

# Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



## COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DEL QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL HONGO "*Aspergillus niger*" FRENTE AL OBTENIDO A PARTIR DE CRUSTÁCEOS, EN EL EFECTO CICATRIZANTE DE TEJIDO EPITELIAL

Tesis presentada por las bachilleres:

Ceballos Samalvides, Gina Johana

Quiroz Barrios, Ana Sofía Roxana

Para optar el Título Profesional:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

Dra. Valderrama Valencia, María Rosario

AREQUIPA - PERÚ  
2018

**UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas**  
**y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**

Expediente N°. **15048579**  
N° Trámite en Fac. **259-2015**  
Fecha Recep. Fac. **02-12-2015**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **CEBALLOS SAMALVIDES, Gina Johana**  
**QUIROZ BARRIOS, Ana Sofía Roxana**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"COMPARACION DE LAS CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS DEL QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL HONGO *Aspergillus niger* FRENTE AL OBTENIDO A PARTIR DE RESIDUOS DE CRUSTACEOS"**

DICTAMINADORES: 1) **Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga** 2) **Mgter. Fredy Molina Rodríguez**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"COMPARACION DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS DEL QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DE HONGO *Aspergillus niger* FRENTE AL OBTENIDO A PARTIR DE CRUSTACEOS EN EL EFECTO CICATRIZANTE DE TEJIDO EPITELIAL"** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS: **2346 737** (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **11/01/2016**

ASESOR: **Dra. Maria Valderrama Valencia**

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"COMPARACION DE LAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS Y BIOLOGICAS DEL QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL HONGO "*Aspergillus niger*" FRENTE AL OBTENIDO A PARTIR DE CRSUTACEOS, EN EL EFECTO CICATRIZANTE DE TEJIDO EPITELIAL"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

FIRMA FECHA **20/04/2018**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Blgo. Carlos Eitel Paz Aliaga** 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**  
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **22/06/2018**

JURADOS: PRESIDENTE **Blgo. Carlos Eitel Paz Aliaga**  
VOCAL **Dr. Fredy Molina Rodríguez**  
SECRETARIO **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

FECHA **12/07/18** HORA **19.00** LOCAL **SUR C-402**

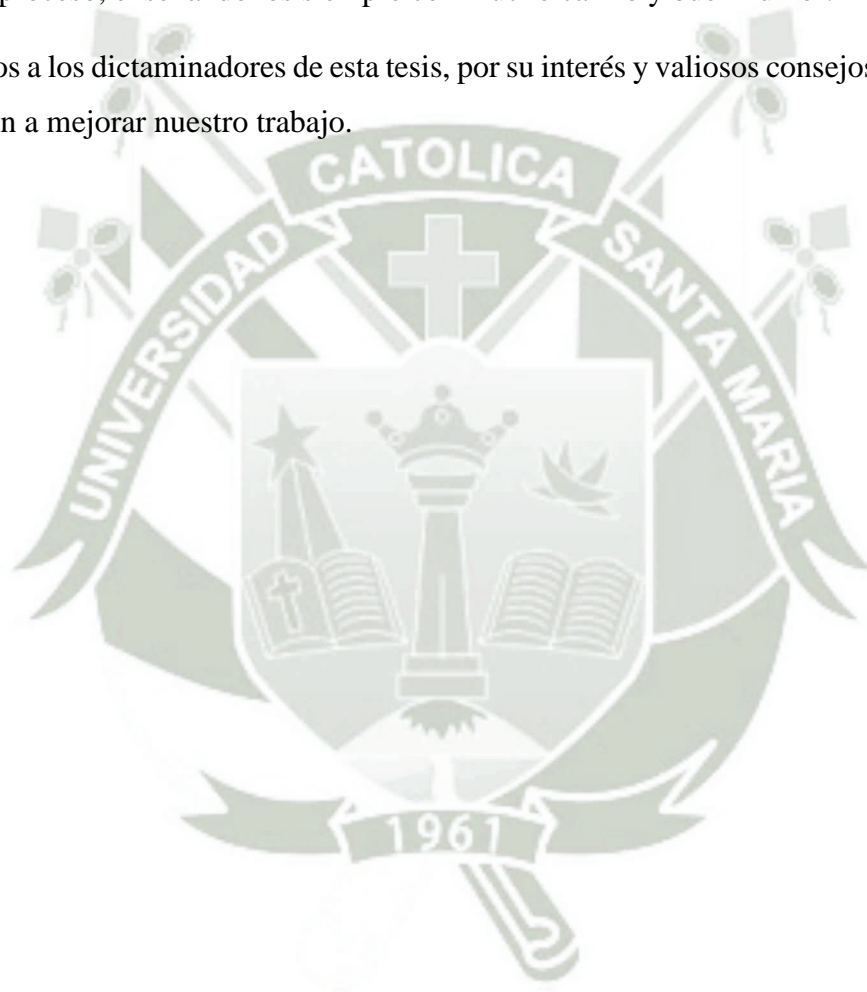
FIRMA DEL DECANO FECHA **06/07/18**

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a Dios, gracias porque nos permites alcanzar esta meta, porque nos has regalado una familia maravillosa que nos ha apoyado de manera incondicional en este difícil camino.

Agradecemos de forma muy especial a nuestra asesora Dra. María Valderrama Valencia por toda la orientación que nos brindó, por ayudarnos tanto al resolver cada duda que surgía a lo largo del proceso, enseñándonos siempre con mucho cariño y buen humor.

Agradecemos a los dictaminadores de esta tesis, por su interés y valiosos consejos, los cuales nos ayudaron a mejorar nuestro trabajo.



## DEDICATORIA

*A mi adorable hijo Marcelo Ernesto, mi fiel compañerito en este camino, que es mi motor y motivo.*

*A mis padres Carlos y Gina por darme todo su amor, paciencia y comprensión, pero sobretodo haberme apoyado en todo momento.*

*A mi esposo Ernesto por su amor e incondicional apoyo.*

*A mi hermana Karla por ser un ejemplo de optimismo y superación.*

*A mis abuelitos por su inmenso amor.*

*A mis tíos por compartir sus conocimientos y ser un ejemplo a seguir.*

*A toda mi familia que me acompañó en este camino para que se cumpla este primer objetivo.*

**Gina Johana Ceballos Samalvides**

*A mi hermosa hija Valentina, la fuente de motivación más grande que llegó a mí vida para llenarla de optimismo y perseverancia. El amor inmenso que siento por tí hace que quiera ser cada día mejor.*

*A mi mamá Carmen, porque sin tí esto no hubiera sido posible, gracias por todo tu amor y apoyo, por cada palabra de aliento cuando sentía que todo se me venía encima, gracias por tanta paciencia y preocupación por el avance de esta tesis*

*A mi esposo Diego, esta meta cumplida es para ambos, gracias por tu apoyo incondicional, por contagiarme tu optimismo que más de una vez lo necesitaba, por entender muchas veces mi mal genio y tranquilizarme, gracias por ser mi compañero ideal.*

*A mis hermanos Liliana y Carlos, a pesar de la distancia siempre están ahí con la palabra exacta en el momento preciso, gracias por sus consejos sé que siempre buscan lo mejor para mí.*

**Ana Sofía Roxana Quiroz Barrios**

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	I
ABSTRACT.....	III
INTRODUCCIÓN .....	V
OBJETIVO GENERAL.....	VI
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	VI
HIPÓTESIS.....	VI
CAPÍTULO I .....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Polímeros .....	1
1.1.1 Naturales.....	2
1.1.2 Polímeros sintéticos orgánicos .....	2
1.1.3 Polímeros semi-sintéticos.....	2
1.1.4 Polímeros inorgánicos .....	2
1.2 Generalidades de la Quitina.....	2
1.2.1 Estructura de la quitina.....	2
1.3 Generalidades del quitosano .....	3
1.3.1 Estructura del quitosano .....	4
2. Obtención de quitina.....	4
3. Origen de la quitina.....	6
3.1 A partir del Hongo <i>Aspergillus niger</i> .....	6
3.1.1 Aplicaciones del hongo <i>Aspergillus niger</i> : .....	7
3.1.2 Morfología del hongo .....	8
3.2 A partir de crustáceos.....	9
3.2.1 Clasificación de acuerdo a Orantes A. 2015 .....	10
3.2.1.1 Malacóstracos o Crustáceos Superiores.....	10
3.2.1.2 Entomóstracos o Crustáceos Inferiores.....	12
3.3 Procesos para la obtención de quitosano a partir de la quitina .....	13
4. Caracterización de las propiedades fisicoquímica del quitosano.....	14
4.1 Espectroscopía en el infrarrojo .....	14
4.2 Grado de N-desacetilación. Por el método Potenciométrico según (Parada et al., 2004) 16	

4.3 Porcentaje de proteína. Por el método de Kjeldahl A.O.A.C. 1984 según (Hernández et al., 2009) .....	17
4.4 Rendimiento global. Según (Rowe et al., 2009) .....	18
4.5 Porcentaje de ceniza- Por el método gravimétrico. A.O.A.C. 923.23, 2005 según (Tello E. 2017) .....	18
4.6 Porcentaje de humedad. Por el método de gravimetría (Rowe et al., 2009).....	19
4.7 Porcentaje de materia insoluble. Según (Rowe et al., 2009) .....	19
4.8 Viscosidad y peso molecular. Por el método de viscosimetría (Rinaudo et al., 1993)...	19
5. Propiedades y aplicaciones .....	21
6. Caracterización de las propiedades biológicas del quitosano .....	22
6.1 Efecto cicatrizante del quitosano .....	22
6.2 Cicatrización .....	22
6.2.1 Tipos de cicatrización de las heridas .....	22
6.2.1.1 Cierre primario.....	22
6.2.1.2 Cierre secundario .....	23
6.2.1.3 Cierre terciario .....	23
6.2.2 Proceso de cicatrización: .....	23
6.2.2.1 Inflamación o reacción.....	23
6.2.2.2 Proliferación, granular o regeneración.....	24
6.2.2.3 Maduración o remodelación .....	24
6.3 Método de Tensión .....	24
 CAPÍTULO II.....	 25
MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
2.1 Materiales.....	25
2.1.1. Reactivos.....	25
2.1.2 Equipos .....	26
2.1.3 Material de vidrio.....	26
2.1.4 Instrumentos u otros.....	27
2.1.5 Material Biológico.....	27
2.2 Métodos .....	28
2.2.1 Obtención de la cepa <i>Aspergillus niger</i> .....	28
2.2.2 Identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i> .....	28
2.2.3 Crecimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i> en diferentes sustratos .....	28

2.2.4 Crecimiento del hongo en medio líquido – YPD .....	29
2.2.5 Extracción de quitosano a partir del hongo <i>Aspergillus niger</i> Según (Alzate et al., 2014).....	29
2.2.6 Extracción del quitosano a partir de crustáceos .....	30
2.2.7 Caracterización físico-química del quitosano obtenido por <i>A. niger</i> frente al obtenido de crustáceos.....	30
2.2.7.1 Determinación del quitosano por espectroscopía en IR.....	30
2.2.7.2 Determinación del Grado de N-desacetilación por el método potenciométrica 31	
2.2.7.3 Determinación del porcentaje de proteína por el método KJELDAHL: A.O.A.C 1984 .....	31
2.2.7.4 Determinación del rendimiento global según (Rowe et al., 2009) .....	32
2.2.7.5 Determinación del porcentaje de ceniza por el método gravimétrico. A.O.A.C. 923.23, 2005. Según (Tello E. 2017) .....	32
2.2.7.6 Determinación del porcentaje de humedad por el método de gravimetría. (Rowe et al., 2009).....	32
2.2.7.7 Determinación del porcentaje de materia insoluble. (Rowe et al., 2009) .....	33
2.2.7.8 Determinación de la viscosidad y el peso molecular por el método de viscosimetría. (Rinaudo et al., 1993).....	33
2.2.8 Caracterización biológica del quitosano obtenido de <i>A. niger</i> frente al obtenido de crustáceos a través del efecto cicatrizante. (García T. & Roca J., 2008) .....	33
2.2.8.1 Ambientación o acondicionamiento .....	33
2.2.8.2 Depilación .....	33
2.2.8.3 Incisiones y sutura .....	34
2.2.8.4 Aplicación del ungüento: .....	34
2.2.9 Determinación de la fuerza de tensión: .....	34
 CAPÍTULO III.....	 35
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
3.1 Proceso de identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i> .....	35
3.2 Análisis del tiempo de dispersión del micelio de <i>Aspergillus niger</i> en diferentes sustratos .....	36
3.3 Extracción de Quitosano .....	37
3.3.1 Extracción de Quitosano a partir de crustáceos.....	37

3.3.2 Extracción de Quitosano a partir de <i>A. niger</i> .....	38
3.4 Caracterización físico-química del quitosano obtenido por <i>A. niger</i> frente al obtenido de crustáceo .....	38
3.4.1 Espectroscopia en IR de quitosano puro frente los obtenido de crustáceos y <i>Aspergillus niger</i> .....	38
3.4.2 Determinación del Grado de N-desacetilación por el método potenciométrico ....	40
3.4.3 Determinación del porcentaje de proteína por el método KJELDAHL .....	43
3.4.4 Determinación del porcentaje de humedad.....	44
3.4.5 Determinación del porcentaje de ceniza .....	45
3.4.6 Determinación del porcentaje de materia insoluble.....	46
3.4.7 Determinación de la viscosidad y el peso molecular por el método de viscosimetría.....	47
3.4.8 Caracterización biológica del quitosano obtenido de <i>A. niger</i> frente al obtenido de crustáceos a través del efecto cicatrizante por el método de Fuerza de tensión....	51
RECOMENDACIONES Y/O SUGERENCIAS .....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS .....	67



