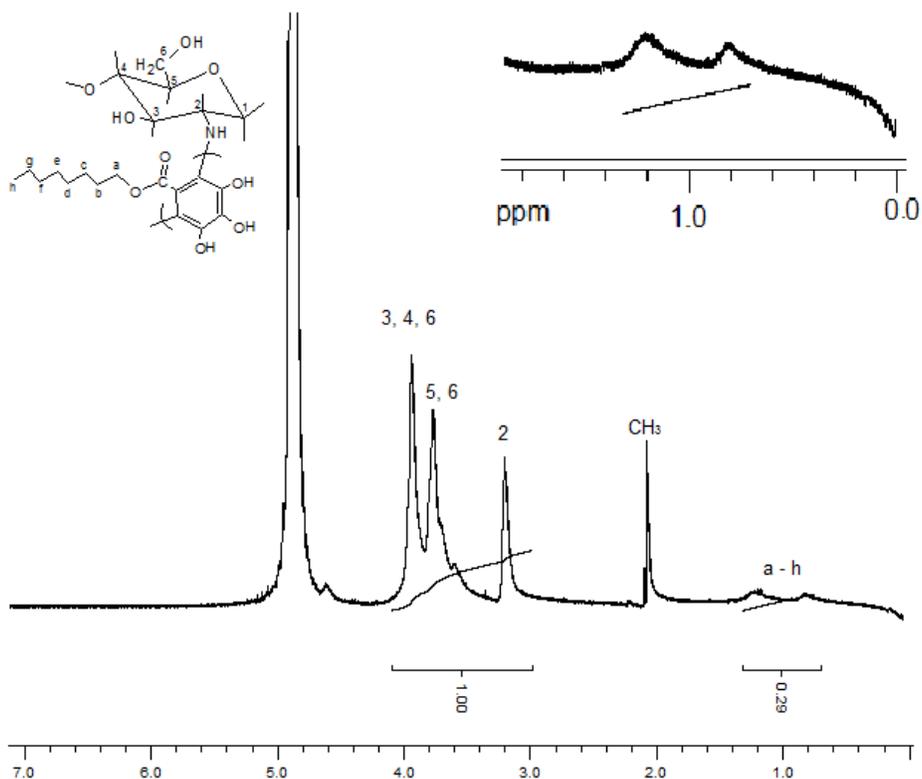


Figura 14 Espectro  $^1\text{H}$  RMN del quitosano nativo. R corresponde a un H en el caso de la forma desacetilada o a  $-\text{CO}-\text{CH}_3$  en el caso de la forma acetilada



**Figura 15** Espectro  $^1\text{H}$  RMN del quitosano modificado QOG10B. Ampliación de la señal correspondiente a los protones de la cadena alquílica.

Se puede observar que la inserción enzimática del GO al quitosano se realizó, ya que a 1.2 ppm se presenta un grupo de señales característica de hidrógenos alifáticos. La resolución en muchos casos en dicha zona del espectro de  $^1\text{H}$  RMN en 2 señales anchas poco definidas, puede deberse por un lado a los hidrógenos metilénicos más cercanos al grupo éster, por ende apantallados del campo electromagnético externo, cuya corrimiento respecto al estándar interno (TMS) es mayor que aquellos asignables a la zona terminal de la cadena alquílica del GO.

El porcentaje de DA para ambos quitosanos comerciales (QM y QB) coincidió en 16%. Según lo reportado entre mayor sea el grado de desacetilación del quitosano es más fácil que ocurran las reacciones de copolimerización ya que éstas se dan preferentemente por medio de enlaces covalentes con el grupo amino libre del quitosano. Se ha encontrado que un buen DA por debajo de 25 % es bueno para que suceda exitosamente la formación de copolímeros funcionales que le proporcionan características diferentes al quitosano para sus posteriores aplicaciones.<sup>19</sup>

Aplicando las ecuaciones 1 y 2 para el cálculo del porcentaje de incorporación, se obtuvieron los porcentajes que se presentan en la tabla 6. Estos porcentajes representan el número de unidades insertadas de GO por cada 100 unidades de polímero modificado.

**Tabla 6 Porcentaje de incorporación obtenidos del RMN**

<b>Muestra</b>	<b>% de Incorporación de GO</b>
QOG20B	8.15 ± 1.14
QOG20M	8.42 ± 1.14
QOG10B	4.82 ± 0.1
QOG10M	5.31 ± 0.1

De estos resultados podemos notar que a medida que se aumenta la concentración del GO en la reacción, la incorporación aumenta. Por otro lado, no existe una gran diferencia en la incorporación de GO en función del peso molecular promedio de los quitosanos. Esto se explica porque los sitios de inserción son iguales en ambos casos e independientes de la longitud promedio de las cadenas de polímero.

### **5.2.3. Termogravimetría**

Con esta técnica se determinó la estabilidad térmica de los materiales obtenidos. En la figura 16 se muestra los termogramas de las muestras analizadas y en la tabla 7 se resumen las temperaturas de descomposición a la cual se tiene un 5% de pérdida de peso de la muestra inicial.

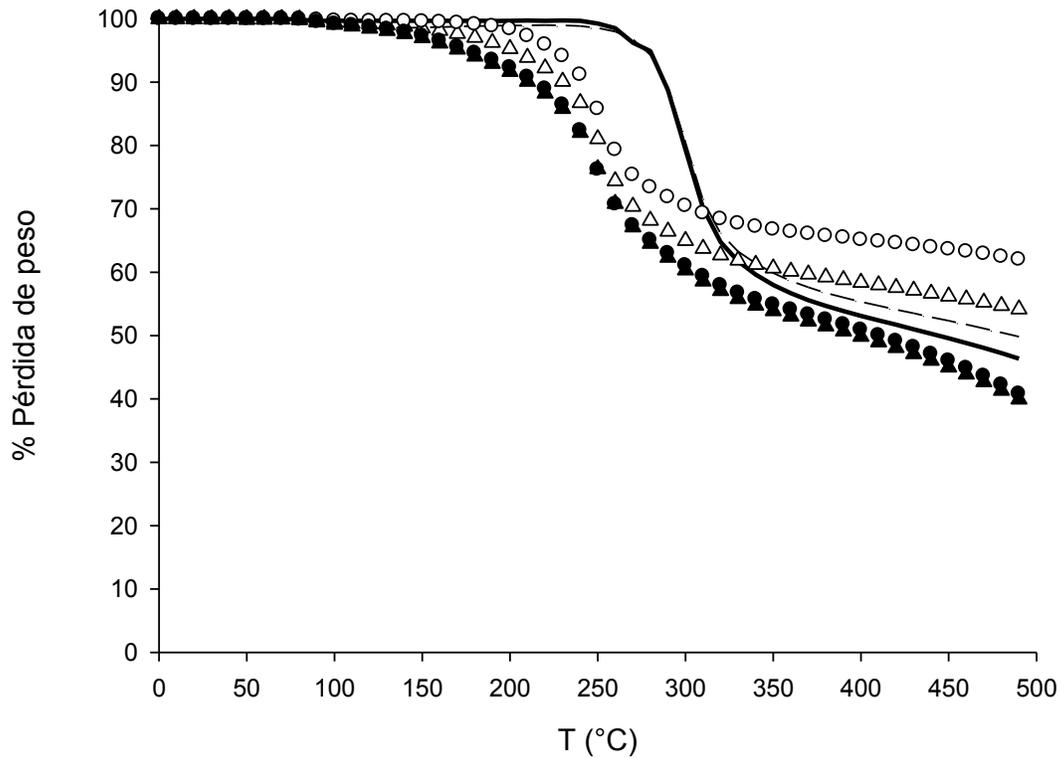


Figura 16 Termogramas — QM, ----- QB, ● QOG20M ○ QOG10M, ▲ QOG20B y △ QOG10B

Tabla 7 Temperaturas de descomposición ( $T_d$ ).

