



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS MAGISTER EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE OLIGOQUITOSANO Y SU  
APLICACIÓN EN PELÍCULAS DE QUITOSANO/OLIGOQUITOSANO  
PARA LA PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS**

**CARLA PAOLA CALBE**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2013**

A mis grandes amores:

    Mi esposo Daniel

    Mis hijos Sofía y Joaquín

    Mi mamá, que dedica su vida a nosotros  
    cada día

## **AGRADECIMIENTOS**

-A la Dra. Liliana Albertengo, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

-A la Lic. Mirta Montero, por ayudarme a llevar adelante la etapa experimental del trabajo de tesis, y por su paciencia y serenidad.

-A las Dras. Adriana Debbaut, Olivia Fernandez y Sonia Farenzena; y al Dr. Alejandro Gentili, por su colaboración tanto en la etapa experimental como en la edición de la tesis.

-A la Dra. Fernández del Dpto. de Matemáticas, por aportar el diseño experimental que permitió desarrollar uno de los principales objetivos de la tesis.

-Al Director y al Coordinador de FUNBAPA: Dr. Eduardo Merayo e Ing. Daniel Villalba, por confiar en mí, y por promover mi capacitación y formación permanente.

-A mis compañeros de trabajo: Ing. Adrián Justo, Cdra. Verónica Graziano e Ing. Mauricio Leonardo, por su apoyo y compañerismo.

-A mi mamá, mi hermana Ana, y mi papá por su apoyo incondicional en todo momento, y a mi suegra y mi esposo; por colaborar todos ellos con el cuidado de mis hijos durante este proceso.

## RESUMEN

La presente Tesis se basa en la optimización de la obtención de oligoquitosanos por degradación oxidativa, la caracterización de los biopolímeros obtenidos y su aplicación en películas para recubrimiento.

Se estudiaron las mejores condiciones de obtención de oligómeros por el Método de Taguchi utilizando un Arreglo Ortogonal L9. Fueron seleccionadas tres variables controlables: concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%; 12,5%; 15%) volumen del reactivo (etanol 98%) utilizado en la precipitación de los oligómeros (90,0 mL; 150,0 mL; 210,0 mL) y tiempo de reposo para lograr una mejor precipitación (15 min; 30 min; 60 min). La variable respuesta fue el peso de los oligómeros de quitosano obtenidos. Los oligoquitosanos fueron caracterizados determinando peso molecular, grado de polimerización, RX, FTIR y se estudió la solubilidad de los mismos.

Las condiciones operacionales óptimas resultaron, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una concentración del 12,5%, calentamiento en horno microondas (700 W) durante 4 min, precipitación de los oligoquitosanos con 150 mL de etanol 98% y posteriormente se liofilizaron.

Los análisis realizados para la caracterización permiten concluir que los oligoquitosanos obtenidos tienen una solubilidad del 98% con un grado de polimerización igual a 2.

Con el objetivo de evaluar la acción antimicrobiana de los oligómeros se realizaron ensayos sobre una bacteria Gram negativa, *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 25922) y una Gram positiva, *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923). Los

resultados permitieron concluir que el oligoquitosano ingresaría a la célula de *E. coli* (Bacteria Gram -), debido a que posee una capa delgada de peptidoglicano, lo cual no ocurre con *S. aureus*, quien por pertenecer a la familia de bacterias Gram +, está constituida por una capa gruesa de peptidoglicano que impide el ingreso del oligo. La solución mezcla (oligoquitosano/quitosano) en *E. coli*, mejoró el efecto con respecto al del quitosano y del oligoquitosano, individualmente, esto puede deberse a que el quitosano perturbó la pared celular permitiéndole al oligoquitosano ingresar al interior de la célula.

Se estudió la solubilidad a distintas temperaturas del oligómero.

Se estudió la aplicación del oligoquitosano como película o recubrimiento, debido al bajo grado de polimerización, los oligos no tienen propiedades filmogénicas, por esta razón, quitosano se utilizó como base de las películas. Se realizaron diferentes formulaciones, quitosano 0,25% en ácido acético 0,1% y quitosano con oligoquitosano (0,10, 0,25 y 0,50%). Se determinaron: peso molecular, viscosidad, grado de desacetilación, humedad, cenizas del quitosano y del oligoquitosano. Las películas obtenidas se caracterizaron determinando su apariencia, el espesor, homogeneidad y estructura superficial por SEM, FTIR, color y opacidad, propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua. La capacidad antimicrobiana se testeó contra dos bacterias patogénicas que contaminan los alimentos: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y contra dos hongos, *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*.

Los estudios realizados nos permitieron concluir que el quitosano y los oligoquitosanos son capaces de formar películas que tienen espesor uniforme, y

buena apariencia, son homogéneas y fáciles de manipular, poseen buenas propiedades de barrera al vapor de agua y mecánicas. Y que las formulaciones con 0,10 y 0,25% de oligoquitosano reducen el crecimiento de *S. aureus* y *E.coli* en la zona de contacto.

De los estudios realizados podemos concluir que las propiedades funcionales de las películas de quitosano pueden ser modificadas cuando se combinan con oligoquitosano, aumentando la capacidad antimicrobiana.

Por todo lo estudiado, el quitosano y sus derivados, con sus propiedades y funciones, podrían convertirse en un futuro cercano, en material de envase o recubrimiento de uso corriente en alimentos.

## ABSTRACT

This Thesis is based on the optimization of the production of chitooligomers by oxidative degradation, characterization of the obtained biopolymers and application in films.

The best conditions for oligomers obtention were studied by Taguchi method with an orthogonal array L9. Three controllable variables were selected: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (10%; 12.5%; 15%), ethanol volume for chitooligomers precipitation (90.0 mL; 150.0 mL; 210.0 mL) and resting time for getting better precipitation (15 min, 30 min, 60 min). Response variable was chitooligomers weight. Obtained oligomers were characterized determining molecular weight, degree of polymerization, RX, FTIR and derivatives solubility.

The best operational conditions resulted 12.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, microwave heating (700 W) 4 min, 150 mL ethanol 98% for chitooligomers precipitation and freeze-drying. Chitooligomers obtained have 98% solubility and polymerization degree 2.

Oligomers antimicrobial activity was tested against Gram negative *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 25922) and Gram positive *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923). Results showed that chitooligomers enter in *E. coli* cell (Bacteria Gram -) because it has a thin peptidoglycan layer. *S. aureus* (Gram +) has a thick layer, that blocks oligochitosan entrance.

Chitosan/oligomers mixture improved antimicrobial effect in respect to chitosan or oligomers each of them alone, this could be due to chitosan disturbed the wall cell allowing chitooligomers enter into the cell.

Chitooligomers application as films was studied. Chitooligomers have no filmogenic properties because of a low degree of polymerization then chitosan was used as films base. Different formulations were made: chitosan 0,25% in acetic acid 0.1% and chitosan with chitooligomers (0.10, 0.25 y 0.50%). For chitosan and chitooligomers characterization, molecular weight, viscosity, deacetylation degree, water content and ash were determined. Solubility at different temperatures were studied for chitooligomers.

Films obtained were characterized determining: appearance, thickness, Fourier Transform Infrared (FTIR), homogeneity and appearance by Scanning Electronic Microscopy (SEM), optical properties like opacity, UV barrier capacity and color, mechanical properties and water vapor permeability (WVP). Antimicrobial activity was tested against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27933, *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.*

We can conclude that films based on chitosan/oligomers had uniform thickness and good appearance, and they were homogeneous and easy to handle. Have good mechanical properties and were WVP barrier.

Films presented a higher opacity than control ones. Antimicrobial capacity was good demonstrating that films with chitosan oligomers at 0.10 and 0.25% concentration reduced *S. aureus* and *E. coli* growth in the contact zone.

Hence, it is going to be no surprise if we witness a widespread use of chitosan and chitooligomers films in tomorrow food packaging.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. Quitina y quitosano</b>	2
<b>1.2. Quitina</b>	3
<b>1.3. Quitosano</b>	6
<b>1.4. Derivados de Quitina y Quitosano</b>	8
<b>1.4.1. Complejos electrostáticos</b>	10
<b>1.4.2. O- y N- carboximetilquitosanos</b>	10
<b>1.4.3. Quitosanos N-metilenfosfónicos</b>	10
<b>1.4.4. Amonio de trimetilquitosano</b>	11
<b>1.4.5. Carbohidrato de quitosanos ramificados</b>	11
<b>1.4.6. Copolímeros insertados en quitosano</b>	11
<b>1.4.7. Quitosanos alquilados</b>	12
<b>1.4.8. Ciclodextrina ligada a quitosano</b>	12
<b>1.5. Oligoquitosanos</b>	12
<b>1.6. Diseño de experimentos</b>	15
<b>1.7. Actividad antimicrobiana y peso molecular de quitosano</b>	18
<b>1.8. Microbiología</b>	19
<b>1.8.1. El árbol de la vida</b>	19
<b>1.8.2. Características generales de las células bacterianas</b>	21
<b>1.8.2.1. Membranas y paredes celulares</b>	21
<b>1.8.2.2. Estructura de la membrana citoplasmática</b>	21
<b>1.8.2.3. Composición química de las membranas</b>	22
<b>1.8.2.4. Función de la membrana citoplasmática</b>	22

1.8.2.5. Pared celular de procariotas	23
1.8.3. Crecimiento microbiano y alteración de los alimentos	26
1.8.4. Enfermedades transmitidas por los alimentos	29
1.8.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.8.5.1. Biología y epidemiología	30
1.8.5.2. Patogénesis	31
1.8.5.3. Prevención	32
1.8.6. <i>Escherichia coli</i>	32
1.8.6.1. Biología, epidemiología y patogénesis	33
1.8.6.2. Prevención	35
1.9. Películas de quitosano	36
<b>OBJETIVOS</b>	40
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	42
2. Diseño estadístico aplicado a los factores en estudio	43
2.1. Preparación de oligoquitosano para el diseño experimental	43
2.2. Preparación de oligoquitosano para las pruebas microbiológicas y para las películas	44
2.3. Caracterización de quitosano y oligoquitosano	44
2.3.1. Determinación del peso molecular	44
2.3.2. Peso molecular por viscometría	45
2.3.3. Determinación de solubilidad de oligoquitosanos	46
2.3.3.1. Solubilidad de los oligoquitosanos obtenidos con el diseño de experimento	46
2.3.3.2. Solubilidad de los oligoquitosanos a distintas	46

<b>temperaturas</b>	
<b>2.3.4. Determinación de cenizas</b>	47
<b>2.3.5. Determinación de humedad</b>	48
<b>2.3.6. Determinación del grado de desacetilación</b>	48
<b>2.3.7. Determinación de viscosidad</b>	49
<b>2.3.8. Espectrometría de difracción de rayos X</b>	50
<b>2.3.9. Espectroscopía FTIR</b>	50
<b>2.4. Materiales para el estudio microbiológico</b>	50
<b>2.4.1. Preparación de las soluciones de quitosano/     oligoquitosano para el ensayo microbiológico</b>	51
<b>2.4.2. Esterilización del material</b>	52
<b>2.4.3. Microorganismos de ensayo</b>	52
<b>2.4.4. Ensayos de actividad bactericida</b>	52
<b>2.5. Películas de quitosano/oligoquitosanos</b>	54
<b>2.5.1. Obtención de películas</b>	54
<b>2.5.2. Caracterización de películas de quitosano/     oligoquitosanos</b>	54
<b>2.5.2.1. Espectroscopía FTIR</b>	55
<b>2.5.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)</b>	55
<b>2.5.2.3. Propiedades ópticas</b>	55
<b>2.5.2.3.1. Opacidad y barrera al UV</b>	55
<b>2.5.2.3.2. Color</b>	56
<b>2.5.2.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)</b>	56
<b>2.5.2.5. Propiedades mecánicas</b>	57
<b>2.5.2.6. Capacidad antimicrobiana de los oligoquitosanos</b>	57
<b>2.5.2.6.1. Preparación de los inóculos</b>	57

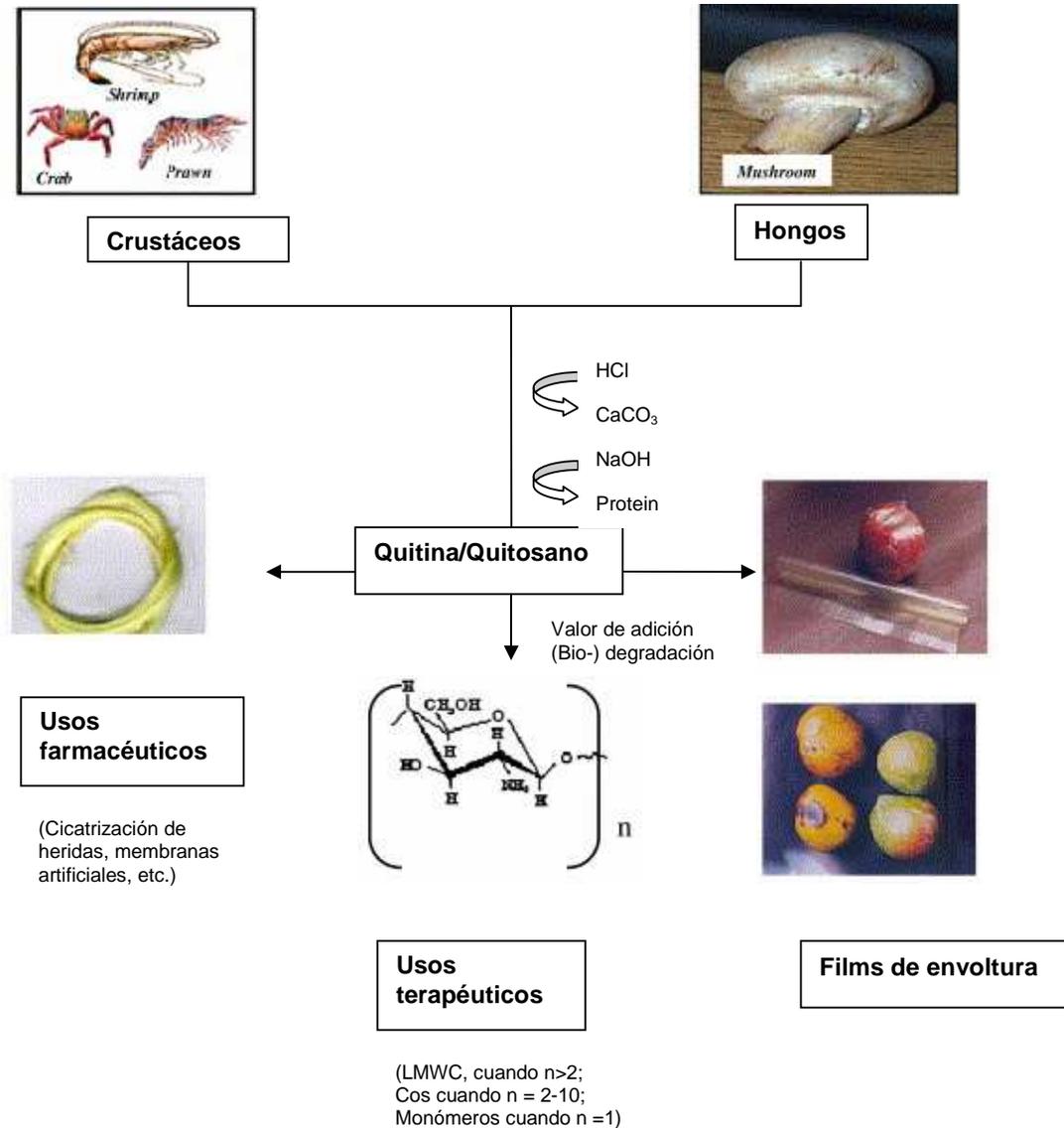
2.5.2.6.2. Ensayos antimicrobianos	58
2.5.3. Análisis estadísticos	58
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	59
<b>3. Degradación oxidativa del quitosano</b>	60
3.1. Diseño de experimento	63
3.2. Caracterización de los oligoquitosanos obtenidos en el diseño experimental	67
3.2.1. Peso Molecular - Grado de polimerización	67
3.2.2. Difracción por Rayos X	69
3.2.3. Espectroscopía FTIR	71
3.2.4. Estudio de la solubilidad	75
3.3. Conclusiones	76
3.4. Obtención y caracterización de oligoquitosano	77
3.4.1. Peso Molecular	77
3.4.2. Determinación de cenizas	77
3.4.3. Determinación de humedad	78
3.4.4. Grado de desacetilación	78
3.4.5. Viscosidad	78
3.4.6. Solubilidad del oligoquitosano	79
3.5. Ensayos microbiológicos	80
3.5.1. Ensayo con <i>Escherichia coli</i>	80
3.5.2. Ensayo con <i>Staphylococcus aureus</i>	82
3.6. Conclusiones	85
3.7. Obtención y caracterización de películas de quitosano/ oligoquitosano	86

<b>3.7.1. Formulaciones de las películas de quitosano/ oligoquitosano</b>	<b>86</b>
<b>3.7.2. Apariencia y homogeneidad de las películas</b>	<b>87</b>
<b>3.7.3. Espesor</b>	<b>88</b>
<b>3.7.4. Análisis FTIR</b>	<b>89</b>
<b>3.7.5. SEM</b>	<b>90</b>
<b>3.7.6. Propiedades ópticas. Color y Opacidad</b>	<b>93</b>
<b>3.7.7. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)</b>	<b>95</b>
<b>3.7.8. Propiedades mecánicas</b>	<b>97</b>
<b>3.7.9. Capacidad Antimicrobiana</b>	<b>101</b>
<b>3.8. Conclusiones</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>

# **INTRODUCCION**

## 1. Quitina y quitosano

Los polímeros quitina y quitosano son aminopolisacáridos naturales que poseen estructuras únicas, tienen propiedades y funciones altamente sofisticadas, con un amplio rango de aplicaciones en áreas biomédicas e industriales (Figura 1.1).



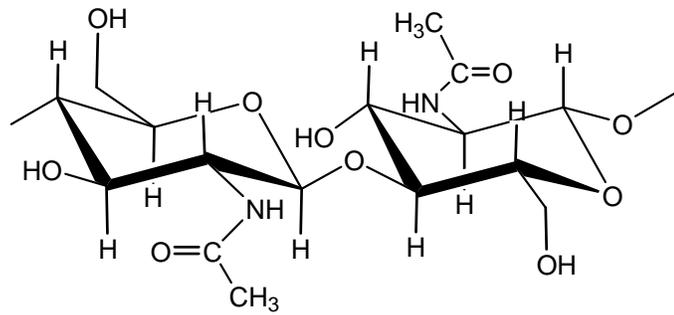
**Figura 1.1: obtención y aplicaciones quitina/quitosano.**

Los atributos positivos de estos biopolímeros como: excelente biocompatibilidad, buena biodegradabilidad y baja toxicidad e inmunogenicidad, que sumados a actividades biológicas versátiles como por ejemplo la capacidad antimicrobiana, les proporcionan amplias oportunidades para futuros desarrollos. Por otra parte, la posibilidad de modificaciones estructurales permite considerarlos materiales de gran potencial para lograr propiedades y funciones específicas de uso en varios campos (Pillai y col. 2009).

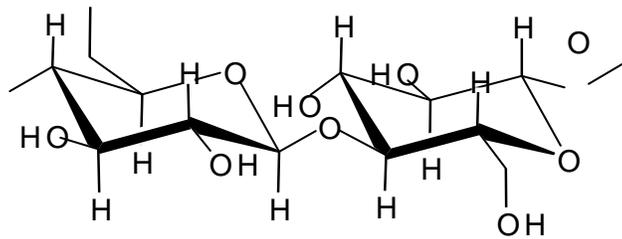
## **1.2. Quitina**

La quitina es el componente más importante en el exoesqueleto de los invertebrados, como por ejemplo, anélidos, artrópodos y moluscos. Se encuentra además en hongos y mohos. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Su fórmula química es similar, sólo que en la quitina se encuentra un grupo acetamida en lugar del hidroxilo del C<sub>2</sub> (Figura 1.2). Esta similitud que poseen en su estructura se ve reflejada en los roles que presentan en la naturaleza, ambas actúan como materiales de defensa y estructurales.

La quitina no se presenta como una entidad química natural, sino que se la considera como el producto de la separación de varios constituyentes a los que se mantiene unida (proteínas, minerales, lípidos y pigmentos) en una matriz compleja llamada “estructura quitinosa”.



**Quitina**



**Celulosa**

**Figura 1.2: Comparación entre la estructura de la quitina y celulosa.**

Es un polímero lineal con predominio de residuos 2-acetamida-2-deoxi-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) y en menor proporción de 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (D-glucosamina). La materia prima es generalmente exoesqueleto de langosta, langostinos, camarones y cangrejos de varias especies (*Pandalus borealis*, *Euphausia superba*, *Pleaticus muller*, *Chionoecetes opilio*, *Japonicus bardii*).

Los exoesqueletos de crustáceos, en base seca, contienen 15-20 % de quitina, 25-40 % de proteínas y 40-55 % de sales minerales (carbonato y fosfato de calcio). Otros constituyentes son lípidos y algunos pigmentos, incluidos los carotenoides. Por lo tanto, la extracción de quitina consta de varias etapas: desmineralización, desproteinización y eliminación de pigmentos (Pistonesi, 2001, Percot y col. 2003).

Una vez aislada se presenta como un polvo blanco, cristalino, insoluble en agua, solventes orgánicos, ácidos y álcalis diluidos y concentrados. Su escasa solubilidad se debe a la formación de puentes hidrógeno intermoleculares entre las cadenas  $\beta$ -(1-4)-glicosídicas y a su rígida estructura cristalina. Es soluble en hexafluoropropanol, hexafluorocetona, cloroalcoholes en conjugación con soluciones acuosas de ácidos minerales y dimetilacetamida conteniendo un 5 % de cloruro de litio (Teng y col. 2001, Pillai, 2009).

Dependiendo de su fuente, la quitina se produce como dos alomorfos, llamados  $\alpha$  y  $\beta$ , que pueden ser diferenciados por infrarrojo y espectroscopía RMN en estado sólido junto a difracción de rayos X. La  $\alpha$ -quitina es por lejos la más abundante; se produce en las paredes celulares de hongos y levaduras, en el krill, en tendones y exoesqueleto de langostas, cangrejos, camarones y langostinos, así como también en cutículas de insectos (Rinaudo, M. 2006).

La quitina tiene baja toxicidad y es inerte en el tracto gastrointestinal de mamíferos; es biodegradable, debido a la presencia de quitinasas ampliamente distribuidas en la naturaleza y encontradas en bacterias, hongos, plantas y en el sistema digestivo de varios animales. Las quitinasas están involucradas en la defensa contra invasión de bacterias (Rinaudo, M. 2006).

Algunos usos de la quitina pueden ser en columnas cromatográficas para aislar lectinas y determinar su estructura, inmovilización de enzimas y células enteras; con aplicación en la industria alimentaria, tales como aclarado de jugos frutales y tratamiento de leche. Es también importante para el tratamiento de contaminantes industriales por poseer características de absorbente. La quitina puede ser procesada en forma de films y fibras: estas fueron desarrolladas por primera vez por Austin y Brine (1997) y luego por

Hirano (2001). Tienen ventajas como ser antialérgicas, desodorizantes, antibacterianas y reguladoras de la humedad. Son usadas como ligantes en el proceso de fabricación del papel. Sin embargo, el principal desarrollo del film y la fibra de quitina es para aplicaciones médicas y farmacéuticas como material de curación y liberación de medicamentos controlados. Puede ser usada también como excipientes y transportador de drogas en forma de film, gel o polvo para aplicaciones que involucran mucoadhesividad (Rinaudo, M. 2006).

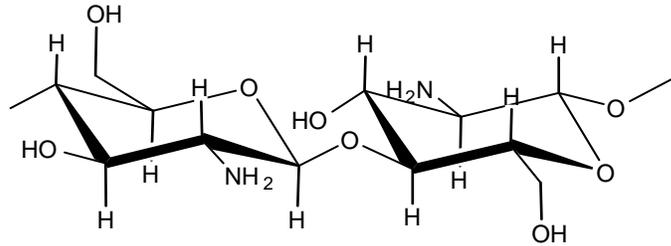
Es importante tener en cuenta que su insolubilidad en solventes comunes, hace a la quitina difícil de caracterizar y procesar. El alto costo de extracción y purificación de la quitina parece reservar este polímero para aplicaciones de alto valor agregado. Por estas razones, se supone que las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas son las áreas más prometedoras para el desarrollo, con la de los cosméticos en segundo lugar (Rinaudo, M. 2006).

### **1.3. Quitosano**

El principal derivado de la quitina es el quitosano, que se produce por desacetilación (parcial) alcalina o enzimática de la misma. Este biopolímero (figura 1.3) contiene una mayor proporción de grupos D-glucosamina con respecto a los N-acetil-D-glucosamina, por lo que se disuelve a bajas concentraciones de ácidos orgánicos acuosos, puesto que el grupo amino se encuentra totalmente protonado a  $\text{pH} < 5$ . Se solubiliza en soluciones diluidas de ácido acético, fórmico y también en ácidos inorgánicos.

La desacetilación completa difícilmente se alcanza y normalmente no es necesaria, ya que la solubilidad en ácidos diluidos se logra a partir de un grado

de desacetilación de 60 %. La solubilización se produce por protonación de la función  $-NH_2$  sobre la posición del C-2 de la unidad de D-glucosamina, por lo cual el polisacárido es convertido a polielectrolito en medio ácido.