## ÍNDICE DE FIGURAS

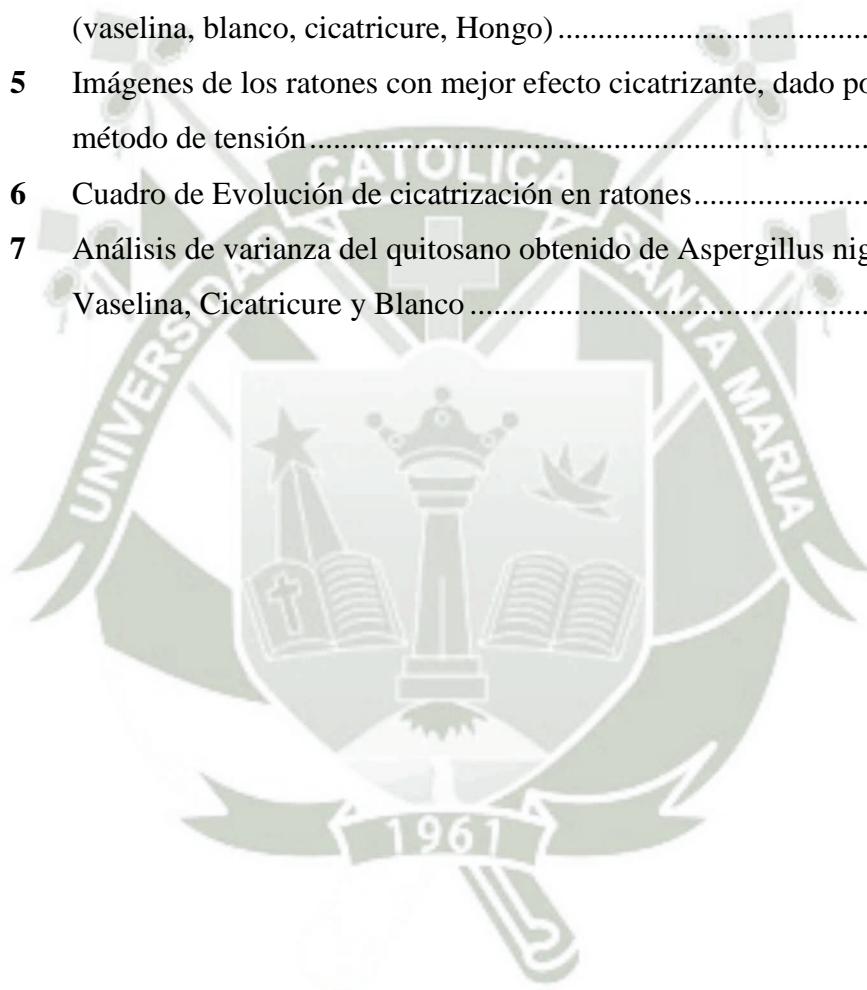
<b>Figura N°1.</b> Estructura de la quitina .....	3
<b>Figura N°2.</b> Estructura del quitosano.....	4
<b>Figura N°3.</b> Estructura unicelular del <i>Aspergillus niger</i> .....	7
<b>Figura N°4.</b> Estructura típica de los Malacóstracos o Crustáceos superiores.....	12
<b>Figura N°5.</b> Estructura típica de los crustáceos inferiores.....	13
<b>Figura N°6.</b> Diagrama simplificado de un espectrómetro por transformada de Fourier ..	15
<b>Figura N°7.</b> Característica macroscópica del hongo <i>Aspergillus niger</i> .....	35
<b>Figura N°8.</b> Vista de cepa <i>Aspergillus niger</i> al microscopio (X40) .....	36
<b>Figura N°9.</b> Molienda del crustáceo .....	37
<b>Figura N°10.</b> Quitosano extraído de crustáceos .....	37
<b>Figura N°11.</b> <i>A. niger</i> .....	38
<b>Figura N°12.</b> Quitosano extraído del <i>A. niger</i> .....	38
<b>Figura N°13.</b> Espectro Infrarrojo de Quitosano Puro en el rango de 1500 – 3600 $\text{cm}^{-1}$ ..	38
<b>Figura N°14.</b> Espectro Infrarrojo de Quitosano extraído de Crustáceos en el rango de 1500 - 3600 $\text{cm}^{-1}$ .....	39
<b>Figura N°15.</b> Espectro Infrarrojo de Quitosano extraído del Hongo <i>A. niger</i> en el rango de 1500 – 3600 $\text{cm}^{-1}$ .....	39
<b>Figura N°16.</b> Inoculación del hongo <i>A. niger</i> en diferentes sustratos .....	69
<b>Figura N°17.</b> Crecimiento del hongo <i>A. niger</i> en cascara de naranja.....	70
<b>Figura N°18.</b> Crecimiento del hongo <i>A. niger</i> en granos de arroz .....	70
<b>Figura N°19.</b> Crecimiento del hongo <i>A. niger</i> en cascara de arroz.....	71
<b>Figura N°20.</b> Inicio del proceso de extracción de quitosano a partir de crustáceos .....	71
<b>Figura N°21.</b> Inicio del proceso de extracción de quitosano a partir del hongo <i>A. niger</i> ..	71
<b>Figura N°22.</b> Quitosano extraído a partir de crustáceos .....	72
<b>Figura N°23.</b> Quitosano extraído a partir del hongo <i>A. niger</i> .....	72
<b>Figura N°24.</b> Ungüentos producidos a partir del quitosano extraído a partir de crustáceos a diferentes concentraciones.....	72
<b>Figura N°25.</b> Ungüentos producidos a partir del quitosano extraído a partir del hongo <i>A.</i> <i>niger</i> a diferentes concentraciones .....	73
<b>Figura N°26.</b> Incisión generada en rata .....	73
<b>Figura N°27.</b> Sutura del corte .....	73
<b>Figura N°28.</b> Aplicación del método de tensión.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°1.</b>	Determinación del Grado de N-desacetilación (%NH <sub>2</sub> ) del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> frente al obtenido de crustáceos.....	41
<b>Tabla N°2.</b>	Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos .....	42
<b>Tabla N°3.</b>	Determinación del porcentaje de proteína % del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> frente al obtenido de crustáceos.....	43
<b>Tabla N°4.</b>	Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos .....	43
<b>Tabla N°5.</b>	Determinación del porcentaje de humedad del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> frente al obtenido de crustáceos.....	44
<b>Tabla N°6.</b>	Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos .....	44
<b>Tabla N°7.</b>	Determinación del porcentaje de ceniza del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> frente al obtenido de crustáceos.....	45
<b>Tabla N°8.</b>	Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos .....	45
<b>Tabla N°9.</b>	Determinación del porcentaje de materia insoluble del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> frente al obtenido de crustáceos.....	46
<b>Tabla N°10.</b>	Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos .....	46
<b>Tabla N°11.</b>	Determinación de la viscosidad del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> .....	47
<b>Tabla N°12.</b>	Determinación de la viscosidad del quitosano obtenido de crustáceos.....	47
<b>Tabla N°13.</b>	Determinación del peso molecular del quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i> frente al obtenido al quitosano de crustáceos y un quitosano comercial .....	48
<b>Tabla N°14.</b>	Rendimiento Global de Quitosano obtenido a partir de <i>A. niger</i> , crustáceos y comercial .....	49
<b>Tabla N°15.</b>	Comparación de las propiedades Físico-química de quitosano comercial y los obtenidos experimentalmente .....	50
<b>Tabla N°16.</b>	Resultados del método de Fuerza de Tensión .....	51

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N° 1</b>	Contenido de quitina en diferentes organismos.....	5
<b>Cuadro N° 2</b>	Análisis de varianza del quitosano obtenido de crustáceos y Aspergillus niger .....	52
<b>Cuadro N° 3</b>	Análisis de Dunnett entre los insumos utilizados (vaselina, cicatricure y blanco vs el hongo a 0.5).....	52
<b>Cuadro N° 4</b>	Análisis de comparación de medias entre los insumos probados (vaselina, blanco, cicatricure, Hongo).....	53
<b>Cuadro N° 5</b>	Imágenes de los ratones con mejor efecto cicatrizante, dado por el método de tensión.....	67
<b>Cuadro N° 6</b>	Cuadro de Evolución de cicatrización en ratones.....	68
<b>Cuadro N° 7</b>	Análisis de varianza del quitosano obtenido de Aspergillus niger, Vaselina, Cicatricure y Blanco .....	69



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N°1.</b> Tiempo de dispersión del micelio en diferentes sustratos .....	36
<b>Gráfico N°2.</b> Curva de titulación potenciométrica del quitosano obtenido de <i>A. niger</i> (pH VS. Gasto).....	40
<b>Gráfico N°3.</b> Curva de titulación potenciométrica del quitosano obtenido de crustáceos (pH VS. Gasto).....	40
<b>Gráfico N° 4.</b> Medias marginales estimadas vs. Concentración de quitosano .....	52



## ABREVIATURAS

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
°C	Grados Celsius
C	Carbono
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cr	Cromo
FIFRA	Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide act
gr	Gramos
GD	Grado de desacetilación
GRAS	Generally Recognized as Safe
HCl	Ácido clorhídrico
IR	Infrarrojo
KBr	Bromuro de potasio
Kg	Kilogramo
L	Litro
m	Masa
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mol	Unidad de cantidad de materia
N	Nitrógeno
N	Normalidad
NaOH	Hidróxido de sodio
O	Oxígeno
PVC	Policloruro de vinilo
Pc	Peso del crisol
Pcz	Peso del crisol y ceniza
Pmh	Peso de la muestra húmeda
Pms	Peso de la muestra seca

RR	Peso de la muestra al final del proceso
RT	Peso de la muestra al inicio del proceso
TSCA	Chemicals under the toxic Substances control act
u.m.a	Unidad de masa atómica
V	Volumen
YPD	Yeast extract peptone dextrose
$\mu\text{m}$	Micra
$\eta$	Viscosidad
$\eta$ red	Viscosidad reducida



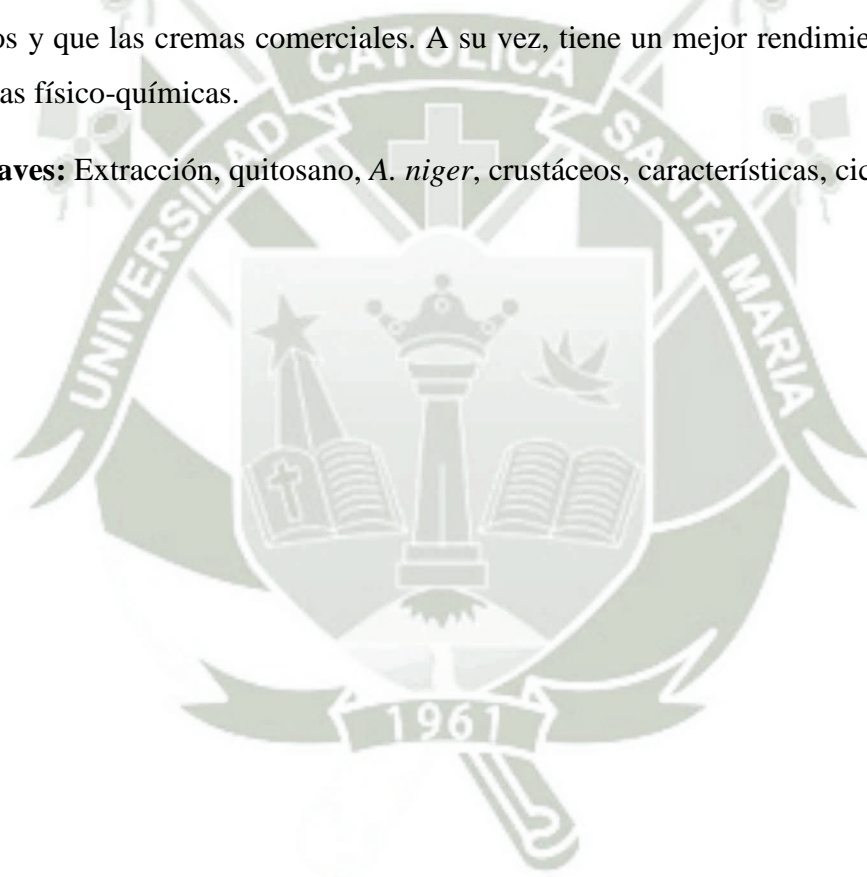
## RESUMEN

Aproximadamente un 30% del peso de los crustáceos es utilizado como alimento y el 70% restante es utilizado para obtener biopolímeros muy importantes a nivel mundial, como es el caso de la quitina y su derivado quitosano, ya que con éste se nos permite obtener un producto natural con propiedades terapéuticas ya que el quitosano posee ciertas propiedades (biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad) y ciertas características (humectantes y antibactericidas) que lo hacen muy útil para el tratamiento de lesiones en la piel, lo cual ayuda en el proceso de cicatrización de heridas. Considerando de esta forma a los crustáceos como la fuente principal de este importante biopolímero, sin embargo la obtención del quitosano está limitada a la temporada de extracción. Por esta razón, se propuso buscar una fuente de obtención alterna a partir de la pared celular del hongo *Aspergillus niger* y de esta forma comparar las propiedades físico químicas y propiedades biológicas, evaluando el efecto cicatrizante en el tejido epitelial de ratón.

Para realizar la extracción de quitosano a partir de *Aspergillus niger*, se le hizo crecer y multiplicar las esporas, se identificó macro y microscópicamente al hongo y luego se extrajo el quitosano de las paredes celulares del hongo obtenido. Se separó a la quitina de diferentes proteínas, sales inorgánicas y pigmentos por métodos de desproteínización, desmineralización y desacetilación. Una vez obtenido el quitosano se llevó a cabo la caracterización físico-química determinando el grado de desacetilación utilizando el método potenciométrico (quitosano fúngico: 92,18%, quitosano extraído a partir de crustáceos: 79,83%), se obtuvo el porcentaje de proteína mediante el método de Kjeldah (quitosano fúngico: 41,12%, quitosano

extraído a partir de crustáceos: 40,06%), se halló la viscosidad y peso molecular por el método viscosimétrico (quitosano fúngico:  $3,88 \times 10^6$  gr/mol, quitosano extraído a partir de crustáceos:  $3,77 \times 10^6$  gr/mol, a su vez se realizó la medición del porcentaje de ceniza (quitosano fúngico: 0,83%, quitosano extraído a partir de crustáceos: 2,92%) humedad (quitosano fúngico: 10,19%, quitosano extraído a partir de crustáceos: 8,31%) y materia insoluble (quitosano fúngico: 1,34%, quitosano extraído a partir de crustáceos: 2,58%), estos últimos parámetros fueron hallados para determinar el grado de purificación del quitosano obtenido. Posteriormente se evaluó el poder cicatrizante, generando ungüentos y comparándolos con cremas de uso comercial. Los resultados obtenidos nos demuestran que el quitosano obtenido a partir del *Aspergillus niger* bajo la forma de ungüento presenta un mayor efecto cicatrizante a una concentración de 0,5%, en comparación al ungüento hecho a base de quitosano extraído de crustáceos y que las cremas comerciales. A su vez, tiene un mejor rendimiento y mejores características físico-químicas.

**Palabras claves:** Extracción, quitosano, *A. niger*, crustáceos, características, cicatrizante.







### ABSTRACT

Approximately 30% of the weight of the crustaceans is used as food and the remaining 70% is used to obtain very important biopolymers worldwide, as is the case of chitin and its chitosan derivative, since with this we are allowed to obtain a natural product with therapeutic properties since chitosan has certain properties (biocompatibility, biodegradability and toxicity) and certain characteristics (humectants and antibactericides) that make it very useful for the treatment of skin lesions, which helps in the healing process of wounds. Considering crustaceans in this way as the main source of this important biopolymer, however, obtaining chitosan is limited to the extraction season. For this reason, it was proposed to look for an alternative source of obtaining from the cell wall of the *Aspergillus niger* fungus and in this way to compare the physical and chemical properties and biological properties, evaluating the cicatrising effect in mouse epithelial tissue.

To perform the extraction of chitosan from *Aspergillus niger*, the spores were grown and multiplied, the fungus was identified macro and microscopically, and then the chitosan was extracted from the cell walls of the obtained fungus. Chitin was separated from different proteins, inorganic salts and pigments by deproteinization, demineralization and deacetylation methods. Once the chitosan was obtained, the physical-chemical characterization was carried out determining the degree of deacetylation using the potentiometric method (fungal chitosan: 92.18%, chitosan extracted from crustaceans: 79.83%), the percentage of protein by the method of Kjeldah (fungal chitosan: 41.12%, chitosan extracted from crustaceans: 40.06%), viscosity and molecular weight were found by the viscosimetric method (fungal chitosan:  $3.88 \times 10^6$  gr /

mol, chitosan extracted from crustaceans:  $3.77 \times 10^6 \text{gr} / \text{mol}$ , in turn, the percentage of ash was measured (fungal chitosan: 0.83%, chitosan extracted from crustaceans: 2.92%) humidity (fungal chitosan: 10.19%, chitosan extracted from crustaceans: 8.31%) and insoluble matter (fungal chitosan: 1.34%, chitosan extracted from crustaceans: 2.58%), these latter parameters were found to determine the degree of chitosan purification or Afterwards, the healing power was evaluated, generating ointments and comparing them with creams for commercial use. The results obtained show that the chitosan obtained from *Aspergillus niger* in the form of ointment has a greater healing effect at a concentration of 0.5%, compared to the ointment made from chitosan extracted from crustaceans and commercial creams. At the same time, it has a better performance and better physical-chemical characteristics.

**Keywords:** Extraction, chitosan, *A. niger*, crustaceans, characteristics, healing.



## INTRODUCCIÓN

La quitina y el quitosano son dos biopolímeros que poseen la ventaja de ser conocidos por la naturaleza desde hace millones de años. En efecto, si se hace caso de infinidad de hallazgos paleontológicos, es posible asignarle a la quitina una edad de al menos 570 millones de años, al haber sido encontrada en el exoesqueleto de artrópodos acuáticos fósiles conocidos como trilobites, que datan de la era paleozoica. (Larez C. 2006).

La quitina es el principal componente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, también se encuentra en las paredes celulares de ciertos hongos (Castro N. & Vidal C., 2015)

Es estructuralmente parecido a la celulosa, siendo el segundo polímero más abundante y más ampliamente distribuido en seres vivos después de esta. Se calcula que su tasa de regeneración en la biosfera es de casi el doble de la celulosa (Goycoolea et al., 2004)

Se estima que cada año se producen en la naturaleza alrededor de 100 billones de toneladas de quitina presente en crustáceos, insectos, moluscos y hongos, lo cual convierte a la quitina en la fuente de biomasa disponible en el planeta menos explotada (Tharanathan et al., 2003)

El quitosano es uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales. Se deriva de la quitina mediante la desacetilación de la misma en condiciones muy alcalinas y a altas temperaturas (Hosokawa et al., 1990)

En la actualidad la producción de quitosano se aproxima a las 70 mil toneladas, esta cantidad es insuficiente para atender la creciente demanda mundial de quitosano, se necesita obtener

una fuente alternativa a la de los crustáceos que sea confiable, económica y amigable con el medio ambiente. (Barra et al., 2012)

La metodología para obtener quitosano a partir de crustáceos es más complicada, se requiere de un tratamiento agresivo para poder lograr el objetivo y muchas veces para ello, se utilizan insumos tóxicos los cuales se quiere evitar utilizar; a su vez, este quitosano es inconsistente en cuanto a sus propiedades físico-químicas debido a la variabilidad en la materia prima. (Berghoff C. 2011). Debido a estos inconvenientes, se desea encontrar una nueva fuente de quitosano, la cual sea una opción más favorable y eficiente.