Muestra	$T_d$ (°C)
QOG20B	$174.1 \pm 32.01$
QOG20M	$176.1 \pm 8.83$
QOG10B	$202.2 \pm 2.38$
QOG10M	$224.4 \pm 13.62$
QM	279.8
QB	277.8

Podemos notar que a medida que la concentración de GO aumenta, la temperatura de descomposición disminuye, es decir, los materiales son térmicamente menos estables, esto podría deberse a la relativamente baja estabilidad térmica de los enlaces éster en el GO injertado al quitosano y también a posibles cambios conformacionales a medida que aumenta la incorporación del compuesto fenólico.

#### 5.2.4. Determinación de pesos moleculares

En este trabajo se estudió la posibilidad de analizar mediante SEC la distribución de los pesos moleculares de nuestros materiales. Los resultados se muestran en la tabla 8 tanto para las muestras de quitosanos nativos de peso molecular bajo como para el de peso molecular medio y su los injertados. Cabe mencionar que en este análisis no fue posible determinar con rigurosidad un peso molecular promedio para cada muestra debido a que presentaban más de una señal en los cromatogramas, por lo que se presenta el peso molecular numérico promedio (Mn) de cada uno de los picos con sus polidispersidades (PDI) y porcentajes de áreas relativas. Los cromatogramas de cada muestra pueden observarse en las figuras del anexo A

**Tabla 8** Peso molecular promedio numérico, polidispersidades y % de área de quitosanos modificados y nativos

Nombre de la Muestra	Mn (g/mol)	PDI	% Área
QOG20B	559421	4.4895	36.5618
	2721	1.842	10.7733
	325	1.0185	1.5174
QOG20M	3499396	1.975	25.5263
	34544	1.8617	29.5287
	307	1.7394	29.6872
QOG10B	11984244	3.9292	30.9944
	28652	2.3105	35.0098
	308	1.5877	28.9541
QOG10M	4373797	1.921	30.4999
	34496	1.9915	37.8129
	291	1.0653	6.2031
QB	3561288	1.9805	24.2007
	32991	1.8225	57.7824
	478	1.5649	18.0170
QM	1558987	1.4529	35.8137
	12554	2.9172	64.1863

Para estas determinaciones se utilizó la siguiente curva de calibración mostrada en la tabla 9 a partir de los estándares de pululano, los valores mostrados corresponden al peso molecular promedio reportado por el fabricante.

**Tabla 9 Curva de calibración de pesos moleculares.**

<b>T<sub>d</sub></b>	<b>M<sub>p</sub>(g/mol)</b>
20.905	708000
22.543	375000
26.698	107000
31.543	21000
34.503	5900
38.663	180

A partir de la curva de calibración y de los gráficos mostrados se puede notar que para los quitosanos nativos, el peso molecular (M<sub>n</sub>) de QB se encuentra entre 21,000 y 107,000 g/mol y para QM el intervalo de M<sub>n</sub> se encuentra entre 21,000 y 708,000 g/mol. La distribución de pesos moleculares por SEC de estos materiales comerciales es muy amplia y multimodal tal y como se observa en los cromatogramas del anexo A. Esta característica es común en los polímeros de origen natural, siendo el quitosano la forma desacetilada de la quitina. El fabricante por ende reporta una estimación del peso molecular, bajo o medio, por medición de viscosidad mediante un viscosímetro de Brookfield, esto junto con los datos reportados en la tabla 7 nos da a entender que el quitosano comercial no es homogéneo, sino más bien es una distribución amplia de pesos moleculares, que son catalogados según su viscosidad más que por su peso molecular. De todas formas, comparando los materiales sintetizados con los quitosanos nativos se nota que el peso molecular aumenta ligeramente en los primeros, esto podría deberse a la incorporación del GO al quitosano y por ende al aumento de sus volúmenes hidrodinámicos en la fase móvil en la SEC.

### 5.3. Determinación del poder antioxidante

Los resultados para la determinación del poder antioxidante de los materiales se muestran en la figura 17

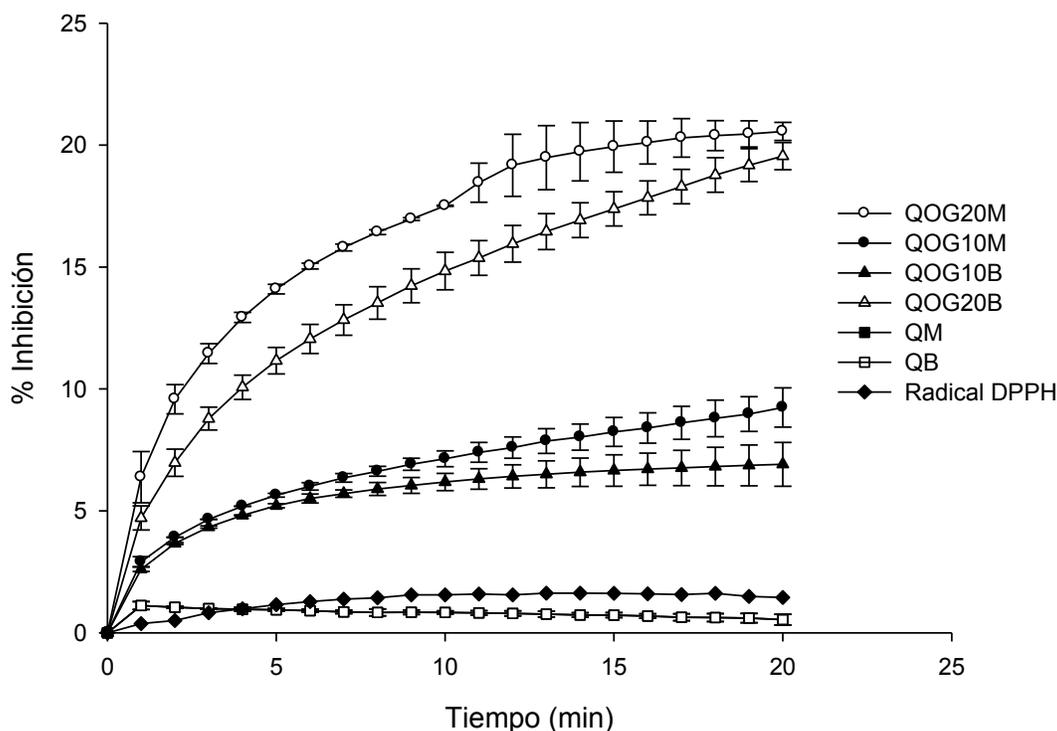


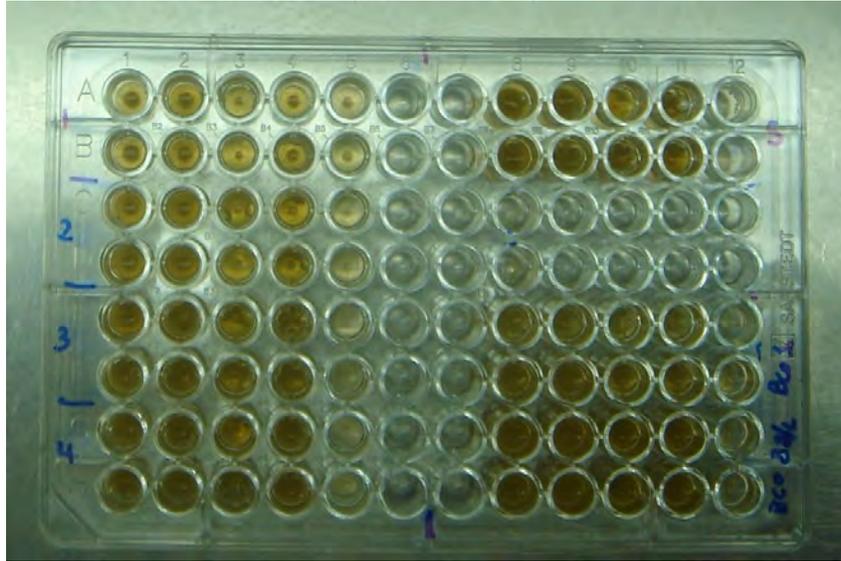
Figura 17 Porcentajes de Inhibición del radical DPPH con el material polimérico.