**Figura 1.3: Estructura del quitosano.**

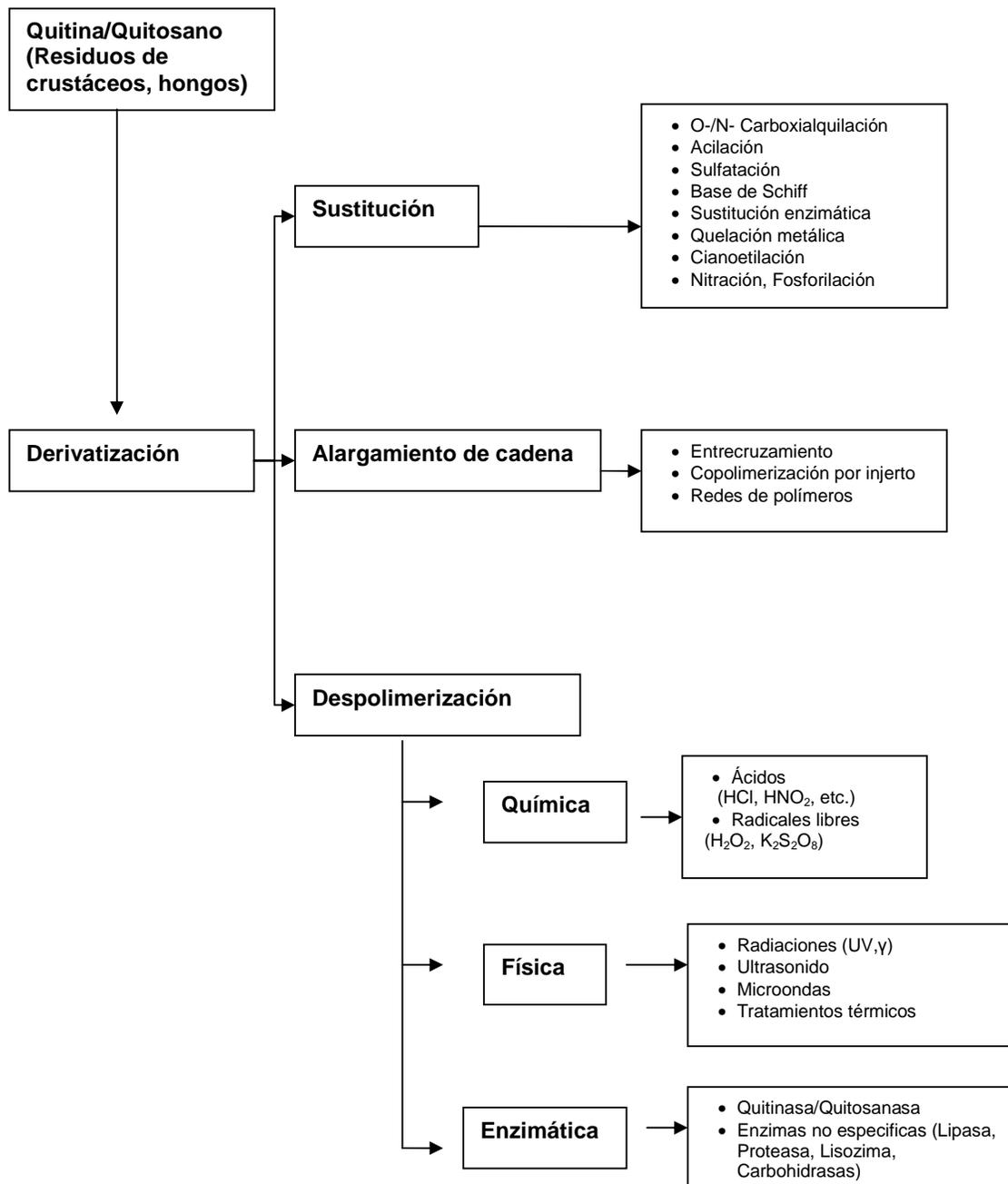
El quitosano es el único polímero catiónico pseudonatural, lo que le confiere características peculiares que le permiten su aplicación en numerosas áreas como la biotecnología, la agricultura, la industria alimenticia, farmacéutica, química, etc.

La solubilidad es un parámetro muy difícil de controlar: está relacionado con el grado de acetilación, la concentración iónica, el pH, la naturaleza del ácido usado en la protonación y la distribución de los grupos acetilos a lo largo de la cadena, así como también el peso molecular, las condiciones de aislamiento y secado del polisacárido influyen en la solubilidad (Rinaudo, M. 2006).

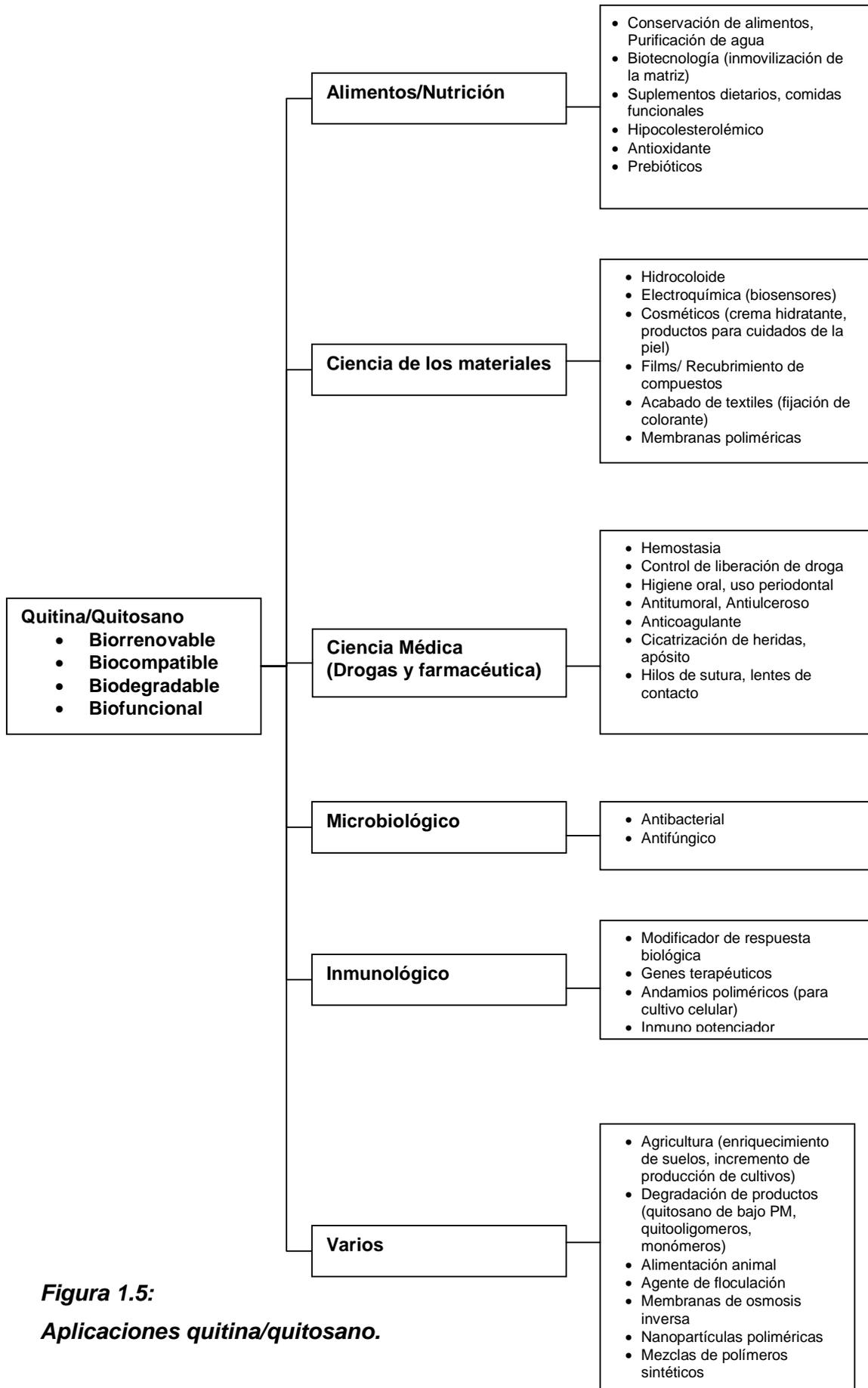
La ventaja del quitosano sobre otros polisacáridos (celulosa, almidón, etc.) es que su estructura química permite modificaciones específicas sin demasiadas dificultades en la posición C-2. Pueden ser introducidos grupos específicos para diseñar polímeros con aplicaciones seleccionadas (Rinaudo, M. 2006).

## 1.4. Derivados de Quitina y Quitosano

En los últimos años se ha desarrollado una variedad muy amplia de derivados de quitina y quitosano (Figura 1.4) para usos específicos y aplicaciones en diversas áreas (Figura 1.5) (Harish Prashnanth y Tharanathan, 2007).



**Figura 1.4: Derivados quitina/quitosano.**



**Figura 1.5:**  
**Aplicaciones quitina/quitosano.**

A continuación describiremos algunas de las múltiples modificaciones del quitosano.

#### **1.4.1. Complejos electrostáticos**

El quitosano, como un polielectrolito, bajo condiciones ácidas es capaz de formar complejos electrostáticos, con un surfactante de carga opuesta (SPEC) y complejos polielectrolitos (PEC).

Las principales aplicaciones de estos complejos electrostáticos son como materiales antitrombogénicos, sistemas de liberación controlada, encapsulación de drogas, inmovilización de enzimas y células, y transportadores de genes (Rinaudo, M. 2006).

#### **1.4.2. O- y N- carboximetilquitosanos**

Carboximetilquitosano (CM-quitosano) es el derivado más estudiado; es un polímero anfótero cuya solubilidad depende del pH. Esta reacción extiende el rango de pH ( $\text{pH} > 7$ ) en el cual el quitosano es soluble en agua (Rinaudo, M. 2006).

#### **1.4.3. Quitosanos N-metilenfosfónicos**

Estos interesantes derivados aniónicos, con algún carácter anfótero fueron sintetizados bajo diferentes condiciones y demostraron tener buena eficiencia de complejación para cationes tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , y los de metales de transición Cu(II), Cd(II), Zn(II), etc. La complejación provee protección contra la corrosión para superficies metálicas. Estos derivados fueron modificados en el LIBAQ (Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas en Quitina-UNS)

con la introducción de cadenas alquílicas para obtener propiedades anfifílicas que para aplicación en cosméticos (Heras y col. 2001, Ramos y col. 2003).

En la actualidad se ha propuesto una metodología sintética para la obtención de quitosano N-propil-N-metilén fosfonato (PNMPC) por introducción de una cadena alquílica corta sobre el derivado hidrosoluble. La introducción del grupo propilo, por aminación reductiva con borhidruro de sodio, se presenta como una alternativa para regular las propiedades hidrofóbicas del NMPC (Zuñiga y col. 2010).

#### **1.4.4. Amonio de trimetilquitosano**

Es un derivado catiónico, soluble en agua prácticamente en todo el rango de pH, es obtenido por cuaternización del quitosano con yoduro de metilo en hidróxido de sodio bajo condiciones controladas. Tiene aplicaciones en la fabricación de papel (Rinaudo, M. 2006).

#### **1.4.5. Carbohidrato de quitosanos ramificados**

Los carbohidratos pueden ser insertados sobre la columna vertebral del quitosano en la posición C-2 por alquilación reductiva. Estos derivados son importantes ya que son reconocidos por las correspondientes lectinas específicas y así podrían ser usados para la orientación de drogas (Rinaudo, M. 2006).

#### **1.4.6. Copolímeros insertados en quitosano**

Uno de los derivados más explorados es el polietilenglicol insertado en quitosano, tiene la ventaja de ser soluble en agua, dependiendo del grado de inserción (Rinaudo, M. 2006).

#### **1.4.7. Quitosanos alquilados**

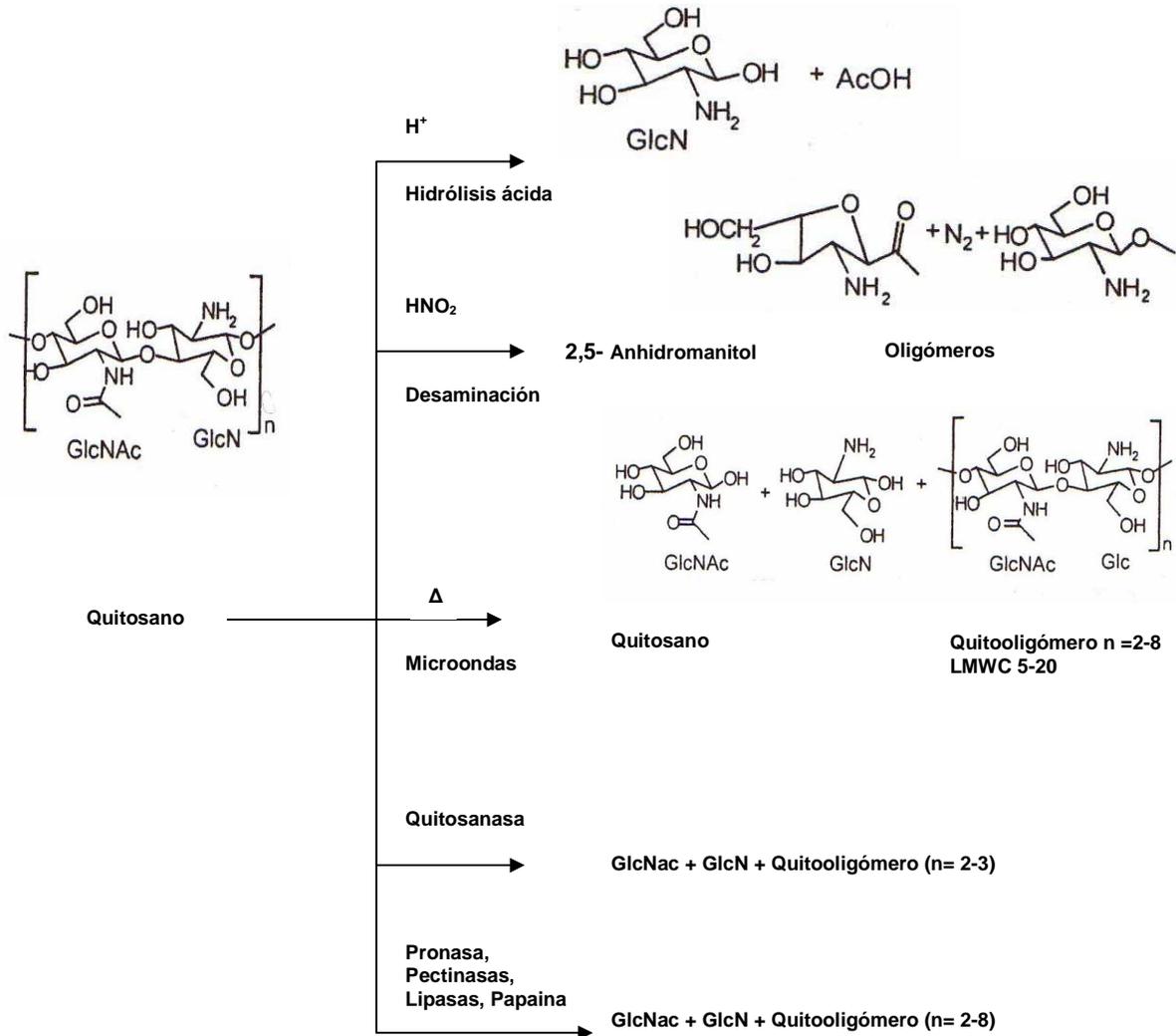
Los quitosanos alquilados son muy importantes como polímeros anfífilicos sobre la base de polisacáridos (Rinaudo, M. 2006).

#### **1.4.8. Ciclodextrina ligada a quitosano**

Los oligosacáridos cíclicos, llamados  $\alpha$ -,  $\beta$ -, $\gamma$ -ciclodextrinas (CD), son importantes debido de su habilidad de encapsular moléculas hidrofóbicas en su cavidad hidrofóbica toroidal, cuya selectividad depende del número de unidades de glucosa (unidades de 6,7,8,D-glucosa respectivamente). Estos nuevos derivados tienen la habilidad de reconocer diferencialmente y retener ciertos compuestos huéspedes en base a sus formas y estructuras moleculares (Rinaudo, M. 2006).

### **1.5. Oligoquitosanos**

El alto peso molecular y por lo tanto la alta viscosidad del quitosano limita su uso en varias aplicaciones biológicas. Siendo un polímero puede estar sujeto a la despolimerización produciendo quitosano de bajo peso molecular, oligosacáridos (quitoligómeros) y monómeros. Como consecuencia de la excelente solubilidad de los oligómeros del quitosano, sus aplicaciones son numerosas y variadas. En la Figura 1.6 se observan varios métodos químicos, físicos y enzimáticos han sido sugeridos para la preparación de oligoquitosanos (Mourya y Inamdar, 2008).



**Figura 1.6: Métodos de obtención de chito-oligómeros**

Los medios químicos se limitan a una hidrólisis ácida con métodos de calentamiento tradicional y tienen algunas desventajas como, bajo rendimiento, acidez residual y que no son específicos; la hidrólisis ocurre aleatoriamente generando una gran cantidad de monómeros de D-glucosamina a medida que el tiempo de reacción aumenta. La hidrólisis mediante ácido clorhídrico concentrado ha sido modificada trabajando con una concentración del 35% a

80°C por corto tiempo, y los oligómeros fueron principalmente compuestos por un grado de polimerización (GP) de 1-15.

La reacción del ácido nitroso con quitosano es selectiva, rápida y fácilmente controlada con buena estequiometría, provee de oligoquitosanos con un GP de 9-18 pero es difícil obtener oligómeros con GP por debajo de 10 y los productos finales contienen residuos de 2,5-anhidromanosa por desaminación.

Recientemente ha sido publicado un método para preparar oligoquitosano con ácido fosfórico caliente con rendimientos del 10-20% para productos con DP de 6-8 (Mourya e Inamdar, 2008).

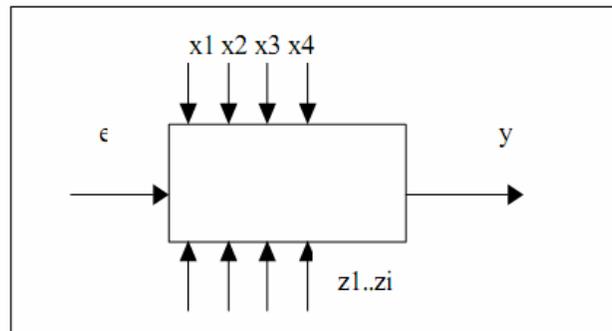
El peróxido de hidrógeno también puede ser usado para despolimerizar el quitosano, la preparación de oligoquitosanos por tratamiento con  $H_2O_2$ , es práctica, de fácil disponibilidad y ecológicamente adecuada.

La despolimerización también puede ser lograda eficientemente con tecnología microondas asistida por la adición de sales bajo condiciones de reacción homogénea que produce quitosanos de bajo peso molecular en corto tiempo. El uso de irradiación por microondas ha recibido un gran interés en las síntesis orgánicas debido a las mejoras de los rangos de algunas reacciones y efectos significantes sobre reacciones convencionales.

Para la degradación del quitosano enzimática se han utilizado más de treinta enzimas, pero aún hay dificultades en lograr un proceso a escala industrial (Shao y Zhong, 2003).

## 1.6. Diseño de experimentos

Se entiende por diseño experimental la realización de una serie de experimentos previamente diseñados donde se varían los valores de las variables de entrada de un proceso o sistema y se miden los valores de la respuesta de salida.



**e:** entrada

**x:** variables trabajadas en el diseño de experimentos.

**z:** variables que intervienen en el proceso pero que se mantienen constantes.

**y:** respuesta de salida que se desea estudiar.

**Figura 1.7: Diseño de experimentos.**

Generalizando, podemos aplicar el diseño de experimentos para:

- Determinar qué variables tienen mayor influencia en los valores de respuesta **y**.
- Determinar el mejor valor de las variables **x** para tener un valor cercano al valor de respuesta deseado.
- Determinar el mejor valor de las variables para que el valor de la respuesta tenga la menor variabilidad.

El diseño experimental es utilizado ampliamente para la mejora de rendimiento de los procesos industriales así como para el desarrollo de nuevos procesos, ahorrando tiempo y costos de desarrollo. Aporta además el conocimiento profundo de los procesos, generando herramientas eficaces de manejo de los mismos.

El diseño estadístico de experimentos es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos, con objeto de producir conclusiones válidas y objetivas.

Se requiere de un enfoque estadístico del diseño de experimentos para obtener conclusiones significativas a partir de los datos. La metodología estadística es el único enfoque objetivo para analizar un problema que involucre datos sujetos a errores experimentales.

A efectos de poder dar un enfoque estadístico al diseño se deberán respetar tres principios básicos en el diseño de experimentos:

- Replicación, o repetición de ensayos
- Aleatorización de experimentos
- Análisis por bloques

La experimentación en sistemas como el descrito en la Figura 1.7 suele perseguir uno de los siguientes objetivos:

- Obtener un conocimiento inicial sobre un nuevo sistema en estudio. ¿En qué valores de los factores se puede centrar la investigación?

- Determinar la influencia de los factores sobre las respuestas observadas. De entre todos los factores que afectan al proceso, ¿cuales influyen más?, ¿cómo interaccionan entre ellos?
- Optimizar respuestas. ¿Qué valores de los factores proporcionan las respuestas de mayor calidad?
- Determinar la robustez del sistema. ¿Cómo afectan a la respuesta variaciones no controladas en el valor de los factores?

La aplicación del diseño de experimentos requiere considerar las siguientes etapas:

1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo.
2. Identificar los factores que potencialmente podrían influir en la función objetivo y los valores que éstos pueden tomar. Entre estos valores se buscará la información necesaria.
3. Establecer una estrategia experimental, llamada plan de experimentación.
4. Efectuar los experimentos con los valores de los factores decididos en el punto para obtener los valores de las respuestas estudiadas.
5. Responder las preguntas planteadas, sea directamente, sea utilizando un modelo matemático. Si es necesario, volver a la etapa 1.

El diseño estadístico de experimentos (DEE) proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente, y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia (Montgomery, 1991).

### **1.7. Actividad antimicrobiana y peso molecular de quitosano.**

En los últimos años la actividad antimicrobiana del quitosano sobre diferentes grupos de microorganismos ha recibido una considerable atención (Rabea y col. 2003). El quitosano muestra su actividad antibacteriana solamente en un medio ácido, el cual es usualmente atribuible a su poca solubilidad a pH altos (Liu y col. 2006; No y col. 2007). Se han reportado actividad antimicrobiana que podría ser efecto de quitosano disuelto en medios ácidos tales como ácido acético, (Devlieghere y col. 2004), ácido láctico (Papineau y col. 1991), ácido glutámico (Roller y Covill, 1999; Sudharshan y col. 1992) y ácido hidroclicóricó (Chung y col. 2003).

La actividad antimicrobiana del quitosano y su dependencia con el peso molecular y grado de desacetilación, fue reportada por Jeon y Kim (2001) y Qin y col. (2003).

El mecanismo por el cual este biopolímero tiene capacidad antimicrobiana no fue elucidado totalmente, la hipótesis más factible es un cambio en la permeabilidad celular, permitiendo interacciones entre el quitosano policatiónico y las cargas electronegativas sobre la superficie celular. Esta interacción conduciría a la salida de electrolitos intracelulares y constituyentes proteínicos.

Los grupos amino catiónicos del quitosano probablemente envuelven a los grupos aniónicos de los microorganismos, resultando en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Otros mecanismos mencionados en la literatura son la interacción de productos hidrolizados difundidos con ADN microbiano, lo cual conduce a la

inhibición del RNA mensajero y a la síntesis de proteínas y la quelación de metales, elementos esporulados y nutrientes esenciales.

Los efectos inhibitorios difieren dependiendo del peso molecular del quitosano, las condiciones de almacenamiento de la solución de quitosano y del desarrollo del experimento.

El quitosano generalmente demostró un efecto bactericida más fuerte para bacterias Gram-positivas que para bacterias Gram-negativas (Jeon y col. 2000).

## 1.8. Microbiología

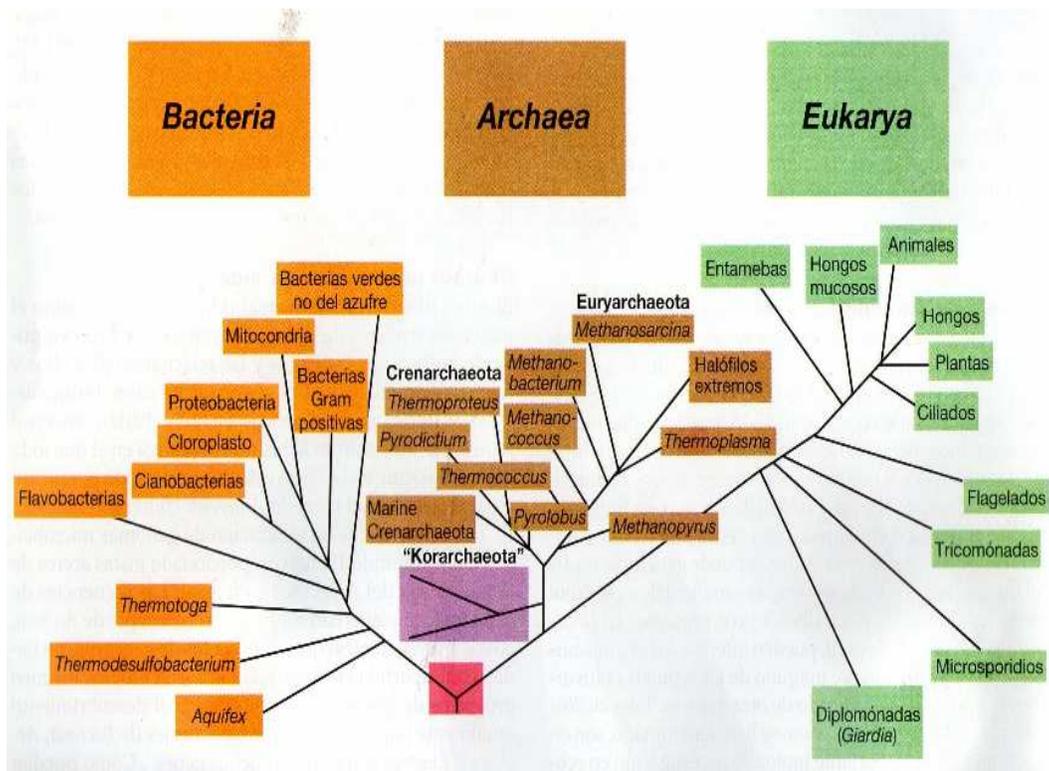
### 1.8.1. El árbol de la vida

Luego de estudios sobre los vínculos evolutivos entre las formas de vida, se han identificado tres líneas celulares filogenéticamente distintas. Estas líneas evolutivas, conocidas como dominios evolutivos son *Bacteria*, *Archea* y *Eukarya*, de las cuales las dos primeras contienen sólo procariontes, mientras que la tercera está compuesta por eucariotes (Figura 1.8).