El quitosano extraído a partir de crustáceos se realiza utilizando bases fuertes y utilizando altas temperaturas durante periodos de tiempo muy largos; esto conlleva a que el proceso de obtención sea laborioso y muy costoso. (Crestini et al., 1996). Por el contrario se estima que el costo de producción a partir de cepas fúngicas sea un 30% menos que el costo de producción a partir de crustáceos. (Morales J. & Rojas D. 2012)

## OBJETIVO GENERAL

Comparar propiedades físico-químicas, grado de desacetilación, porcentaje de proteína, humedad, ceniza, materia insoluble, viscosidad, peso molecular y biológicas del quitosano obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* frente al obtenido a partir de crustáceos, en el efecto cicatrizante del tejido epitelial en ratones.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer quitosano a partir del hongo *Aspergillus niger* y a partir de crustáceos.
- Determinar y comparar las propiedades físico-químicas y biológicas del quitosano obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* frente al obtenido a partir de crustáceos.
- Determinar y comparar el efecto cicatrizante del quitosano obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* y de crustáceos.

## HIPÓTESIS

Dado que el quitosano extraído a partir de crustáceos posee propiedades beneficiosas en el efecto cicatrizante del tejido epitelial en ratones, es posible que al extraer quitosano a partir de una fuente fúngica, éste, presente igual o mejores características y propiedades.



## CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

### 1.1 Polímeros

Los polímeros son muy antiguos, tan antiguos como el origen de la vida misma, toda la vida en la tierra se basa en tres tipos de polímeros: DNA, RNA y proteínas. Las macromoléculas o polímeros presentan un elevado peso molecular, una masa superior a 10.000 u.m.a y pueden llegar a valores del orden  $10^{10}$ ; son constituidas por “eslabones” orgánicos denominados monómeros, unidos mediante enlaces covalentes. Los eslabones están formados, fundamentalmente, por átomos de carbono y pueden poseer grupos laterales o radicales con uno o más átomos (Billmeyer, W. 2008)

Los polímeros poseen propiedades peculiares debido al elevado peso molecular y tamaño que poseen las macromoléculas. Si el compuesto está formado por una sola unidad de dicho patrón de átomos, formando así un polímero, se le conoce como “monómero”. Pero si para la obtención de algún polímero se utilizaron dos o más monómeros los cuales son diferentes, entonces su denominación varía a “copolímero”. (Valdivia, P. 2010).

Atendiendo al origen de estas macromoléculas existen estos tipos de polímeros, clasificación según Horta, A. 1982

### 1.1.1 Naturales

Existen en la naturaleza muchos polímeros como la celulosa, caucho natural y además los seres vivos están constituidos por macromoléculas biológicas o biopolímeros (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos)

### 1.1.2 Polímeros sintéticos orgánicos

Comprende todos aquellos que se pueden sintetizar a partir de monómeros orgánicos. Por ejemplo: poliestireno, polimetacrilato de metilo, PVC.

### 1.1.3 Polímeros semi-sintéticos

Se obtienen a partir de reacciones químicas aplicadas a polímeros naturales como por ejemplo la nitrocelulosa, los ésteres o éteres de celulosa o amilosa y el caucho natural vulcanizado.

### 1.1.4 Polímeros inorgánicos

Se consideran inorgánicos todos los que presentan en su cadena átomos distintos de C, O y N. Son los silicatos naturales y los polisiloxanos sintéticos.

## 1.2 Generalidades de la Quitina

La quitina es el principal componentes de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, también se encuentra en las paredes celulares de ciertos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos; y en algas como las diatomeas (Coma et al., 2003; Pastor e Higuera, 2004).

La quitina es una sustancia orgánica más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Sastoque Cala, I., 2007), Es un polisacárido natural, de tonalidad blanca. Amarillenta, rígido y no elástico (Dutta 2002), estructuralmente parecido a la celulosa, siendo el segundo polímero más abundante y más ampliamente distribuido en los seres vivos después de esta. Se calcula que su tasas de regeneración en la biosfera es de casi el doble de la celulosa (Goycoolea et al., 2004).

### 1.2.1 Estructura de la quitina

La quitina es un biopolímero lineal (figura 1) que posee la siguiente estructura lineal: poli [ $\beta$  - (1- 4) - 2 - acetamida - 2 - desoxi - D - glucopiranososa] (Lárez, C. 2003), altamente insoluble en agua, propiedad que esta limita sus aplicaciones; se disuelve

rápidamente en ácidos concentrados, en algunos fluoroalcoholes y soluciones al 5% de cloruro de litio, lo que hace poco práctica para su aplicación (Mármol et al., 2011) y presenta baja reactividad. Otras propiedades relevantes de este biopolímero son su alto peso molecular y su estructura porosa favoreciendo una elevada absorción de agua (Ramírez et al., 2010)

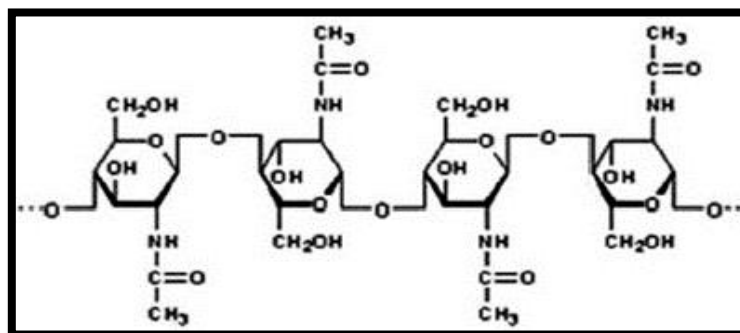


Figura N° 1 Estructura de la quitina

Está constituida por unidades monoméricas de N-acetilglucosamina, estructuralmente similar a la celulosa, con una modificación en la posición C-2 donde presenta un grupo acetamido. Los enlaces glicosídicos son estables en un medio básico, pero en un medio ácido la quitina se degrada en oligómeros y monómeros.

Este biopolímero, existe en la tierra desde hace más de 570 millones de años, ya que se descubrió la presencia de este en los exoesqueletos de artrópodos fósiles; en la actualidad se puede encontrar en los exoesqueletos de insectos, arácnidos y crustáceos, siendo la última la mayor fuente de obtención de este polímero. (Lárez C. 2006).

Entre sus derivados se encuentra el Quitosano, la Astaxantina, las Proteínas, los Pigmentos y el Calcio. Tanto la Quitina como el Quitosano son considerados recursos renovables, y tienen la ventaja de no ser agentes contaminantes ni para el organismo que los utiliza, ni para el medio ambiente que los recibe. (Parada et al., 2004)

### 1.3 Generalidades del quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico derivado de la quitina. Se obtiene principalmente de la desacetilación parcial de la quitina donde el grupo acetamido en el C-2 por desacetilación se convierte en un grupo amino. (Ming-Tsung et al., 2007)

### 1.3.1 Estructura del quitosano

El quitosano posee subunidades poli [ $\beta$ - (1- 4) – 2 – amino – 2 – desoxi – D – glucopiranosas] (figura 2). Los grupos amino son responsables de las características distintas atribuidas a este polímero básico. Es el único polisacárido natural de carácter catiónico; sus características y propiedades pueden variar dependiendo de la longitud de las cadenas y del grado de desacetilación. (Aranaz et al., 2009) La solubilidad del quitosano, biodegradabilidad, reactividad y adsorción de muchos sustratos dependen de la cantidad de grupos amino protonados en la cadena polimérica. (Guibal, 2006).

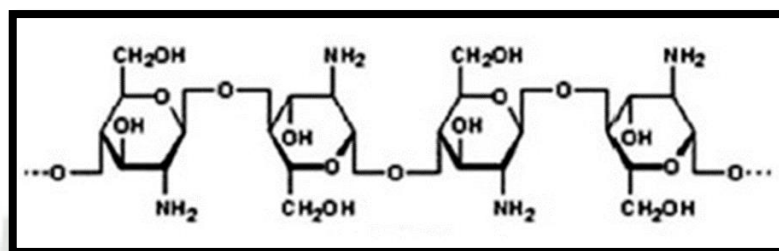


Figura N° 2 Estructura del quitosano

Las propiedades de la Quitina y el Quitosano, como por ejemplo el grado de desacetilación, depende principalmente de la fuente de obtención y de su método de producción. Asimismo, su contenido de humedad permitirá establecer sus grados de calidad. (Conde, M. 2007).

Tanto la quitina como el quitosano comparten una estructura química muy similar a la del polímero más abundante en la naturaleza, la celulosa, sin embargo, sus grupos acetamida y amino respectivamente le confieren propiedades únicas y diferentes (Karunaratne, 2012).

## 2. Obtención de quitina

El quitosano existe de forma natural en algunos organismos pero en menor proporción que la quitina, por lo que es necesario someter a la quitina a una serie de procesos para finalmente lograr obtener el quitosano. (Pastor e Higuera, 2004).

Se le considera a la quitina como el segundo polímero más abundante y ampliamente distribuido en seres vivos. Se estima que cada año se producen alrededor de 100 billones de toneladas de quitina presentes en crustáceos, insectos, moluscos y hongos, lo cual convierte a la quitina en la fuente de biomasa disponible en el planeta menos explotada. (Tharanathan & Kittur, 2003). A pesar de su amplia distribución en la naturaleza, la principal fuente comercial la constituyen los desechos de camarón y cangrejo.



**Cuadro N° 1 Contenido de quitina en diferentes organismos**

<b>FUENTE</b>	<b>CONTENIDO DE QUITINA (%)</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>CRUSTÁCEOS</b>		
Cangrejo (Cáncer)	72,1	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo (Carcinus)	64,2	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo rey (Paralithodes)	35,0	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo azul (Callinectes)	14	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo ( <i>Sylla cerrata</i> )	23,0	Oudor, Odote y col. , 2005
Camarón (Crangon)	69,1	Tharanathan y Kittur, 2003
Camarón de Alaska	28,0	Tharanathan y Kittur, 2003
Camarón ( <i>Penaeus spp</i> )	23,2	Cira y col., 2002
Langosta (Nephrops)	69,8	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta ( Homarus)	65	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta ( <i>Panilirus ornatus</i> )	15	Oudor, Odote y col. , 2005
Gamba	67,9	Oudor, Odote y col. , 2005
Gamba ( <i>Penaeus monodon</i> )	23,2	Chandumpai y col., 2004
Gamba ( <i>Penaeus indicus</i> )	28,0	Oudor, Odote y col. , 2005
<b>MOLUSCOS</b>		
Concha de ostra ( <i>Ostrea edulis</i> )	40,2	Tharanathan y Kittur, 2003
Concha de almeja	6,1	Tharanathan y Kittur, 2003
Pluma de calamar	41,0	Tharanathan y Kittur, 2003
Pluma de calamar ( <i>L. lessoniana</i> )	36,06	Chandumpai y col., 2004
Pluma de calamar ( <i>L. formosana</i> )	36,55	Chandumpai y col., 2004
<b>HONGOS</b>		
<i>Aspergillus Niger</i>	42,0	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Penicillium notatum</i>	18,5	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>P. chrysogenum</i>	20,1	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Agaricus bisporus</i> (champiñón blanco)	27	Wu y col., 2004

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Mucor rouxii</i>	44,5	Wu y col., 2004
<i>Lactarius vellereus</i> (champiñón)	19,0	Tharanathan y Kittur, 2003
<b>INSECTOS</b>		
Cucaracha ( <i>Periplaneta americana</i> )	2,0	Tharanathan y Kittur, 2003
Cucaracha ( <i>Blatella sp.</i> )	18,14	Tharanathan y Kittur, 2003
Escarabajo ( Coleóptera)	35	Tharanathan y Kittur, 2003
Mosca (Diptera)	54,8	Tharanathan y Kittur, 2003
Mariposa sulfurada común ( <i>Colias philodice</i> )	64,0	Tharanathan y Kittur, 2003
Mosca azul larva ( <i>Calliphora erythrocephala</i> )	12,0	Oudor, Odote y col. , 2005
Gusano de cera ( <i>Galleria melonella</i> )	33,7	Tharanathan y Kittur, 2003

**Fuente:** Rinaudo, 2006; Kumar 2000

### 3. Origen de la quitina

#### 3.1 A partir del Hongo *Aspergillus niger*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en el año 1729 por P.A Micheli, que marco el punto de partida de la micología como ciencia en su obra “Nova Plantarum Genera”. La denominación del género se debe a la similitud morfológica de la cabeza conidial con un “*Aspergillum*”, un instrumento religioso que era utilizado para dispersar agua bendita. Posteriormente, el término fue validado por Link en 1809. Este género está encuadrado dentro del orden *Eurotiales* y pertenece a la familia *Trichocomaceae*. (Accensi, F. 2000).

En la clasificación de los hongos filamentosos, la forma en la que estos se reproducen es un factor muy importante. Desde hace mucho tiempo, el género *Aspergillus* es incluido dentro de los *deuteromicetos* o también llamados “hongos imperfectos”, ya que en ellos solo se les conoce la forma asexual o anamórfica y por eso no pueden clasificarse como ascomicetos, basidiomicetos o zigomicetos. Los *deutoromicetos* se clasifican en base a su morfología asexual, aunque en la actualidad se conocen un 5% de especies a las que se les conoce su forma sexual. (Seifert & Gams, 2000).

En el caso de *Aspergillus* aproximadamente un tercio de las especies poseen forma sexual conocida, como por ejemplo *Aspergillus eurotium*, *Emericella*, *Ochraceus*. (Geiser, 2008).

El rango de temperatura para el crecimiento va desde 5°C hasta aproximadamente los 40°C, siendo para *A. niger*, la temperatura óptima de crecimiento el rango comprendido entre los 25-30°C. (Guevara et al., 2007).

El conidióforo característico de *Aspergillus niger*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes: vesícula, estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final a veces separada por el septo que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen células conidiogénidas, denominadas habitualmente fiálides. Las cabezas conidiales que solo presentan fiálides se denomina uniseriadas y las que representan fiálides y méticas, se denominan bisetidas. Se caracteriza por formar colonias de color negro, densas y por formar micelios de color blanco-transparente. (Guevara et al., 2007). Este hongo se caracteriza por ser un fitopatógeno, ya que puede atacar algunas especies vegetales, sin embargo la base de su alimentación son los azúcares, pero por lo general se puede encontrar en el medio ambiente, sobre todo en lugares húmedos. (Carrillo, 2003).



Figura N° 3 Estructura unicelular del *Aspergillus niger*  
(Imagen <http://atlasmicologia.blogspot.com.br/>)

### 3.1.1 Aplicaciones del hongo *Aspergillus niger*:

Generalmente, a los *Aspergillus* se los consideraba peligrosos, esto debido a que este hongo se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, desarrollándose en vegetales en estado de descomposición, siendo su medio ideal los ambientes oscuros, húmedos y cerrados, generando muchas veces reacciones alérgicas y enfermedades. Sin embargo se viene demostrando que pueden tener múltiples aplicaciones como por ejemplo: Es comúnmente utilizado en la industria alimentaria para lograr obtener enzimas. El hongo es fermentado en recipientes de aproximadamente 100.000 litros y luego es procesado para obtener: celulasa, invertasa, amiloglucosidasa, amilasa, lactasa, proteasa acida y pectinasa.

Este hongo puede producir una gran variedad de enzimas, tanto propias de este género, como heterologas, generadas por técnicas de ingeniería genética. Se comenta que grandes empresas de fermentación han logrado obtener títulos enzimáticos alrededor de los 10g/L, los cuales, son muy superiores a los niveles usuales de las 4cepas encontradas en la naturaleza (10 a 100 mg/L). (Viniegra, G. 2003).

Es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial, el cual se utiliza comúnmente en bebidas y en la cocina; se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico en su micelio, lo cual puede estar asociado con una alta concentración de oxígeno en el medio líquido y de glucosa, ya que generalmente en algunas industrias alimentan al hongo con melazas, mieles de la industria del azúcar de caña y de remolacha. Es utilizado al igual que el jugo de limón, para evitar que una manzana o la palta oscurezcan en presencia de oxígeno. (Suárez-Herrera, M.A 2004).

En el 2006, la Organización Mundial de la Salud demostró que este hongo poseía propiedades anticancerígenas (para prevenir el cáncer) y antigioegénicas (para reducir las dimensiones de tumores) Regulation of biotechnology under toxic Substances Control Act (TSCA) and FIFRA. Evaluación final sobre el riesgo de *Aspergillus niger*. El hongo *Aspergillus niger* así como algunos otros hongos, contienen en su pared celular biopolímeros quitinosos, principalmente la quitina, de la cual se obtiene quitosano mediante el proceso de desacetilación. El quitosano obtenido a partir de hongos ofrece ciertas ventajas con respecto a los obtenidos de otras fuentes, ya que este se podría producir a gran escala y de manera controlada durante el tiempo deseado (Velásquez C., 2006).