Se puede observar que el quitosano sin modificar presenta una inhibición despreciable empleando la técnica del DPPH, pero conforme el porcentaje de incorporación de GO en el material va aumentando, su capacidad de inhibir el radical DPPH aumenta. Esto demuestra que el anillo bencénico de los galatos es lo que le confiere esta característica.<sup>41</sup> También se puede notar que el porcentaje de inhibición es un poco mayor en los materiales sintetizados a partir de los quitosanos de peso molecular medio, en comparación con aquellos de peso molecular bajo. Esto puede atribuirse a que el GO incorporado al quitosano tiene una tendencia ligeramente mayor, como se observó en los estudios de RMN, en el de peso molecular medio aun sin diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, también podría atribuirse a que los bencenos estuvieran más expuestos en un caso en comparación con el otro, aunque no tenemos pruebas concluyentes que afirmen esto en este trabajo.

## 5.4. Actividad antimicrobiana

### 5.4.1. Determinación de MIC

La distribución de las muestras en los pozos se puede observar en la figura 18.



**Figura 18** Prueba antimicrobiana de materiales basados en Quitosanos de peso molecular medio a 1, 2, 3, 4 y 5 g/L de concentración al tiempo cero.

Después de 24 h de incubación a 30° C se observó que en los pozos se presentaba un precipitado, figura 19, el cual podría deberse al crecimiento del microorganismo por lo que se realizó la determinación del crecimiento por la técnica de la gota.

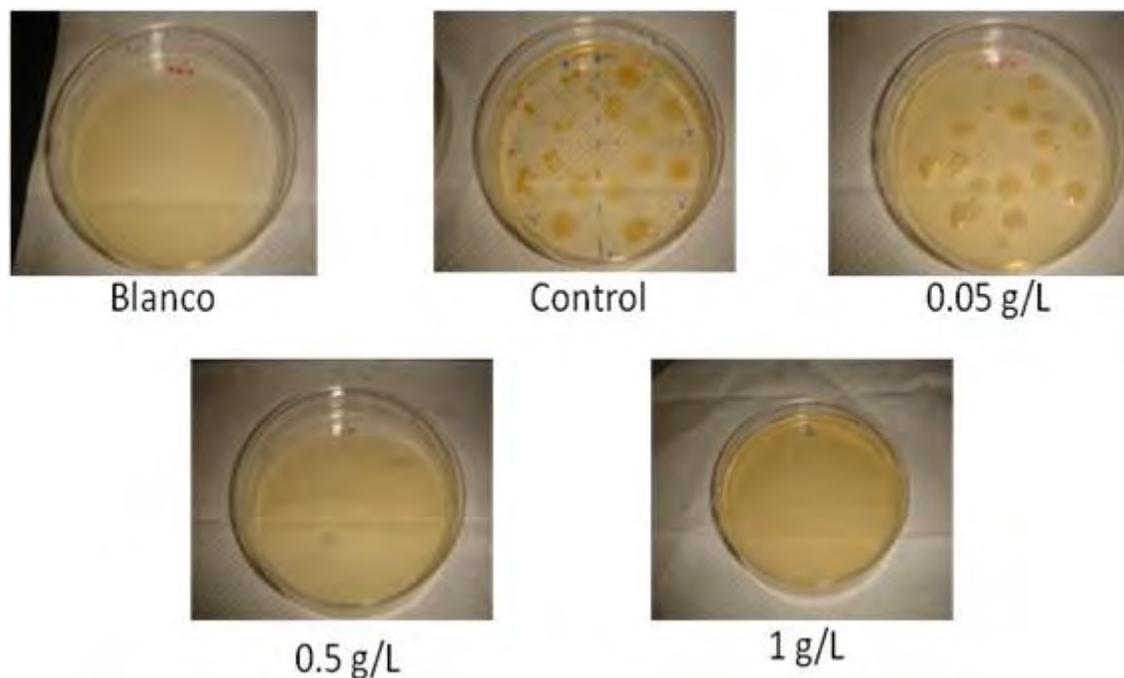


**Figura 19 Prueba antimicrobiana de materiales basados en Quitosanos de peso molecular medio a 1, 2, 3, 4 y 5 g/L de concentración después de 24 h de incubación.**

De esta prueba no se obtuvo crecimiento alguno en las placas por lo que el precipitado que se apreciaba era el material polimérico insoluble y células no viables. Se concluyó que la concentración utilizada de quitosano era muy alta, razón por la cual se decidió realizar de nuevo esta prueba pero con concentraciones más bajas (0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 g/L). Al disminuir la concentración se pudo observar crecimiento microbiano.

La MIC fue determinada a 0.5 g/L. Esta concentración se encuentra en el intervalo reportado por Li y colaboradores<sup>58</sup>, quienes encontraron que la MIC para *E. coli* en presencia de quitosano sin modificar es de 0.05% a 0.2%.

En la figura 20 se muestra como el crecimiento del microorganismo disminuía cuando la concentración del quitosano (nativo o modificado) aumentaba.

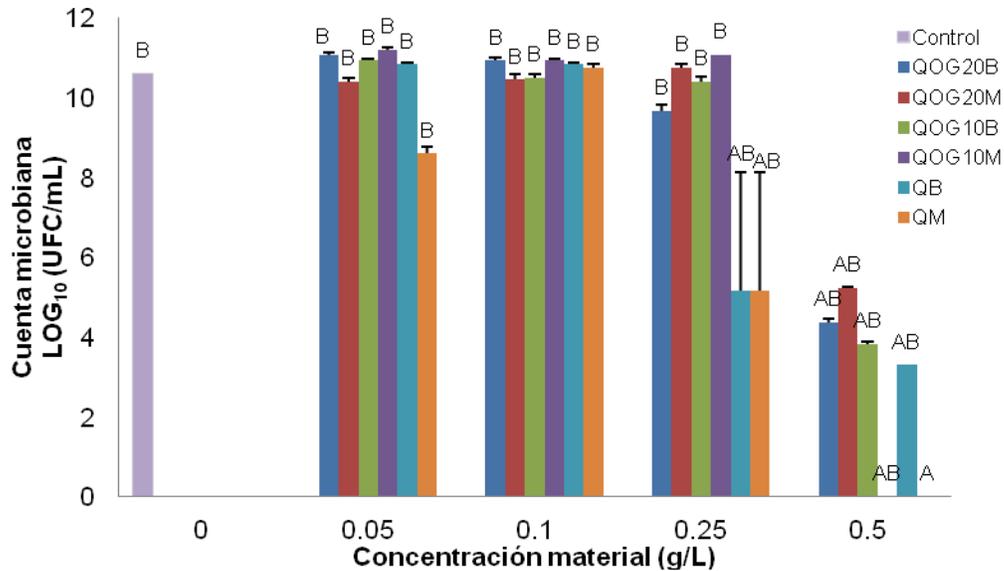


**Figura 20 Efecto del material QOG20M en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *E. coli*. El blanco se refiere a solo medio de cultivo sin microorganismo. El control se refiere al medio de cultivo con microorganismo pero sin la adición de quitosano.**

Este comportamiento se apreciaba en cada uno de los materiales, esto podría significar que a pesar de la inserción del GO al quitosano, éste no pierde su propiedad antimicrobiana, lo cual nos permite tener un material con propiedades tanto antioxidantes, proporcionado por el compuesto fenólico injertado, como antibacterianas.

#### **5.4.2. Determinación del efecto de los quitosanos nativos y modificados sobre la cuenta bacteriana**

En la Fig. 21 se muestra la cuenta bacteriana determinada en los medios de cultivo adicionados con quitosano nativo o modificado según fue el caso.



**Figura 21 Cuenta bacteriana de *E. coli* con diferentes concentraciones de quitosanos nativos y modificados después de 24 h de incubación. Se presenta el error estándar de la media. Letras iguales no son diferentes significativamente a  $\alpha \leq 0.05$ .**

Las medias de cuenta bacteriana fueron comparadas con la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $\alpha \leq 0.05$ ). Se utilizaron las siguientes fuentes de variación: peso molecular del quitosano, concentración del GO, concentración del material y también la interacción de estas tres. Los datos del análisis estadístico se encuentran en el anexo B.