Dentro de ***Bacteria***, se han descubierto al menos 40 divisiones (llamadas *phyla*). Este dominio contiene una enorme variedad de procariontes. Todos los procariontes causantes de enfermedades (patógenos) pertenecen a *Bacteria*, así como miles de especies no patógenas. La división **Proteobacteria** (*phylum*) es la división más amplia de *Bacteria*. Dentro de las Proteobacterias se encuentran bacterias quimiorganotróficas como *Escherichia coli*, así como varias especies de fototrofos y quimiolitotrofos.

Otros procariontes comunes del suelo y del agua, o especies que viven en o sobre plantas o animales, bien de modo casual u originando enfermedades, también son miembros de las Protobacterias, tal es el caso de *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

La línea de **Bacteria Gram positivas** contiene especies unidas por una filigenia común y una estructura similar de pared celular, aquí encontramos a *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, bacterias del ácido láctico (*Streptococcus* y *Lactobacillus*).

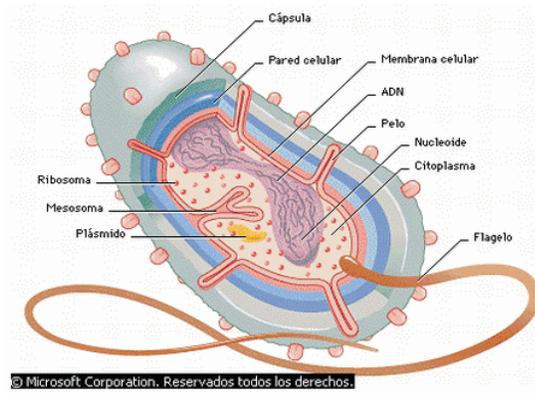


**Figura 1.8: Árbol filogenético universal.**

## 1.8.2. Características generales de las células bacterianas

### 1.8.2.1. Membranas y paredes celulares

Dos de las estructuras celulares más importantes son la membrana celular y la pared celular, cada una de ellas lleva a cabo funciones vitales bien definidas como el transporte de nutrientes (membrana) o la protección frente a la lisis osmótica (pared) (Figura 1.9)



**Figura 1.9: Esquema de una célula bacteriana.**

### 1.8.2.2. Estructura de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es una estructura fina que rodea completamente la célula, es una estructura vital de 8nm de espesor que constituye la barrera que separa el interior de la célula (el citoplasma) del exterior; por lo que si se rompe la membrana, se liberan al medio los componentes que la integran y se produce la muerte celular. La membrana

citoplasmática actúa también como una barrera muy selectiva, permitiendo que en el interior de la célula se concentren determinados metabolitos y se excreten las sustancias de desecho.

### **1.8.2.3. Composición química de las membranas**

La estructura general de la mayoría de las membranas biológicas es una bicapa de fosfolípidos en la que existen proteínas asociadas. Las principales proteínas de membrana poseen una región altamente hidrofóbica que interacciona con las zonas apolares de los ácidos grasos y atraviesan las membranas presentando regiones superficiales tanto en el exterior como en el interior de la célula. La estructura global de la membrana citoplasmática se estabiliza mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Además, algunos cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  también contribuyen a la estabilización de la membrana a través de interacciones iónicas con los grupos polares de carga negativa presentes en los fosfolípidos.

La membrana citoplasmática es bastante fluida, pues los fosfolípidos y las proteínas, presentan una considerable libertad de movimiento dentro de la misma.

### **1.8.2.4. Función de la membrana citoplasmática**

La membrana citoplasmática lleva a cabo funciones celulares tales como la de barrera a la permeabilidad, evitando la pérdida pasiva de componentes

del citoplasma y la entrada indiscriminada de constituyentes. Además es el lugar donde se asientan una diversidad de proteínas, muchas de las cuales son enzimas o están implicadas en el transporte de sustancias hacia el interior y hacia el exterior de la célula y donde se produce la energía de la misma (ATP).

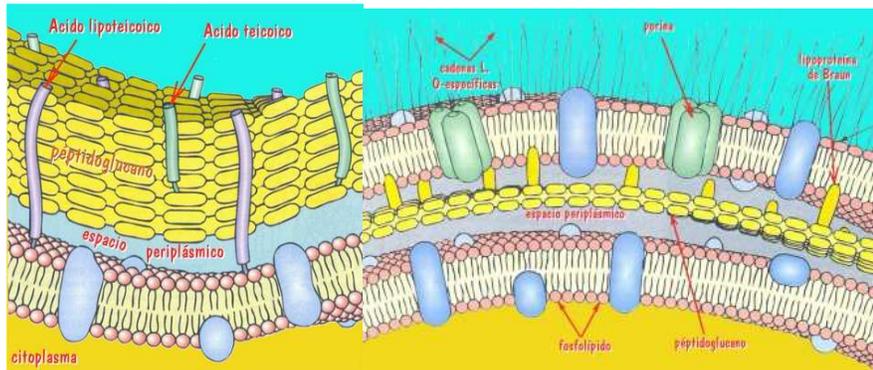
Aunque algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas pueden atravesar la membrana por difusión, las moléculas hidrofílicas y cargadas no la atraviesan y deben ser transportadas de modo específico, a través de proteínas de transporte. Incluso, una sustancia tan pequeña como el ion de hidrógeno ( $H^+$ ) no es capaz de pasar la membrana citoplasmática por difusión, sí lo hace el agua, aunque el transporte de la misma es acelerado mediante proteínas de transporte (aquaporinas). Muchas proteínas transportadoras reaccionan solamente con un tipo único de molécula, mientras que otras muestran distintas afinidades para una clase química determinada de moléculas.

#### **1.8.2.5. Pared celular de procariontas**

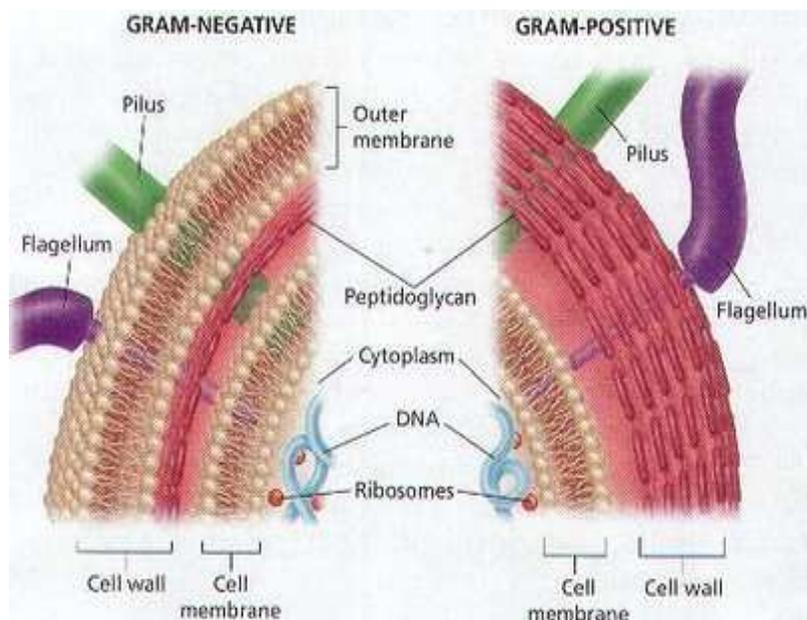
Debido a la concentración de solutos disueltos dentro de una célula bacteriana se desarrolla una considerable presión de turgencia, para resistir esta presión, las bacterias poseen paredes celulares, que además son las responsables de la forma y rigidez de la célula.

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos: las **Gram positivas** y las **Gram negativas**. La distinción inicial entre estos dos tipos se llevó a cabo mediante una tinción diferencial denominada tinción de Gram que se basa en

las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares (Figuras 1.10 y 1.11).



**Figura 1.10:** Izquierda: esquema de la pared celular de una bacteria Gram positiva. Derecha: esquema de la pared celular de una bacteria Gram negativa.



**Figura 1.11:** Esquema comparativo entre bacterias Gram positiva y Gram negativa.

En las Gram negativas la pared celular está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared en las Gram positivas está formada fundamentalmente por un solo tipo de moléculas y suele ser más ancha.

En la pared celular de *Bacteria* hay una capa rígida que es la responsable de la resistencia de la pared celular. En *Bacteria* Gram negativas existen capas adicionales que se sitúan en el exterior de ésta. La capa rígida tiene una composición química muy similar tanto en *Bacteria* Gram positivas como en Gram negativas. Se denomina capa de peptidoglicano (o mureína) y está formada por finas láminas compuestas de dos derivados de azúcares, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, además de un pequeño grupo de aminoácidos. Los azúcares se conectan entre sí por puentes peptídicos a través de los aminoácidos. Los enlaces glicosídicos que unen los azúcares en las cadenas son muy fuertes, pero cuando las cadenas se entrecruzan mediante puentes peptídicos es cuando se logra la rigidez característica de la pared.

En *Bacteria* Gram positivas, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared (también suelen estar presentes ácidos teicoicos, en pequeñas cantidades), pero en *Bacteria* Gram negativas, el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de pared, estando constituido el resto por una membrana externa.

Muchas *Bacteria* Gram positivas presentan polisacáridos ácidos embebidos en su pared denominados ácidos teicoicos. Debido a su carga negativa, los ácidos teicoicos son, en parte, responsables de la carga negativa

neta de la superficie de las células y puede intervenir en el paso de iones a través de la pared celular.

Además del peptidoglicano, las *Bacteria* Gram negativas poseen en su pared una capa adicional que está compuesta de lipopolisacáridos. Esta capa representa una segunda bicapa lipídica formada además por fosfolípidos, carbohidratos y proteínas. Esta membrana externa se denomina capa de lipopolisacárido o simplemente LPS.

La estructura del LPS, consta de dos porciones: el núcleo del lipopolisacárido y el polisacárido O, en el cual se encuentra una parte lipídica conocida como lípido A. Aunque la principal función de la membrana externa (LPS) es estructural, una propiedad biológica importante es que es tóxica para los animales. Entre las *Bacteria* Gram negativas que son patógenas para el hombre y otros mamíferos se encuentran especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*.

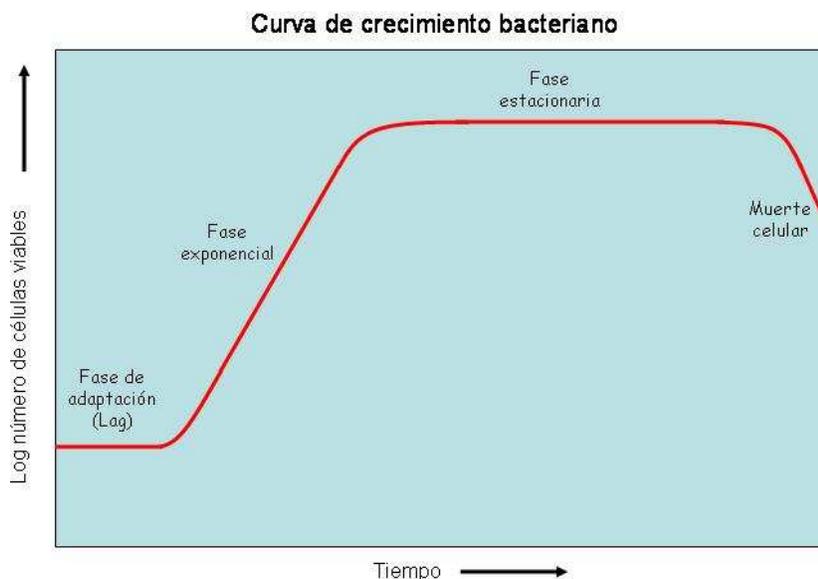
Algunos síntomas que provocan estos patógenos en sus hospedadores se deben al efecto tóxico de la membrana externa, por lo que, las propiedades tóxicas se asocian con parte del lipopolisacárido de estos organismos, en particular con el lípido A.

### **1.8.3. Crecimiento microbiano y alteración de los alimentos**

Los microorganismos son ubicuos en nuestro ambiente, pudiéndose encontrar en el agua, aire y especialmente en los alimentos, en donde son

capaces de colonizar y crecer, con lo cual se produce una reducción en la calidad y como consecuencia en la disponibilidad de los mismos.

El crecimiento bacteriano en los alimentos sigue el patrón estándar del crecimiento bacteriano Figura 1.12.



**Figura 1.12: Curva de crecimiento bacteriano.**

La fase de latencia puede ser de duración variable, dependiendo del organismo contaminante y su historia de crecimiento previa. La tasa de crecimiento durante la fase exponencial depende de la temperatura, el valor nutritivo del alimento y otras condiciones de crecimiento. El tiempo requerido para que la densidad de población de la bacteria alcance un nivel significativo en un determinado producto alimenticio depende del inóculo inicial y de la tasa de crecimiento durante la fase exponencial. Los efectos de la alteración del alimento son sólo observables cuando la densidad de población del microorganismo alcanza un nivel sustancial. Incluso durante gran parte del crecimiento exponencial la densidad de la población es tan baja que no se observa efecto alguno. Solamente en los últimos momentos de esta fase se

observa la alteración. Así, durante la mayor parte del crecimiento microbiano sobre los alimentos no se detecta fácilmente ningún cambio en la calidad de los mismos.

Los alimentos, principalmente los frescos, son alterados por una amplia variedad de bacterias y hongos, cada tipo de alimento es colonizado típicamente por un microorganismo en particular o grupo de microorganismos (Tabla 1.1). Debido a que las propiedades químicas de los alimentos son muy variables, estos son colonizados por aquellos microorganismos que son mejores a la hora de aprovechar los nutrientes disponibles.

<b>TABLA 1.1 Alteración microbiana de los alimentos frescos</b>		
<b>Alimento</b>	<b>Tipo de microorganismo</b>	<b>Género del organismo que causa la alteración</b>
Frutas y verduras	Bacterias	<i>Erwinia</i> , <b><i>Pseudomonas</i></b> , <b><i>Corynebacterium</i></b> (principalmente patógenos vegetales, raramente en frutas)
	Hongos	<i>Aspergillus</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Geotrichium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Phytophthora</i> , varias levaduras
Carne fresca, aves y mariscos	Bacterias	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <b><i>Pseudomonas</i></b> , <i>Micrococcus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <b><i>Proteus</i></b> , <b><i>Salmonella</i></b> , <b><i>Escherichia</i></b> , <b><i>Campylobacter</i></b> , <b><i>Listeria</i></b>
	Hongos	<i>Cladosporium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Geotrichium</i> , <b><i>Sporotrichium</i></b> , <b><i>Candida</i></b> , <i>Torula</i> , <i>Rhodotorula</i>
Leche	Bacterias	<b><i>Streptococcus</i></b> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <b><i>Pseudomonas</i></b> , <b><i>Proteus</i></b>
Alimentos muy azucarados	Bacterias	<b><i>Clostridium</i></b> , <b><i>Bacillus</i></b> , <i>Flavobacterium</i>
	Hongos	<i>Saccharomyces</i> , <i>Torula</i> , <i>Penicillium</i>

Los organismos citados son los observados más frecuentemente como agentes causantes de la alteración de alimentos frescos o perecederos. Los géneros en negrita contienen posibles microorganismos patógenos para el hombre.

#### 1.8.4. Enfermedades transmitidas por los alimentos

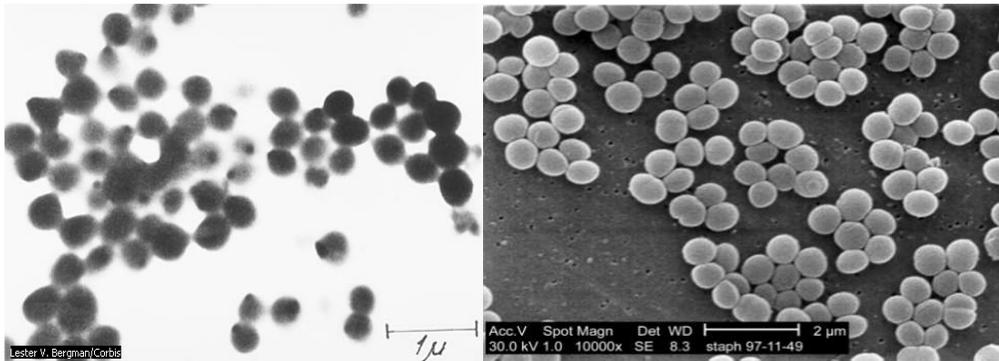
El fallo en la adecuada descontaminación y conservación de los alimentos puede permitir el crecimiento de patógenos, pudiendo éstos causar enfermedades, las cuales se pueden dividir en dos categorías: *intoxicación alimentaria e infección alimentaria*.

**Intoxicación alimentaria:** es la enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen toxinas generadas por microorganismos. Los microorganismos que producen estas toxinas no tienen que crecer en el hospedador y normalmente no están vivos en el momento en que los alimentos contaminados son consumidos. La enfermedad es debida a la ingestión y acción de la toxina activa.

**Infecciones alimentarias:** son infecciones activas resultantes de la ingestión de un alimento contaminado con un patógeno. Además de la ingesta pasiva de toxinas, el alimento puede tener un número suficiente de microorganismos patógenos vivos como para causar infección y enfermedad en el hospedador.

### 1.8.5. *Staphylococcus aureus*

En la Figura 1.13 se puede observar la micrografía del *Staphylococcus aureus*.



**Figura 1.13. Fotografía electrónica de *Staphylococcus aureus*.**

#### 1.8.5.1. Biología y epidemiología

*Staphylococcus aureus* y otros miembros del género son cocos pequeños Gram positivos, pertenecientes a la familia micrococcaceae, de forma esférica, y se agrupan en racimos tridimensionales; todos los *Staphylococcus aureus* productores de enterotoxinas son coagulasa positivos (coagulan el plasma oxalato) y anaerobios facultativos. Toleran muy bien la sal, creciendo en soluciones de cloruro de sodio así como también lo hacen relativamente bien con los nitritos y azúcares disueltos. Son fermentativos y proteolíticos, pero no producen, en general, olores desagradables en los alimentos ni deterioran su aspecto.

Los estafilococos se encuentran en la piel y en el tracto respiratorio de prácticamente todos los humanos y son a menudo patógenos oportunistas. Su origen son las lesiones de la piel (acné, forúnculos, heridas infectadas, etc.).

Se asocia frecuentemente con intoxicaciones alimentarias porque, mientras crece, produce diferentes enterotoxinas proteicas termoestables que difieren en su toxicidad.

Las enterotoxinas son liberadas en el medio colindante o en los alimentos; si el alimento que contiene la toxina es ingerido, aparecen en un plazo de 1 a 6 horas gastroenteritis caracterizadas por náuseas, vómitos y diarrea.

Los alimentos más comúnmente involucrados son pasteles rellenos de crema, aves, carne y productos cárnicos, huevos y ensaladas de carne, condimentos de ensaladas.

Si estos alimentos se mantienen refrigerados después de su preparación, generalmente se mantienen saludables, ya que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a bajas temperaturas se reduce notablemente.

#### **1.8.5.2. Patogénesis**

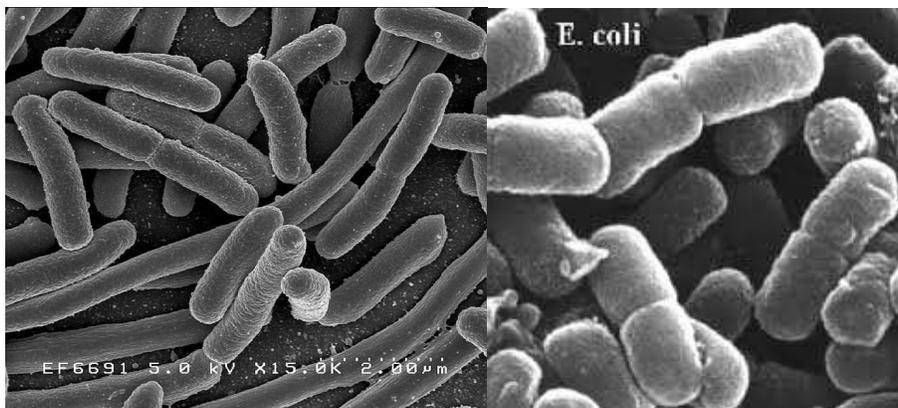
*Staphylococcus aureus* produce 7 enterotoxinas diferentes: A, B, C1, C2, C3, D y E. La enterotoxina A es la más frecuentemente relacionada con la intoxicación por estafilococos.

### 1.8.5.3. Prevención

La intoxicación alimentaria por *S. aureus* puede ser severa, pero es autolimitada, ya que habitualmente se resuelve en 48 horas. La intoxicación puede ser prevenida mediante cuidadosas medidas sanitarias y de higiene, tanto en la producción y en la preparación como en el almacenamiento de los alimentos, que debe ser a bajas temperaturas para inhibir el crecimiento bacteriano. Los alimentos susceptibles de la colonización por *S. aureus* que hayan sido mantenidos varias horas a temperaturas superiores a 4°C (temperatura de refrigeración) deben ser descartados del consumo.

### 1.8.6. *Escherichia coli*

En la Figura 1.14 se puede observar la micrografía del *Escherichia coli*.



**Figura 1.14. Fotografía electrónica de *Escherichia coli*.**

Diferentes cepas de *Escherichia coli* son patógenas potenciales transmitidas por los alimentos. Todas las cepas patógenas actúan primero en el

intestino y muchas se caracterizan por su capacidad para producir potentes enterotoxinas.

#### **1.8.6.1. Biología, epidemiología y patogénesis**

*Escherichia coli* es un habitante comensal en el intestino de los animales. Son bacterias pequeñas, alargadas (bacilos), Gram negativas y clasificadas dentro de las bacterias entéricas. Existen alrededor de 200 cepas patógenas conocidas de *E. coli* que pueden causar enfermedades diarreicas y del tracto urinario, que pueden poner en peligro la vida del paciente.

Las cepas patógenas se dividen en varias categorías, basándose primero en la toxina que producen y luego en la enfermedad que causan.

Muchas cepas de *E. coli* producen enterotoxinas termolábiles (LT) y/o termoestables (ST), que actúan en el intestino delgado. A estas cepas se las denomina “enterotoxigénicas” (ETEC). Las toxinas LT, junto con un factor que permite que el microorganismo se adhiera al epitelio intestinal, activan la adenilciclase, lo que es causa de un aumento de los niveles de AMP cíclico. Este compuesto altera la función celular del epitelio, causando la secreción activa de agua y electrolitos a la luz intestinal. Las enterotoxinas ST probablemente actúan del mismo modo, activando la guanilciclase y aumentando los niveles de GMP cíclico.

Las cepas ETEC, son las causantes de la denominada “diarrea del viajero”, la cual es una infección entérica muy común que causa diarrea en

viajeros, en países en desarrollo. En estudios realizados en ciudadanos de los Estados Unidos que viajaban a México, la proporción de infectados por estas cepas supera el 50%.

Otro grupo de cepas de *E. coli*, llamadas “enteroinvasivas” (EIEC) produce una enfermedad más grave, a menudo con diarrea sanguinolenta. Estas cepas son citopatógenas: invaden la mucosa intestinal del colon y producen la muerte de las células epiteliales.

Las cepas que integran el tipo o grupo “enterohemorrágico” (EHEC), son la causa de colitis hemorrágica: diarrea sanguinolenta y espasmos abdominales con apenas fiebre, pero a menudo caracterizada por el síndrome urémico hemolítico y por púrpura trombocitopénica. El serotipo predominante es el O157:H7 y las toxinas implicadas se denominan verotoxinas. Después de la ingestión de comida o agua que contenga la cepa particular de EHEC, *E. coli*, el organismo crece en el intestino delgado produciendo la verotoxina, la cual produce diarrea hemorrágica y fallo renal. *E. coli* O157:H7 causa al menos 60000 infecciones y 50 muertes cada año como enfermedad transmitida por los alimentos, y es la causa más importante de fallo renal en niños. La causa más común de esta infección es la ingestión de carne sin cocinar o poco cocinada, particularmente carne picada. La cepa de *E. coli* se origina de las carcasas de los animales sacrificados; dado que *E. coli* O157:H7 crece en el intestino y se encuentra en el material fecal, es también una fuente potencial de enfermedad transmitida por el agua.

El grupo de cepas denominadas “enteropatógenas (EPEC) provoca diarreas al adherirse o fijarse al epitelio intestinal y destruir las

microvellosidades, efecto denominado de adherencia y esfacelación o desprendimiento. Esta cepa causa diarrea en niños y bebés, pero no produce enfermedades invasivas o toxinas.

Existe otro grupo llamado “enteroagregativo” (EAEC) el cual produce una o más enterotoxinas; además contiene un factor fimbria 1 de adherencia agregativa. Es prevalente en países en desarrollo y causa más frecuente de diarrea persistente (más de 14 días) en lactantes, pudiendo interferir en su crecimiento. Genera diarrea acuosa sanguinolenta con moco y ocasionalmente fiebre. El período de incubación es de 20-40 h.

#### **1.8.6.2. Prevención**

En general un manejo apropiado de los alimentos, la purificación del agua y los hábitos higiénicos pueden prevenir las infecciones por cepas patógenas de *E. coli*. La diarrea del viajero puede ser prevenida evitándose las fuentes locales de agua y los alimentos frescos, así como también la cepa enteropatógena O157:H7 puede prevenirse cocinando bien la carne.

### **1.9. Películas de quitosano**

El crecimiento de la población mundial es exponencial y para satisfacer sus necesidades se ha incrementado el desarrollo y extendido el uso de una gran diversidad de materiales en la producción, conservación y comercialización de alimentos. Actualmente muchos esfuerzos están orientados hacia la investigación y desarrollo de diferentes metodologías y materiales debido a la demanda de productos cada vez más seguros, que conserven su característica nutritiva, con mayor vida útil y alta calidad sensorial.