Se ha empleado últimamente al *A. niger* en la biorremediación de ambientes contaminados con Cr (VI) y fenol, estos contaminantes provienen de efluentes industriales de tenerías, elaboración de películas fotográficas, preservación de madera, manufactura de automóviles, refinación de petróleo y actividad agrícola. Esta opción innovadora resulta muy atractiva ya que al utilizar este hongo filamentoso se utiliza menos energía. (Rivera et al., 2007).

### 3.1.2 Morfología del hongo

La pared celular fúngica abarca aproximadamente un 40% de todo el volumen de la célula, esta pared celular es gruesa, es una matriz extracelular conformada por

carbohidratos poliméricos los cuales están entrelazados con proteínas, y también hay presencia de carbohidratos adicionados post-traslacionalmente, algunos de los hongos poseen también melanina. La pared celular también está conformada por polisacáridos: glucán se encuentra en un 29%, manano se encuentra en un 30% y quitina entre un 25-30%; la principal función que tiene la quitina es delinear la célula y conferir la fuerza mecánica a la pared celular (Bardalaye & Nordin 1976). La quitina se encuentra en la pared celular del micelio, esporas y tallo, su concentración depende mucho de la fisiología, medio ambiente y las condiciones en las que la fermentación se da. Por lo tanto recientes avances en tecnologías de fermentación sugieren lograr una producción a gran escala de cultivo de microorganismos que contienen quitina y pueden ser una atractiva fuente de obtención de quitosano. (Khalaf, 2004).

### 3.2 A partir de crustáceos

El nombre crustáceo deriva del latín “*crustacostra*”, se le otorga este nombre debido a la rigidez que el tegumento posee debido a las sales de carbonato de calcio contenidas en la cutícula.

Los crustáceos conforman uno de los grupos zoológicos exitosos, porque abarca un gran número de especies (67 829) (Brusca & Brusca, 2005) y por la diversidad de hábitat que colonizan, por ello se les halla en todas las aguas y latitudes, desde los abismos al borde de la playa, por donde se desplazan en la marea baja, como también otros que se mueven tierra dentro. Presenta una diversidad morfológica muy amplia, ningún otro grupo de plantas o animales lo iguala. (Martin & Davis, 2001).

Su morfología es tan extraordinariamente variada por la diversidad de sus adaptaciones a distintas modalidades de vida, que algunos, modificados por el parasitismo o por la vida fija, sólo fueron reconocidos como crustáceos mediante el estudio de sus formas larvarias. La gran diversidad de crustáceos que integran la fauna marina de las costas Sudamericanas consta de 296 especies que corresponden a 164 géneros y 48 familias. De ellas, 86 son comunes para el Perú y Ecuador, 47 para el Perú y Chile y 59 para los tres países. (GEF-ONUDI-IMARPE-IFOP Manejo integrado Gran ecosistema marino de la corriente de Humboldt).

Los crustáceos pertenecen al grupo de los artrópodos e incluyen desde pulgas de agua (*Artemia*) hasta los más conocidos como langostas, camarones y cangrejos. Poseen afinidades evolutivas con los insectos, como por ejemplo el poseer un esqueleto externo rígido el cual

mudan para poder crecer y pueden adaptarse a una amplia variedad de ambientes.(Gobur, D. 2013).

Todos los crustáceos desempeñan una función primordial en el equilibrio biológico del medio acuático ya que ellos representan la mayor masa del mismo, formando una parte esencial del plancton marino. Por ejemplo: algunos de ellos transforman materia vegetal en animal, ya que ellos se alimentan de fitoplancton, lo cual forma parte de su materia y lo que finalmente servirá de alimento a los animales carnívoros. Existen también otro tipo de crustáceos que viven en el fondo, limpian las aguas de detritos que se acumulan en el mismo. Por todas las razones ya mencionadas los crustáceos ocupan una posición básica en la cadena alimenticia acuática. En los crustáceos su forma de reproducción es sexual y algunos otros se alterna la reproducción sexual y asexual, su ciclo reproductivo está ligado a su ciclo de muda. La mayoría de los crustáceos registra estadios larvarios antes de llegar a su forma adulta. (Simoes et al., 2010)

### **3.2.1 Clasificación de acuerdo a Orantes A. 2015**

Su clasificación es sumamente compleja, distribuyéndose principalmente en dos grandes grupos: malacóstracos o crustáceos superiores, que comprenden a los de mayor talla y más conocidos, y entomóstracos o crustáceos inferiores, que incluyen especies más pequeñas, tales como pulgas de agua, ciprés, ciclops, lepas, balanos, etc.

#### **3.2.1.1 Malacóstracos o Crustáceos Superiores**

Las especies mejor organizadas de los crustáceos superiores (cangrejo de río, langostino, etc.), tienen el cefalotórax cubierto por un caparazón bien desarrollado, que limita a los lados una cavidad que encierra las branquias.

El abdomen está formado por anillos con la estructura típica de los artrópodos. En algunos, aquel termina por el telson, aparato de propulsión en la natación. Cada una de estas regiones posee apéndices.

En el cefalotórax se observan dos pedúnculos oculares, en cuya extremidad lleva el aparato de la visión; dos anténulas y dos antenas (sensoriales); un par de mandíbulas y dos pares de maxilas, cuya misión es triturar y acomodar los alimentos cuando llegan a la boca, y tres pares de patas maxilas que sirven para la prensión de los alimentos; después vienen cinco pares de patas verdaderas. En el cangrejo de río, en el de mar, en la centolla, etc., las pinzas del primer par son muy vigorosas.

Los apéndices abdominales reducidos sirven para la natación, y en las hembras, para retener los huevos.

El aparato digestivo es completo; se inicia en la boca, rodeada por los apéndices bucales, y termina en el ano.

Los órganos respiratorios son las branquias.

La circulación es lacunar; el vaso dorsal presenta un saco contráctil o corazón.

El sistema nervioso es ganglionar, ventral.

Una de las diferencias principales que se observan en las especies que forman este grupo, se halla en la conformación del abdomen. Los langostinos, las langostas de mar, los camarones, etc., tienen el abdomen bien desarrollado y en general, más o menos encorvado por debajo del cefalotórax.

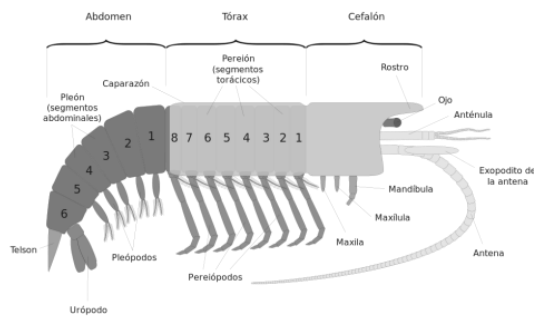
Las langostas, los langostinos, los camarones, etc., son marinos, pero mientras los últimos son nadadores, los otros son principalmente caminadores.

El cangrejo de río sudamericano, la centolla, etc., presentan el abdomen medianamente desarrollado, terminado en un telson pequeño y con el último par de pata locomotora reducida y replegada bajo el caparazón.

Existen otros crustáceos cuyo abdomen blando y disimétrico, lo albergan en el caparazón vacío de un caracol.

Los caparazones habitados por este crustáceo, casi siempre son utilizados por otros animales (anémonas de mar, colonias de hidras, esponjas). Con las anémonas se prestan ayuda mutua, porque aquella defiende al cangrejo con sus tentáculos urticantes, y éste la transporta de un lugar a otro y hasta la alimenta con los restos de su comida.

Los cangrejos de mar se caracterizan por poseer abdomen corto sin aleta caudal, escondido en la cara ventral del cefalotórax, que en general es muy ancho. El primer par de patas locomotoras, termina por pinzas y en algunos, el último par, se compone de patas planas, apropiadas para nadar.



**Figura N° 4 Estructura típica de los Malacóstracos o Crustáceos superiores**  
(Tomada de Wikipedia por el autor Hans Hillewaert)

### 3.2.1.2 Entomóstracos o Crustáceos Inferiores

Entre los crustáceos inferiores, hay algunos que son casi microscópicos, estos habitan principalmente en aguas dulces.

Los ciclops no tienen caparazón y poseen un solo ojo; las dafnias poseen un caparazón bivalvo y tienen también un único ojo. Se mueven a sacudidas, por lo que se les llama “pulgas de agua”.

Hay algunos que viven fijados a las rocas, las maderas flotantes, etc., por medio de un pedúnculo tubuloso, como es el caso de las lepas. Otros se fijan directamente a las rocas o al cuerpo de los peces, cetáceos, moluscos, etc. En las costas se les observa fijados a las conchas de los mejillones; ejemplos son los balanos o bellotas de mar.

El esqueleto de estos crustáceos es rico en quitina, un polímero que es la segunda sustancia más abundante de la tierra y que también está presente en los insectos, los hongos y levaduras. Las plantas y animales sintetizan anualmente más de cien mil millones de toneladas de quitina, pero ésta permanece esparcida en todo el mundo y prácticamente se la ignora. Desde 1930 la industria química ha tratado de encontrarle un uso intensivo y un gran avance se produjo cuando en 1977 se comprobó que el cloruro de litio tiene el poder de disolverla. Dicho descubrimiento abrió insospechadas posibilidades a un empleo múltiple. Trabajos realizados en la Universidad de Delaware, EE.UU., dieron con un método destinado a extraer quitina bajo la forma de finísimos filamentos similares a suturas quirúrgicas reabsorbibles, las que al no contener proteína no provocan irritaciones. En forma paralela se sabe que la quitina contiene una curiosa propiedad cicatrizante de las heridas, que los científicos han tratado de conocer en detalle sin lograrlo hasta ahora. (Revista Creces 1985 Quitina)



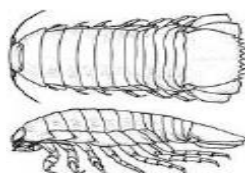


Figura N° 5 Estructura típica de los crustáceos inferiores

### 3.3 Procesos para la obtención de quitosano a partir de la quitina

La quitina se encuentra en sus fuentes naturales asociada a proteínas, pigmentos y sales inorgánicas y para poder ser utilizada, deben ser separados estos compuestos. Por ello, se siguen una serie de pasos para obtener finalmente el quitosano, los procesos que se siguen son de desmineralización, desproteínización, decoloración y desacetilación.

- i. **La desproteínización:** se realiza en medio alcalino, comúnmente NaOH, a temperaturas entre 65 a 100 °C durante 1 hora a 24 horas. La quitina se observa entonces como un sólido de color blanco amarillento y la solución extractora posee un color anaranjado debido a la presencia de proteínas y colorantes extraídos. Las grasas y colorantes presentes en la solución pueden ser recuperados en medio neutro y procesados para utilizarlas en acuicultura como suplemento nutricional. (Stevens et al., 2012).
- ii. **La desmineralización:** se realiza en medio ácido donde los minerales de la matriz quitinosa son separados de la quitina y finalmente por neutralización se obtiene la quitina libre. Para la obtención de quitosano, nuevamente se hace reaccionar la quitina con NaOH en concentraciones muy altas, para promover la hidrólisis del grupo acetamida de la quitina a temperaturas de 80 °C a 120 °C. (Hong Kyoonyoung et al., 2000)
- iii. **La desacetilación:** en este último proceso no se completa, por ello es que el quitosano posee dos diferentes subunidades, unas desacetiladas y otras no. El porcentaje de desacetilación puede variar dependiendo de la concentración de NaOH y de la duración del proceso, entre otros factores. (Jooyeoun et al., 2011)

Si bien las técnicas utilizadas para obtener quitina y quitosano son contaminantes, debido a que se utilizan soluciones de hidróxido de sodio y de ácido clorhídrico los cuales generan residuos corrosivos, es por ello que se debe realizar un manejo adecuado y responsable de las mismas para así aportar un valor agregado y realizar una explotación económica del residuo, y

a su vez disminuir el riesgo de la contaminación del medio ambiente. Durante el proceso, las aguas residuales provenientes de productos secundarios de la reacción, reactivos que no pueden ser reutilizados y aguas de lavado. Se dividieron en dos grupos los efluentes de residuo: Residuos líquidos de la etapa de desproteínización: compuesto principalmente por una importante carga orgánica constituida por proteínas; así como, restos de hidróxido de sodio. El pH de estos residuos líquidos es de aproximadamente 13.85. Residuos líquidos de la etapa de Desmineralización: compuesto por minerales de calcio y magnesio disueltos, y restos de ácido clorhídrico. El pH de estos efluentes es de aproximadamente de 1.04. El uso de una lechada de cal al 5% p/v permite lograr una efectividad de neutralización, es menos costosa que la sosa cáustica y no forma precipitados con el ácido clorhídrico. Un subproducto valioso que se puede recuperar de los residuos líquidos del proceso de desproteínización son las proteínas, que pueden ser utilizadas como suplemento en comida animal de pollos y pescado. (Barra, A. et al., 2012).

#### **4. Caracterización de las propiedades fisicoquímica del quitosano**

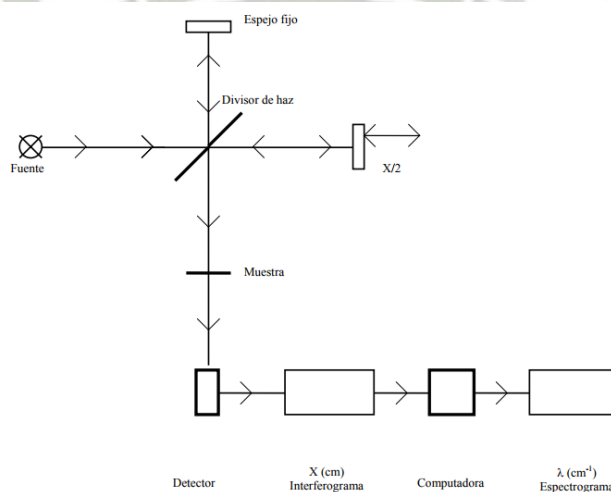
El producto resultante del proceso químico de desmineralización, desproteínización, decoloración y desacetilación de la quitina, presente tanto en el micelio del hongo *A. Niger* como en el exoesqueleto del crustáceo, fueron caracterizados tomando en cuenta sus parámetros más críticos.

Roberts G. (1998) explica que tanto la composición de las cadenas de quitosano, como sus dimensiones, suelen variar dependiendo del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención. Por este motivo, la aplicación de método espectro-fotométrico (IR), la solubilidad y el grado de desacetilación son parámetros que se deben conocer para caracterizar una muestra de este polisacárido, ya que tienen gran incidencia en sus propiedades. Otros parámetros a determinar para su caracterización más completa serían, el peso molecular, el porcentaje de humedad, el contenido de cenizas, las proteínas totales, la determinación del contenido de material insoluble, etc.

##### **4.1 Espectroscopía en el infrarrojo**

La radiación infrarroja abarca aproximadamente las siguientes longitudes de onda: 1 a 100  $\mu\text{m}$ , que corresponde en número de ondas al intervalo 10000 a 100  $\text{cm}^{-1}$ . La mayoría de las moléculas absorben eficientemente radiación infrarroja (IR). Esta energía de los fotones IR que son absorbidos es almacenada por las moléculas en forma de energía vibracional y rotacional. Cada molécula tiene un espectro de absorción IR específico lo cual puede servir como ayuda

para la identificación y cuantificación de su presencia en una muestra. Existen dos tipos de espectrómetros infrarrojos, los dispersivos y los de transformada de Fourier. Un espectrómetro por transformada de Fourier posee tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector. Su funcionamiento es el siguiente: un haz colimado, proveniente de una fuente que emite en toda la región infrarroja, incide sobre un divisor de haz. El haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de los cuales incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo. Los haces son reflejados por ambos espejos y se recombinan al llegar al divisor de haz. Esto da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la posición relativa del espejo móvil con respecto del espejo fijo. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede una absorción selectiva de longitudes de onda y, finalmente, llega al detector. (Gómez R. & Murillo R. 2006).