Para el caso del quitosano se encontró diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ) entre los pesos moleculares probados y como se puede observar en la figura 21 las muestras con quitosano de peso molecular medio fueron las que presentaron una mayor disminución en la cuenta bacteriana, esto de acuerdo a lo reportado por Mellegard *et al*<sup>59</sup>, y por No *et al*,<sup>60</sup> en donde reportan que entre mayor sea el peso molecular del quitosano, el efecto antimicrobiano es mayor. Se puede notar que a concentraciones bajas el quitosano no fue antimicrobiano, esto probablemente se deba a que la cantidad de quitosano presente en el medio es muy pequeña para que el microorganismo se vea afectado por la presencia de este polisacárido, ya sea nativo o modificado. En cambio cuando la concentración del quitosano aumenta, ya sea nativo o modificado, la cuenta bacteriana disminuye de manera significativa ( $\alpha < 0.05$ ), esto se observa en la figura 21 para la concentración de 0.5 g/L en donde los materiales a base de quitosano de peso molecular medio (QM) presentaron mayor disminución en la cuenta bacteriana comparado con los materiales a base de quitosano de bajo peso molecular (QB).

La concentración de GO empleada no presentó diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ) en el análisis estadístico, sin embargo su efecto se puede notar en la figura 21 que en el caso de los materiales con concentración de 20 mM de GO produjeron una disminución ligeramente menor en la cuenta bacteriana que los materiales con 10mM de GO.

En el caso de la concentración del material, se puede notar que a 0.05 g/L todos los materiales, a excepción de QOG20M y QM, no presentaron disminución en la cuenta bacteriana, sino que por el contrario favoreció el crecimiento del microorganismo, en cambio las otras 2 muestras disminuyeron la cuenta, QOG20M en 0.2 ciclos logarítmicos y QM en 2 ciclos logarítmicos. Sin embargo cuando la concentración del material fue de 0.1 g/L los materiales no presentaron disminución en la cuenta bacteriana con respecto al control, pero si presentaron disminución en comparación con la cuenta obtenida a 0.05 g/L. Cuando la concentración del material fue de 0.25 g/L se observa que QM y QB disminuyeron la cuenta microbiana de manera significativa. Para el caso de 0.5 g/L se puede observar que la disminución en la cuenta bacteriana es significativa en todos los materiales.

Con la interacción de las tres fuentes de variación se observó que el quitosano – GO preparado con QB a baja concentración (0.05 g/L) incrementó la cuenta bacteriana un ciclo logarítmico. Por su parte el QM disminuyó la cuenta en más de dos ciclos logarítmicos con respecto al control. A 0.1 g/L los materiales no presentan diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ) con el control. Por otro lado, a partir de 0.25 g/L los materiales QOG20B y QOG20M, son los que presentaron mayor inserción de GO en la cadena de quitosano (Tabla 6), se puede observar que un efecto negativo en la cuenta bacteriana, mientras que a esa misma concentración los quitosanos nativos disminuyeron en 5 ciclos logarítmicos con respecto al control la cuenta bacteriana, esto podría deberse a que la inserción del GO se llevó a cabo en el grupo amino, que es al que se le atribuye la propiedad antimicrobiana.<sup>61</sup> La cuenta bacteriana disminuye significativamente en presencia de todos los quitosanos, nativos o modificados, a 0.5 g/L a pesar de la pérdida de los grupos amino en los quitosanos nativos, esto podría deberse a la presencia del GO ya que se ha reportado además de sus propiedades antioxidantes es también antimicrobiano.<sup>43, 62, 63</sup> No se ha establecido un mecanismo de la forma en que el GO actúa sobre el microorganismo se piensa que el GO, al tener una estructura de cabeza – cola, actúa como un surfactante no iónico, es decir, el mecanismo de acción del GO involucra la interacción con la membrana, con pérdida de potencial de la misma y la fuga

de materiales intercelulares lo que podría ser una de las causas de la inhibición del crecimiento microbiano.<sup>43, 59</sup>

#### 5.4.3. Determinación del efecto de los quitosanos nativos y modificados sobre el porcentaje de inhibición.

Los porcentajes de inhibición de crecimiento del microorganismo *E. coli* con los quitosanos nativos y modificados se presentan en la figura 22.

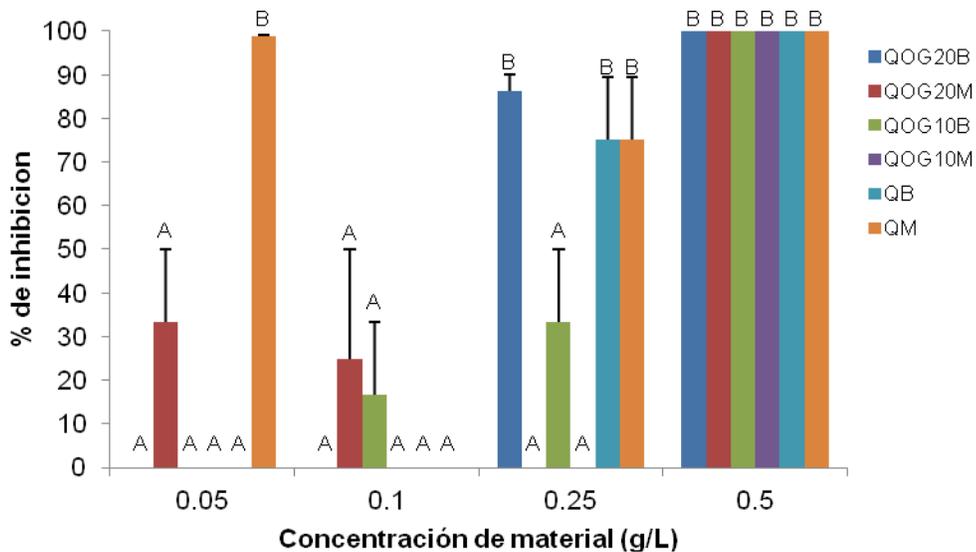


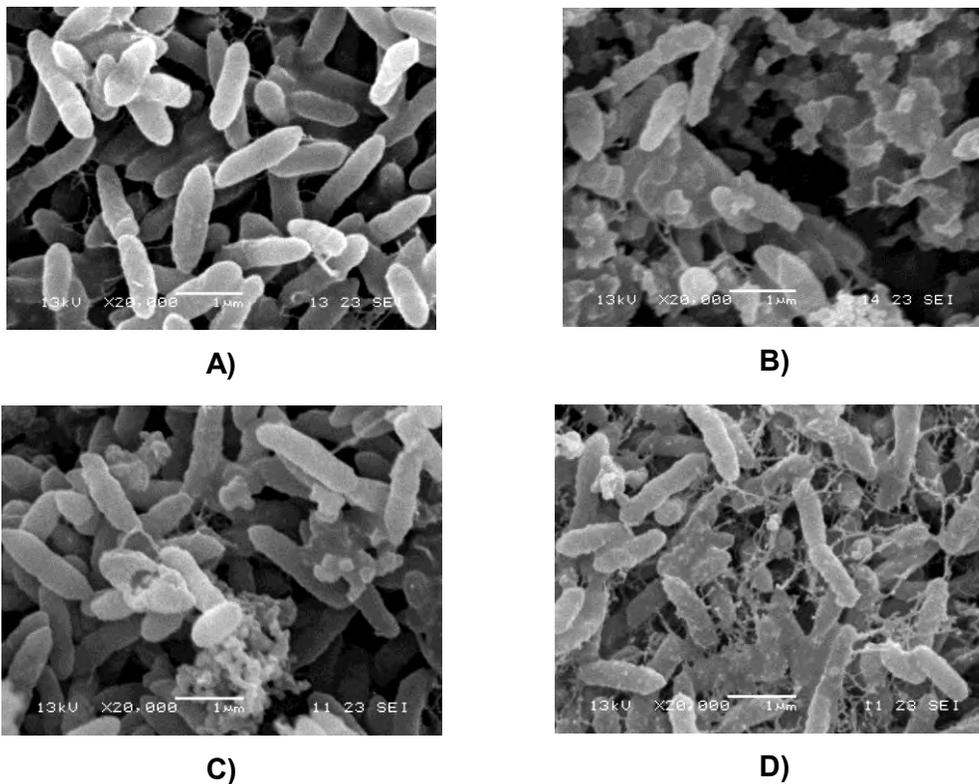
Figura 22 Porcentajes de Inhibición de crecimiento de *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de quitosanos nativos y modificados a 24 h de incubación. Se presenta el error estándar de la media. Letras iguales no son diferentes significativamente a  $\alpha \leq 0.05$ .