En los últimos 50 años ha habido un aumento gradual del uso de materiales poliméricos provenientes de la industria petroquímica ya que los mismos permiten obtener materiales flexibles con características distintivas. A pesar de que la mayoría de los polímeros sintéticos derivados del petróleo garantizan la protección deseada en términos de costo, conveniencia, formato, marketing y características físicas, químicas y ópticas, tienen la desventaja de no ser biodegradables, siendo responsables, en gran parte, de los residuos contaminantes que se acumulan en la naturaleza. Además su fabricación requiere un alto costo energético y en general se descartan tras el primer uso, siendo su destrucción muy costosa y contaminante. Por lo tanto ha surgido la necesidad de proponer restricciones ambientales basadas en una verdadera política de control de residuos no degradables con el fin de reducir la cantidad de desechos de envases además de reutilizar los materiales y reciclarlos para producir nuevos insumos.

Esta problemática trajo aparejado el estudio de materiales alternativos, y en especial, surge el concepto de materiales biodegradables asociados al uso de materias primas renovables. Este reemplazo puede reducir el uso de recursos no recuperables y disminuir los desechos ambientales a través del reciclado biológico del sistema.

El interés académico e industrial en el desarrollo de biomateriales a partir de fuentes renovables se ha incrementando en los últimos años debido principalmente a los inconvenientes ambientales ocasionados por los materiales sintéticos y al avance en la legislación vigente en relación a su uso indiscriminado. En la provincia de Buenos Aires, siguiendo una tendencia mundial, se aprobó, en el año 2008, la ley N° 13868 que prohíbe la utilización y entrega de bolsas plásticas en los comercios de la provincia. En este sentido, se han desarrollado numerosas películas y recubrimientos a base de polímeros biodegradables y renovables con diferentes propiedades y funcionalidades específicas tales como celulosa y sus derivados, almidones, gomas, proteínas y quitosano, entre otros (Flores y col. 2010).

Dentro de los materiales que pueden utilizarse se encuentra el quitosano, entre los polisacáridos, este biopolímero tiene propiedades filmogénicas particulares. Existen numerosos trabajos que lo utilizan solo o combinado para la obtención de películas (Coma y col. 2002; Pranoto y col. 2005; Chillo y col. 2008; Pelissari y col. 2011; Pelissari y col. 2012).

Estas películas tienen aplicaciones en agricultura y agroindustrias para recubrimiento de productos naturales especialmente frutas. Esto permite la prolongación del almacenamiento y la posibilidad de transformación en un

recubrimiento activo, permitiendo una liberación controlada de agentes preservantes que inhiben el crecimiento fúngico y por lo tanto manteniendo la apariencia de las frutas por más tiempo. Galed y col. (2004) demostraron que con el empleo de quitosano como recubrimiento, mandarinas Fortune y naranjas Valencia mejoraban su apariencia y la pérdida de peso.

Hay un incremento del interés por el desarrollo de materiales filmogénicos que tengan capacidad antimicrobiana y que aumenten la seguridad de los alimentos y su vida estante. Los recubrimientos antimicrobianos son los sistemas de envases activos más promisorios que se encontraron, con la característica de ser altamente efectivos en inhibir el deterioro producido por el desarrollo de microorganismos que contaminan los alimentos (Salleh y col. 2007).

En este contexto las películas de quitosano son una gran promesa para su aplicación en la preservación de alimentos. Con su uso se podrían evitar alteraciones microbianas que son las responsables de enormes pérdidas de alimentos. Además el incremento en la demanda de alimentos mínimamente procesados, y de productos libres de preservantes favorece el uso de recubrimientos con bajos niveles de compuestos antimicrobianos que estén en contacto con el alimento, siendo el quitosano un componente potencial para estos requerimientos.

Tanto el quitosano como los oligoquitosanos tienen múltiples propiedades funcionales y se ha incrementado el interés en ellos debido a la actividad biológica que poseen y su potencial aplicación en la industria de los alimentos y farmacéutica. Principalmente han llamado considerablemente la atención por la actividad antimicrobiana. Hay numerosos estudios de la

actividad antimicrobiana del quitosano y de sus derivados los oligoquitosanos confirmando su acción sobre bacterias, hongos y levaduras (Zheng y Zhu, 2003; Kim y Rajapakse, 2005; Zhao y Xia 2006, Du y col. 2009; Xia y col. 2011).

No y col. (2002) estudiaron la actividad de seis quitosanos y seis oligómeros contra cuatro bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, y *Vibrio parahaemolyticus*) y siete gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus bulgaricus*) encontrando que los efectos difieren con el peso molecular y con las especies bacterianas. Zheng y Zhu (2003) estudiaron el efecto de quitosanos de diferente peso molecular frente a *E. coli* y *S. aureus* y encontraron que en caso de PM por debajo de 300kDa el efecto contra *S. aureus* se potenciaba, sucediendo lo contrario en caso de *E. Coli*. Hay varios factores intrínsecos y extrínsecos que afectan la capacidad antimicrobiana del quitosano. Se ha demostrado que a menor peso molecular (menor de 10 kDa) mayor es la actividad antimicrobiana (Dutta y col. 2009).

Por todos los trabajos que lo reportan, se puede inferir que el quitosano y los oligoquitosanos tienen una importante capacidad antimicrobiana y que son seguros para el consumo humano, lo que permitiría un potencial importante para el desarrollo de recubrimientos de alimentos naturales, así como su aplicación como películas biodegradable en productos alimenticios.

# **OBJETIVOS**

El objetivo general de esta Tesis es la obtención de derivados de quitosano de mayor solubilidad y su empleo en distintas aplicaciones.

Los objetivos específicos son:

- Utilización de la degradación oxidativa en microondas como método de obtención de derivados más solubles y optimización de sus variables operativas.
- Caracterización fisicoquímica de los compuestos obtenidos.
- Estudio de la capacidad antimicrobiana de los oligoquitosanos obtenidos en soluciones acuosas.
- Incorporación de los oligoquitosanos obtenidos en la formulación de películas a base de quitosano.
- Caracterización de las películas obtenidas: propiedades estructurales, ópticas, mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua de las películas obtenidas.
- Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas de quitosano/oligoquitosano.

# **MATERIALES Y METODOS**

## 2. Diseño estadístico aplicado a los factores en estudio

Se utilizó un diseño donde se varían 3 factores, con 3 niveles de modificación.

Los factores a modificar fueron:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....10%; 12,5%; 15%

Volumen Etanol.....90,0 mL, 150,0 mL, 210,0 mL

Tiempo de reposo.....15 min.; 30 min.; 60 min

Para analizar el efecto de los factores A: Tiempo de reposo, B: Volumen de etanol y C: concentración de Agua Oxigenada, (cada uno de ellos a tres niveles) se utilizó el Diseño de Experimentos, Método de Taguchi, se utiliza un Arreglo Ortogonal L9, 9 ensayos con tres réplicas para cada uno de ellos.

### 2.1. Preparación de oligoquitosano para el diseño experimental

Se colocaron 2 g de quitosano en un vaso de precipitado con 50 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con diferentes concentraciones (10%; 12,5%; 15%), se dejó reposar tapado durante 20 min. Se colocó la mezcla en un horno microondas giratorio donde fue irradiado a 700W de potencia durante 4 min. Se lo dejó enfriar 30 min a temperatura ambiente y se filtró a través de un filtro Buchner bajo presión reducida. El filtrado fue recogido y se le agregaron distintos volúmenes (90,0 mL, 150,0 mL, 210,0 mL) de etanol 98% para precipitar los oligoquitosanos. Luego de un tiempo de reposo (15 min; 30 min; 60 min) se lo filtró a presión reducida, el precipitado fue lavado con etanol hasta reacción negativa con KMnO<sub>4</sub> (0,02 M).

Los oligoquitosanos obtenidos se disolvieron en agua destilada, se liofilizaron y se pesaron.

## **2.2. Preparación de oligoquitosano para las pruebas microbiológicas y para las películas**

Se siguió el procedimiento detallado en **2.1** con las consideraciones establecidas con el diseño experimental ( $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5%; 150,0 mL etanol 98% y 15 min reposo).

## **2.3. Caracterización de quitosano y oligoquitosano**

### **2.3.1. Determinación del peso molecular**

El valor promedio del peso molecular ( $\overline{M}_n$ ) de los oligoquitosanos fue determinado por el método de análisis del grupo terminal.

*Reactivo de color:* 0,5 g de ferricianuro de potasio fueron pesados y disueltos en una solución (1L) de carbonato de sodio 0,5M, manteniendo la solución en una botella color caramelo.

*Solución estándar:* se pesó 1g de D-glucosamina hidrociorada (GAH) y se llevó a 100 mL.

*Curva de calibrado:* Se mezclaron diferentes volúmenes de solución estándar (0,2; 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 mL) con 2,0 mL de reactivo de color y se colocaron en tubos cerrados de 10 mL. El volumen final se llevó a 5 mL agregando agua destilada. Los tubos fueron colocados en un baño de agua

hirviendo durante 15 min, se enfriaron en agua hasta temperatura ambiente. Luego se determinó la absorbancia, espectrofotométricamente a una longitud de onda de 420 nm, utilizando un blanco de agua destilada. Se obtuvo la ecuación de regresión (A vs g GAH).

En tubo cerrado se colocó 3 mL de solución al 0,2% de oligoquitosano, se le agregó 2,0 mL de reactivo de color, se colocaron en baño María durante 15 min, se enfriaron en baño de agua y se determinó la absorbancia a 420 nm. La cantidad de GAH de cada oligoquitosano se obtuvo por la ecuación de regresión.

El número promedio de peso molecular ( $\overline{M}_n$ ) fue calculado por la siguiente ecuación:

$$\overline{M}_n = \frac{W_1}{W_2} \times 215,5$$

donde  $W_1$  es el peso de oligoquitosano (g);  $W_2$  es la cantidad de GAH obtenida con la ecuación de regresión (Shao y col. 2003).

### **2.3.2. Peso molecular por viscometría**

Se midió a partir de una solución al 0,1% (p/v) en solvente Roberts 0,1M AcH/0,2M NaCl (Roberts y Domszy, 1982) empleando un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde acoplado a un aparato de medición ViscoClock (Schott-Garäte, Germany) en un baño termostatzado a temperatura constante de 25°C. Se utilizó un capilar modelo N° 525.20/II de 1,03 mm de diámetro. Se procedió midiendo la viscosidad cinemática (tiempo de caída de la solución polimérica) y

calculando la viscosidad intrínseca según Wang y col. (1991) y Arguelles y col. (2004). El peso molecular viscoso promedio, se calculó con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. Los valores de las constantes para las soluciones de quitosano en el solvente 0,1M AcH/0,2M NaCl en esta ecuación son  $\alpha = 0,93$  y  $Km = 1,81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$  (Roberts y Domszy, 1982).

$$[\eta] = Km \times M \nu^{\alpha}$$

### **2.3.3. Determinación de solubilidad de oligoquitosanos**

#### **2.3.3.1. Solubilidad de los oligoquitosanos obtenidos con el diseño de experimento**

Se mezclaron 0,05 g de oligoquitosano con 5,0 mL de agua destilada, se agitó durante 5 h y luego se filtró a través de un filtro de papel (0,45  $\mu\text{m}$ ) previamente tarado. Se secó el papel en desecador, a temperatura ambiente hasta peso constante.

#### **2.3.3.2. Solubilidad de los oligoquitosanos a distintas temperaturas**

Se determinó la solubilidad de los oligoquitosanos a temperatura ambiente, 40°C, 60°C, y 100°C, para tres concentraciones: 1%, 0,5% y 0,1 %. Se mezclaron 0,5 g en 50 mL de agua destilada (1%); 0,25 g en 50 mL de agua destilada (0,5%); y 0,1 g en 100 mL de agua destilada (0,10%). Se dejaron durante media hora para favorecer el hinchamiento o “swelling”. Posteriormente se agitaron durante una hora y media a la temperatura correspondiente. Luego

se filtraron utilizando filtros de papel (previamente secados en desecador hasta peso contante y tarados ( $P_1$ ) y los filtros se dejaron nuevamente secar en desecador hasta peso constante ( $P_2$ ).

$$\% \text{ oligo sin disolver} = \frac{P_2 - P_1}{c} \times 100$$

$P_1$  = peso filtros

$P_2$  = peso filtros luego de el filtrado de las disoluciones

$C$  = peso de la muestra

*Solubilidad = 100 - % de oligoqitosano sin disolver*

#### **2.3.4. Determinación de cenizas**

Se realizó por calcinación en crisoles que, previamente, se secaron colocándolos durante media hora en mechero y luego se enfriaron en desecador y se tararon ( $P_1$ ).

Se pesaron aproximadamente 0,5 g de quitosano y de oligoqitosanos. Se calcinaron las muestras sobre mechero y luego en mufla a 800°C hasta cenizas blancas de peso constante. La determinación se realizó por triplicado.

$$\text{Cenizas}\% = \frac{(a - b) \times 100}{c}$$

donde:

$a$ : peso del crisol junto con la muestra calcinada

$b$ : peso del crisol vacio

c: peso de la muestra

Los resultados se expresan en base seca.

### 2.3.5. Determinación de humedad

Se determinó por secado de la muestra (0,3 g) en estufa de vacío a 105°C y  $6,66 \times 10^2$  Pa, hasta peso constante.

La determinación se realizó por triplicado.

El contenido de humedad se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{(P_2 - P_3) \times 100}{P_2 - P_1}$$

donde:

P1: peso del pesafiltro vacío

P2: peso pesafiltro con muestra

P3: peso pesafiltro con la muestra después del secado

### 2.3.6. Determinación del grado de desacetilación

Las muestras de quitosano y oligoquitosano (0,15 y 0,30 g) previamente homogeneizadas se colocaron en un balón. Se agregaron 50 mL de agua destilada y 50 mL de ácido ortofosfórico al 85% (m/m). Se conectó el balón a un equipo de destilación. Se recogió el destilado hasta que la temperatura de la solución alcanzó los 160°C. Se tituló el destilado obtenido con NaOH 0,1000 M en presencia de fenolftaleína.

Paralelamente se procesó el blanco de reactivos.

El grado de desacetilación (X1) se calculó de la siguiente manera:

$$X1 = \frac{1,61}{m - 0,0042 V}$$

donde:

V: diferencia entre los mL de NaOH gastados en la titulación de la muestra y los mL de NaOH gastados en la titulación del blanco.

m: masa en gramos de la muestra (peso corregido con el contenido de cenizas y humedad).

1,61: coeficiente que refleja el PM de N-acetil-D-glucosamina.

0,0042: coeficiente que tiene en cuenta el contenido de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina en el polímero quitosano.

El grado de acetilación (X2) se calcula con:

$$X2 = 100 - X1$$

Se consideró como resultado el promedio de tres determinaciones.

### **2.3.7. Determinación de viscosidad**

Se prepararon soluciones al 1% de quitosano en ácido acético al 1% (v/v) y se agitó hasta completa disolución del quitosano. Se prepararon soluciones de oligoquitosano al 1% en agua destilada. Se agitaron durante 4 horas. Se midió la viscosidad de las soluciones en viscosímetro BROOKFIELD a 50 rpm y 25°C de temperatura, con spindle 21.

### **2.3.8. Espectrometría de difracción de rayos X**

Para la determinación las muestras fueron previamente procesadas en mortero. Los datos fueron obtenidos usando un difractómetro Rigaku D/Max-III C (Cu K $\alpha$ ) irradiando a 35 kv-15 ma.

### **2.3.9. Espectroscopía FTIR**

Para la determinación las muestras fueron previamente procesadas en mortero. Los espectros infrarrojos fueron obtenidos como una dispersión sólido en sólido conteniendo 2 mg de muestra anhidra en 200 mg de KBr, mediante una copa para micromuestras de un accesorio de reflectancia difusa (Avatar) con capacidad para 250 mg y 1 cm de diámetro.

El registro se hizo utilizando KBr como background, con un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) marca Nicolet modelo 470, con un total de 64 escanes y un rango de barrido entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ .

## **2.4. Materiales para el estudio microbiológico**

- Caldo nutritivo. Componentes: extracto de carne 0,1% (m/v), extracto de levadura 0,2% (m/v), peptona 0,5% (m/v), NaCl 0,5% (m/v), pH: 7,2

- Medio de cultivo PCA (Agar Plate Count). Componentes: peptona de caseína 5 g, extracto de levadura 2,5 g, D(+) glucosa 1,0 g, Agar-agar 14,0 g, agua destilada 1L, pH 7,0±0,1.
- Solución fisiológica: NaCl 0,9%
- Solución de ácido acético 1%
- Solución de Quitosano: 1% (en ácido acético)
- Solución de Oligoquitosano: 1% (en agua)
- Solución de mezcla de Quitosano (50%)/Oligoquitosano (50%): 1% (en ácido acético)

#### **2.4.1. Preparación de las soluciones de quitosano/oligoquitosano para el ensayo microbiológico**

La solución madre de quitosano se preparó al 1% en ácido acético (1%); el oligoquitosano al 1% en agua destilada; y una solución mezcla de quitosano 0,5% y oligoquitosano 0,5% en ácido acético al 1%.

Las soluciones se dejaron agitando durante 24 horas a temperatura ambiente. Se filtraron en Büchner con filtro de tela, secado en estufa a 65°C, 48 horas y tarados. Los filtros fueron secados en las mismas condiciones y tarados nuevamente.

Se calculó la concentración real de las diferentes soluciones preparadas de quitosano, oligoquitosano y mezclas.

### **2.4.2. Esterilización del material**

Los medios de cultivo, las soluciones madre y de trabajo, la solución fisiológica y el material empleado en los ensayos microbiológicos, fueron esterilizados en autoclave de Chamberland a 1 atm durante 20 minutos.

### **2.4.3. Microorganismos de ensayo**

Para los ensayos de actividad microbiana se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y una cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 25922).

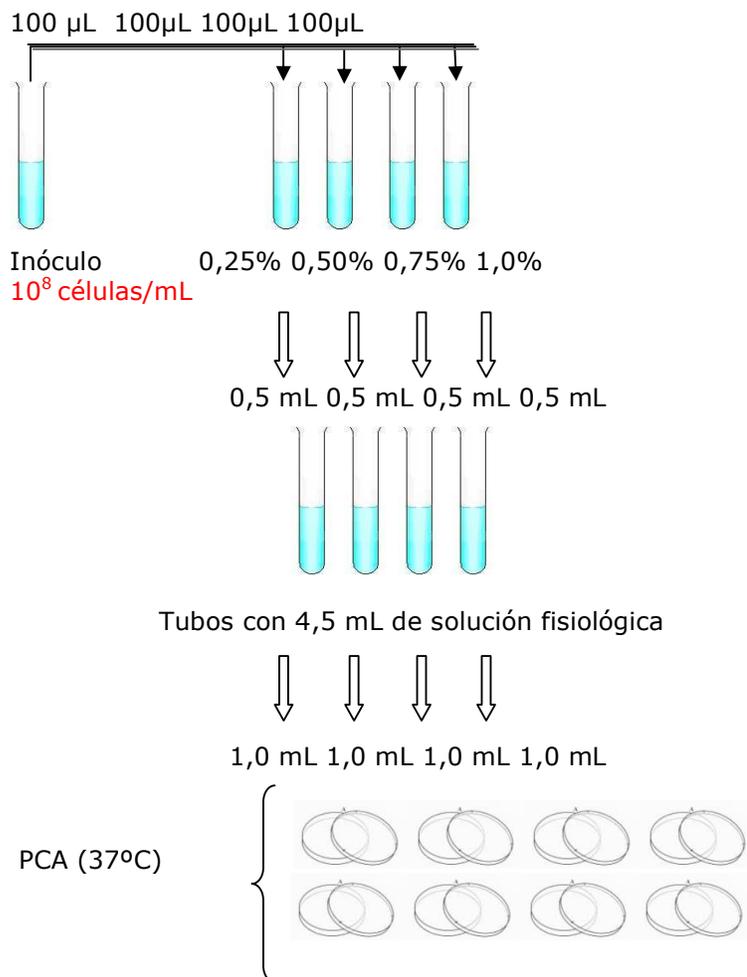
### **2.4.4. Ensayos de actividad bactericida**

A partir de las soluciones de ensayo, se prepararon disoluciones con solución fisiológica. Las concentraciones de trabajo fueron 0,25%; 0,50%; 0,75% y 1,00%. Además, se prepararon tubos con diluciones de ácido acético y blancos de solución fisiológica.

Cada tubo fue inoculado con 100  $\mu$ L de una suspensión bacteriana, correspondiente a 108 UFC/mL, obtenida de un cultivo en caldo nutritivo a 37°C de 24 horas de *E. coli* y 48 horas de *S. aureus*. El tiempo de contacto fue de 2 horas (el cual se comenzó a contar desde la siembra del primer tubo). Durante la experiencia se agitaron los tubos en vórtex cada 20 minutos.

Finalizado el tiempo de contacto, de cada uno de los tubos se realizó una dilución 10-1 en solución fisiológica (500  $\mu$ L de la solución diluida en 4.5

mL de solución fisiológica). De cada una de las diluciones se sembró 1mL en PCA por la técnica de agar volcado. Las cajas se incubaron a 37°C durante 72 horas. Los resultados se expresaron como log UFC/mL. En la figura 2.1 se muestra el esquema del ensayo. Cada experiencia se realizó por duplicado.



**Figura 2.1 Esquema de trabajo capacidad antimicrobiana.**

## **2.5. Películas de quitosano/oligoquitosanos**

### **2.5.1. Obtención de películas**

Se prepararon películas al 0,25% de quitosano y 0,10% de ácido acético, con el agregado de tres concentraciones distintas de oligoquitosanos (0,10%, 0,25%, y 0,50%); de acuerdo al siguiente procedimiento:

Solución 1: Se colocaron 0,350 g de quitosano en 20 mL de agua destilada, se agitaron durante media hora para favorecer el “swelling”. Se le agregaron 0,14 mL de ácido acético y 30 mL de agua destilada y se lo dejó en agitación durante 24 h.

Solución 2: se colocaron 0,140, 0,350 g y 0,700 g de oligoquitosanos en 40 mL de agua destilada y se los dejó agitando durante 24 h. Por último se mezclaron ambas soluciones (1 y 2) , arrastrando los oligoquitosanos con 50 mL de agua destilada.

Las películas de las diferentes formulaciones se prepararon cada una con 60 g de solución en platos playos de melamina de 15 cm de diámetro interno y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **2.5.2. Caracterización de películas de quitosano/oligoquitosanos**

Las películas fueron acondicionadas a 25°C y 60% HR y el espesor medido en diferentes locaciones con empleo de un micrómetro, se informó el resultado promedio de 10 determinaciones.

### **2.5.2.1. Espectroscopía FTIR**

El espectro FTIR se obtuvo usando un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus (United States). Las muestras fueron preparadas mezclando un polvo fino de las diferentes formulaciones con KBr (Sigma Aldrich, 99%) al 3% m/m. Las muestras se presionaron para la obtención de una pastilla transparente. Los espectros son la acumulación de 100 escaneados con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en el rango de  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.5.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La homogeneidad y la apariencia de las películas fueron examinadas visualmente y con SEM con un microscopio electrónico LEO, modelo EVO40, (Japan) se usó un voltaje de aceleración de 7 kV. Las muestras fueron criofracturadas por inmersión en nitrógeno líquido, colocadas en una montura de bronce y cubiertas con una capa de oro ( $\sim 30\text{ \AA}$ ) usando un plasma de "argon plasma metallizer" (sputter coater PELCO 91000).

### **2.5.2.3. Propiedades ópticas**

#### **2.5.2.3.1. Opacidad y barrera al UV**

La opacidad y la barrera al UV fueron determinadas espectrofotométricamente. El espectro de absorbancia entre 200 y 700 nm fue medido en un Espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-Vis (Agilent technologies

Inc., Australia). Las películas fueron cortadas en rectángulos y colocadas en la cara interna de una cubeta de cuarzo. La opacidad (AU nm) fue definida como el área bajo la curva y determinada con un procedimiento de integración de acuerdo con Piermaría y col (2011) y por la norma ASTM D1003-00 (Standard test method for haze and luminous transmittance of transparent plastics recommendations).

#### **2.5.2.3.2. Color**

Las medidas de color se hicieron en un colorímetro Hunterlab UltraScan XE (United States) en el modo de reflectancia. Los parámetros de color L, y b fueron determinados con la escala de Hunter, en 10 lugares diferentes y al azar para cada muestra analizada. Los tres parámetros en el modelo representan la luminosidad de color ( $L^*$ ,  $L^*=0$  rendimientos negro y  $L^*=100$  indica blanco), su posición entre rojo y verde ( $a^*$ , valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul ( $b^*$ , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo). Los estándares considerados fueron  $L = 97.75$ ,  $a = -0.49$ , y  $b = 1.96$ .

#### **2.5.2.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)**

La WVP fue determinado usando el método ASTM E 96-95 a 25°C y 50% HR, en un equipo Mocon Permatran-W modelo 3/33 (Mocon, Minneapolis, MN), sobre muestras de 5 cm<sup>2</sup> con enmascaramiento de

aluminio. El espesor promedio de las muestras se determinó con un micrómetro.

#### **2.5.2.5. Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas fueron medidas en una Instron 3369 universal. Las muestras se ensayaron sobre diez probetas de 13 x 100 mm. El máximo esfuerzo de tensión (MPa), Elongación a la ruptura % y el Módulo elástico (MPa) fueron calculados de acuerdo al Norma ASTM D882-00 (1996).

#### **2.5.2.6. Capacidad antimicrobiana de los oligoquitosanos**

La capacidad antimicrobiana fue testeada contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27933, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Los ensayos se hicieron manteniendo condiciones asépticas en un gabinete de flujo laminar (LFC) irradiado previamente con luz ultravioleta durante 20 minutos.

##### **2.5.2.6.1. Preparación de los inóculos**

Inóculos bacterianos: los medios líquidos cultivados durante toda la noche se diluyeron en solución fisiológica en el rango de  $10^5$  -  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, previamente estandarizados usando la escala McFarland.

Los inóculos de las muestras de hongos se introdujeron en tubos inclinados con agar de papa-dextrosa (PDA, Merck, Darmsdat, Germany) y se incubaron

durante 5 días a 37°C. Se le agregaron 10 mL de solución fisiológica estéril y se agitaron durante 5 minutos. Se cosecharon las esporas y se diluyeron en solución fisiológica usando la escala de McFarland.