**Figura N° 6 Diagrama simplificado de un espectrómetro por transformada de Fourier**  
(Gómez R. & Murill R. 2006)

La caracterización del quitosano obtenido se realiza mediante espectroscopia en el infrarrojo (IR) en la región de  $500-4000\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de absorción son obtenidos en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier y sistema ATR. Se señala que uno de los métodos más usados para la identificación de quitina y quitosano es la identificación por Espectrofotometría Infrarroja (IR). En el análisis de estos compuestos por espectroscopia IR se puede identificar, principalmente, los grupos funcionales amida y carbonilo. Para el quitosano las bandas de intensidad media correspondientes a vibraciones de estiramiento del NH ubicadas en la región de  $3500-3300\text{ cm}^{-1}$  y la banda de absorción de intensidad media a fuertes relativa a

vibraciones de deformación del grupo amino a una frecuencia entre 1640 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  en T1. (Vílchez S. 2005)

Generalmente los materiales sólidos poseen una alta absorción como para permitir la transmisión directa de la radiación infrarroja. Existen casos muy excepcionales en los cuales se pueden generar películas muy delgadas del material que permitan, sin mezclarlo con otros, obtener un espectro por transmisión. Las muestras sólidas en polvo, además, presentan otro problema y es que gran parte de la radiación transmitida es dispersada. Una solución para este problema es colocando el sólido finamente pulverizado en un medio líquido cuyo índice de refracción coincida con el de la sustancia. El medio sirve al mismo tiempo como diluyente. Otra opción para preparar muestras sólidas diluidas es el método del comprimido de bromuro de potasio (KBr). La muestra se muele con bromuro de potasio pulverizado y luego se comprime en un troquel, a una presión de  $700 \text{ kg/cm}^2$  en una prensa hidráulica. Así se obtendrá un disco muy delgado suficientemente transparente y como el bromuro de potasio es higroscópico, entonces es casi imposible eliminar el agua atmosférica, en las muestras preparadas por este método se observa siempre la banda del OH. (Gómez, R. & Murillo, R. 2006).

#### **4.2 Grado de N-desacetilación. Por el método Potenciométrico según (Parada et al., 2004)**

El quitosano es un gran biopolímero capaz de ser utilizado para múltiples aplicaciones que van desde el área de remediación ambiental hasta el área de la medicina. El grupo amino que posee este biopolímero es una de sus principales características fisicoquímicas ya que es el responsable de muchas de sus propiedades. Es de suma importancia conocer la cantidad de grupos amino presentes en el biopolímero obtenido para comprender y cuantificar sus interacciones con otros materiales en sus diferentes aplicaciones. Es por eso que conocer el grado de desacetilación es muy importante ya que este es un dato cuantitativo de la cantidad de grupos amino que están presentes en la cadena del biopolímero. (Ramírez et al., 2016). Por lo tanto, el grado de desacetilación se define como el contenido de grupos aminos presentes en la cadena polimérica. Las quitinas tendrán GD inferiores al 60% y los quitosanos presentan niveles de GD superiores al 60%. Para ello, se realizará una determinación potenciométrica para obtener el grado de N-desacetilación.

Se puede considerar al grado de desacetilación como una medida de la pureza del biomaterial.

$$\% \text{NH}_2 = \frac{16.1 (Y - X)}{W} F$$

**Dónde:**

Y: Punto de inflexión mayor (expresado como volumen)

X: Punto de inflexión menor (expresado en volumen)

F: Molaridad de la solución de NaOH

W: Masa en gramos de la muestra

16.1: Factor asociado al tipo de proteína que se utilice

**4.3 Porcentaje de proteína. Por el método de Kjeldahl A.O.A.C. 1984 según (Hernández et al., 2009)**

La quitina se encuentra asociada a proteínas, las cuales posteriormente en el proceso de obtención de quitosano serán tratadas de eliminar. Hoy en día todos los métodos para determinar el contenido proteico son de naturaleza empírica. Un método absoluto es el aislamiento y pesado directo de la proteína pero dicho método se utiliza sólo a veces en investigaciones bioquímicas debido a que es dificultoso y poco práctico. En el año de 1883 el investigador danés Johann Kjeldahl desarrolló el método más usado en la actualidad para el análisis de proteínas (método Kjeldahl) al utilizar la determinación del nitrógeno orgánico. En esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos que pueden estar presentes en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total se convierte mediante esta digestión en sulfato de amonio. La mezcla digerida se neutraliza con una base y se destila posteriormente. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formado se titulan con HCl para determinar el nitrógeno contenido en la muestra. (Santiago F. 2011).

El porcentaje de proteína (Pr) presente en el quitosano se determinará utilizando el método Kjeldahl, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Pr} = \frac{(14.01)(N)(V)(100)(F)}{m (1000)}$$

**Dónde:**

N: Normalidad del HCl

V: Vol. de HCl para la muestra en mL – Vol. de HCl para el blanco en mL.

14.01: Peso atómico del Nitrógeno

m: Masa de la muestra en gramos.

F: 6.25 (Valor asignado para proteínas en general)

#### 4.4 Rendimiento global. Según (Rowe et al., 2009)

El porcentaje de rendimiento obtenido al finalizar un proceso es la relación entre la cantidad de producto obtenida experimentalmente (en situaciones reales) y la cantidad de la muestra con la que se comenzó el proceso, expresado como un porcentaje:

Fórmula utilizada para su determinación:

$$RG = \frac{RR}{RT} \cdot 100$$

**Dónde:**

RT = cantidad en gramos de la muestra con la que se comenzó el proceso.

RR = cantidad en gramos del producto final (quitosano).

#### 4.5 Porcentaje de ceniza- Por el método gravimétrico. A.O.A.C. 923.23, 2005 según (Tello E. 2017)

Mediante esta determinación se nos permite conocer el contenido de materiales inorgánicos ya que estos están presentes en las cenizas de la muestra, luego que la materia orgánica se ha quemado. Es considerado un parámetro muy importante al momento de evaluar las aplicaciones de un determinado quitosano o quitina. Las cenizas que se obtienen no necesariamente poseen la misma composición que la materia mineral presente en el polímero original, ya que pueden existir pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes. (Tello, E. 2017) Una determinación de este tipo revela los elementos específicos que se encuentran presentes, además las cenizas pueden contener carbón de la materia orgánica en forma de carbonato cuando hay excesos de minerales capaces de formar bases. (Fong, 2012).

Fórmula utilizada para su determinación:

$$\% \text{ CENIZA} = \frac{P_{cz} - P_c}{P_{cm} - P_c} \cdot 100$$

**Dónde:**

P<sub>cz</sub>: Peso del crisol más cenizas

P<sub>ms</sub>: Peso del crisol más muestra

P<sub>c</sub>: Peso del crisol

#### 4.6 Porcentaje de humedad. Por el método de gravimetría (Rowe et al., 2009)

Para hallar el porcentaje de humedad se determina el peso inicial de la muestra, luego la muestra es calentada con el fin de evaporar el agua y finalmente cuando la desecación termina el resultado se muestra cómo porcentaje (%) de contenido de humedad y el peso final de la muestra (g)

Fórmula utilizada para su determinación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_{mh} - P_{ms}}{P_{mh}} 100$$

**Dónde:**

P mh: Peso de la muestra húmeda

P ms: Peso de la muestra seca

#### 4.7 Porcentaje de materia insoluble. Según (Rowe et al., 2009)

Este método está basado en diluir la muestra de quitosano en un disolvente adecuado para ser posteriormente filtrado y al final realizar una pesada del residuo no solubilizado.

$$\% \text{ Insoluble} = \frac{M_1 - C}{M} 100$$

**Dónde:**

M: peso en gramos del material a ensayar

M<sub>1</sub>: peso en gramos del crisol conteniendo los insolubles

C: peso en gramos del crisol vacío

#### 4.8 Viscosidad y peso molecular. Por el método de viscosimetría (Rinaudo et al., 1993)

El peso molecular y su distribución afectan las propiedades físicas y químicas del quitosano, así como su funcionalidad, y determina en gran parte la solubilidad y la viscosidad del mismo (Tsaih & Chen, 1999). Por lo tanto, la determinación del peso molecular es muy importante para elucidar las características del propio quitosano como de sus productos.

Existen diferentes métodos para la determinación del peso molecular tanto en quitina como en quitosano, como la viscosimetría. Este es un método sencillo y rápido, además de no requerir

instrumentos costosos. Este método se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca, la cual está relacionada con el peso molecular del polímero. Debido que esta no es una técnica absoluta, se utilizan constantes que se calculan mediante la correlación de valores de viscosidad intrínseca, con valores de pesos moleculares del compuesto medido por un método directo. Dichas constantes dependen mayormente de la naturaleza del polímero, del solvente utilizado y de la temperatura. Por ello, siempre que se reporte el peso molecular por medio de viscosimetría debe declararse el solvente utilizado, la temperatura la referencia a partir de la cual se tomaron los valores de las constantes viscosimétricas (Argüelles W., 2004; Tsaih & Chen, 1999).

El peso molecular afecta la actividad que presente el quitosano como espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color, grasa y agua, vehículo de liberación, entre otras aplicaciones (Argüelles W., 2004).

Viscosidad específica:  $\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$

Viscosidad reducida:  $\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$

**Dónde:**

$t$  y  $t_0$  corresponden a los tiempos de vertido del disolvente y de cada disolución.

Las mencionadas viscosidades se encuentran relacionadas con la viscosidad intrínseca, lograremos obtenerla a través de la ecuación de Huggins y una vez hallada la viscosidad intrínseca es que se logrará obtener el peso molecular utilizando la ecuación de Mark-Houwink- Sakurada.

**Ecuación de Huggins:**  $\eta_{sp}/C = (\eta) + K_H (\eta)^2 C$

**Dónde:**  $K_H$  es la constante de Huggins

**Ecuación de Mark- Houwink- Sakurada:**  $(\eta) = K (M_w)^a$

**Dónde:** Las constantes  $K$  y  $a$  son constantes para un sistema polímero, teniendo en cuenta el disolvente en el cual fue diluido y la temperatura.



## 5. Propiedades y aplicaciones

La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica. (Okuyama et al., 2000). Es importante recalcar que en el año 2001, el quitosano fue reconocido como sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe) en Corea, Japón y Estados Unidos. (Food and drug administration “Gras claim notification Primex chitosan” 2012.).

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolemia y antioxidante. (Aranaz et al., 2009). Estas propiedades funcionales han permitido y promovido su utilización en diferentes campos. En agricultura, el quitosano se ha descrito como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. Así mismo cumple funciones de recubrimiento de semillas para la protección ante agentes microbianos y mejoramiento de la germinación (Agulló et al., 2004).

También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en el tratamiento de aguas residuales. (H.K. No, Meyers, S.P. 2000).

Su carácter catiónico le permite capturar compuestos aniónicos, por ello es un candidato ideal para la remoción de iones metálicos en efluentes mineros. (Benavente et al., 2011). En la industria cosmética se utiliza el quitosano, ya que es soluble en ácidos y compatible con la piel, puede ser utilizado en la formulación de cremas, lociones y en esmaltes para uñas, creando una barrera contra la radiación ultravioleta y la deshidratación de la piel (Anchisi et al., 2006). Por otro lado en la industria alimentaria se puede utilizar como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además, tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolemico en productos dietéticos. (Aranaz et al., 2009).

Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina utilizándolo en cremas para heridas, úlceras, hilos de sutura, implantes para regeneración de tejido conjuntivo y huesos; también en ortopedia debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica (Helander et al., 2001). Y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Ravi Kumar et al., 2004).

## 6. Caracterización de las propiedades biológicas del quitosano

### 6.1 Efecto cicatrizante del quitosano

El quitosano presenta actividad cicatrizante, y se ha sugerido que el mecanismo por el cual él ejerce esta acción es mediante la activación de neutrófilos y macrófagos, la migración de polimorfo nuclear y células mononucleares, acelerando la regeneración de tejido conectivo y angiogénesis. Es posible que las moléculas positivamente cargadas de quitosano adsorban algunas sustancias implicadas en la proliferación de célula y la migración, como factores de crecimiento y citocinas, del plasma en la sangre o exudado en la herida y que las sustancias adsorbidas estimulan la proliferación de célula y la migración (García et al., 2008).

### 6.2 Cicatrización

Es un proceso normal que los seres humanos presentan al momento de regenerar el tejido epidérmico y dérmico, este proceso es altamente dinámico mediado por proteínas solubles (citocinas y factores de crecimiento) y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado (Enoch et al., 2007).

#### 6.2.1 Tipos de cicatrización de las heridas

Se pueden mencionar tres categorías: cierre primario, cierre secundario y cierre terciario:

##### 6.2.1.1 Cierre primario

Se refiere al cierre de una herida dentro de horas de su producción, es la manera ideal de tratar una herida, sin embargo hay algunos factores que se deben tomar en cuenta, ya que podrían infectar la herida como por ejemplo:

Huésped: si la persona que tiene la herida es una persona saludable.

Concentración bacteriana: está estipulado un umbral  $10^6$  bacterias x gr. de tejido, si se excede a este umbral entonces definitivamente se producirá una infección, esta concentración bacteriana aumentara si la herida ha permanecido abierta por un mayor lapso de tiempo, tradicionalmente se tiene como un límite de tiempo 6 horas, pasado este tiempo se recomienda no cerrar la herida. Hay casos especiales como las mordeduras de perro, serpientes, ratas en los cuales no se debe realizar un cierre completo de la herida solo se deben acercar los bordes, para permitir que la herida drene.

### **6.2.1.2 Cierre secundario**

Este tipo de cicatrización no incluye un cierre formal de la herida, esta cerrara de forma espontánea por contracción, esta cicatrización tomará más tiempo y será menos estética, Generalmente estas heridas son heridas que poseen una infección (poseen pus, abscesos, peritonitis, etc.)

### **6.2.1.3 Cierre terciario**

Es el cierre de una herida luego de un periodo de tiempo en el que se dejan abiertas, generalmente son heridas que han tenido una infección, entonces cuando ya se controla la infección, se cierra intencionalmente generalmente con suturas (Midwood et al., 2004).

Independientemente del tipo de herida, la cicatrización requerirá los mismos procesos bioquímicos y celulares para su reparación, aunque con mayor o menor formación de tejido conectivo. La cicatrización comienza al producirse la lesión y su velocidad de reparación vendrá marcada por una serie de factores, como son: la superficie que fue afectada, su profundidad, la zona anatómica en la cual se encuentra la herida, el daño vascular, si se presenta o no infección en la herida y alteraciones genéticas que el paciente pudiera tener como por ejemplo alteraciones hemofílicas, defectos en las metaloproteasas. (Fernández et al., 2008).

## **6.2.2 Proceso de cicatrización:**

Smith et al., 2009 reconocen 3 fases principales para que una herida cicatrice: Inflamación o reacción, proliferación, granular o regeneración y maduración o remodelación de la herida.

### **6.2.2.1 Inflamación o reacción**

Esta primera fase dura aproximadamente de 2 a 5 días, luego que se produce un daño o lesión, los vasos sanguíneos más pequeños se dilatan, al suceder esto se vuelven más permeables y así se trasvasa líquido seroso hacia la herida, como resultado de la histamina y prostaglandinas que han sido liberadas. También se origina un edema producto del plasma y electrolitos que son liberados hacia los espacios intersticiales. Es por ello, que en esta primera fase se observa una herida enrojecida e inflamada. Aproximadamente luego de unas 6 horas los neutrófilos llegan a la herida, estos ayudaran a evitar que se produzca una infección en la herida mediante la ingestión y digestión de bacterias mediante fagocitosis, esto gracias a la presencia de oxígeno. Luego de la ingestión de bacterias los neutrófilos sobreviven

varias horas, luego pasan a formar parte del exudado de la herida. Después de cuatro días aparecen en la herida los monocitos, una vez allí se diferencian macrófagos, estos van a digerir el tejido necrótico, eliminan los residuos que se encuentren allí, evitan la proliferación de microorganismos y también intervienen en la síntesis del colágeno. Una vez que los macrófagos desaparecen la deposición de colágeno en la herida aumenta considerablemente.

#### **6.2.2.2 Proliferación, granular o regeneración**

Esta segunda fase comienza aproximadamente entre 2 y 3 días después que se produce el daño y finaliza después de 14 a 24 días. En toda esta fase las células epiteliales se multiplican con una gran velocidad para poder generar una cubierta que le otorgara protección a la herida. Se producirá una reconstrucción de la red capilar vascular y el tejido conjuntivo. Las fibras de colágeno jugaran un papel muy importante al incrementar la fuerza de tensión de la herida. Aproximadamente luego de 42 días la herida ya cicatrizada solo tendrá un 10 % de la fuerza de tensión que normalmente la piel posee. En el caso de heridas extensas, la generación de suficiente tejido de granulación para cerrar la piel puede requerir de muchos meses. Este tejido ya sano es de color rosado debido a que posee una mayor irrigación sanguínea con el fin de aportar mayor oxígeno y nutrientes al tejido recién formado.