En la figura 22 se presentan los materiales que mostraron inhibición en la cuenta bacteriana, donde se puede observar que todos los materiales presentaron inhibición bacteriana en 0.5 g/L, de estos materiales los QM, QOG20M y QOG10B son los que presentaron inhibición en casi todas las concentraciones.

#### 5.4.4. Microscopía Electrónica de Barrido.

Se realizaron micrografías SEM a algunas muestras del microorganismo inoculado en caldo nutritivo adicionado con los quitosanos modificados con GO (QOG20M, QOG10B, QOG10M) y un control con *E. coli* en caldo nutritivo sin la presencia de material polimérico, para observar mejor el efecto del quitosano en el crecimiento de *E. coli*.

Comparando estas fotografías se puede notar que cuando el microorganismo se inocula en el medio enriquecido con quitosano, éste último va recubriéndolo, debido a que el quitosano a pH bajos se comporta como un polication interactuando con los grupos cargados negativamente de la pared celular bacteriana.<sup>58</sup> En la figura 23-B se puede observar que la pared celular del microorganismo se encuentra rodeada por este polímero, de hecho la pared celular se nota un poco más rugosa en comparación con el control. En las figuras 23-C y 23-D se observa, aunque de una forma menos intensa, que el quitosano tiene el mismo efecto de cubrir al microorganismo, también se puede notar una disminución en el tamaño la célula, que se puede atribuir al hecho de que el quitosano impide el paso de los nutrientes hacia el interior de ella. Otro efecto que se puede notar es, cuanto mayor es el GO incorporado al quitosano, el efecto sobre la pared celular del microorganismo es mayor (23-B) en comparación con los quitosanos con menor incorporación de GO (23-C y 23-D), tal y como se había previsto en la literatura.<sup>43, 61, 62</sup>



**Figura 23 Microscopías electrónicas de barrido de A) Control (*E. coli* en caldo nutritivo), B) Con adición de QOG20M, C) QOG10B y D) QOG10M**

## 6. Conclusiones

- Se estableció una metodología para la reacción enzimática de inserción de octil galato a quitosano.
- El porcentaje de incorporación de GO al quitosano, obtenido por RMN fue mayor para las concentraciones de 20 mM del fenólico,  $8.15 \pm 1.14$  para el quitosano de bajo peso molecular y  $8.42 \% \pm 1.14$  para el quitosano de peso molecular medio, en comparación con las concentraciones de 10 mM de GO, 4.82% para el quitosano de bajo peso molecular y 5.31 % para el quitosano de peso molecular medio. Además se determinó que DA de los quitosanos utilizados coincidió para ambos en 16%.
- El análisis de ATR, al igual que con el RMN, corroboró la incorporación del compuesto fenólico en el quitosano.
- Con el TGA se pudo notar que los materiales modificados presentaron una disminución en la temperatura de degradación en comparación con el quitosano sin modificar, siendo más estables los que utilizaron 10 mM de octil galato en la reacción.
- La mayor capacidad antioxidante fue presentada por el material que se obtuvo utilizando el quitosano de peso molecular medio con 20 mM de octil galato; y el de menor fue el material obtenido utilizando el quitosano de bajo peso molecular con 10 mM de octil galato.
- En el estudio microbiológico con la *E. coli*, se comprobó que los materiales presentaban actividad antimicrobiana, encontrándose una MIC de 0.5 g/L para todos los materiales. Los materiales QM, QOG20M y QOG10B son los que presentaron inhibición en casi todas las concentraciones analizadas. Además por medio de SEM se observó que el material se adhirió a la pared celular del microorganismo posiblemente impidiendo el crecimiento microbiano.

## 7. Recomendaciones y trabajo futuro

Se proponen algunas ideas que pueden ser sujetas a estudio en el futuro.

1. Estudio básico de las estructuras moleculares de los materiales obtenidos, por ejemplo mediante técnicas cristalográficas, para entender las variaciones observadas en cuanto a la estabilidad térmica y poder antioxidante.
2. Estudiar la actividad antimicrobiana de estos materiales en otras especies de microorganismos, a fin de poder ampliar el campo de aplicación de estos.
3. Determinar las propiedades reológicas de estos materiales para su aplicación en películas u otros materiales.
4. Realizar un estudio *in vivo* para determinar la toxicidad de estos materiales y estudios de biodegradabilidad.

## 8. Referencias

1. Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F. y Vazquez-Duhalt, R. (2001) Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:380-385
2. Donís Castro, L. (2010) Polimerización enzimática por apertura de anillo de L-Láctido en líquidos iónicos basados en el catión 1-butil-3-metilimidazolio. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, D:F.
3. Castillo Ruz, M. C. (2010) Síntesis enzimática de poli(épsilon-caprolactona-co-glicólido)s en el medio 1,1,1,2-tetrafluoroetano líquido. Tesis de Maestría en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D.F:
4. Mourya, V. K. e Inamdar, N. N. (2008), Chitosan –modifications and applications: Opportunities galore, *Reactive & functional polymers*, 68: 1013-1051
5. Kumar, G., Smith, P. J. y Payne, G. F. (1999) Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 63(2):154-165
6. Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U.G. y Picci, N. (2009) Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:5933-5938.
7. Sousam F., Guebitz, G. M., y Kokol, Vanja. (2009) Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry*, 44:749-756.
8. Sampaio, S., Taddei, P., Monti. P., Buchert, J. y Freddi, G. (2005) Enzymatic grafting of chitosan onto Bombyx mori silk fibroin: kinetic and IR vibrational studies. *Journal of Biotechnology* 116:21-33.
9. Bárcenas Ochoa, E. M. (2010) Biopolímeros de cefalotórax y exoesqueleto de camarón. Uso de aditivos químicos para modificar sus propiedades mecánicas, Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, D.F.
10. Lárez Velázquez, C. (2003) Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericano de Polímeros*, 4(2):91-109.
11. Muzzarelli, R. A. A. y Muzzarelli, C. (2005) Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Advances in polymer science*, 186:151-209.
12. Pacheco López, N. A. (2010) Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Tesis de Doctorado en

- Biotecnología, Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa, D. F.
13. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. y Sandford, P. (1989) Chitin and Chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. 1ª Edición, Inglaterra, Elsevier applied science.
  14. Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in polymer science, 31:603-632.
  15. Rabea, E. I., Badawy, M. E. – T., Stevens, C. V., Smagghe, G. y Steurbaut, W. (2003) Chitosan and antimicrobial agents: Applications and mode of action. Biomacromolecules 4(6):1457 – 1465.
  16. Cira, L. A., Huerta, S. Hall. G. M., Shirai, K. (2002) Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry, 37:1359-1366.
  17. Covarrubias Cruz, G. C. y Hidalgo Hernández, M. L. (2006) Evaluación del efecto del quitosán como cubriente en granos de maíz, en la mortalidad, la oviposición y emergencia de *Sitophilis zeamais* así como antifúngico en hongos de campo y almacén *in vitro*. Tesis de licenciatura en Ingeniería de Alimentos, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
  18. Aider, M. (2010) Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. LWT-Food science and Technology. 43:837-842.
  19. Nemtsev, S. V., Gamzaza de, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M. y Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. Applied Biochemistry and Microbiology. 38(6):521-526.
  20. Synowiecki, J. y Al-Khateeb, N.A., (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43: 145–171)
  21. García Pérez, C. (2010) Funcionalización enzimática de quitosano con ácido gálico y octil galato empleando peroxidasa de rábano. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, D.F.
  22. Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J. y Du, Y. (2006) Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity, Carbohydrate Polymers, 63:367-374.
  23. Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean. Marine Biotechnology mini-review. 8:203-226