#### **2.5.2.6.2. Ensayos antimicrobianos**

La capacidad antimicrobiana se evaluó con el ensayo de la zona de inhibición de los discos de las películas (Rojas-Graü y col., 2006). Las películas fueron cortadas asépticamente en discos de 15 mm y colocadas en las cajas de Petri conteniendo, para bacterias, agar Mueller Hinton (MHA, Merck, Darmsdat, Germany) y con PDA para hongos. Los platos, previamente pulverizados con 0,1 mL de los inóculos, se incubaron a 37°C por 24 h para las bacterias y 5 días para los hongos. Se examinaron visualmente las zonas de inhibición alrededor de los discos y el crecimiento debajo de los mismos (área de contacto con la superficie del agar). Los estudios se realizaron por triplicado para cada formulación.

#### **2.5.3. Análisis estadísticos**

Para caracterizar las películas en estudio se utilizó un diseño experimental al azar. Para comparar las medias de las diferencias se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher llevado a cabo en un nivel de significación de  $p = 0,05$ .

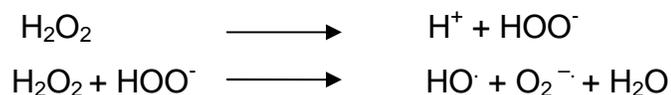
# **RESULTADOS Y DISCUSION**

### 3. Degradación oxidativa del quitosano

Las modificaciones químicas del quitosano son de gran interés debido a que dan lugar a numerosos derivados, la despolimerización es una modificación, que sin producir cambios en la estructura original, permite conservar las propiedades biológicas y fisicoquímicas, obteniéndose derivados de aplicaciones muy diversas (Mourya y Inamdar, 2008).

Para la despolimerización, el quitosano, como polisacárido, es susceptible a algunas técnicas de degradación oxidativa; en este trabajo se utiliza un método de preparación de oligómeros del quitosano por degradación oxidativa con peróxido de hidrógeno en horno de microondas. Las ventajas de utilizar peróxido de hidrógeno para la degradación de quitosano, se deben a que tiene buena disponibilidad, fácil manipulación y características no contaminantes.

El mecanismo de acción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es debido a la formación de radicales hidroxilos reactivos por la disociación del mismo, estos pueden atacar las uniones glicosídicas del quitosano y, como consecuencia, romper la cadena. El mecanismo de oxidación puede explicarse debido a que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es sustancialmente más ácido que el agua, con un pKa de 11,6. El anión peroxidrilo ( $\text{HOO}^-$ ) formado en la disociación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es inestable, lo que justifica la disminución en la estabilidad del peróxido. El anión peroxidrilo reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), altamente reactivos. Ambos son oxidantes fuertes, y atacan la unión glicosídica del quitosano para causar la escisión de la cadena (Huang y col. 2007).



El calentamiento y el medio básico aumentan la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entre las ventajas que tiene el uso de este reactivo encontramos que la reacción no necesita ningún iniciador y que el producto final de la reacción es  $\text{H}_2\text{O}$ . Esto justifica las características no contaminantes que tiene la técnica y a lo que se suma las características de los oligosacáridos que con ella se obtienen.

El principio del calentamiento con microondas dieléctrico ha sido reportado por Galema (1997). El fundamento de uso es que la irradiación con microondas induce a las partículas a migrar o rotar, lo cual resulta en la polarización de partículas polares. El retraso entre esta polarización y las rápidas inversiones del campo del microondas crea una fricción entre las moléculas la cual genera calor. A causa del rápido cambio del estado estático al dinámico que está ocurriendo en las moléculas, el calentamiento por microondas tiene lugar dentro de las mismas, esta es la causa por la cual es descripto como "calentamiento interno".

La irradiación por microondas hace que el ritmo de algunas reacciones orgánicas sea 1240 veces más alto que por los métodos clásicos. El nivel de energía de las microondas coincide con el nivel de energía de rotación de moléculas polares, implicando que ésta pueda ser absorbida rápidamente por los enlaces polares. El resultado final es el intercambio entre la energía de activación y un incremento en la actividad de reacción dentro de uniones polares, como por ejemplo la unión glicosídica (C-O-O), lo que justifica el uso de esta tecnología en la degradación de biopolímeros como el quitosano.

La técnica de degradación se continúa con la precipitación de los oligómeros con alcohol (Figura 3.1), separación por filtración, disolución en agua destilada (Figura 3.2) y liofilización para obtener un producto final estable al pardeamiento.



***Figura 3.1: Aspecto macroscópico de la precipitación con etanol de oligoquitosanos.***



***Figura 3.2: Disolución en agua de oligoquitosano.***

### 3.1. Diseño de experimento

Para la optimización del método de obtención de oligoquitosano se realizaron estudios preliminares en los que se evaluó la influencia del tamaño de partícula del quitosano de origen, el tiempo de contacto con el reactivo oxidante y la forma de recuperación del producto de reacción.

Los resultados experimentales mostraron que el tamaño de partícula del quitosano debe ser menor a 100-mesh. A su vez, el quitosano debe ser sumergido en la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por lo menos 20 min con el objeto de producir su “swelling” o hinchamiento que favorece la posterior disolución (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Quitosano después de 20 min de “swelling”.

Otra de las condiciones estudiadas fue la recuperación de los productos finales debido a que los quitooligómeros obtenidos sufren pardeamiento. Esto es

consecuencia de la alta probabilidad que los grupos carbonilo reaccionen con los grupos amino (reacción de Maillard) lo que limita sus aplicaciones (Zeng y col. 2007, Caiqin y col. 2008). Este deterioro fue controlado a partir de la liofilización de los productos finales de la reacción en lugar de secado al aire a temperatura ambiente, lo que les aportó gran estabilidad sin cambio de color (Figura 3.4).



**Figura 3.4: Oligoquitosanos después de la liofilización.**

Una vez establecidas estas tres condiciones operacionales (tamaño de partícula, tiempo de contacto con el oxidante y recuperación del producto final) se estudiaron las mejores condiciones de obtención de oligómeros por el Método de Taguchi utilizando un Arreglo Ortogonal L9. Fueron seleccionadas tres variables

controlables: concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%; 12,5%; 15%,) volumen del reactivo (etanol 98%) utilizado en la precipitación de los oligómeros (90,0 mL; 150,0 mL; 210,0 mL) y tiempo de reposo para lograr una mejor precipitación (15 min; 30 min; 60 min). La variable respuesta fue el peso de los oligómeros de quitosano obtenidos.

Los estudios experimentales previos realizados en el laboratorio nos permiten concluir que los factores analizados no tienen interacciones entre sí, lo que posibilita utilizar un Arreglo Ortogonal L9, realizándose 9 ensayos con tres réplicas para cada uno de ellos. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el Diseño de Experimentos, Método de Taguchi.

Del análisis de los datos experimentales (Tabla 3.1) se puede observar que los factores volumen de etanol y concentración de agua oxigenada son significativos ( $p < 0.00001$  y  $p < 0.000001$ , respectivamente), tanto para incrementar la respuesta media (peso del derivado obtenido) como para disminuir la variabilidad del proceso (se utilizó el Método de Repeticiones Simples para analizar la Señal-Ruido).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y del análisis de los datos experimentales (Tabla 3.1) se puede concluir que, el mejor nivel para ellos, es decir el que permite lograr el mejor rendimiento en la obtención de oligoquitosanos (hacer máxima la variable respuesta) y que, a su vez, disminuye la variabilidad es: 12,5 % en la concentración de agua oxigenada usada en el ataque y 150 mL de alcohol etílico 98% para la precipitación de los oligómeros.

En la tabla 3.1 se observan los resultados obtenidos

**Tabla 3.1: Resultados obtenidos en el diseño de experimentos.**

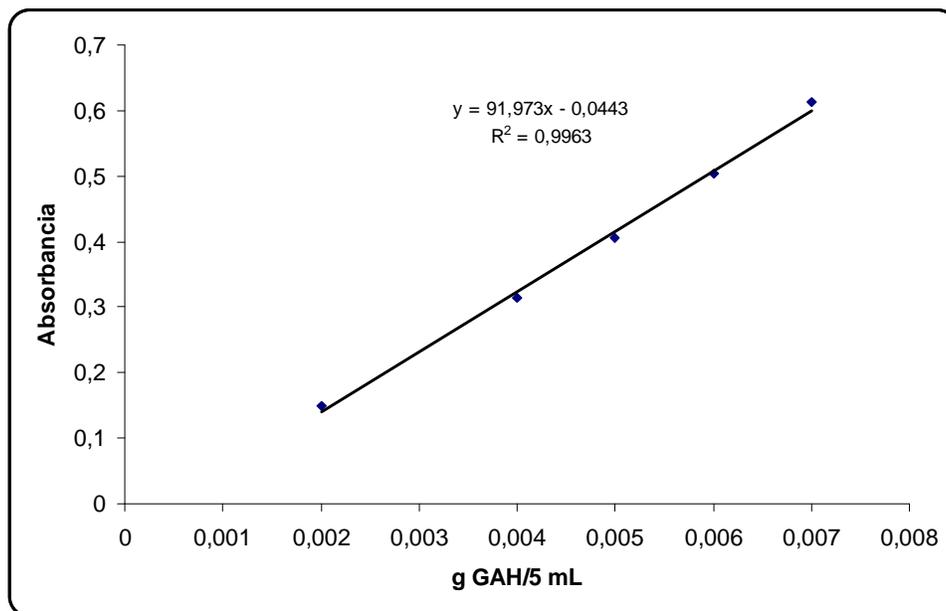
N° Ensayo	Conc. Agua Oxigenada %	Vol. Etanol (mL)	Tiempo Reposo (min)	Oligoquitosano (g)
1	10	90	15	0,296 ± 0,130
2	12,5	150	15	0,820 ± 0,006
3	15	210	15	0,776 ± 0,060
4	12,5	90	30	0,523 ± 0,030
5	15	150	30	0,794 ± 0,038
6	10	210	30	0,422 ± 0,146
7	15	90	60	0,446 ± 0,123
8	10	150	60	0,426 ± 0,136
9	12,5	210	60	0,825 ± 0,100

La implementación de las condiciones óptimas para la obtención de oligoquitosanos permite no solo el mejor rendimiento en peso de los mismos sino que también asegura el ahorro significativo de los reactivos usados tanto en el ataque como en la precipitación.

## 3.2. Caracterización de los oligoquitosanos obtenidos en el diseño experimental

### 3.2.1. Peso Molecular - Grado de polimerización

Para determinar el peso molecular promedio de los oligoquitosanos se utilizó el método de análisis de grupo final. El mismo se basa en emplear un reactivo de color, ferricianuro de potasio, que en medio básico, reacciona con el oxidrilo del hemiacetal de los azúcares reductores, grupo funcional presente en los oligoquitosanos y en la glucosamina, dando un color amarillo cuya absorbancia se lee a 420 nm. La Figura 3.5 corresponde a la curva de calibrado realizada con Glucosamina hidrociorada (GAH). La ecuación de regresión obtenida fue  $y = 91,973x - 0,0443$  y el coeficiente de correlación fue 0,9963.



**Figura 3.5:** Curva de calibrado realizada con glucosamina hidrociorada (GAH).

La tabla 3.2 muestra los valores de PM de los oligoquitosanos obtenidos con los 9 tratamientos en estudio.

**Tabla 3.2: Valores del PM de los oligoquitosanos**

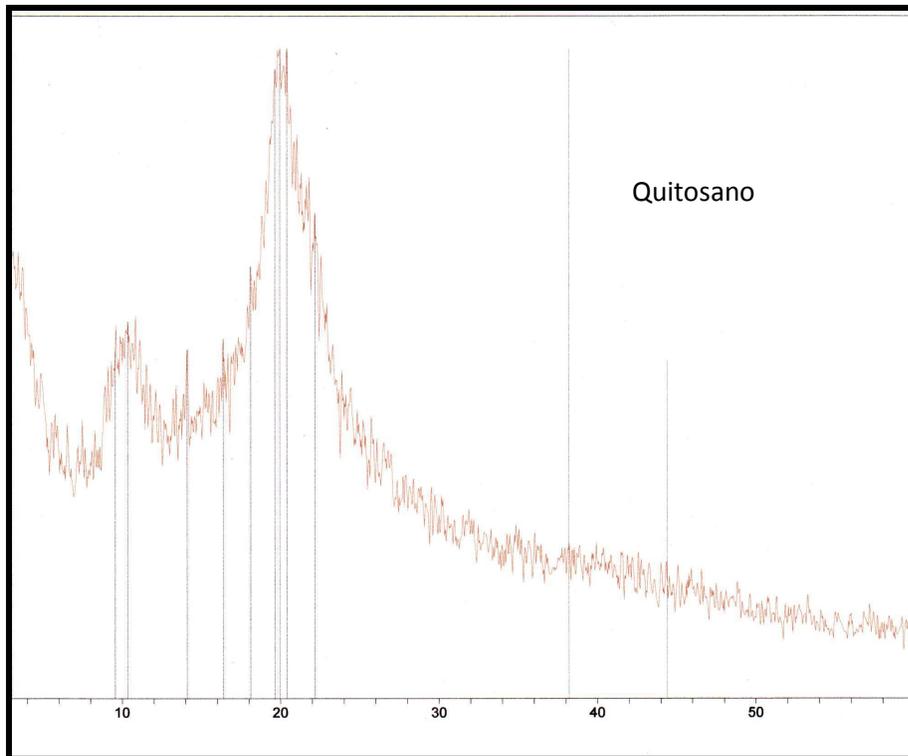
Muestra	PM oligoquitosano (u.m.a.)
1	269.4
2	318.9
3	278.0
4	300.3
5	258.6
6	267.2
7	280.1
8	275.8
9	271.5

Teniendo en cuenta que la unidad repetitiva (n) de glucosamina en el quitosano tiene un PM de 160, podemos concluir que los oligoquitosanos obtenidos con nuestra técnica tienen un grado de polimerización (n) igual a dos. De acuerdo con la clasificación dada por Pillai y col. (2009) corresponde a quitosanos de bajo peso molecular (LMWC  $n > 2$ ) o Cos (Chitooligosacaridos n 2 a 10).

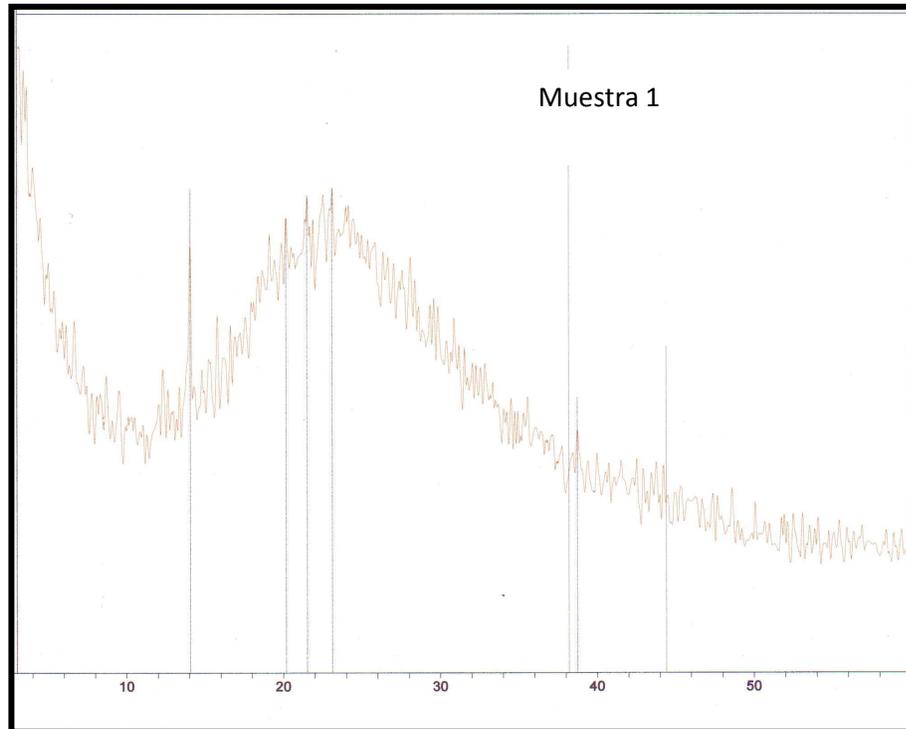
Coincidiendo con estudios previos (Shao y col. 2003) no se encontró dependencia entre el promedio del peso molecular de los oligoquitosano obtenidos con las condiciones experimentales estudiadas.

### 3.2.2. Difracción por Rayos X

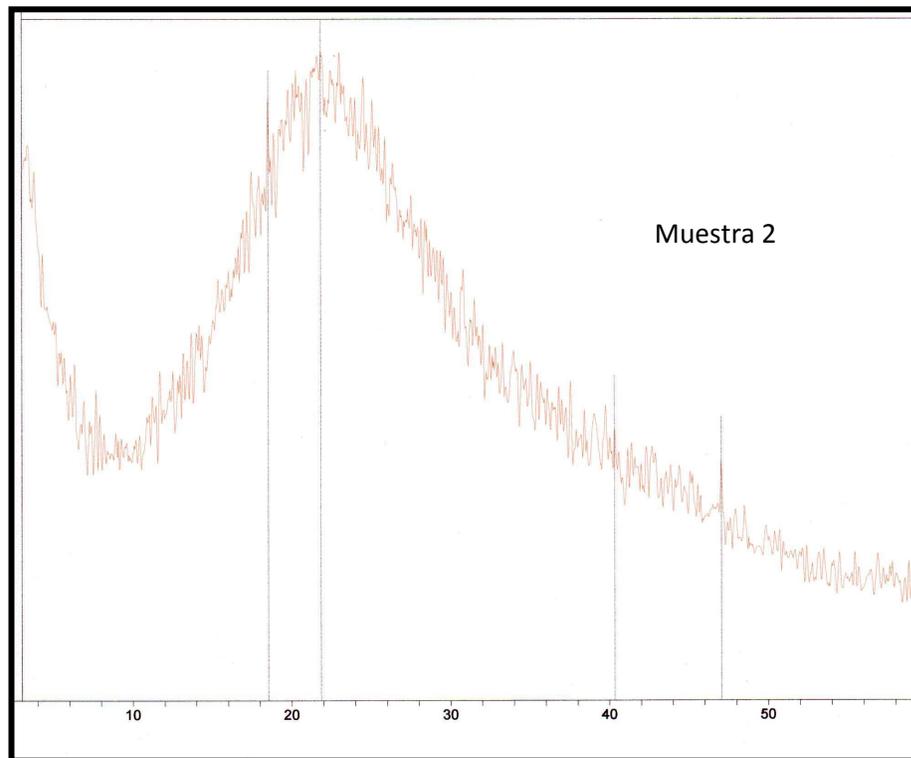
El espectro de difracción de rayos X del quitosano de origen muestra los picos de difracción característicos del biopolímero a  $2\theta = 10.09^\circ$  y  $2\theta = 20.38^\circ$  (Figura 3.6). Después de la escisión de la cadena se observa una fuerte disminución de la cristalinidad (disminución de la altura y ensanchamiento del pico) es decir, la transformación en una estructura amorfa, esto se potencia a medida que el tratamiento se optimiza. En las Figuras 3.7, 3.8 y 3.9 se pueden observar los espectros correspondientes a los tratamientos 1, 2 y 9. El pico a  $2\theta = 10.09^\circ$  desaparece y el de  $2\theta = 20.38^\circ$  se va ensanchando. Este último desaparece totalmente en la muestra 9 lo que indica que la estructura cristalina fue destruida completamente debido a la degradación.



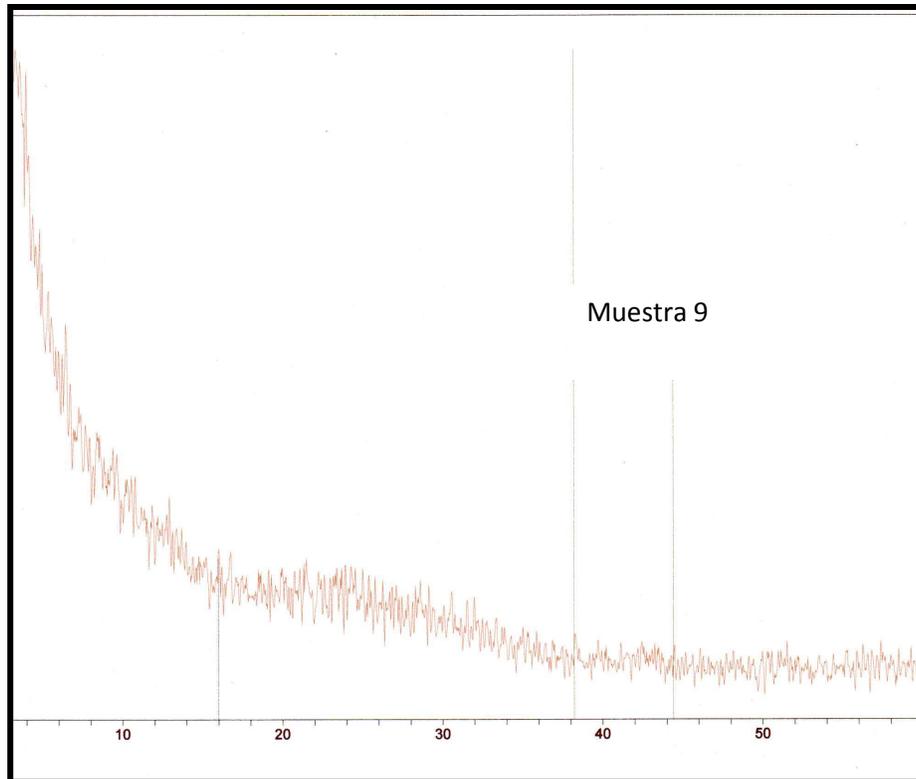
**Figura 3.6: Espectros de difracción de Rayos X quitosano**



**Figura 3.7: Espectros de difracción de Rayos X oligoquitosano 1.**



**Figura 3.8: Espectros de difracción de Rayos X oligoquitosano 2.**

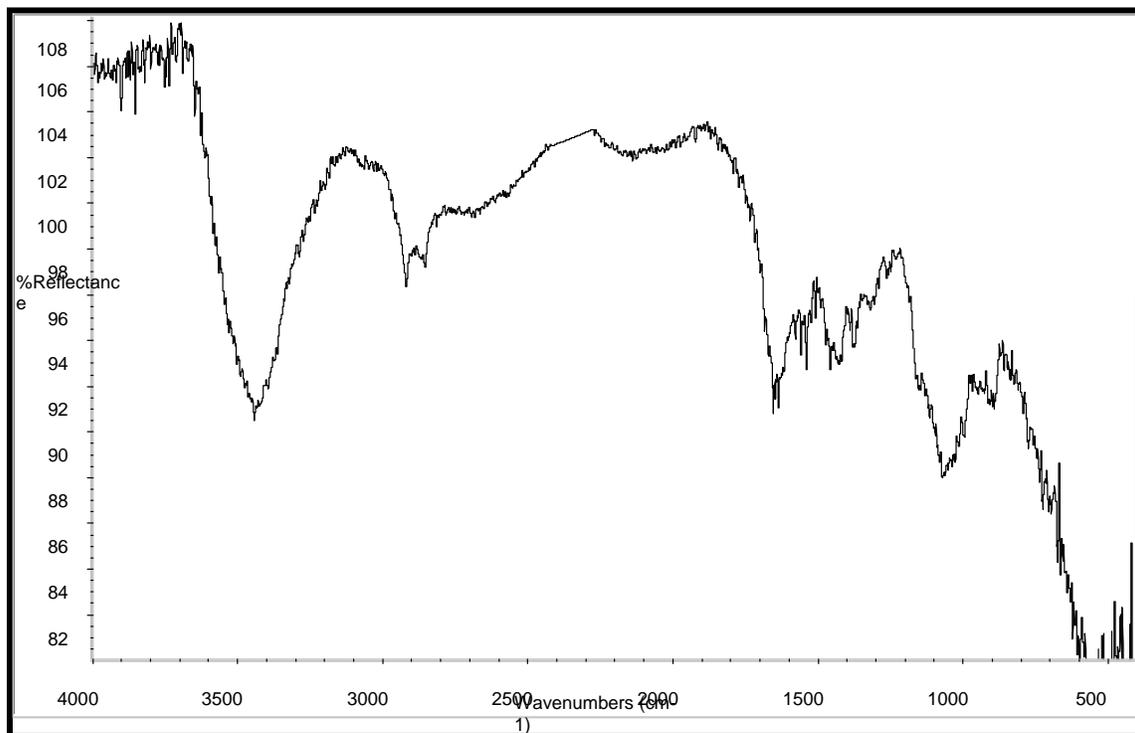


***Figura 3.9: Espectros de difracción de Rayos X oligoquitosano 9.***

### **3.2.3. Espectroscopía FTIR**

Se ha demostrado que la espectroscopia FTIR es una herramienta poderosa para el estudio de propiedades fisicoquímicas de polisacáridos.

En el espectro Infrarrojo de la Figura 3.10, se pueden observar las bandas asignables correspondientes al quitosano.