#### **6.2.2.3 Maduración o remodelación**

La contracción de la herida empieza a los 14 y 21 días luego del daño o lesión y puede durar hasta aproximadamente 2 años. En esta etapa el espesor y dimensión de la cicatriz se reduce notablemente. Van desapareciendo los capilares entonces va bajando la intensidad del color rosado. Los responsables de esta contracción son los miofibroblastos, estos van a facilitar la migración de los bordes de la herida hacia el centro de la misma. En esta fase la herida tendrá un 70 a 80% de la fuerza de tensión que normalmente la piel posee. El color que posee es más pálido que la piel normal ya que posee una menor cantidad de melanocitos.

### **6.3 Método de Tensión**

Método descrito por (*Howes et al, 1929*) que se aplica para la determinación del efecto cicatrizante. El método de la fuerza de tensión mide la fuerza necesaria para abrir una herida incisa de 1 cm de largo, realizada en el tercio anterior del lomo y perpendicular al eje longitudinal de un ratón.

## CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1. Reactivos

El grado de pureza de los reactivos utilizados son: Grado Reactivo Analítico (RA/ PA), Grado Químicamente Puro (QP) y Reactivos analíticos ACS de la compañía Merck.

- Agar Czapek
- Medio YPD ( Yeast Extract-Peptone-Dextrose)
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico
- Etanol
- Acetona
- Sulfato de potasio
- Sulfato de sodio
- Ácido sulfúrico
- Sulfato cúprico
- Fenolftaleína
- Ácido esteárico
- Ácido bórico

- Sulfato de amonio
- Ácido acético
- Agua destilada

### 2.1.2 Equipos

- Incubadora
- Microscopio óptico Zeiss Primostar
- Parrilla eléctrica
- Agitador magnético
- Autoclave vertical temporizado HW Kessel
- Balanza electrónica Ohaus Scout
- Cabina de Flujo Laminar Horizontal marca C4
- Centrifuga
- Espectrofotómetro en IR
- Destilador de agua
- Estufa marca JP Selecta
- Mufla
- Cocina eléctrica
- pH metro HANNA
- Viscosímetro Tipo Ubbelholde OB-NO 206
- Baño Termostático
- Equipo Bruker de 400 MHz

### 2.1.3 Material de vidrio

- Portaobjetos
- Láminas cubre objetos
- Tubos de ensayo
- Termómetro
- Matraces
- Probetas
- Embudo
- Pipetas
- Bureta

- Vasos Beaker
- Frascos de vidrio estériles
- Mechero
- Varilla
- Placas Petri
- Crisoles
- Tubos de ensayo

#### 2.1.4 Instrumentos u otros

- Impronta o cinta adhesiva
- Asa micológica
- Cáscara de arroz, cáscara de naranja y granos de arroz
- Algodón
- Pabilo
- Papel aluminio
- Jeringas
- Papel filtro
- Crema depilatoria Veet
- Anestesia con pentobarbital sódico
- Gasas
- Hilo esterilizado
- Pinzas
- Crema Cicatricure
- Vaselina
- Guantes
- Tijeras

#### 2.1.5 Material Biológico

- Residuos de crustáceos
- Cepas del Hongo *Aspergillus niger*
- 36 ratones albinos machos de la variedad *Rattus Novergicus*

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Obtención de la cepa *Aspergillus niger*

La cepa *Aspergillus niger* fué cedida por el Banco de germoplasma del Laboratorio de Genética Molecular de la Escuela de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín. Se realizó la siembra de las cepas en placas que contienen agar Czapek y, se incubó a una temperatura de 28° a 30°C, por 3 a 7 días.

### 2.2.2 Identificación del hongo *Aspergillus niger*

#### A. Características macroscópicas:

Para la observación morfológica se examinó colonias de cultivos frescos. Se observó el tamaño de la colonia, textura (lanosa, flocosa, granulosa, etc.) color, presencia de surcos, exudado, producción de pigmento, etc. (Cercenado, E. & Cantón, R, 2010).

#### B. Características microscópicas: (Jácome et al., 2014)

Se utilizó un microscopio binocular marca Zeiss, modelo Primostar. El estudio se realizó en fresco y tras tinción se reveló la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Se realizó una tinción de lactofenol, la cual preservó la integridad de las estructuras fúngicas, esta permitió la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas.

#### C. Preparación de la impronta: (Jácome et al., 2014)

Se colocó el material necesario en la campana. Se seleccionaron las colonias y se realizaron las improntas. Se cortó segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup>. Se pegaron los segmentos de cinta en un asa micrológica. Se colocó una gota de azul de lactofenol en el portaobjetos. Con el lado adhesivo de la cinta, se tocó la parte superior del hongo. Se colocó la cinta sobre la gota de azul de lactofenol y se colocó otra gota más. Se puso un cubreobjetos sobre la preparación y se observó en el microscopio a un aumento de 40x.

### 2.2.3 Crecimiento del hongo *Aspergillus niger* en diferentes sustratos

*Método según (López et al., 2008)*

Se utilizó tres tipos de sustrato: Cáscara de arroz, cáscara de naranja y granos de arroz. Para la ejecución de este tratamiento se colocó agua estéril en un tubo de ensayo el cual



contenía una asada del microorganismo *A. niger*; luego se agitó para provocar la salida de esporas. Finalmente se tomó 1 ml de la suspensión formada y se colocó en matraces que contengan a) Granos de arroz b) Cáscaras de arroz c) Cáscara de naranja y un control.

#### 2.2.4 Crecimiento del hongo en medio líquido – YPD

Para realizar el crecimiento del hongo en medio líquido, se utilizó el medio líquido YPD

- **Elaboración del Medio YPD según (Ausubel et al., 1994)**

Se pesó: Dextrosa (20gr), peptona (20gr) y extracto de levadura (10gr), y se vertió en 1 L. de agua, se usó un agitador magnético adentro para que así todos los reactivos se mezclen de forma homogénea y se llevó al fuego; luego se llevó a la autoclave a 121°C por 15 minutos.

- **Inoculación del hongo según (Gómez et al., 2014)**

Para inocular el hongo al medio líquido, se realizó una suspensión, para ello se colocó agua estéril en un tubo de ensayo el cual contenía una asada del microorganismo *A. Niger*; luego se agitó para provocar la salida de esporas. Se tomó 1 ml de la suspensión formada y se colocó en matraces que contienen medio YPD (250ml.). Se realizó todo el proceso en la campana de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación. Finalmente se dejó reposar todos los matraces en una incubadora a 37°C, por aproximadamente unos 7 a 10 días para observar el crecimiento del micelio.

#### 2.2.5 Extracción de quitosano a partir del hongo *Aspergillus niger* Según (Alzate et al., 2014)

Se lavó 85 g de *A. niger* para eliminar impurezas, y se realizó un tratamiento altamente básico utilizando NaOH al 40% durante 5 horas, a 95°C. Se eliminó todo el exceso de NaOH lavándolo con abundante agua caliente y luego se midió el pH hasta que sea cercano a la neutralidad (pH 7). Se mezcló el material de forma manual con HCl al 10% durante 3 horas. Se midió el pH, el cual debe oscilar entre 3,8–4,5, Se centrifugó a 6.000 rpm durante 20–25 minutos. La operación de extracción se repitió 3 veces más adicionando HCl al 10%. Los tres extractos se reunieron en un mismo recipiente. Para que el polímero precipite se adicionó NaOH al 40% hasta que el pH sea de 10,0 y se dejó en reposo para una completa sedimentación. Para recuperar el quitosano se centrifugó y filtró. Finalmente se lavó con agua, etanol y acetona, y se secó en un horno al vacío a 50°C durante 24 horas, hasta obtener peso constante.

## 2.2.6 Extracción del quitosano a partir de crustáceos

*Según (Escobar et al., 2013)*

Se lavaron los caparazones para eliminar impurezas y se pesó la cantidad deseada.

Se adicionó HCl 2N en relación sólido: líquido a temperatura ambiente por dos horas. Esto generó desprendimiento de volúmenes de CO<sub>2</sub>. Se lavó con abundante agua y se realizó una desproteinización mediante una inmersión de los caparazones en NaOH al 2 % bajo una relación 1:5, igualmente sólido: líquido entre 30 y 60 minutos y se agitó a una temperatura entre 70 y 80° C. Es importante destacar que entre cada etapa del proceso es necesario lavar para remover las sustancias, tanto el ácido como el álcali. Para la obtención del quitosano, esta solo se realizó en un solo paso, el cual consiste en la inmersión de los caparazones en NaOH al 50% por 60 minutos a una temperatura de 80 a 90 °C. Finalmente se secó a 100°C por un tiempo de dos horas. Al finalizar y escurrir la solución, los caparazones retomaron un color melón cristalino al contacto con el agua para su lavado y remoción de la solución alcalina.

## 2.2.7 Caracterización físico-química del quitosano obtenido por *A. niger* frente al obtenido de crustáceos

### 2.2.7.1 Determinación del quitosano por espectroscopía en IR

Se calentó el espectrofotómetro IR antes de iniciar el experimento.

Triturar hasta un polvo fino 200 a 300 mg de KBr utilizando un mortero, seguir las instrucciones de la prensa manual y hacer una pastilla de KBr.

**Instrucciones de la prensa manual:** La prensa mini pellet es una prensa básica hidráulica de laboratorio, usada con el fin de preparar pastillas de KBr de 7 mm de alta calidad, para el análisis de transmisión en FTIR. Su funcionamiento es totalmente hidráulico, el usuario debe aplicar la carga requerida para la preparación de la muestras y mediante un simple giro de una rosca de carga se obtiene la pastilla lista para el análisis de muestras sólidas por transmisión de FTIR. ([www.specac.com](http://www.specac.com)).

Antes de realizar una asignación cuantitativa de bandas en los espectros, es necesario realizar un calibrado de frecuencias del espectrofotómetro. Este calibrado suele realizarse mediante la medida del espectro de una película de poliestireno de espesor conocido.

Colocar la pastilla de KBr en el compartimiento de la muestra y obtener el espectro.

### **2.2.7.2 Determinación del Grado de N-desacetilación por el método potenciométrica**

*Según (Parada et al., 2004)*

Se disolvió el quitosano en 0.3M HCl y luego se valoró con 0,1 M NaOH y se midió el cambio de pH cada ml de base que se añadió, este procedimiento se debe realizar agitando constantemente y en forma lenta para así evitar que el quitosano precipite y para que la solución sea siempre homogénea. De esta manera, se obtuvo una curva de pH vs mL de NaOH añadidos, la cual presenta dos puntos de inflexión; la diferencia entre ellos corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano.

### **2.2.7.3 Determinación del porcentaje de proteína por el método KJELDAHL:**

*A.O.A.C 1984*

*Según (Hernández et al., 2009)*

Se efectuó un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos. Se pesó 0.1 mg de muestra homogeneizada de quitosano extraído a partir de crustáceos y a su vez se trabajó con otra muestra homogeneizada de quitosano extraído a partir de *A. niger* en un matraz de digestión Kjeldahl. Se agregó 3 perlas de vidrio de 5mm de diámetro, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 0.5 g de sulfato cúprico y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se conectó el matraz a la trampa de absorción que contiene 250 mL de hidróxido de sodio al 15 %. El disco poroso produce la división de los humos en finas burbujas con el fin de facilitar la absorción y para que tenga una duración prolongada debe ser limpiado con regularidad antes del uso. Los depósitos de sulfito sódico se eliminan con ácido clorhídrico. Cuando la solución de hidróxido de sodio al 15 % adicionada de fenolftaleína contenida en la trampa de absorción permanece incolora debe ser cambiada (aprox. 3 análisis). Calentar en manta calefactora y una vez que la solución esté transparente, dejar en ebullición 15 a 20 min. Si la muestra tiende a formar espuma agregar ácido esteárico o gotas de silicona antiespumante y comenzar el calentamiento lentamente. Enfriar y agregar 200 mL de agua. Se conectó el matraz al aparato de destilación, agregar

lentamente 100 mL de NaOH al 30 % por el embudo, y cerrar la llave. Destilar no menos de 150 mL en un matraz que lleve sumergido el extremo del refrigerante o tubo colector en:

- 50 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N, 4 a 5 gotas de rojo de metilo y 50 mL de agua destilada. Asegurar un exceso de  $H_2SO_4$  para que se pueda realizar la retrotitulación. Titular el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta color amarillo
- 50 mL de ácido bórico al 3 %. Titular con ácido clorhídrico 0.1 N hasta pH 4.6 mediante un medidor de pH calibrado con soluciones tampón pH 4 y pH 7, o en presencia del indicador de Tashiro hasta pH 4.6

Cada cierto tiempo es necesario verificar la hermeticidad del equipo de destilación usando 10 mL de una solución de sulfato de amonio 0.1 N (6.6077 g/L), 100 mL de agua destilada y 1 a 2 gotas de hidróxido de sodio al 30 % para liberar el amoníaco, así como también verificar la recuperación destruyendo la materia orgánica de 0.25 g de L (-)-Tirosina. El contenido teórico en nitrógeno de este producto es de 7.73 %. Debe recuperarse un 99.7 %. La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas una después de otra, por el mismo analista, no debe exceder 0.06 % de Nitrógeno o 0.38 % de proteína.

#### **2.2.7.4 Determinación del rendimiento global según (Rowe et al., 2009)**

Se hizo una relación entre la cantidad de producto obtenida experimentalmente y la cantidad de la muestra con la que se comenzó el proceso, para finalmente ser expresado como un porcentaje.

#### **2.2.7.5 Determinación del porcentaje de ceniza por el método gravimétrico. A.O.A.C. 923.23, 2005. Según (Tello E. 2017)**

Se incineró 2 gr de muestra, primero se expuso a una llama de fuego hasta su total carbonización y hasta que desaparece el humo blanco, se colocó la muestra en una mufla a 750- 800°C por aproximadamente 6 horas. Se enfrió y pesó el crisol.

#### **2.2.7.6 Determinación del porcentaje de humedad por el método de gravimetría. (Rowe et al., 2009)**

Se colocó 2gr. de muestra en una estufa a 105°C hasta peso constante

#### **2.2.7.7 Determinación del porcentaje de materia insoluble.** (Rowe et al., 2009)

Se disolvió el quitosano al 1,0% (p/v) extraído a partir del hongo *A. niger* y de crustáceos en una solución de ácido acético al 1%, se agitó constantemente a 200 rpm, durante 24 horas, se filtró y luego el papel con el residuo se secó a 105°C, hasta peso constante.

#### **2.2.7.8 Determinación de la viscosidad y el peso molecular por el método de viscosimetría.** (Rinaudo et al., 1993)

Se utilizó un viscosímetro tipo Ubbelholde OB-NO 206, el cual se sumergió en un baño termostático a 25 °C (Antes de realizar las medidas se calibrará con 10 mL de ácido acético). Una vez calibrado, se prepararon soluciones de 10 mL de concentraciones 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 y 0.01 g/mL Para cada solución se midió el tiempo de caída desde la marca superior a la inferior por triplicado.

### **2.2.8 Caracterización biológica del quitosano obtenido de *A. niger* frente al obtenido de crustáceos a través del efecto cicatrizante.** (García T. & Roca J., 2008)

#### **2.2.8.1 Ambientación o acondicionamiento**

Los 36 ratones machos albinos de la variedad *Rattus norvegicus* de un mes y medio de edad provenientes del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María (UCSM), fueron distribuidos al azar en 6 grupos de 3 ratones cada uno. A dichos animales se les mantendrá en un ambiente ventilado apropiadamente, en jaulas individuales, con alimento balanceado y agua.

#### **2.2.8.2 Depilación**

Después de ambientarse los ratones en el lugar de trabajo, se procedió a depilarlos con crema depilatoria en el primer tercio dorsal anterior en un área, aproximada, de 2 cm<sup>2</sup>, se les aplicara anestesia con pentobarbital sódico por vía subcutánea a una concentración de 50 mg/kg de peso. La depilación se realizara previa humectación (con agua tibia) de la zona a depilar, luego se agregara la crema depilatoria permaneciendo 3 minutos para ejercer su efecto. Finalmente, con la ayuda de gasas húmedas se retirara la crema. Posterior a la depilación, los ratones se colocan en sus respectivas jaulas individuales teniendo estos libre acceso a bebida y comida. La depilación se realiza 24 horas antes del procedimiento quirúrgico a fin de descartar cualquier reacción alérgica a la crema depilatoria.

### **2.2.8.3 Incisiones y sutura**

Después de 24 horas de la depilación, se procedió a anestésiar a los ratones administrándoles una dosis de 50 mg/Kg de pentobarbital sódico vía subcutánea (tercio inferior del lomo). Se colocará al ratón sobre la mesa de trabajo, desinfectando el área depilada y marcando 2 puntos equidistantes en 1cm y perpendicular al eje longitudinal del ratón (zona de corte). Se realizará el corte sobre la zona indicada, se unen los bordes con un punto de sutura con hilo esterilizado en la parte central del corte. Esta etapa se realiza cumpliendo condiciones de asepsia.