24. Shahidi, F. and Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry production applications and health effects. *Advances in food and nutrition research*. 49: 93-135
25. Domard, A. (1989). Physicochemical properties of chitinous materials. *Advances in chitin science*. 3: 24-37
26. Ravi Kumar, M. N. V. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46:1-27.
27. Alonso Segura, D. (2009) Estudio de la funcionalización de textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quitooligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas. Tesis de Doctorado en Biotecnología, Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa, D. F.
28. Corona Suárez, I. J. (2011) Síntesis y caracterización de las propiedades mecánicas y antifúngicas de las películas de quitosano-co-cítrico. Tesis de licenciatura en Química de alimentos, Facultad de Química, UNAM. D.F.
29. Stryer, L. (1981) *Biochemistry*, 2ª Edición, EUA, Editorial W. H. Freeman and Company
30. Mahler, H. R. y Cordes, E. H. (1969) *Biological Chemistry*, 1ª Edición, EUA, Editorial Harper International.
31. Enzyme structures database <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/> Consultado el 20 de septiembre de 2011
32. Moss, G. P. Enzyme Nomenclature <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> Consultado el 20 de septiembre de 2011.
33. Puskas, J. E., Sen, M. Y. y Su Seo, K. (2009) Green Polymer Chemistry Using Nature's Catalysts, Enzymes. *Journal of polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 47:2959-2976.
34. Mahmoudi, A., Nazari, K., Khoshraneh, M., Mohajerani, B., Kelay, V. y Moosavi-Movahedi, A. A. (2008) Can aminoacids protect horseradish peroxidase against its suicide-peroxidase substrate? *Enzyme and Microbial Technology* 43:329-335
35. Dordick, J. S. (1992) Enzymatic and chemoenzymatic approaches to polymer synthesis. *Trends In Biotechnology*, 10:287-293.
36. Sánchez Moreno, C., Larruari, J. A. y Saura Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of science in food Agricultural*, 76:270-276

37. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. y Chun, O. K. (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Compositions and Analysis*. , doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008
38. Zulueta, A., Esteve, M. J. y Frígola, A. (2009) Analytical Methods ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114:310-316.
39. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for the estimating antioxidant. *Journal of science technology*, 26(2):211-219.
40. Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:1841-1846.
41. Van der Heijden, C. A., Janssen, P. J. C. M. y Strik, J. J. T. W. A. (1986) Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food and chemical toxicology*, 24(10):1067-1070
42. Hughes, C. C. (1989). *The additives Guide*, 1ª edición, Gran Bretaña, Editorial John Wiley & Sons.
43. Fujita, K. y Kubo I. (2002) Antifungal activity of octyl gallate. *Journal of Food Microbiology*, 79:193-201
44. Andrews, J. M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(S1):5-16.
45. Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. E. W. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2):163-175.
46. Gallegos Cruz, E. G. (1999) Recopilación bibliográfica de antibióticos Beta-lactámicos empleados como tratamiento de última elección en cepas multirresistentes de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureoginosa*. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
47. Luna Méndez, O. (2003) Prevalencia de los principales grupos diarreogénicos de *Escherichia Coli* en niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda grave en la ciudad de México. Tesis de licenciatura en Biología, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
48. Peña, N. C. (2006) Investigación hemero – bibliográfica de aspectos más recientes de la producción de diarrea por los diferentes patotipos de *Escherichia coli* en

- México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica bióloga, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
49. Ortega Murillo, F. D. y Téllez Vargas, A. (2010) Influencia de compuestos derivados de propóleo en la formación de biocapas mono especie por *Streptococcus mutans* y *Escherichia Coli*. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica bióloga, Facultad de Química, UNAM, D. F.
  50. Wade, L. G. (2004) Química Orgánica, 5ª Edición, España, Editorial Pearson Prentice Hall.
  51. Morrison, R. T. y Boyd, R. N. (1998) Química Orgánica, 5ª Edición, México, Editorial Pearson Addison Wesley.
  52. Mena Martínez, M. E. (2009) Síntesis enzimática de biopolímeros en líquidos iónicos. Tesis de Maestría en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D. F.
  53. Angulo, J. (1995). Caracterización fisicoquímica de polímeros. 1ª Ed. México, Editorial LIMUSA.
  54. Yossen, M.M. (2006) Caracterización de polímeros sintéticos y naturales por cromatografía líquida de exclusión. Estimación del ensanchamiento instrumental y otros problemas. Tesis de Doctorado en Tecnología Química, Facultad de Ingeniería Química, UNL, Argentina.
  55. Raymond, S. y Charles, C. (1995). Introducción a la química de los polímeros. 1ª ed. España, editorial Reverté.
  56. Hirai, A., Odani, H. y Nakajima, A. (1991) Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Polymer Bulletin, 26:87-94.
  57. Wójcik, W. y Zlotek, U. (2008) Use of chitosan film coatings in the storage of carrots (*Daucus carota*). Progress on chemistry and application of chitosan and its derivatives, 13:141-148.
  58. Li, X. F., Feng, X. Q., Yang, S., Fu, G. Q., Wang, T. P. y Su, Z. X. (2010) Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. Carbohydrate Polymers. 79:493-499.
  59. Mellegard, H., Strand, S.P., Christensen, B. E., Granum, P. E. y Hardy. S. P. (2011) Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. International Journal of Food Microbiology, 148:48 – 54

60. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H. y Meyers, S. P. (2002) Antibacterial activity of chitosans oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 74:65 – 72
61. Friedman, M. y Juneja, M. K. (2010) Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food protection*, 73(9): 1737 – 1761.
62. Kubo, I., Xiao, P. y Kujita, K. (2001) Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioorganic and Medicinal chemistry letters*, 11:347-350.
63. Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K. y Nihei, A. (2004) Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 1072 – 1076.