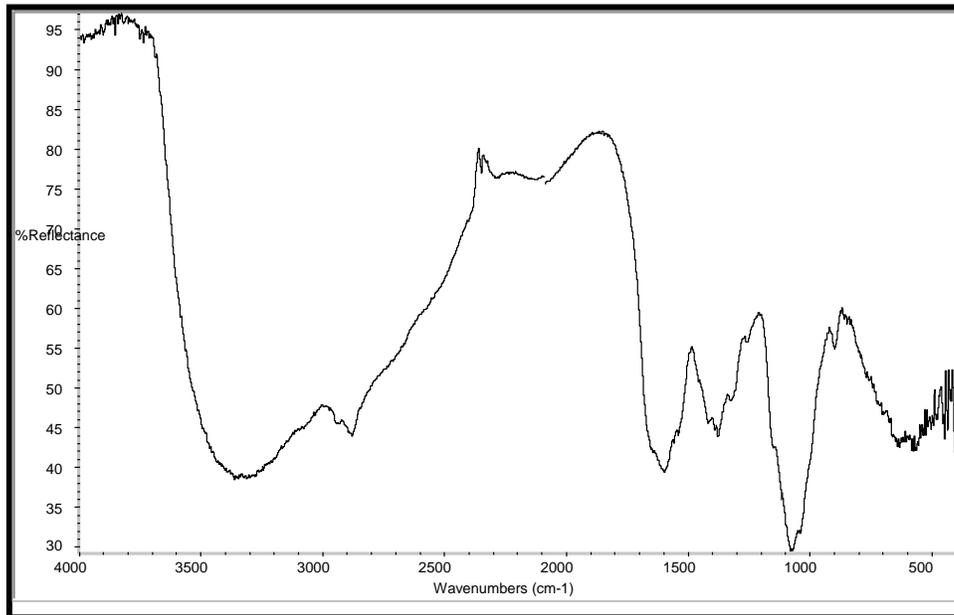


**Figura 3.10: Espectro Infrarrojo quitosano.**

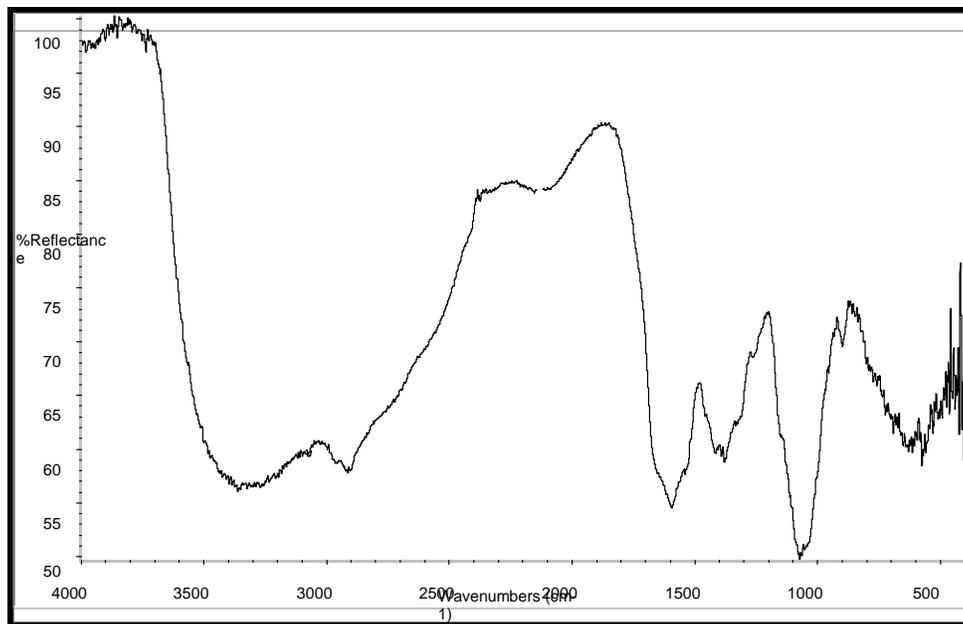
Las bandas correspondientes son:

- a) Vibraciones de tensión oxígeno-hidrógeno ( $\gamma$  O-H) y nitrógeno-hidrógeno ( $\gamma$  N-H), ambas en el rango comprendido entre  $3600$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$
- b) Vibraciones de tensión carbono-hidrógeno ( $\gamma$  C-H) en  $2960$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$
- c) Vibraciones de deformación nitrógeno-hidrógeno ( $\delta$  N-H) en  $1660\text{ cm}^{-1}$
- d) Vibraciones de deformación carbono-hidrógeno ( $\delta$  C-H) en  $1460$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$
- e) Vibraciones de tensión carbono-oxígeno ( $\gamma$  C-O) y carbono-nitrógeno ( $\gamma$  C-N) entre  $1150$  y  $980\text{ cm}^{-1}$ .

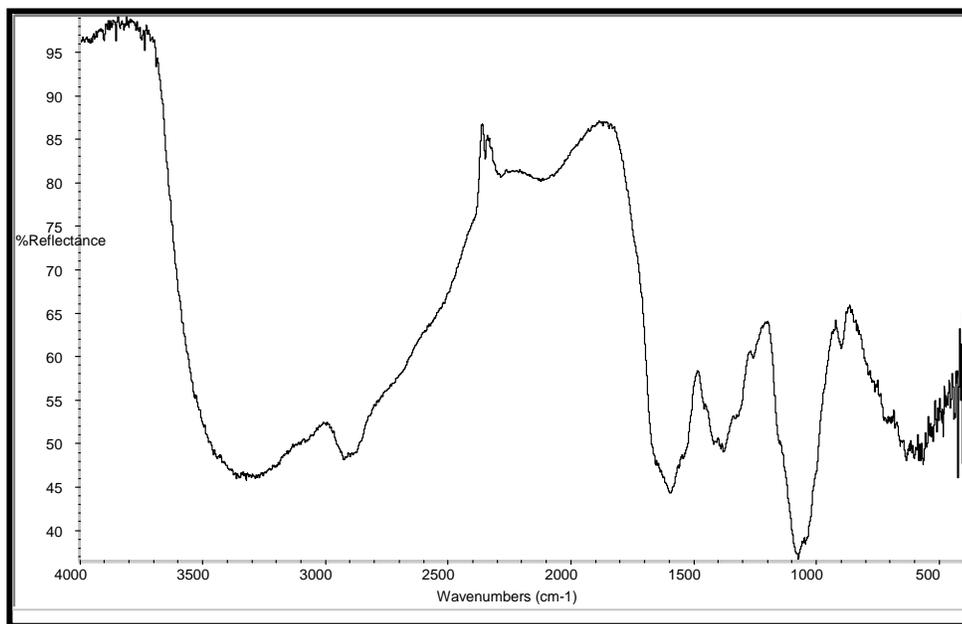
Tales bandas de absorción son compatibles con los grupos funcionales presentes en el biopolímero original. Los Espectros Infrarrojos de las Figuras 3.11, 3.12 y 3.13 corresponden a las muestras 1, 2 y 9.



**Figura 3.11: Espectro Infrarrojo de la muestra 1**



**Figura 3.12: Espectro Infrarrojo de la muestra 2.**



**Figura 3.13: Espectro Infrarrojo de la muestra 9.**

Se observan las mismas bandas de absorción ( $\gamma$  O-H;  $\gamma$  N-H;  $\gamma$  C-H;  $\delta$  N-H;  $\delta$  C-H;  $\gamma$  C-O y  $\gamma$  C-N) que en el quitosano.

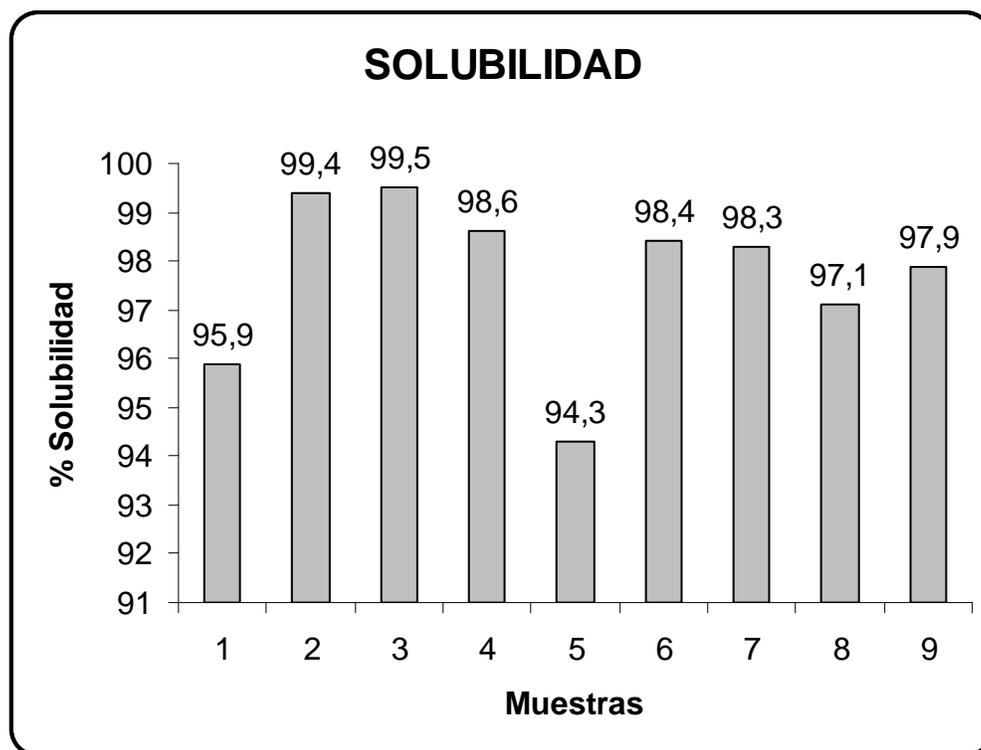
Del análisis de los espectros surge que las tres muestras tratadas coinciden en la posición de sus bandas con las de quitosano original, por lo que puede deducirse que la estructura básica molecular de éste no se altera durante el proceso.

Se observa que los tres espectros son superponibles entre sí, por lo tanto, el procedimiento utilizado conduce al mismo tipo de estructura molecular, sin cambios en sus grupos funcionales. La diferencia más notable está en la forma ensanchada de las bandas, lo que puede ser atribuido a una mayor interacción entre los grupos OH y NH, posibilitada por la transformación del biopolímero en

oligómeros cíclicos de menor tamaño. Los resultados confirman la ruptura de la unión glicosídica.

### 3.2.4. Estudio de la solubilidad

Uno de los objetivos de la obtención de quitosano de menor peso molecular tiene en cuenta principalmente la dificultad de solubilizar a este biopolímero lo que limita su utilización en diferentes aplicaciones. Debido a esto estudiamos la solubilidad de los oligoquitosanos obtenidos. En la Figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 3.14:** solubilidad de los oligoquitosanos.

En todos los casos se observa muy buena solubilidad, superior al 94 %. En el caso de los mejores rendimientos (ensayos nº 2 y 9) las solubilidades son del 98-99%. Esto significa una ventaja para la utilización de estos biopolímeros en la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos.

### **3.3. Conclusiones**

- ✓ Se determinaron las condiciones operacionales óptimas para la obtención de oligómeros de quitosano. Las mismas se basan en emplear H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una concentración del 12,5% y calentar en horno microondas (700 W) durante 4 min.
- ✓ Los oligómeros obtenidos se precipitan con 150 mL de etanol 98% y posteriormente se liofilizan para evitar el pardeamiento en el secado.
- ✓ Se pudo comprobar que el tratamiento no modifica la estructura molecular del biopolímero.
- ✓ Los análisis realizados permiten determinar que los oligoquitosanos obtenidos tienen una solubilidad del 98%
- ✓ El grado de polimerización de los oligoquitosanos obtenidos es igual a 2.

### 3.4. Obtención y caracterización de oligoquitosano

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los oligoquitosanos y la aplicación en películas de quitosano/oligoquitosano, los derivados usados se obtuvieron con las condiciones determinadas por el diseño experimental y fueron caracterizados especialmente para su posterior utilización. Además se caracterizó el quitosano de origen.

#### 3.4.1. Peso Molecular

Los valores de peso molecular se obtuvieron por viscometría, se informan a continuación:

- ❖ **Quitosano** 476.746 daltons
- ❖ **Oligoquitosano** 2.764 daltons

Como se puede observar el peso molecular de los derivados obtenidos disminuyó aproximadamente 172 veces lo que explica el aumento de la solubilidad del oligoquitosano.

#### 3.4.2. Determinación de cenizas

Se determinó el contenido de cenizas del quitosano y del oligoquitosano, los valores obtenidos fueron:

- ❖ **Quitosano** 0,53 g ceniza/100 g en base seca.
- ❖ **Oligoquitosano** 0,46 g ceniza/100 g en base seca.

### 3.4.3. Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad del quitosano que se utilizó para la obtención del oligoquitosano y de los quitooligómeros siendo los valores obtenidos:

- ❖ **Quitosano** 6,58 g %
- ❖ **Oligoquitosano** 4,30 g %

### 3.4.4. Grado de desacetilación

Se determinó el grado de desacetilación de los biopolímeros.

- ❖ **Quitosano:** 89 GD
- ❖ **Oligoquitosano:** 68 GD

### 3.4.5. Viscosidad

Para la determinación de la viscosidad se prepararon soluciones al 1% en ácido acético para el quitosano y al 1% agua para los oligómeros. Se observa la

notable disminución de la viscosidad con la despolimerización producida por la oxidación degradativa con agua oxigenada, que coincide con la disminución del peso molecular reportado para el quitosano y su derivado.

❖ **Viscosidad quitosano:** 670 mPas

❖ **Viscosidad oligoquitosano:** 8 mPas

### 3.4.6. Solubilidad del oligoquitosano

Se realizó el estudio de la solubilidad en agua de los oligoquitosanos en distintas concentraciones (1, 0,5 y 0,1%) y a diferentes temperaturas (ambiente, 40°C, 60°C y 100°C). Los resultados se pueden observar en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3: Solubilidad de oligoquitosano a diferentes concentraciones y temperatura**

	Concentración oligoquitosano		
	0,1%	0,5%	1%
	Solubilidad %		
<b>T° amb.</b>	81	81	81
<b>40°</b>	87	91	89
<b>60°</b>	88	90	90
<b>100°</b>	88	91	90

De los resultados obtenidos podemos concluir que a temperatura ambiente no hay diferencia en la solubilidad con respecto a la concentración. A mayores

temperaturas, se mejora la solubilidad, pero a partir de los 60°C comienza a evidenciarse un desarrollo de color amarillo ligeramente marrón en las soluciones, que esta asociado a un pardeamiento de tipo no enzimático debido a la exposición de grupos reactivos (CO y NH) de los quitooligómeros.

Para la realización de las películas se decidió hacer las soluciones a temperatura ambiente para evitar el desarrollo de color en las mismas.

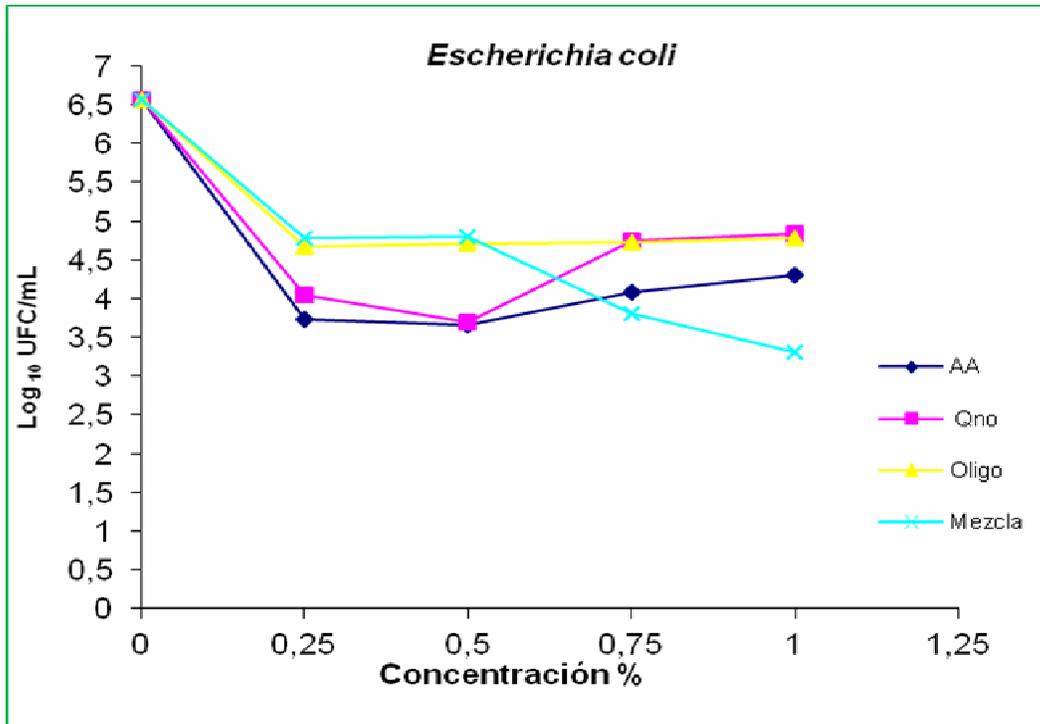
### **3.5. Ensayos microbiológicos**

Con el objetivo de evaluar la capacidad antimicrobiana de los oligómeros obtenidos se realizaron ensayos sobre una bacteria Gram negativa, *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 25922) y una Gram positiva, *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923).

#### **3.5.1. Ensayo con *Escherichia coli*.**

Para el ensayo con *E. coli* se trabajó con distintas soluciones de partida (quitosano al 1% en ácido acético al 1%; oligoquitosano al 1% en agua; y mezcla de quitosano 0,5% con oligoquitosano 0,5%) que se ensayaron en cuatro concentraciones (0,25%; 0,50%; 0,75% y 1%) llevadas a cabo en solución fisiológica. Simultáneamente se estudiaron las mismas diluciones para ácido acético. Los resultados obtenidos se expresaron en log UFC/mL.

Las distintas soluciones en estudio muestran un comportamiento que podemos observar en la Figura 3.15.



**Figura 3.15: Acción sobre *E.coli*.**

En los resultados se destaca una disminución significativa del recuento a partir de la concentración de 0,25% de las distintas soluciones evaluadas.

Cuando observamos el comportamiento del ácido acético 1% y del quitosano (1% en ácido acético) en las diluciones estudiadas se ve un efecto inhibitorio semejante con una disminución en el recuento de colonias similar entre los valores de 0.25 y 0.5 %, debido a la disolución de quitosano en ácido acético, se podría adjudicar este efecto principalmente a la acción del ácido y no a la del biopolímero.

La mezcla de oligoquitosano y quitosano y los quitoooligómeros solos, presentan el mismo efecto inhibitorio hasta 0,50 %. A mayores concentraciones el

recuento de colonias del tratamiento con la mezcla sufre un considerable descenso aumentando su acción inhibitoria, mientras que los quitoooligómeros en todas las concentraciones estudiadas mantienen el mismo nivel en el recuento de colonias. Se observa claramente la acción bacteriostática del oligoquitosano.

La solución de quitosano genera un descenso del número de viables, pero como se mencionó anteriormente, no se puede visualizar el efecto neto del quitosano debido a la concentración de ácido acético que presenta la solución.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo y las distintas teorías de acción de los quitoooligómeros postuladas en la bibliografía, podríamos decir que el oligoquitosano ingresa a la célula de *E. coli* (Bacteria Gram -), debido a que posee una capa delgada de peptidoglicano. La solución mezcla (oligoquitosano-quitosano) mejoró el efecto de cada uno de ellos individualmente, lo cual puede deberse a que el quitosano perturba la pared celular permitiéndole al oligoquitosano ingresar al interior de la célula y actuar más efectivamente.

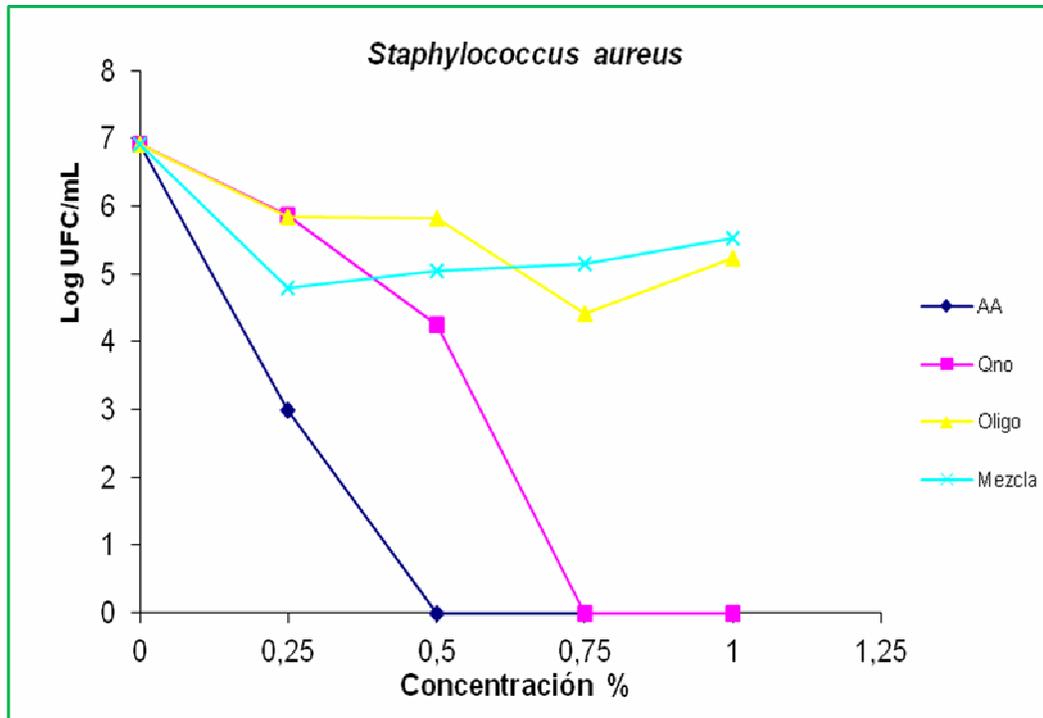
### **3.5.2. Ensayo con *Staphylococcus aureus***

Los resultados de los ensayos realizados para evaluar el efecto sobre *Staphylococcus aureus* se observan en la Figura 3.16. Los mismos fueron realizados para concentraciones de quitosano y oligoquitosano similares al ensayo para *E. coli*.

El quitosano y el ácido acético tiene el mismo comportamiento, se observa que a partir de 0,5 % para el ácido y de 0,75 % para el biopolímero, hay una disminución importante del número de viables, aunque el efecto letal, al igual que

en el caso de *E. coli* no podría atribuírsele al quitosano ya que este se encuentra disuelto en ácido.

En este estudio, tanto la mezcla de oligoquitosano y quitosano, como los quitoooligómeros en agua, muestran un efecto inhibitorio poco importante.



**Figura 3.16: Acción sobre *S. aureus*.**

El comportamiento observado frente a bacterias Gram (-) (*E coli*) es diferente respecto al observado con *S. aureus*, los que, por pertenecer a la familia de bacterias Gram +, presentan una pared celular constituida por una capa gruesa de peptidoglicano que impediría el ingreso de los quitoooligómeros.

Estos resultados no coinciden con Du y col. (2009), quienes consideran en su publicación que las células Gram + son inhibidas fácilmente por los oligómeros debido a que presentan muchos poros en la capa de peptidoglicano de la pared celular, lo que facilitaría el ingreso de los mismos. Si bien los resultados son discordantes, la metodología de evaluación del efecto antimicrobiano es totalmente diferente. En nuestro caso se estableció un tiempo de contacto de 2 horas entre los cultivos de microorganismos y las distintas soluciones de biopolímeros, mientras que en la metodología de Du y col. (2009) se cultivaron los microorganismos en medio de crecimiento con los biopolímeros inhibidores agregados al medio de cultivo. Por lo tanto el agente antibacteriano está en contacto con las células en el momento de su desarrollo y por ello el efecto puede ser diferente.

### 3.6. Conclusiones

- Considerando los resultados obtenidos, podríamos decir que el oligoquitosano ingresaría a la célula de *E. coli* (Bacteria Gram -), debido a que posee una capa delgada de peptidoglicano, lo cual no ocurre con *S. aureus*, quien por pertenecer a la familia de bacterias Gram +, está constituida por una capa gruesa de peptidoglicano que impide el ingreso del oligoquitosano.
- La solución mezcla (oligoquitosano-quitosano) en *E. coli*, mejoró el efecto del quitosano y del oligoquitosano, individualmente, lo cual puede deberse a que el quitosano perturba la pared celular permitiéndole al oligoquitosano ingresar al interior de la célula, observándose una evidente acción bacteriostática.
- La solución de quitosano genera un descenso del número de viables, pero no se puede visualizar el efecto neto del biopolímero debido a la concentración de ácido acético que presenta la solución.

### **3.7. Obtención y caracterización de películas de quitosano/oligoquitosano**

Se continuó el estudio de los quitoooligómeros con una aplicación como película o recubrimiento. Debido a la característica de tener un grado de polimerización bajo, los oligos no tienen la capacidad de formar películas, por esa razón, se utilizó como base quitosano. Este tiene muy buenas características filmogénicas y puede ser un buen vehículo de los oligoquitosanos.

En los últimos tiempos, el quitosano y los quitoooligosacáridos han sido objeto de considerable interés debido a sus actividades biológicas, principalmente su actividad antimicrobiana (Zhao y Xia, 2006; Dutta y col. 2009, Tomé y col. 2012). Los resultados obtenidos en esta tesis, que demostraron que soluciones de quitosano-oligoquitosano tienen efecto sobre el crecimiento de *E. coli* (Bacteria Gram -), dieron lugar a continuar con el objetivo de estudiar la capacidad antimicrobiana, ahora de películas de quitosano/oligoquitosano.

#### **3.7.1. Formulaciones de las películas de quitosano/oligoquitosano**

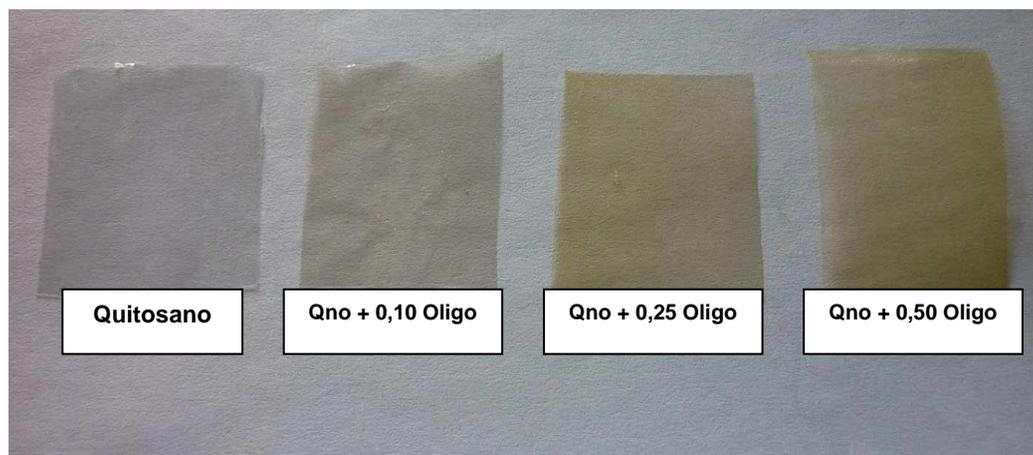
Las películas se diseñaron empleando tres formulaciones. En todos los casos el quitosano fue disuelto en una concentración de ácido acético muy baja (0,10%). Esto se tuvo en cuenta para evitar que en el estudio de la capacidad antimicrobiana el ácido tuviera influencia en los resultados obtenidos.