### **2.2.8.4 Aplicación del ungüento:**

Obtenido el punto de sutura, se administró en forma tópica la primera dosis del tratamiento sobre la incisión con la ayuda de un hisopo, para obtener una distribución homogénea sobre la incisión. Se aplicó tanto las formulaciones a base de quitosano, la base del ungüento y una crema de uso comercial. Se repitió el tratamiento cada 12 horas en un lapso de 72 horas.

### **2.2.9 Determinación de la fuerza de tensión:**

Howes et al., (1929) realizó estudios para la determinación de la fuerza de tensión, método que se aplicó para la determinación del efecto cicatrizante de los ungüentos a base de quitosano por el método de la fuerza de tensión.

Luego de 72 horas de tratamiento, se procedió a realizar la medición de la fuerza de tensión. Para ello, los ratones son previamente anestesiados con una dosis de 100 mg/kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Luego se ejerció tensión a 0,5 cm de ambos extremos del punto de sutura. Se retiró con mucho cuidado el punto de sutura y se colocó al animal en posición decúbito ventral, luego se abrió la bureta para dejar caer el agua encima de la herida, hasta que se genera una fuerza de tensión capaz de abrir la herida en toda su longitud. Finalmente, se anotó el nivel de agua requerido. Dando como resultado las condiciones cicatrizantes óptimas.

### CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 Proceso de identificación del hongo *Aspergillus niger*

**A. Características macroscópicas:** Las colonias al inicio de su crecimiento presentan un color blanco amarillento, con el paso del tiempo su color varia a un color negro intenso. Se observa la presencia de conidios por la presencia de puntos negros similares a la pimienta. Su textura es granular y se puede observar claramente que al reverso de la placa la colonia presenta un color crema.



**Figura N° 7** Característica macroscópica del hongo *Aspergillus niger*

Se aprecia el color negro característico del micelio de *A. niger*, con su textura afelpada proveniente de un micelio de tamaño mediano y una topografía con líneas que surcan el centro hasta los extremos, indicando la topografía rugosa. El aspecto observado de la cepa es muy similar a la imagen de la cepa de *A. niger mostrada* en (Torrenegra R. & Rueda L. 2011), lo cual indica que no ha perdido su viabilidad y que es una cepa pura.

**B. Características microscópicas:** Se logró identificar un hongo, el cual presenta estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas, estas son tabicadas y presentan septos que delimitan las diferentes células, también se observaron esporas de color negro y ovalado.

Con los datos obtenidos a partir de realizar la caracterización macroscópica y microscópica se realizó una comparación con el Atlas fúngico (Torrenegra R. & Rueda L. 2011) con esto se confirmó la identificación de la cepa “*Aspergillus niger*”.



Figura N° 8 Vista de cepa *Aspergillus niger* al microscopio (X40)

### 3.2 Análisis del tiempo de dispersión del micelio de *Aspergillus niger* en diferentes sustratos

Según (Romero et al., 2000; García, 2003; Fernández 2004) el tiempo de dispersión del micelio hace referencia al tiempo que tarda el hongo en colonizar el sustrato que se puede evidenciar con el cambio de color a blanco del bloque de sustrato y la compactación del mismo. Dicha cobertura se observó en todos los sustratos evaluados, incluyendo el sustrato control.

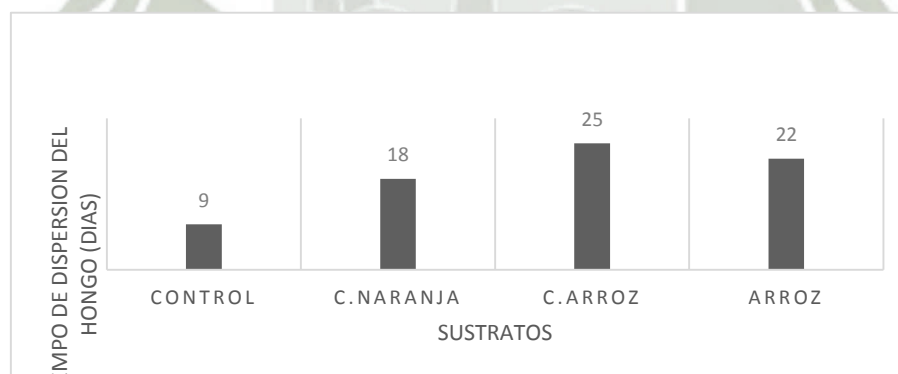


Gráfico N° 1 Tiempo de dispersión del micelio en diferentes sustratos

Al observar el tiempo de expansión del micelio del hongo en cada uno de los sustratos (Gráfico 1) evaluados se puede ver que el tiempo de crecimiento de micelio en la cáscara de arroz, cáscara de naranja y arroz (25, 18 y 22 respectivamente), fue mayor al del control (medio YPD, 9 días). Esto debido a que el sustrato control es el mismo medio en el cual el hongo está habituado a crecer en la naturaleza, contiene todos los elementos necesarios para que el hongo crezca sin problema alguno, indicando que no es un sustrato desconocido para su crecimiento, por tal razón no se ve afectado el metabolismo del hongo sobre el sustrato y el hongo no



necesito trabajar para empezar a crecer. Después del control, la cáscara de naranja es el mejor de los soportes ya que según Orxua et al., 2009, contiene gran cantidad de nutrientes favorables para el crecimiento de los *Aspergillus*. Finalmente el crecimiento en la cascara de arroz y granos de arroz fue muy lento y no invadieron totalmente el soporte. Por lo tanto según el gráfico podemos observar que el peor soporte para *A. niger* es la cáscara de arroz ya que demoró más tiempo (25 días) en ser colonizada mientras que el medio YPD (control) sigue siendo el mejor medio para su crecimiento.

### 3.3 Extracción de Quitosano

#### 3.3.1 Extracción de Quitosano a partir de crustáceos

Al inicio del procedimiento se pesó 125gr. de crustáceos y se obtuvo al final del proceso 38,825gr de quitosano. Este resultado determinó el rendimiento global que es 31,06%.



Figura N° 9 Molienda del crustáceo



Figura N° 10 Quitosano extraído de crustáceos

### 3.3.2 Extracción de Quitosano a partir de *A. niger*

Al inicio del procedimiento se pesó 85gr. de *A. niger* y se obtuvo al final del proceso 36.065 gr. de quitosano. Este resultado determinó el rendimiento global que es 42.429%.



Figura N° 11 *A. niger*



Figura N° 12 Quitosano extraído del *A. niger*

## 3.4 Caracterización físico-química del quitosano obtenido por *A. niger* frente al obtenido de crustáceo

### 3.4.1 Espectroscopia en IR de quitosano puro frente los obtenido de crustáceos y *Aspergillus niger*

Varian Resolutions Pro

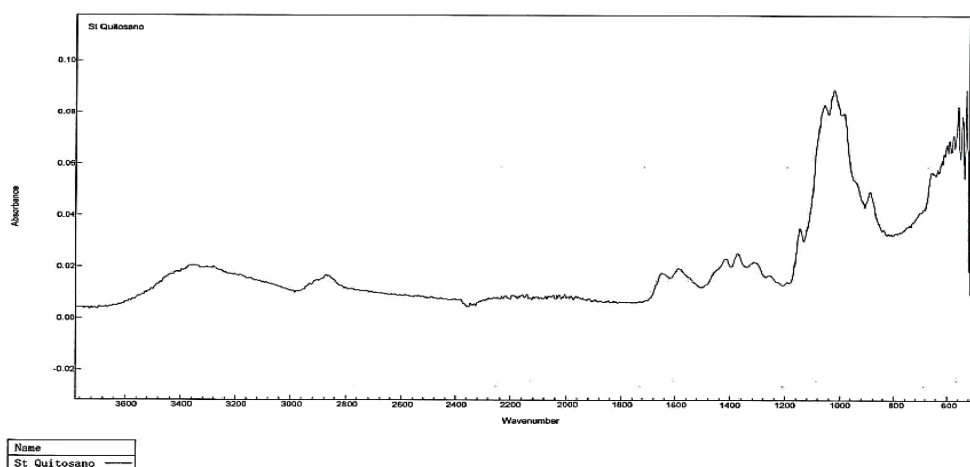
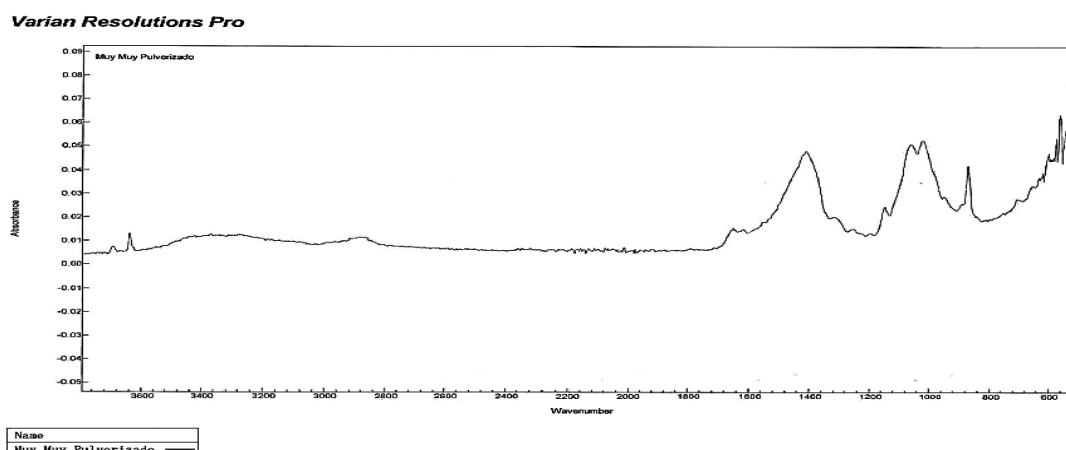


Figura N° 13 Espectro Infrarrojo de Quitosano Puro en el rango de 1500 – 3600  $\text{cm}^{-1}$



**Figura N°14 Espectro Infrarrojo de Quitosano extraído de Crustáceos en el rango de  
1500 - 3600 cm<sup>-1</sup>**



**Figura N°15 Espectro Infrarrojo de Quitosano extraído del Hongo *A. niger* en el rango de  
1500 - 3600 cm<sup>-1</sup>**

Un análisis espectroscópico por IR nos da una referencia de los grupos funcionales que tiene la muestra en su composición pero se necesita otras técnicas analíticas para confirmar la real estructura.

El quitosano puro muestra una banda moderada pero bien definida entre 300 y 3500 cm<sup>-1</sup> con absorbancia máxima a 3400, lo que es compatible con vibraciones de estiramiento del enlace O-H polimérico (3200 - 3400) que corresponde a una banda de forma ancha.

Una banda moderada a 2880 aproximadamente corresponde de manera clásica al IR-I de alcanos de grupos metilen - CH<sub>2</sub>- y una banda de absorción entre 1520 y 1680 de intensidad moderada, corresponde a estiramientos de grupo carbonilo y amino, por lo que probablemente se trate de una amida.

En el quitosano de crustáceos a 2900 se observa al grupo metilen y una absorción moderada entre 3000 y 3400 debido a la presencia del estiramiento O-H.

En el quitosano de *Aspergillus niger* se observa a una banda entre 3000 y 3400 debido al grupo O-H. Banda entre 2800 y 2900 a grupos -CH<sub>2</sub>- y a una banda entre 1600 y 1700 característica de amidas.

### 3.4.2 Determinación del Grado de N-desacetilación por el método potenciométrico

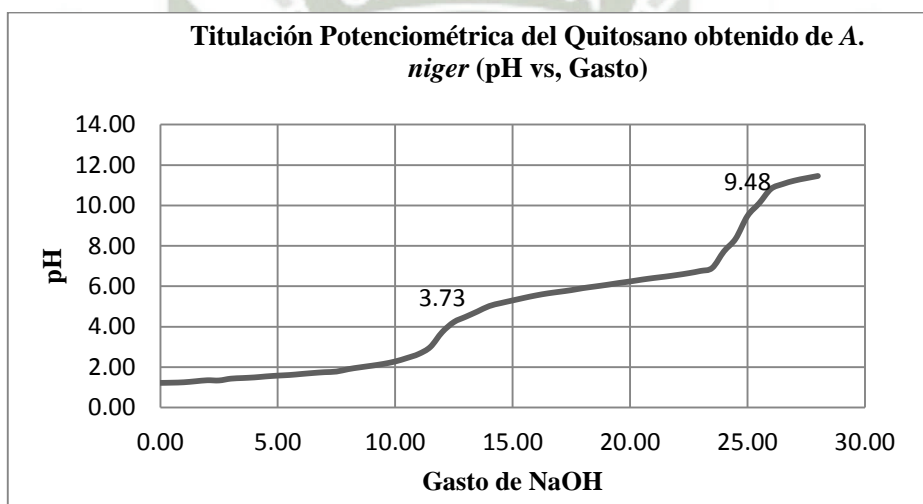


Gráfico N° 2 Curva de titulación potenciométrica del quitosano obtenido de *A. niger* (pH VS. Gasto)

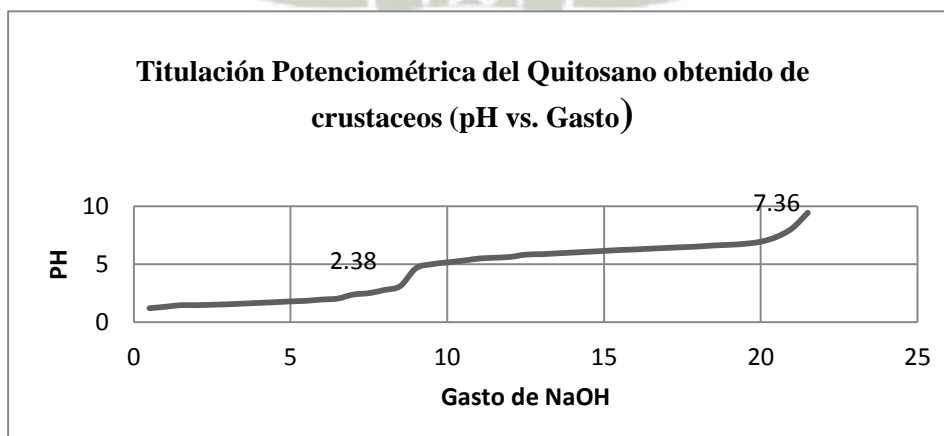


Gráfico N° 3 Curva de titulación potenciométrica del quitosano obtenido de crustáceos (pH VS. Gasto)

En los gráficos N° 2, 3 se establecen los grados de desacetilación con el fin de conocer el contenido de grupos aminos presentes en las muestras de quitosano, utilizando para ello una titulación potenciométrica allí se observa cada curva de titulación con dos puntos de inflexión cuyos valores fueron determinados según el criterio de la primera derivada (Huggins ML y J. Am. 1942). La diferencia que existe entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponden a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos aminos del quitosano.

En la muestra de quitosano extraído a partir del hongo *A. niger*, los puntos de inflexión son:  $x = 3.73$   $y = 9.48$ ; el grado de desacetilación se obtuvo utilizando 0,1 gr. de quitosano y  $f = 0.09957$ . En la muestra de quitosano extraído a partir de crustáceo, los puntos de inflexión son:  $x = 2.38$   $y = 7.36$ ; el grado de desacetilación se obtuvo utilizando 0,09gr de quitosano y  $f = 0.09957$ . Al contrastar los datos de ambos quitosanos obtenidos son similares al quitosano con efecto cicatrizante obtenido según (Baltodano L. & Yaipen J., 2006) El cual tuvo como puntos de inflexión  $x = 4.45$ ;  $y = 9.57$ , el grado de desacetilación se obtuvo utilizando 0.1076gr. de quitosano y  $f = 0.99725$ .

**Tabla N° 1 Determinación del Grado de N-desacetilación (%NH<sub>2</sub>) del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* frente al obtenido de crustáceos**

	Grado de N-desacetilación (%NH <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus niger</i>	92.18
Crustáceos	79.83

**Tabla N° 2 Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos**

<b>F</b>	0.8365
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0.4555
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	0.0526

El grado de desacetilación obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* (92.18%) y el de crustáceos (79.83%). Ambos grados de desacetilación se encuentran dentro de los parámetros establecidos según (Gacen J. & Gacen I., 1996) que son de 80 a 90%.