# **9. ANEXOS**

9.1. Anexo A: Cromatogramas de determinación de pesos moleculares de los quitosanos nativos y modificados.

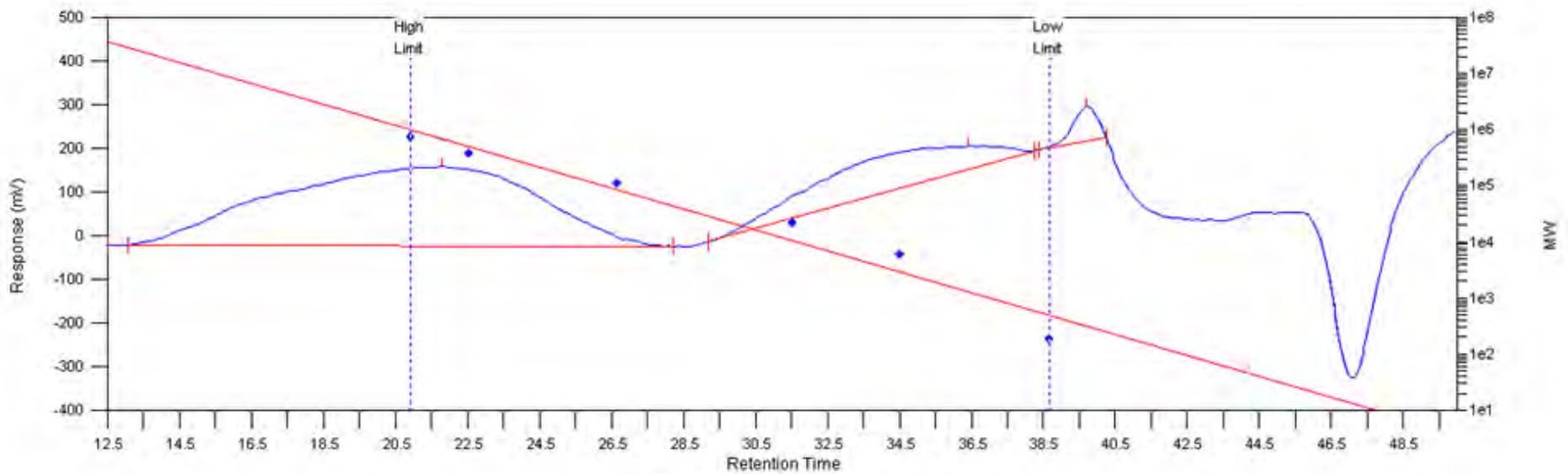


Figura 24 Cromatograma QOG20B

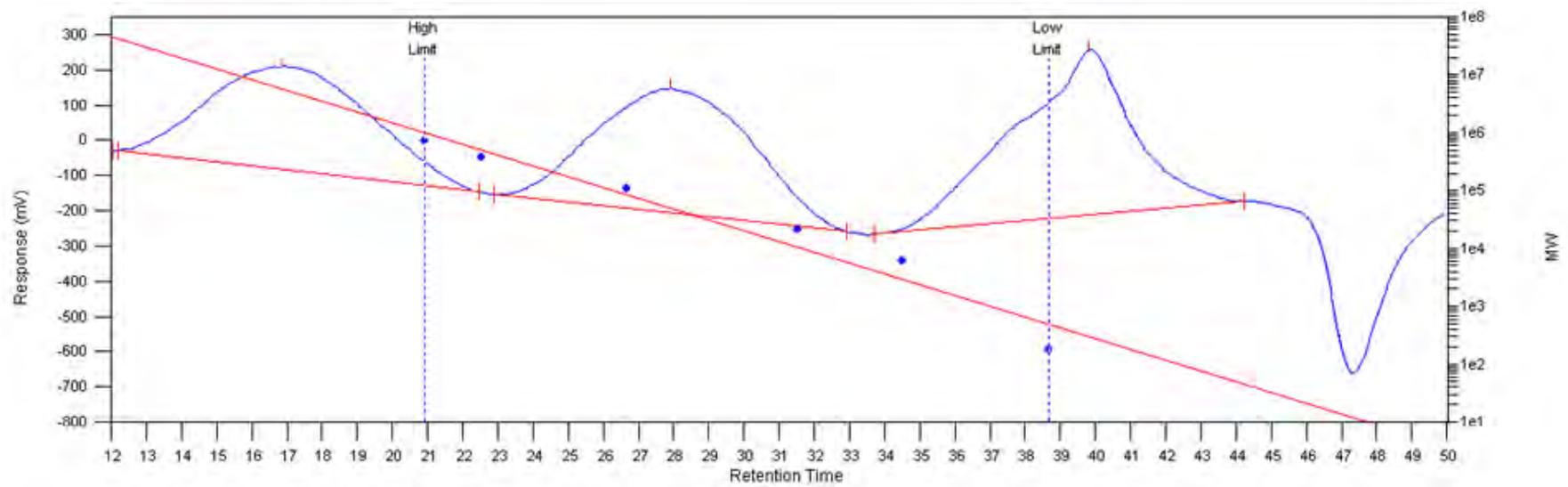


Figura 25 Cromatograma QOG20M

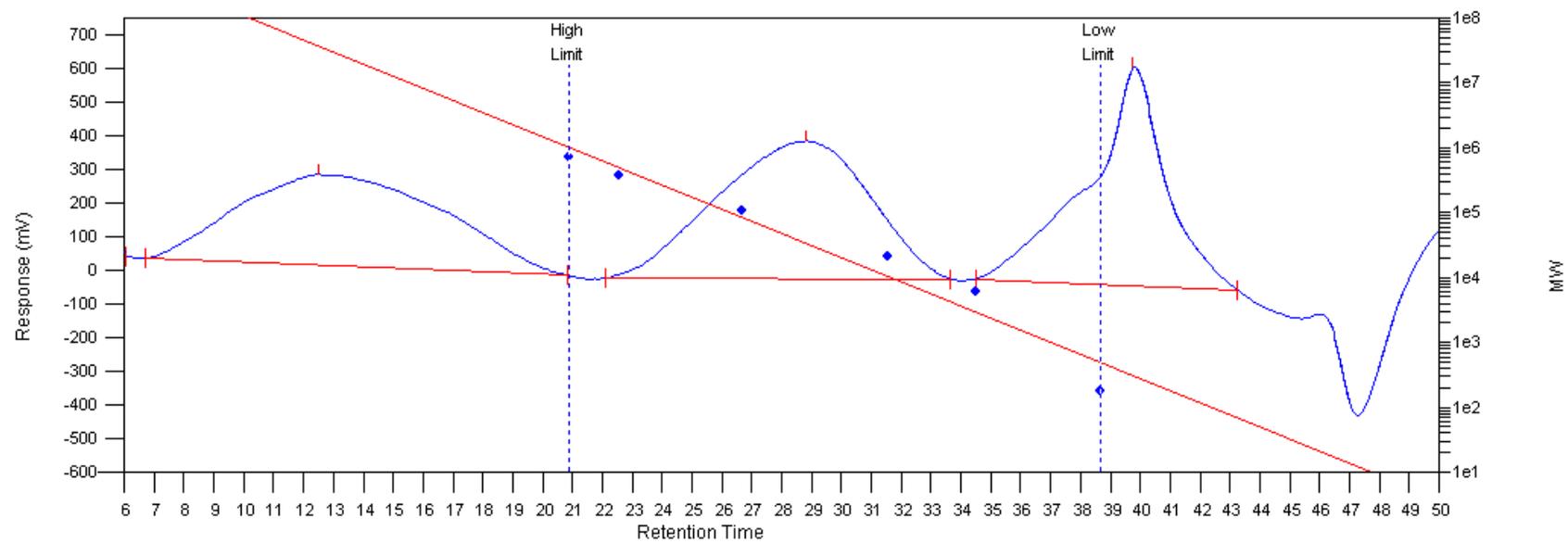


Figura 26 Cromatograma QOG10B

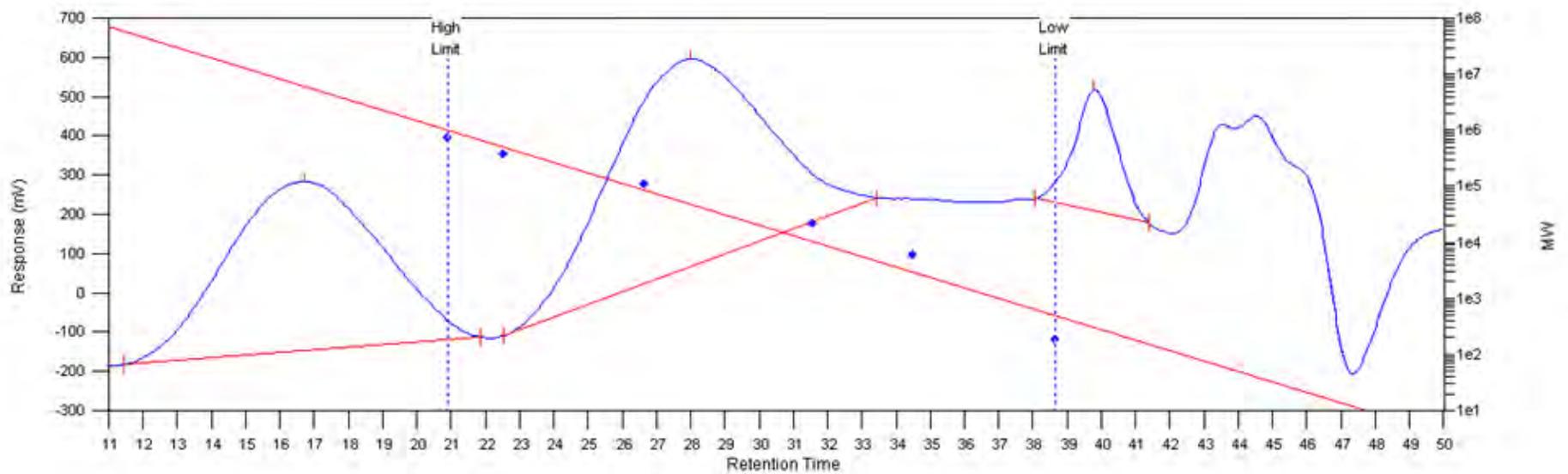


Figura 27 Cromatograma QOG10M

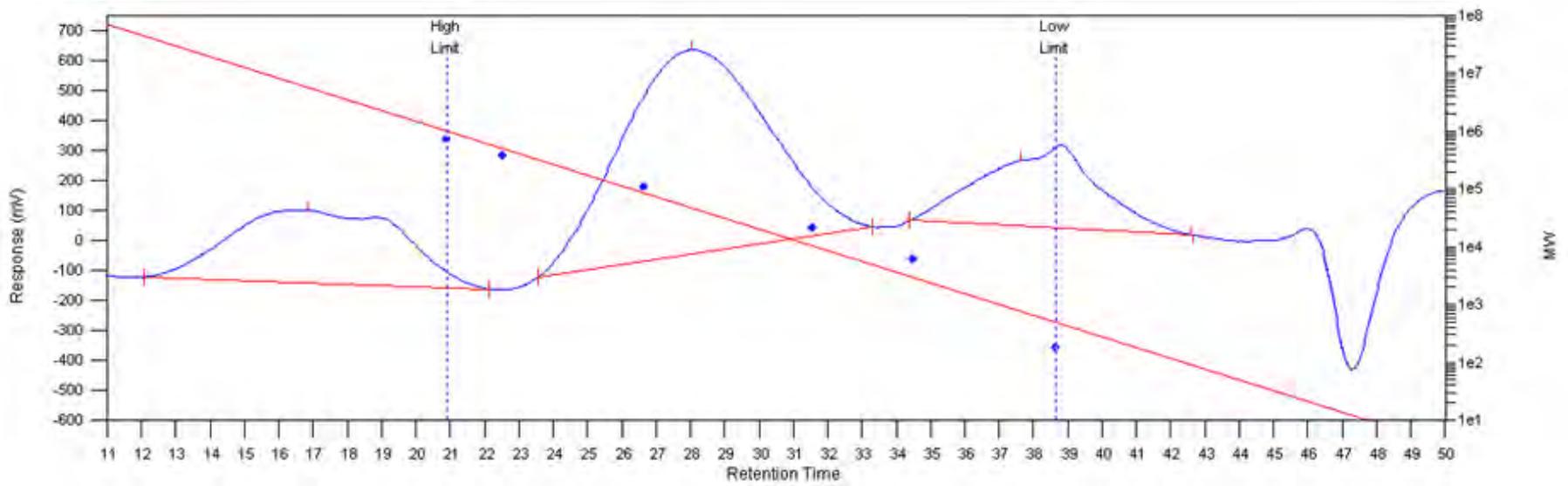


Figura 28 Cromatograma QB

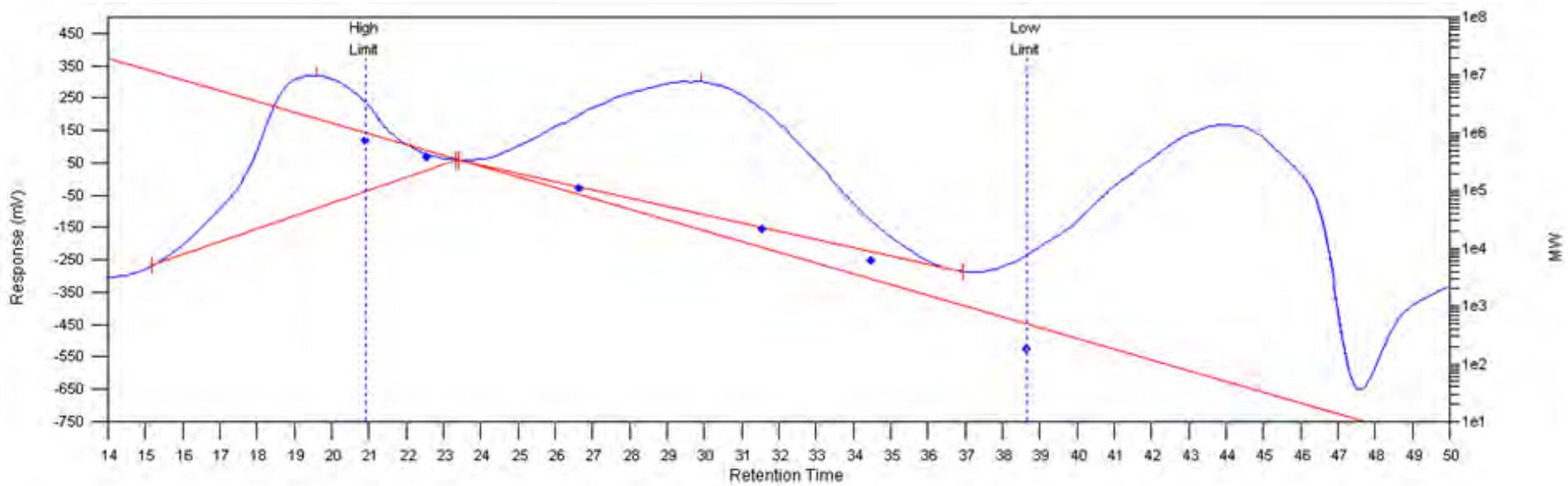


Figura 29 Cromatograma QM

## 9.2. Anexo B: Análisis estadístico (ANOVA) de los materiales empleados para la actividad antimicrobiana

Para todos los análisis se empleó un nivel de significancia de  $\alpha \leq 0.05$ , el grado de acetilación para ambos quitosanos (peso molecular medio y peso molecular bajo) fue de 16%, las concentraciones de GO fueron 0, 10 y 20 mM y las concentraciones del material empleadas fueron 0, 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 g/L.

**Tabla 10 ANOVA empleando Log (UFC/mL) como variable de respuesta y el peso molecular del quitosano como fuente de variación.**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Peso molecular del Quitosano	2	907.6375	453.8187	24.52	0.000000*	0.999998
Error	120	2220.747	18.50622			
Total	123					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 11 ANOVA empleando Log (UFC/mL) como variable de respuesta y la concentración del GO como fuente de variación.**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Concentración GO	2	5.243876	2.621938	0.10	0.904242	0.065067
Error	120	3123.14	26.02617			
Total	123					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 12 ANOVA empleando Log (UFC/mL) como variable de respuesta y la concentración del material como fuente de variación.**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Concentración del material en el medio de cultivo	4	1062.352	265.588	15.17	0.000000*	0.999999
Error	118	2066.032	17.50875			
Total	123					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 13 ANOVA empleando Log (UFC/mL) como variable de respuesta interactuando los 3 factores de variación, material (Quitosano – GO) vs concentración del material**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Material	8	946.2497	118.2812	43.25	0.000000*	1.000000