Se prepararon películas con 0,25% de quitosano en ácido acético 0,10%, con el agregado de tres concentraciones distintas de oligoquitosanos (0,10%, 0,25%, y 0,50%) de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se colocó el quitosano en agua destilada, agitándolo durante media hora para favorecer el “swelling” o hinchamiento que mejora la posterior disolución del biopolímero. Se agregó el ácido acético y se lo dejó agitando durante 24 horas. Por otro lado se colocaron 0,140, 0,350 y 0,700 g de oligoquitosanos en agua destilada y se los dejó agitando durante 24 hs a temperatura ambiente para evitar el desarrollo de color. Por último se mezclaron ambas diluciones. De esta manera se tuvo en cuenta las condiciones de disolución de cada biopolímero

Todas las formulaciones estudiadas fueron capaces de formar películas que se pudieron remover fácilmente de los moldes comprobando así, que el agregado de oligoquitosano no interfirió en la capacidad filmogénica del quitosano en todas las concentraciones ensayadas

### 3.7.2. Apariencia y homogeneidad de las películas



**Figura 3.17: Vista macroscópica de las películas quitosano/oligoquitosano.**

Las películas de quitosano con el agregado de oligoquitosano presentaron buena apariencia, fueron homogéneas y fáciles de manejar. Se puede observar que el aumento en la concentración de quitooligómeros está asociado a un incremento de la coloración en el proceso de secado. Esto se puede atribuir a un pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) reacción entre los grupos amino y carbonilo, que se encuentran más expuestos en los oligoquitosanos debido a su menor grado de polimerización.

### 3.7.3. Espesor

El espesor de las películas fue determinado con micrómetro y los valores aumentaron con la incorporación de oligoquitosanos. Los datos obtenidos se observan en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4 espesor películas**

Formulaciones	Espesor $\mu\text{m} \pm \text{DE}$	Espesor estudio permeabilidad
Quitosano	25 $\pm$ 8	6 $\mu\text{m}$
Qno-oligos 0,10	26 $\pm$ 4	7,66 $\mu\text{m}$
Qno-oligos 0,25	28 $\pm$ 7	9 $\mu\text{m}$
Qno-oligos 0,50	38 $\pm$ 6	15 $\mu\text{m}$

DE= desvío estándar,  $n=50$

Los datos de la primera columna se obtuvieron en las distintas muestras ( $n = 50$ ) que se emplearon para las pruebas mecánicas. Los valores de la segunda columna corresponden al espesor de la zona central de las películas que corresponden al estudio de permeabilidad. La diferencia observada en los valores

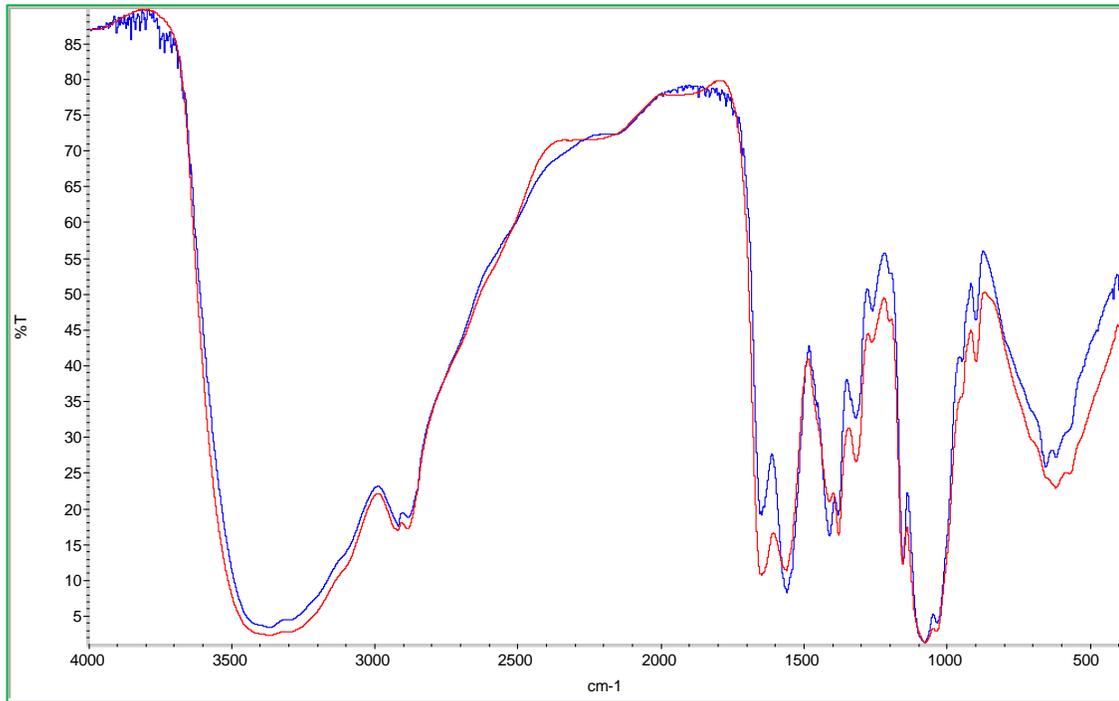
(variabilidad) se debe a que el método de obtención de las películas por casting no permite un espesor homogéneo.

#### 3.7.4. FTIR analysis

Los espectros FTIR se realizaron para estudiar la influencia de la adición de oligoquitosano en la estructura molecular del quitosano. Yin y col. (1999) indicaron que cuando dos o más sustancias se mezclan, las interacciones químicas se reflejan en los cambios de las bandas características del espectro FTIR. La Figura 3.18 muestra los espectros encimados de las películas de quitosano y de quitosano con la máxima concentración de oligoquitosano (0,50%). Los espectros ejemplificados son coincidentes con los de las formulaciones de menor concentración de oligoquitosano (0,10 y 0,25%).

En ambos espectros se pueden observar:

- la banda de absorción a  $3450\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones de tensión (OH) y N-H
- vibraciones de tensión entre  $2960$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a ( $\gamma$  C-H)
- a  $1594$ - $1663\text{ cm}^{-1}$  los grupos amino, que en los oligo tiene menor intensidad debido a la disminución de los grupos acetilo (Mourya y col. ,2011)
- a  $1460$ - $1400$  los grupos carbono – hidrógeno ( $\delta$  C-H)
- y numerosas bandas entre  $1031$ - $1156$  atribuidas a las vibraciones de tensión (C-O) (Pranoto y col. 2005)

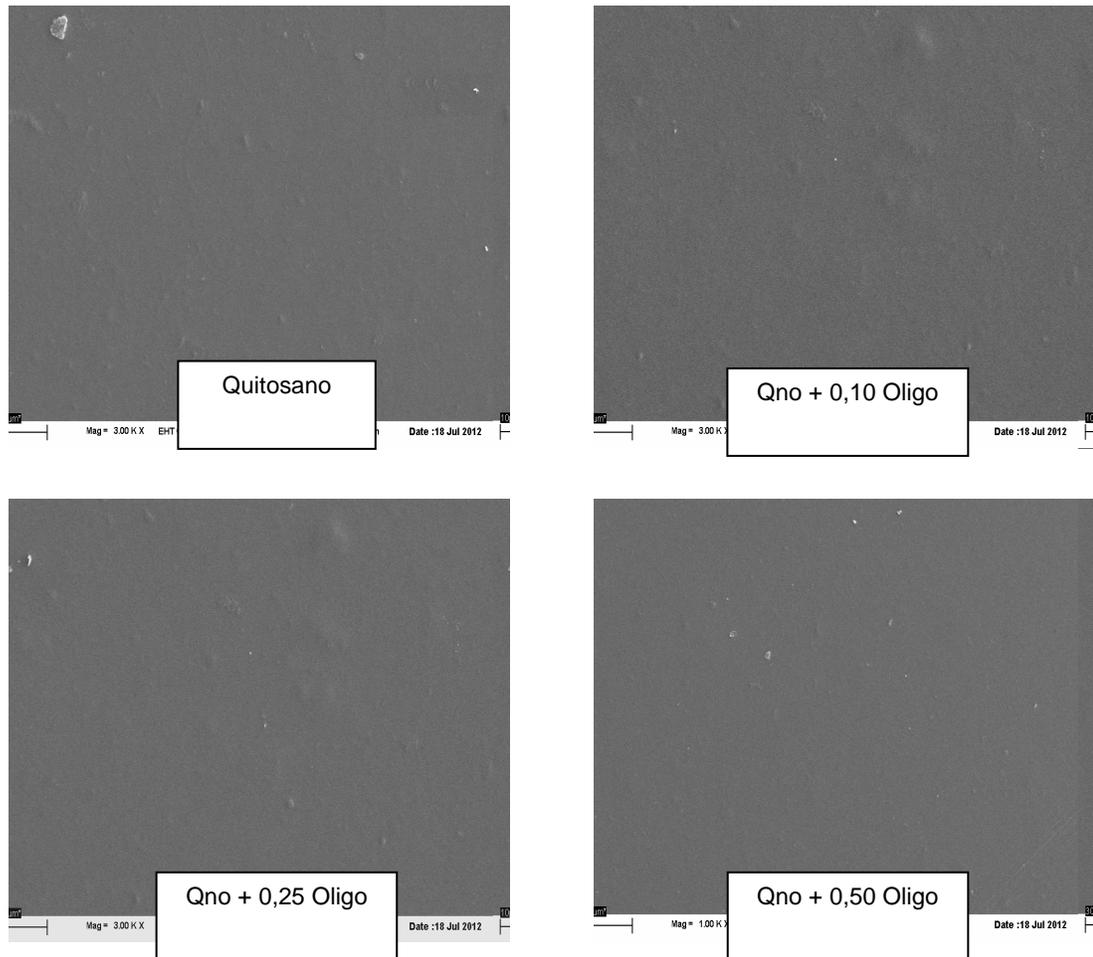


**Figura 3.18: FTIR película quitosano (azul) película quitosano-oligo 0,50% (rojo).**

Del análisis comparativo de ambos espectros se puede concluir que la adición de oligoquitosanos en la formulación de películas a base de quitosano no influye en la estructura del biopolímero.

### 3.7.5. SEM

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) es usada para evaluar homogeneidad, estructura de la superficie y espesor de las películas. La superficie de las mismas se muestra en la Figura 3.19 para las diferentes formulaciones (3000x).

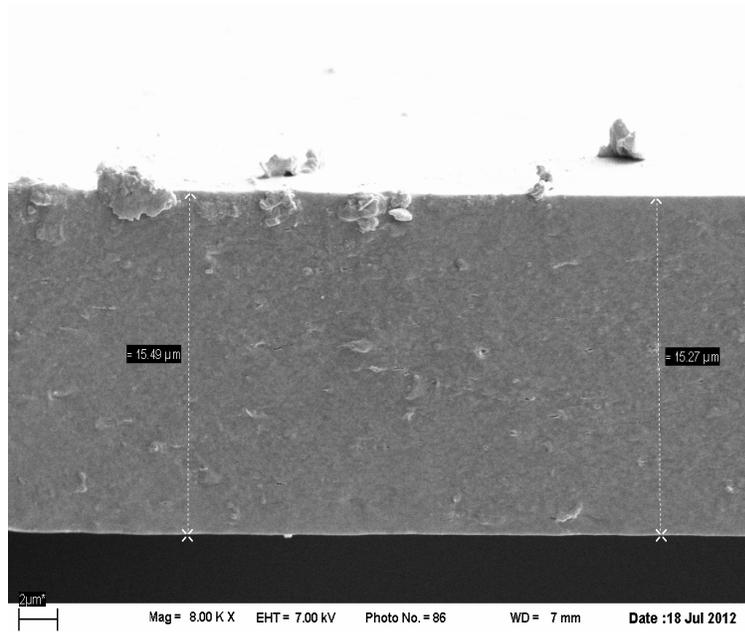


**Figura 3.19: Microscopía electrónica de barrido de las películas.**

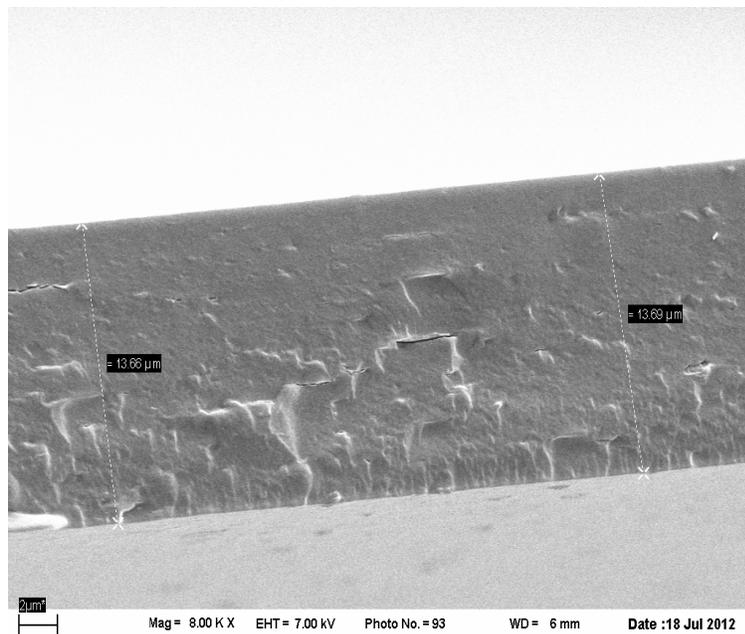
Todas las películas estudiadas presentaron superficies homogéneas y lisas, sin poros ni grietas visibles.

Los cortes transversales de las películas con 0,25 % y 0,50 % de oligoquitosano se pueden observar en la Figura 3.20 A y B.

**A: 0,25 oligo 8000 x**



**B: 0,50 oligo 8000 x**



**Figura 3.20: Microscopía electrónica de barrido de los cortes transversales.**

Las SEM muestran que las películas poseen una estructura homogénea, tanto en la formulación base de quitosano como en las que tuvieron agregado de

oligoquitosano. No se observaron aglomerados visibles lo que permite concluir que el oligoquitosano fue bien incorporado en la matriz.

Esta matriz homogénea indica una integridad estructural, que como es de esperar, consecuentemente, está asociada a las propiedades mecánicas de las películas tales como buena resistencia a la elongación y a la ruptura (García M. y col. 2009). Las medidas de espesor obtenidas con las micrografías SEM de los cortes de las películas coincidieron con las obtenidas con micrómetro.

### **3.7.6. Propiedades ópticas. Color y opacidad.**

El color de los alimentos es un atributo importante por que influye directamente en la aceptación por el consumidor. En el caso de las películas y recubrimientos comestibles, es importante su estudio para evaluar si las mismas modifican el color de los alimentos. En la Tabla 3.5 se pueden observar los parámetros de color correspondientes a las formulaciones estudiadas.

La adición de oligoquitosano disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) el parámetro de luminosidad ( $L$ ) de las películas de quitosano.

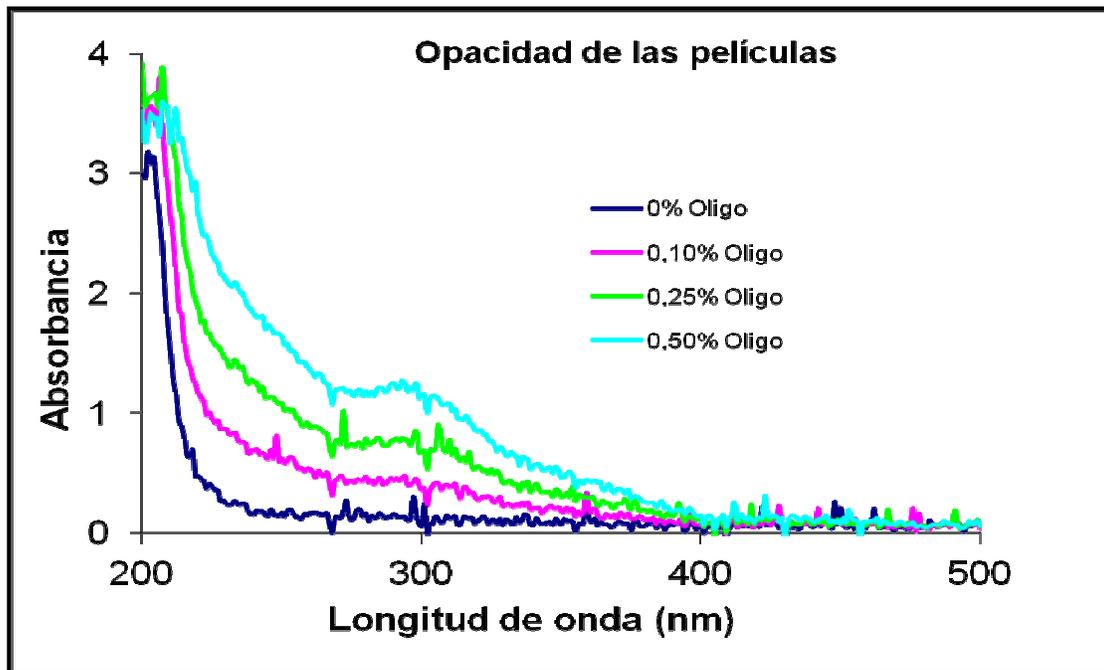
El parámetro  $a$  (verde-rojo) disminuye con el incremento de la concentración, pero el parámetro  $b$  azul-amarillo se incrementa significativamente ( $p > 0,05$ ) con la concentración de oligoquitosano. El color desarrollado en las películas, ligeramente amarillento, está relacionado con un pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) entre los grupos amino y los carbonílicos.

**Tabla 3.5 Parámetros de color.**

	Parametro <i>L</i> (luminosidad)	Parametro <i>a</i> (verde-rojo)	Parametro <i>b</i> (azul- amarillo)
Quitosano	91,29±0.046 <sup>a</sup>	-0,68±0,01 <sup>a</sup>	0,956±0,021 <sup>a</sup>
Qno-oligos 0,10	90,69±0,064 <sup>b</sup>	-1,03±0,13 <sup>b</sup>	2,92±0.64 <sup>b</sup>
Qno-oligos 0,25	90,535±0.27 <sup>c</sup>	-1,46±0,21 <sup>c</sup>	5,21±1,10 <sup>c</sup>
Qno-oligos 0,50	89,975±0,20 <sup>d</sup>	-1,84±0,07 <sup>d</sup>	8,41±0,59 <sup>d</sup>

Los valores informados corresponden al promedio ± el desvío estándar Las diferentes letras indican diferencias significativas para cada columna ( $p < 0.05$ ).

El estudio de la absorción en el UV de las películas permite evaluar la aplicación, en diferentes condiciones de las mismas, en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. La Figura 3.21 corresponde a los espectros UV-vis de las películas estudiadas.

**Figura 3.21: Espectros de absorción luz UV-Vis.**

Para todas las formulaciones el máximo pico de absorción se encuentra localizado en 250-300 nm, esto demuestra que los oligoquitosanos adicionados no afectan la capacidad de absorción del quitosano. Por otra parte, los picos se incrementan con la adición de quitoooligómeros, este incremento corresponde a los valores de opacidad. Este resultado está en coincidencia con el comportamiento de los valores correspondientes a color, específicamente con los de luminosidad (*L*).

Los resultados demostrarían que estas películas podrían ser de gran utilidad para extender la “vida de estante” de productos susceptibles a la rancidez oxidativa debido a que aumentan los valores de opacidad.

### **3.7.7. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)**

Para completar el estudio de las posibles aplicaciones de las diferentes formulaciones se evaluó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) para las películas de quitosano y las de quitosano/oligoquitosano. En general, las películas de quitosano son buenas barreras al oxígeno, pero pobres barreras al agua (Fajardo y col. 2010).

En la Tabla 3.6 se encuentran los resultados de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) para cada muestra ensayada.

Tabla 3.6

## WVP: Permeabilidad al Vapor de Agua

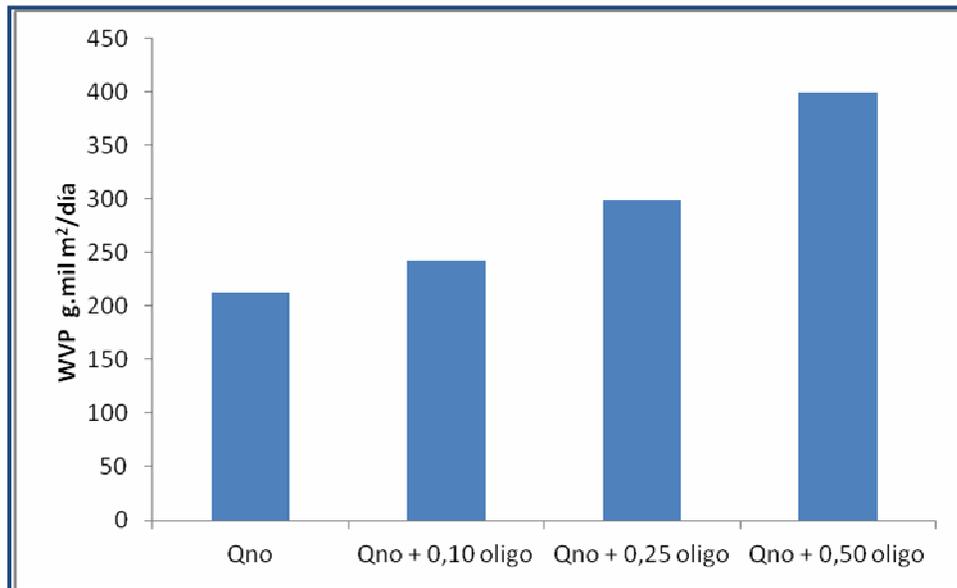
Película	Espesor <sup>1</sup> [μm]	WVP (23°C, 50%HR) [g.mil/m <sup>2</sup> .día]	WVP Promedio ±cv%
Quitosano	6	<b>198.40</b>	<b>213.37</b>
	6	<b>238.28</b>	±10.18
	6	<b>203.42</b>	
Quitosano + 0,10% Oligoquitosano	6	<b>169.98</b>	<b>242.94</b>
	8	<b>276.63</b>	±26.03
	9	<b>282.20</b>	
Quitosano + 0,25% Oligoquitosano	10	<b>336.48</b>	<b>299.11</b>
	10	<b>306.34</b>	(13.86
	7	<b>254.50</b>	
Quitosano + 0,50% Oligoquitosano	15	390.38	399.67
	15	399.76	(2.31
	15	408.85	

<sup>1</sup>Valor promedio de varias determinaciones en el área de medición.

Debido a la dispersión en los valores medidos en las tres primeras muestras (atribuida principalmente a la no homogeneidad en la composición y/o el espesor de las películas), se incluyen en cada caso los valores de 3 determinaciones individuales, así como también el valor promedio y el coeficiente de variación asociado ( $cv\% = [\text{DesvStd}/\text{Valor Prom}] \times 100$ ).

El aumento de la WVP podría deberse a una matriz menos cohesiva. En la Figura 3.22 se observa que la incorporación de oligoquitosanos contribuye al aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) en la permeabilidad al vapor de agua probablemente debido a la interrupción de la estructura polimérica del quitosano con compuestos de menor grado de polimerización. Este aumento es más notorio

en las películas con la incorporación de 0,50% de oligoquitosano, esto podría ser atribuido al mayor número de grupos oxidrilos libres y en consecuencia una mayor interacción con el agua favoreciendo la permeabilidad (Fajardo y col. 2010).



**Figura 3.22: Modificación de la permeabilidad al vapor de agua con el agregado de oligoquitosano.**

### 3.7.8. Propiedades mecánicas

Se estudiaron las propiedades mecánicas de las películas puesto que de ellas dependen las posibles aplicaciones de las mismas. Los resultados condicionan las fuerzas que deben soportar en la manipulación para evitar el deterioro de los productos envasados. Los parámetros módulo elástico, máximo esfuerzo de tensión y elongación a la ruptura se muestran en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7. Propiedades mecánicas.**

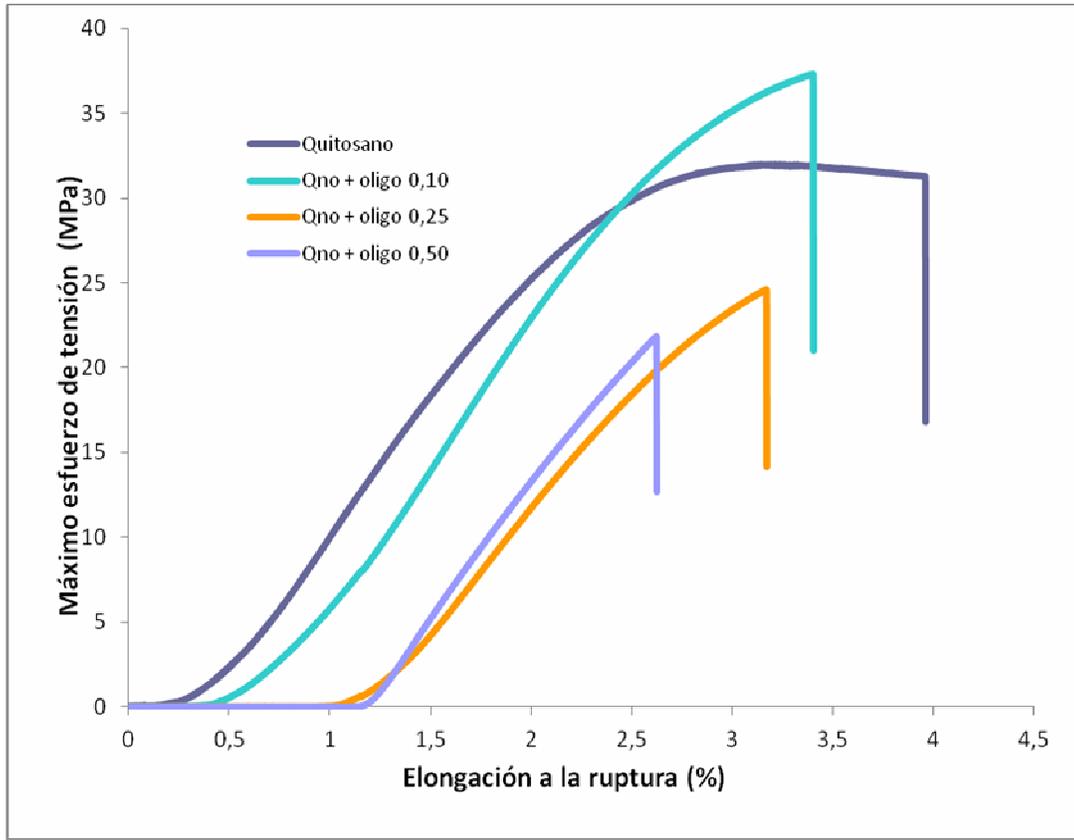
Formulación de las películas	Módulo elástico (MPa)	Máximo esfuerzo de tensión (MPa)	Elongación a la ruptura (%)
Quitosano	1736	31,27	3,96
Quitosano + 0,10% Oligoquitosano	1849	32,29	3,40
Quitosano + 0,25% Oligoquitosano	1520	24,57	3,17
Quitosano + 0,50% Oligoquitosano	1734	21,74	2,62

El módulo elástico indica la rigidez de las películas. Los valores más altos corresponden a un material más rígido (Pelissari y col., 2012). Las películas desarrolladas presentan una rigidez apreciable con valores de módulo elástico que varían entre 1520 y 1849 MPa (Tabla 3.7).