B: Concentración Material	4	742.3721	185.593	67.86	0.000000*	1.000000
AB	32	1023.49	31.98405	11.69	0.000000*	1.000000
Error	78	213.3309	2.735012			
Total	123					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 14 ANOVA empleando el porcentaje de inhibición como variable de respuesta y el peso molecular del quitosano como fuente de variación.**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Peso molecular del Quitosano	2	36209.92	18104.96	10.75	0.000047*	0.988870
Error	135	227451	1684.822			
Total	138					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 15 ANOVA empleando el porcentaje de inhibición como variable de respuesta y la concentración de GO como fuente de variación.**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Concentración GO	2	7978.62	3989.31	2.11	0.125663	0.426387
Error	135	255682.3	1893.943			
Total	138					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 16 ANOVA empleando el porcentaje de inhibición como variable de respuesta y la concentración del material como fuente de variación.**

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ )
A: Concentración del material en el medio de cultivo	4	109295.8	27323.94	23.54	0.000000*	1.000000
Error	133	154365.1	1160.64			
Total	138					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad

**Tabla 17 ANOVA empleando el porcentaje de inhibición como variable de respuesta interactuando los 3 factores de variación, material (Quitosaño – GO) vs concentración del material**

<b>Fuente de variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Medio de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Nivel de probabilidad</b>	<b>Nivel de significancia (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: Material	8	40455.84	5056.98	14.21	0.000000*	1.000000
B: Concentración del Material en el medio de cultivo.	4	76515.52	19128.88	53.77	0.000000*	1.000000
AB	32	65107.98	2034.625	5.72	0.000000*	1.000000
Error	93	33087.67	355.7814			
Total	138					

\* Término significativo a  $\alpha \leq 0.05$ , GL: Grados de libertad