El agregado de oligoquitosanos disminuye el máximo esfuerzo de tensión lo que podría atribuirse a la interferencia de los mismos en la estructura polimérica del quitosano, relajando la matriz del biopolímero.

La flexibilidad y la capacidad de elongación se reflejan en los valores de la elongación a la ruptura. El agregado de oligoquitosano disminuye entre 14 y 34% los valores de elongación de las películas de quitosano que perdería flexibilidad con este agregado dando películas menos flexibles.

En la Figura 3.23 se observa el comportamiento de las películas de quitosano y oligoquitosano.

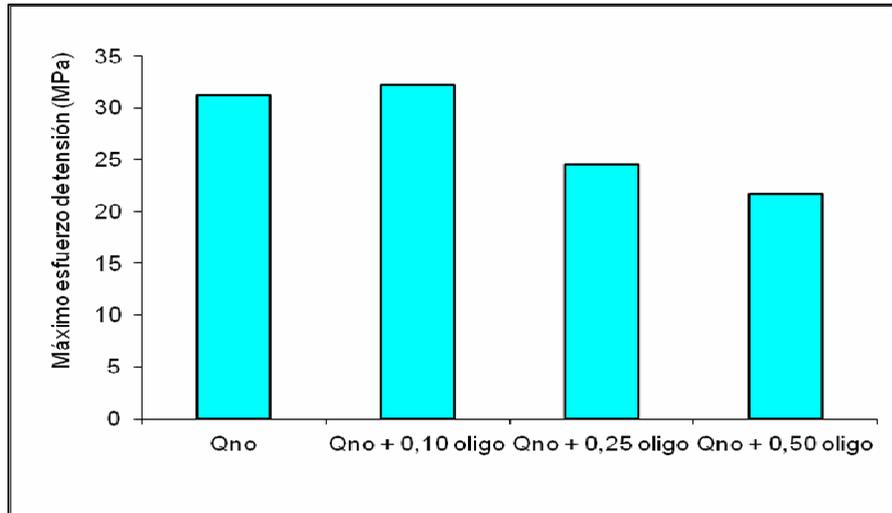


**Figura 3.23: Curva de elongación a la ruptura en función del máximo esfuerzo de tensión.**

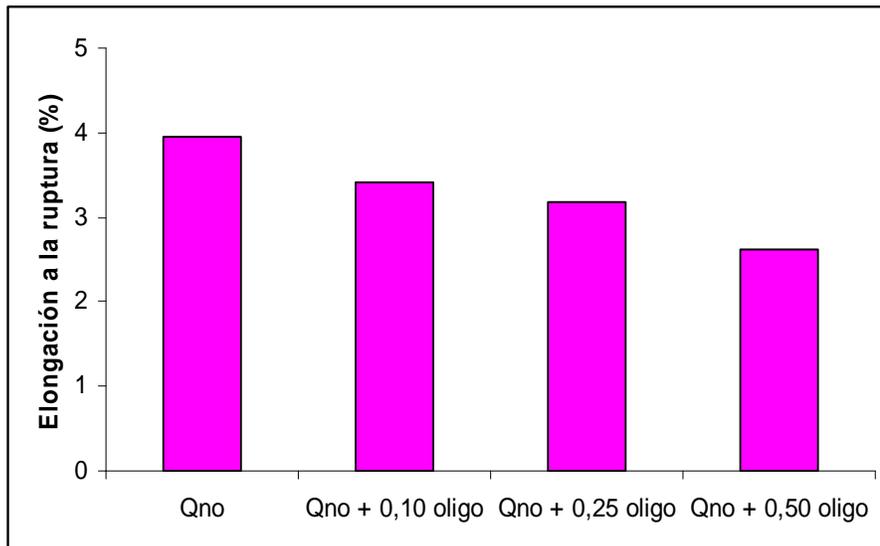
Las películas de quitosano y quitosano con 0,10% de oligoquitosano resultaron ser las más fuertes con una mayor fuerza de ruptura (máximo esfuerzo de tensión).

De acuerdo a los resultados obtenidos podríamos concluir que los oligoquitosanos incorporados al quitosano interfieren en la asociación de las cadenas poliméricas modificando las propiedades mecánicas como se observa en la Figura 3.24 y 3.25 El comportamiento de las películas con el agregado de oligoquitosano podría asociarse al de los materiales menos dúctiles ya que la

elongación a la ruptura y el máximo esfuerzo de tensión disminuyeron comparado con las películas de quitosano y las de menor concentración de oligoquitosano.



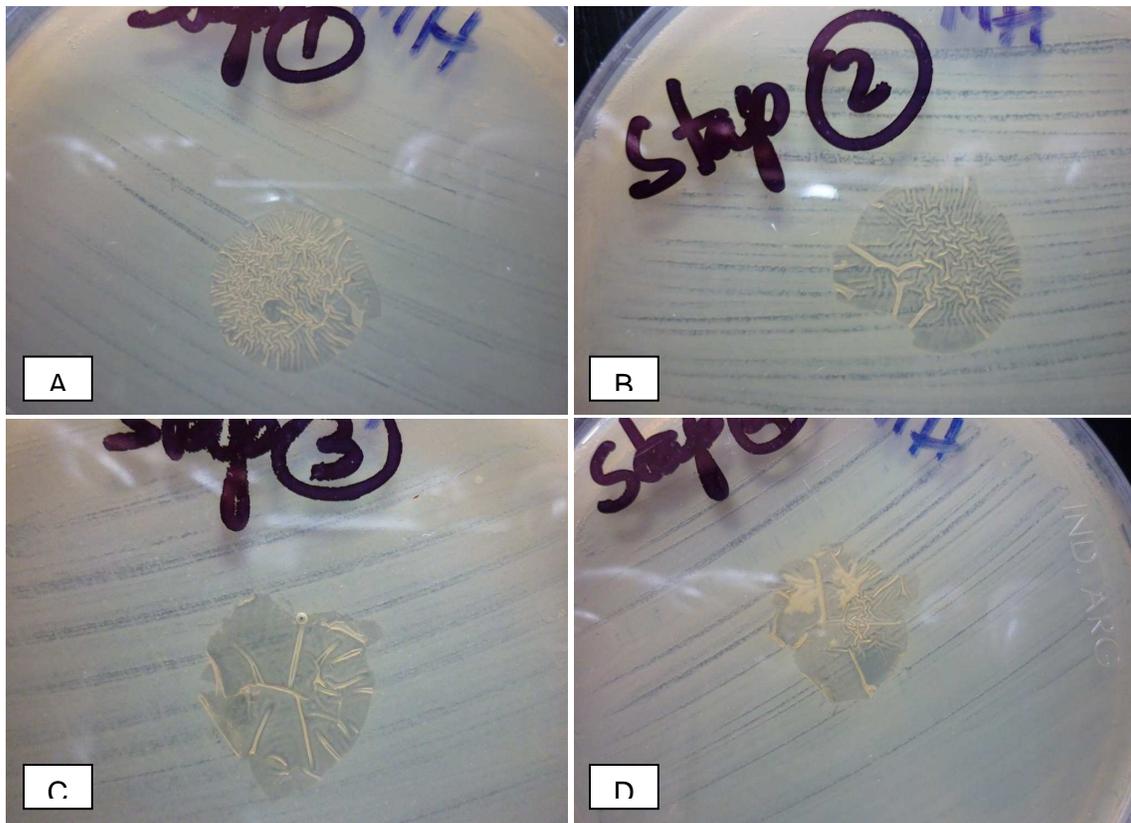
**Figura 3.24:** Influencia del agregado de oligoquitosano en la máxima tensión al estiramiento.



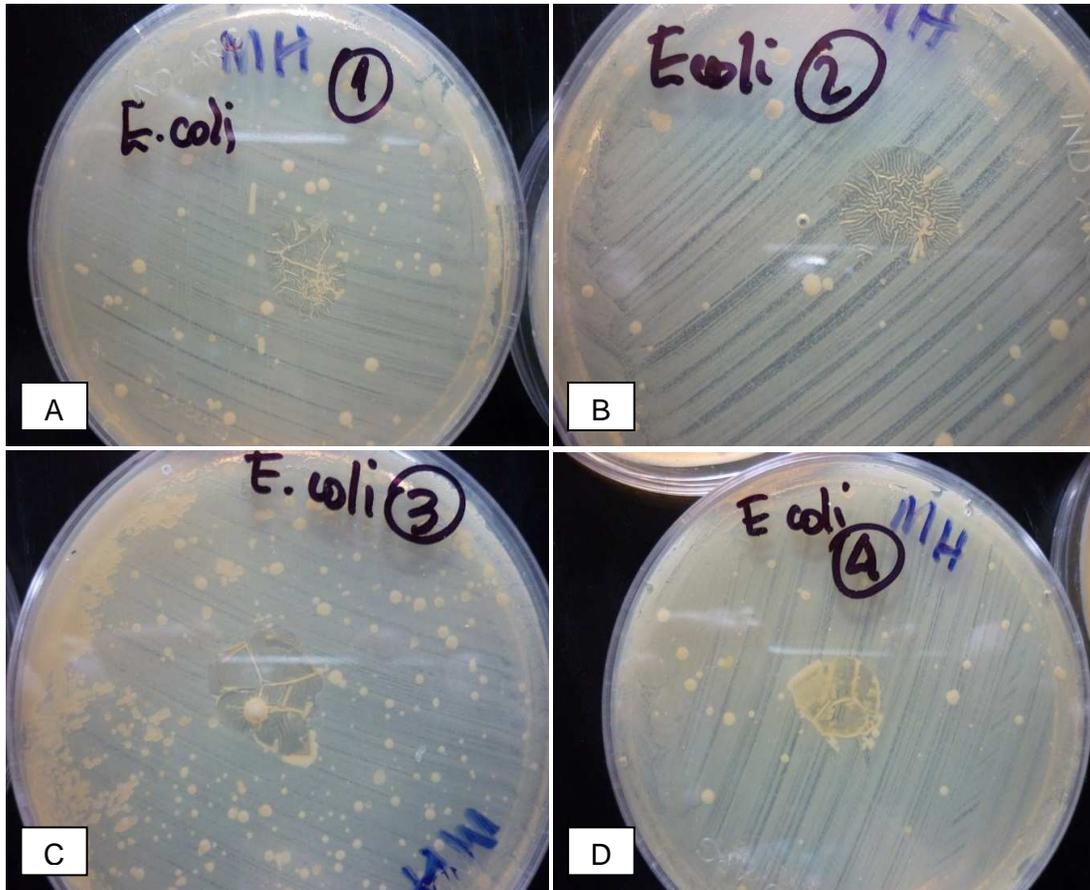
**Figura 3.25:** Influencia del agregado de oligoquitosano en la elongación a la ruptura.

### 3.7.9. Capacidad Antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana se estudió frente a dos bacterias patogénicas que contaminan los alimentos: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y contra dos hongos, *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*, que poseen alta resistencia a los factores de elaboración como disminución del pH, incorporación de altos niveles de azúcar y pasteurización. Las Figuras 3.26 y 3.27 muestran en detalle la respuesta a la actividad antimicrobiana estudiada.



**Figura 3.26: Capacidad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27933 de películas A) quitosano B) quitosano + 0,10 oligo C) quitosano + 0,25 oligo D) quitosano + 0,50 oligo**



**Figura 3.27: Capacidad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922 de películas A) quitosano B) quitosano + 0,10 oligo C) quitosano + 0,25 oligo D) quitosano + 0,50 oligo**

A pesar de la numerosa bibliografía existente en donde se reporta la acción antimicrobiana del quitosano y de sus oligómeros, no se observaron zonas de inhibición alrededor de los discos, tanto para el quitosano, como para ninguna de las formulaciones estudiadas tal como fue observado en un trabajo anterior (López y col. 2013). Este resultado puede ser atribuido a la incapacidad de esta macromolécula y sus oligos de difundir en el medio, lo que imposibilitaría el

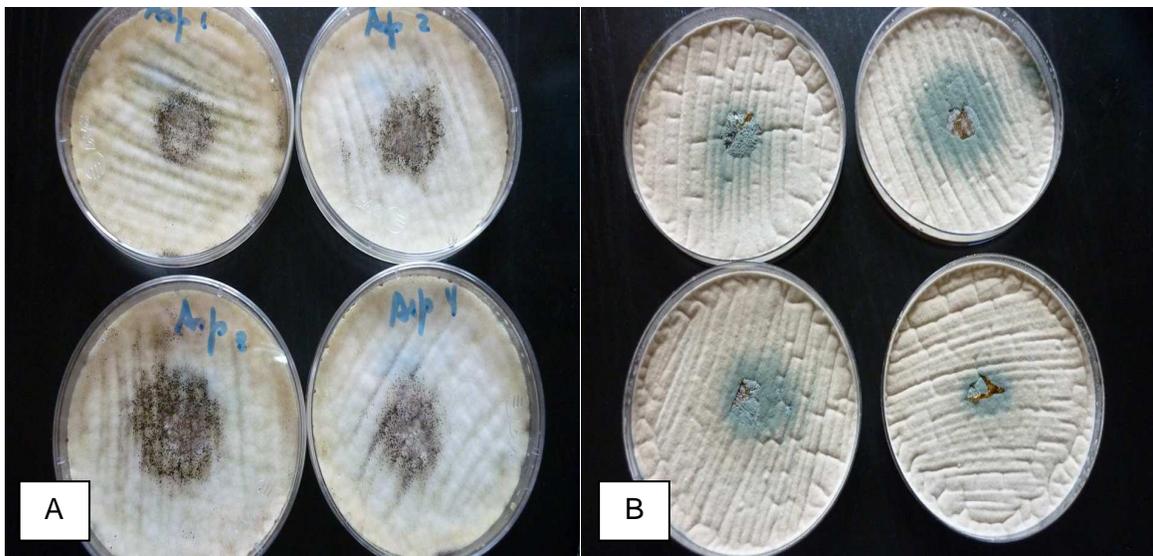
contacto directo de las bacterias con los grupos activos del biopolímero y sus derivados (Coma y col. 2002; Pranoto y col. 2005).

Cuando se examinaron visualmente las zonas de contacto entre la película y la superficie del agar se puede observar que el crecimiento de *S. aureus* (Figura 3.26) se ve muy limitado para las formulaciones con quitosano + 0,10% de oligos y quitosano + 0,25% de oligos (Figura 3.26 B y C). No obstante se comprueba un gran desarrollo de colonias por debajo de la película de quitosano sólo (Figura 3.26 A), y un crecimiento aunque menor para las formulación con 0,5 % de oligos (Figura 3.26 D). Este resultado es coincidente con el obtenido por nuestro grupo de trabajo con películas de almidón de maiz y quitosano (Lopez y col 2013).

Este resultado demuestra que podría resultar beneficioso la utilización de este tipo de formulaciones en recubrimientos comestibles pero teniendo en cuenta la concentración del oligómero en las mismas.

En la Figura 3.27 observamos las zonas de contacto y el crecimiento debajo de las mismas para *E. coli*. En este caso casi no se observa crecimiento para las formulaciones con quitosano + 0,10% (Figura 3.27 B), las de películas de quitosano + 0,25% tiene menor desarrollo (Figura 3.27 C), que las de quitosano sólo (Figura 3.27 A). Como en el estudio con *S. aureus* el mayor crecimiento se ve debajo de las películas con mayor concentración de oligoquitosano (Figura 3.27 D). Este comportamiento podría justificarse porque los grupos amino de los oligoquitosanos reaccionarían con los azúcares reductores disminuyendo el número de grupos reactivos que podrían actuar como antimicrobianos (Wu y col. 2013).

Simultáneamente se realizó el estudio del efecto antimicrobiano de las películas frente a *Penicilium spp* y *Aspergillus niger*, dos hongos con gran incidencia en el deterioro de alimentos. El resultado demostró que no hay efecto sobre las zonas de inhibición alrededor de los discos, ni en la zona de contacto, con todas las concentraciones quitosano/oligoquitosano estudiadas (Figura 3.28 A y B).



**Figura 3.28: Capacidad antimicrobiana contra A) *Aspergillus niger* B) *Penicilium spp.***

Por último es importante destacar existe un amplio rango de actividad antimicrobiana de los oligoquitosanos, reportada en bibliografía, dependientes de numerosos factores estructurales, tales como el grado de N-acetilación y del peso molecular. Wu y col. (2013) concluyen que las soluciones de oligómeros del quitosano calentados no muestran actividad antimicrobiana, dado por que los grupos amino reaccionan con los azúcares reductores disminuyendo el contenido

de grupos reactivos antimicrobianos, lo que justificaría alguno de los resultados obtenidos en esta tesis. Existen otros factores importantes como los materiales usados y el tipo de ensayos realizados, que en la actualidad no han sido estandarizados, lo que dificultan la comparación de los resultados obtenidos.

De los estudios realizados podemos concluir que las propiedades funcionales de las películas de quitosano pueden ser modificadas cuando se combinan con oligoquitosano, modificando entre otras características, la capacidad antimicrobiana.

Por todo lo estudiado, el quitosano y sus derivados, con sus propiedades y funciones, podrían convertirse en un futuro cercano, en material de envase o recubrimiento de uso corriente en alimentos.

### **3.8. Conclusiones**

- El agregado de oligoquitosano no interfirió en la capacidad filmogénica del quitosano.
- Las películas de quitosano y oligoquitosano tienen buena apariencia, homogéneas y son fáciles de manipular.
- Las películas tienen buenas propiedades de barrera al vapor de agua y mecánicas.
- Las formulaciones con 0,10 y 0,25% de oligoquitosano reducen el crecimiento de *S. aureus* and *E. coli* en la zona de contacto.

# **CONCLUSIONES**

- Se determinaron las condiciones operacionales óptimas para la obtención de oligómeros de quitosano. Las mismas se basan en emplear  $H_2O_2$  en una concentración del 12,5% y calentar en horno microondas (700 W) durante 4 min.
- Los oligómeros obtenidos se precipitan con 150 mL de etanol 98% y posteriormente se liofilizan para evitar el pardeamiento en el secado.
- Se pudo comprobar que el tratamiento no modifica la estructura molecular del biopolímero.
- Los análisis realizados permiten determinar que los oligoquitosanos obtenidos tienen una solubilidad del 98%
- El grado de polimerización de los oligoquitosanos obtenidos es igual a 2.
- Considerando los resultados obtenidos, podríamos decir que el oligoquitosano ingresa a la célula de *E. coli* (Bacteria Gram -), debido a que posee una capa delgada de peptidoglicano, lo cual no ocurre con *S. aureus*, quien por pertenecer a la familia de bacterias Gram +, está constituida por una capa gruesa de peptidoglicano que impide el ingreso del oligoquitosano.
- La solución mezcla (oligoquitosano-quitosano) en *E. coli*, mejoró el efecto del quitosano y del oligoquitosano, individualmente, lo cual puede deberse a que el quitosano perturba la pared celular permitiéndole al oligoquitosano ingresar al interior de la célula.
- La solución de quitosano genera un descenso del número de viables, pero no se puede visualizar el efecto neto del biopolímero debido a la concentración de ácido acético que presenta la solución.

- El agregado de oligoquitosano no interfirió en la capacidad filmogénica del quitosano.
- Las películas de quitosano y oligoquitosano tienen buena apariencia, homogéneas y son fáciles de manipular.
- Las películas tienen buenas propiedades de barrera al vapor de agua y mecánicas.
- Las formulaciones con 0,10 y 0,25% de oligoquitosano reducen el crecimiento de *S. aureus* and *E. coli* en la zona de contacto.

# **BIBLIOGRAFIA**

American Society for Testing and Materials (ASTM); Standard test method for haze and luminous transmittance of transparent plastics. (2000). Annual Book of ASTM Standards, (D1003-00), Philadelphia, PA.

American Society for Testing and Materials (ASTM); Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. (1996). Annual book of ASTM standards, (D882-91), Philadelphia, PA.

American Society for Testing and Materials (ASTM); Standard test methods for water vapor transmission of materials. (1995). Annual book of ASTM standards, Vol. 08.01 (E96-95), Philadelphia, PA.

Austin, P. R., & Brine, C. J. (1977). *U.S. Patent No. 4,029,727*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Caiqin, Q., Wei, W., Huie, P., Rong, H., & Wei, L. (2008). Preparation and properties of reduced chitooligomers. *Carbohydrate Polymers*, 72(4), 701-706.

Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L., & Del Nobile, M. A. (2008). Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88(2), 159-168.

- Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M., & Li, S. L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*, *88*(3), 179-184.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, *67*(3), 1162-1169.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, *21*(6), 703-714.
- Du, Y., Zhao, Y., Dai, S., & Yang, B. (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *10*(1), 103-107.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, *114*(4), 1173-1182.
- Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, *101*(4), 349-356.

- Flores, S. K., Costa, D., Yamashita, F., Gerschenson, L. N., & Grossmann, M. V. (2010). Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science and Engineering: C*, 30(1), 196-202.
- Galema, S. A. (1997). Microwave chemistry. *Chemistry Society Reviews*, 26(3), 233-238.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2009). Characterization of starch and composite edible films and coatings. In *Edible films and coatings for food applications* (pp. 169-209). Springer New York.
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18(3), 117-131.
- Hirano, S. (2001, March). Wet-spinning and applications of functional fibers based on chitin and chitosan. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 168, No. 1, pp. 21-30). WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Huang, Q. Z., Wang, S. M., Huang, J. F., Zhuo, L. H., & Guo, Y. C. (2007). Study on the heterogeneous degradation of chitosan with hydrogen peroxide under the catalysis of phosphotungstic acid. *Carbohydrate Polymers*, 68(4), 761-765.

- Jeon, Y. J., & Kim, S. K. (2000). Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 41(2), 133-141.
- Kim, S. K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357-368.
- Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S., Meng, X. H., & Yu, L. J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 60-65.
- López, O., García, M. A., Villar, M. A., Gentili A., Rodríguez M: S: & Albertengo L: (2013). Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch Films containing chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, enviado para su publicación.
- Montgomery, D. (1991). Diseño y análisis de experimentos. 589 p. *Grupo Editorial Iberoamérica SA, México*.
- Mourya, V. K., & Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68(6), 1013-1051.

- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72(5), R87-R100.
- No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 65-72.
- Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., & Farkas, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 5(1), 45-57.
- Pelissari, F. M., Yamashita, F., & Grossmann, M. V. E. (2011). Extrusion parameters related to starch/chitosan active films properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(4), 702-710.
- Pelissari, F. M., Yamashita, F., Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., & Grossmann, M. V. E. (2012). Constrained mixture design applied to the development of cassava starch–chitosan blown films. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 262-267.
- Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*, 4(1), 12-18.

- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1269.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.
- Pistonesi, M. (2001). Obtención de quitosano estándar y su aplicación para el tratamiento de aguas industriales". Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 38(8), 859-865.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., & Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 367-374.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.

- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Roberts, G. A., & Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(6), 374-377.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., & McHugh, T. H. (2006). Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9262-9267.
- Roller, S., & Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1), 67-77.
- Salleh, E., Muhamad, I., & Khairuddin, N. (2007). Preparation, characterization and antimicrobial analysis of antimicrobial starch based film incorporated with chitosan and lauric acid. *Asian Chitin Journal*, 3, 55-68.
- Sashiwa, H., & Aiba, S. I. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 29(9), 887-908.

- Shao, J., Yang, Y., & Zhong, Q. (2003). Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, 82(3), 395-398.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257-272.
- Teng, W. L., Khor, E., Tan, T. K., Lim, L. Y., & Tan, S. C. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*, 332(3), 305-316.
- Tomé, L. C., Fernandes, S. C., Sadocco, P., Causio, J., Silvestre, A. J., Neto, C. P., & Freire, C. S. (2012). Antibacterial thermoplastic starch-chitosan based materials prepared by melt-mixing. *BioResources*, 7(3), 3398-3409.
- Wang, W., Bo, S., Li, S., & Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(5), 281-285.
- Wu, S., Du, Y., Hu, Y., Shi, X., & Zhang, L. (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of xylan-chitooligomer-zinc complex. *Food chemistry*, 138, 1312-1319.

- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179.
- Yin, Y. J., Yao, K. D., Cheng, G. X., & Ma, J. B. (1999). Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polymer international*, 48(6), 429-432.
- Zeng, L., Qin, C., Chi, W., Wang, L., Ku, Z., & Li, W. (2007). Browning of chitooligomers and their optimum preservation. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 551-558.
- Zhao, X. R., & Xia, W. S. (2006). Antimicrobial activities of chitosan and application in food preservation. *Chinese Food Research and Development*, 27(2), 157-160.
- Zheng, L. Y., & Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.
- Zuñiga, A., Debbaudt, A., Albertengo, L., & Rodríguez, M. S. (2010). Synthesis and characterization of *N*-propyl-*N*-methylene phosphonic chitosan derivative. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 475-480.