En ambos quitosanos se observa que la proporción de los grupos aminos libres es alta, sin embargo el quitosano extraído a partir del hongo *Aspergillus niger* es superior al quitosano extraído a partir de crustáceos lo que es indicativo que el método utilizado permitió la obtención de un producto altamente desacetilado a partir del hongo *Aspergillus niger*, según Matsumoto K. 2011 esta diferencia del grado de desacetilación posiblemente se debe a que existen diferentes condiciones de reacción durante el proceso de extracción. Finalmente se corrobora que ambos productos obtenidos son quitosano ya que según (Struszczyk et al., 2000), se ha establecido el grado desacetilación comprendido entre 60-98% como quitosano.

En cuanto a la aplicación de la prueba t de Student se observa que dado que el estadístico  $F = 0.8365$  es mayor a el valor crítico = 0.0526 y la probabilidad es de 0.4555. Por lo tanto P es inferior a 0.05, entonces se puede asumir que las varianzas si presentan diferencia estadísticamente significativa.

### 3.4.3 Determinación del porcentaje de proteína por el método KJELDAHL

**Tabla N° 3** Determinación del porcentaje de proteína % del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* frente al obtenido de crustáceos

	Porcentaje de proteína %
<i>Aspergillus niger</i>	41.12
Crustáceos	40.06
Quitosano (L. Lezama et al., 2014)	40.25

**Tabla N° 4** Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos

<b>F</b>	1.3788
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0.4204
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	19

Según L. Lezama et al., 2014. se realizaron la determinación de proteínas por el método de Kjeldahl de crustáceos obtenidos de marisquerías con un porcentaje de 40,25.

El contenido de proteína que se encuentra en el quitosano obtenido a partir de crustáceos y a partir de *A. niger* es similar al obtenido en la investigación anteriormente mencionada, en el caso de nuestra investigación el porcentaje de proteínas hallado en el quitosano es favorable ya que según Begoña M. 2015, las proteínas presentes en nuestro producto durante el proceso de cicatrización se unirán a la fibrina y fibronectina formando una especie de red, allí llegarán plaquetas, proteínas, glóbulos rojos, etc. Lo cual evitara que ocurra una hemorragia y el coagulo formado será el principal soporte estructural para la herida y servirá de lugar de depósito del colágeno.

En cuanto a la aplicación de la prueba t de Student se observa que dado que el estadístico  $F = 1.3788$  es menor a el valor crítico = 19 y la probabilidad es de 0.4204. Por lo tanto P es superior a 0.05, entonces se puede asumir que las varianzas no presentan diferencia estadísticamente significativa.

### 3.4.4 Determinación del porcentaje de humedad

**Tabla N° 5 Determinación del porcentaje de humedad del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* frente al obtenido de crustáceos**

	Porcentaje de humedad %
<i>Aspergillus niger</i>	10.19
Crustáceos	8.31
Quitosano comercial	11.58

**Tabla N° 6 Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos**

F	3.7458
P(F<=f) una cola	0.2107
Valor crítico para F (una cola)	19

El porcentaje de humedad obtenido a partir del hongo *A. niger* (10.19%) es casi similar al contenido de humedad obtenido en el quitosano comercial (11.58%). Y ambas muestras son mayores que la del quitosano obtenido a partir de crustáceos (8.31%), esto se puede deber según Hidalgo C. et al., 2009 a la eliminación de grupos acetilo como resultado de la desacetilación termoalcalina de la quitina, lo cual genera grupos amino libres en la cadena polimérica y este sería un sitio sensible a la formación de puentes de hidrógeno con el oxígeno de radicales libres - OH y dado que el grado de desacetilación en el caso del quitosano obtenido a partir de crustáceos fue de 79.83%, la posibilidad de formación de moléculas de agua disminuye debido a una menor presencia de grupos amino. Además como indican Gocho et al., 2001 puede deberse a que la estructura del quitosano extraído a partir del *A. niger* es más porosa con regiones cristalinas y amorfas que facilitan la absorción del agua en su superficie. Según Gacén I. & Gacén I. 1996, sugieren que en quitosano debe poseer un porcentaje de humedad entre el 2 al 10 % ya que permite una mejor manipulación del quitosano y su almacenamiento, característica presente en nuestras muestras de quitosano.

En cuanto a la aplicación de la prueba t de Student se observa que dado que el estadístico F= 3.7458 es menor a el valor critico = 19 y la probabilidad es de 0.2107. Por



lo tanto P es superior a 0.05, entonces se puede asumir que las varianzas no presentan diferencia estadísticamente significativa.

### 3.4.5 Determinación del porcentaje de ceniza

**Tabla N° 7 Determinación del porcentaje de ceniza del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* frente al obtenido de crustáceos**

	Porcentaje de ceniza%
<i>Aspergillus niger</i>	0.83
Crustáceos	2.92
Quitosano comercial	0.60

**Tabla N° 8 Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos**

F	0.1721
P(F<=f) una cola	0.1468
Valor crítico para F (una cola)	0.0526

El quitosano extraído a partir de crustáceos presenta un mayor porcentaje de ceniza (2.92%) que el quitosano extraído a partir del hongo *Aspergillus niger* (0.83%) y que el quitosano comercial (grado farmacéutico) (0.60%), posiblemente debido a un ineficiente proceso de desmineralización ya que el fin de ese proceso es el de eliminar fosfatos, carbonatos y minerales que puedan existir en la muestra tratada, los cuales pueden permanecer aun en la muestra ya que son los principales componentes inorgánicos de los exoesqueletos de los crustáceos como asegura Cortizo A., 2001 y García C.2017, que las caparazones de crustáceos están compuestos por proteínas (13-58 %), carbonatos y fosfatos de calcio (20-72 %). Por el contrario el quitosano extraído a partir del hongo *Aspergillus niger* tuvo por un proceso de desmineralización más efectivo ya que el porcentaje de ceniza es mucho menor. Esta diferencia entre ambos quitosanos puede deberse al origen de la materia prima y en qué condiciones fue trabajada la misma, tal como asegura García C. 2017.

En cuanto a la aplicación de la prueba t de Student se observa que dado que el estadístico  $F = 0.1721$  es mayor a el valor crítico  $= 0.0526$  y la probabilidad es de 0.1468. Por lo tanto P es inferior a 0.05, entonces se puede asumir que las varianzas si presentan diferencia estadísticamente significativa.

### 3.4.6 Determinación del porcentaje de materia insoluble

**Tabla N° 9 Determinación del porcentaje de materia insoluble del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* frente al obtenido de crustáceos**

	Porcentaje de materia insoluble %
<i>Aspergillus niger</i>	1.34
Crustáceos	2.58
Quitosano comercial	0.94

**Tabla N° 10 Aplicación de la Prueba t de Student a los datos obtenidos**

<b>F</b>	0.1737
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0.1480
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	0.0526

Según Toledo M. 2014, la presencia de materia insoluble se debe a que aún existe materia inorgánica en la muestra. Se debe tomar en cuenta que el resultado obtenido depende de cómo es que se obtuvo el quitosano, el origen de la materia prima y en qué condiciones fue trabajada la misma. Evidentemente el quitosano obtenido a partir de crustáceos presenta una mayor cantidad de materia insoluble (2.58%) que el quitosano extraído a partir del hongo *A.niger* (1.34%) y ambos presentan una cifra superior al quitosano comercial (0.94%).

En cuanto a la aplicación de la prueba t de Student se observa que dado que el estadístico  $F = 0.1737$  es mayor a el valor crítico  $= 0.0526$  y la probabilidad es de 0.1480. Por lo tanto P es inferior a 0.05, entonces se puede asumir que las varianzas si presentan diferencia estadísticamente significativa.

### 3.4.7 Determinación de la viscosidad y el peso molecular por el método de viscosimetría

Tabla N° 11 Determinación de la viscosidad del quitosano obtenido de *Aspergillus niger*

Soluciones a diferentes concentraciones (gr/ml.)	Viscosidad cP ( $10^{-3}$ Pa·s)
0.01	$1.3986 \pm 0.025$
0.008	$1.3482 \pm 0.025$
0.006	$1.3212 \pm 0.025$
0.004	$1.2768 \pm 0.025$
0.002	$1.2323 \pm 0.025$

Tabla N° 12 Determinación de la viscosidad del quitosano obtenido de crustáceos

Soluciones a diferentes concentraciones (gr/ml.)	Viscosidad cP ( $10^{-3}$ Pa·s)
0.01	$1.4278 \pm 0.025$
0.008	$1.3888 \pm 0.025$
0.006	$1.3010 \pm 0.025$
0.004	$1.2634 \pm 0.025$
0.002	$1.2433 \pm 0.025$

Los resultados obtenidos en la aplicación de la técnica de viscosimetría capilar para la determinación del peso molecular del quitosano, se muestran en la Tabla 6 y 7.

La viscosidad de disoluciones diluidas no es una medida directa del peso molecular, su valor reside en la sencillez de la técnica y el hecho que puede relacionarse empíricamente con el peso molecular en muchos sistemas (*Billmeyer, 2008*), en las tablas se observan una disminución de la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) a medida que la concentración del polímero (quitosano) disminuye, lo que indica que se cumple la expresión de Huggins para el polímero en estudio, en las condiciones de trabajo utilizadas. Según esta ecuación, la viscosidad intrínseca no es más que el valor de la viscosidad reducida extrapolada a concentración cero.

La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el disolvente y la temperatura de trabajo. Para un sistema polímero–disolvente a una temperatura determinada, la expresión de Mark–Houwink–Sakurada puede utilizarse para determinar el peso molecular promedio viscosa de un polímero. (Paz et al., 2012).

**Tabla N° 13 Determinación del peso molecular del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* frente al obtenido al quitosano de crustáceos y un quitosano comercial**

	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>
<i>Aspergillus niger</i>	3.88 x10 <sup>6</sup>
<b>Crustáceo</b>	3.77x10 <sup>6</sup>
<b>Quitosano comercial</b>	1.25 x 10 <sup>6</sup>

El peso molecular promedio viscoso, obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* fue estimado en 3.88 x10<sup>6</sup> g/mol y el obtenido a partir de crustáceos fue de 3.77x10<sup>6</sup> g/mol; mientras que el quitosano comercial tiene un peso molecular de 1.25 x 10<sup>6</sup> g/mol.

El quitosano obtenido del *Aspergillus niger* presenta un peso molecular un poco más alto en comparación con el quitosano de crustáceos y el quitosano comercial. Según (*Khan et al, 2002*) el quitosano comercial debe presentar un peso molecular entre 1-3 x10<sup>6</sup> g/mol, estando en 1.25 x 10<sup>6</sup> g/mol. Todos los resultados nos confirman que el peso molecular de los tres quitosanos está dentro de los parámetros establecidos.

Con respecto al efecto cicatrizante, la determinación del peso molecular es importante, porque al aplicar quitosano en las heridas, esta da mayor retención de agua y minimiza el riesgo de infección. Según (*Ming Kong. et al 2010*), un quitosano de alto peso molecular soluble en agua presenta una interacción del biopolímero con la superficie celular que altera su permeabilidad o puede formarse una capa impermeable.

**Tabla N° 14 Rendimiento Global de Quitosano obtenido a partir de *A. niger*, crustáceos y comercial**

	<b>Rendimiento global de quitosano</b>
<i>Aspergillus niger</i>	42.43 %
<b>Crustáceo</b>	31.06 %.
<b>Otro quitosano</b> <i>(Hernández et al. 2009)</i>	51.94%

El rendimiento global del *Aspergillus niger* fue 42.43% y del crustáceo fue de 31.06%. El porcentaje de rendimiento obtenido al finalizar el proceso es menor en el de crustáceos mientras que el de *Aspergillus niger* es mayor. De acuerdo con (Vogel, A.I.1996) los rendimientos obtenidos al finalizar los procesos son considerados como rendimientos pobres ya que son menores al 40%, esto se puede deber a que los pasos de purificación siempre disminuyen el rendimiento, y los rendimientos reportados se refieren al rendimiento del producto final purificado.

Ambos rendimientos globales son menores con respecto al rendimiento mencionado por (Hernández et al. 2009) (51.94%), lo cual nos indica que posiblemente en nuestros procesos existen algún tipo de deficiencia.

Sin embargo al comparar ambos rendimientos globales tanto del quitosano extraído a partir de crustáceos (31.06%) y el quitosano extraído a partir de *A. niger* (42.43%) podemos observar que el rendimiento global del quitosano fúngico es mayor que el de crustáceos, esto resulta beneficioso para una producción de quitosano fúngico a gran escala ya que el crecimiento en el medio es rápido (9 días) y una colonización masiva en el medio se da al decimotercer día, esto quiere decir que la obtención de biomasa requiere de periodos cortos de esta manera se puede obtener una gran cantidad de materia prima para obtener quitosano y no está influenciada por el medio ambiente como es el caso de los crustáceos. Según (Becerra et al, 2011) menciona que se puede incrementar la cantidad de quitina en la pared celular fúngica, mediante el cambio de fuente de carbono como material de consumo durante la etapa de producción de biomasa en el proceso de fermentación.

**Tabla N°15 Comparación de las propiedades Físico-química de quitosano comercial y los obtenidos experimentalmente**

Muestra	Grado de N-desacetilación (%)	Porcentaje de proteína (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	Material insoluble (%)	Peso molecular (gr/mol)	Rendimiento Global (%)
Quitosano comercial (grado farmacéutico) Khan et al.,, 2002	79	40.25	0.60	11.58	0.94	1.25 x 10 <sup>6</sup>	51.94
Quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i>	92.18	41.12	0.83	10.19	1.34	3.88 x10 <sup>6</sup>	42.43
Quitosano obtenido de crustáceos	79.83	40.06	2.92	8.31	2.58	3.77x10 <sup>6</sup>	31.06

Esta es una tabla comparativa de los resultados fisicoquímicos del quitosano obtenido de *Asp. niger* y crustáceo frente a un quitosano comercial.

El grado de desacetilación obtenido en este trabajo de investigación es de 79.83% para el quitosano obtenido a partir de crustáceos y de 92.18% para el quitosano fúngico, siendo el obtenido a partir de crustáceos similar al comercial y el quitosano fúngico fue superior a los dos. Existiendo una diferencia significativa entre las muestras de quitosano obtenidas en la investigación. Ambos grados de desacetilación se encuentran dentro de los parámetros establecidos según (Gacén J. & Gacén I., 1996) que son de 80 a 90%.

El quitosano extraído a partir de crustáceos presenta un mayor porcentaje de ceniza (2.92%) que el quitosano extraído a partir del hongo *Aspergillus niger* (0.83%) y que el quitosano comercial (0.60%), existiendo una diferencia significativa entre las muestras de quitosano obtenidas en la investigación.

El porcentaje de humedad obtenido a partir del hongo *A. niger* (10.19%) es casi similar al contenido de humedad obtenido en el quitosano comercial (11.58%). Y ambas muestras son mayores que la del quitosano obtenido a partir de crustáceos (8.31%). No se encontró una diferencia significativa entre las muestras de quitosano obtenidas en la investigación.

Evidentemente el quitosano obtenido a partir de crustáceos presenta una mayor cantidad de materia insoluble (2.58%) que el quitosano extraído a partir del hongo *A.niger*

(1.34%) y ambos presentan una cifra superior al quitosano comercial (0.94%). Se encontró una diferencia significativa entre las muestras de quitosano obtenidas en la investigación.

El peso molecular promedio viscoso, obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* fue estimado en  $3.88 \times 10^6$  g/mol y el obtenido a partir de crustáceos fue de  $3.77 \times 10^6$  g/mol; mientras que el quitosano comercial tiene un peso molecular de  $1.25 \times 10^6$  g/mol.

El quitosano obtenido del *Aspergillus niger* presenta un peso molecular un poco más alto en comparación con el quitosano de crustáceos y el quitosano comercial. Según (*Khan et al, 2002*) las muestras de quitosano obtenidas en esta investigación están dentro de los parámetros establecidos.

### 3.4.8 Caracterización biológica del quitosano obtenido de *A. niger* frente al obtenido de crustáceos a través del efecto cicatrizante por el método de Fuerza de tensión

**Tabla N° 16 Resultados del Método de Fuerza de Tensión**

RATONES	% QUITOSANO (CRUSTACEOS)			CONTROL		BLANCO
	0.25%	0.5%	1%	Vaselina	Cicatricure	
A	10.1ml	20.4ml	8.3ml	7.8ml	10.3ml	7.8ml
B	10.6ml	19.5ml	7.1ml	6.6ml	12.2ml	9.2ml
C	10.0ml	21.2ml	8.3ml	7.9ml	10.7ml	8.3ml
RATONES	% QUITOSANO (HONGO)			CONTROL		BLANCO
	0.25%	0.5%	1%	Vaselina	Cicatricure	
D	11.2ml	21.0ml	9.1ml	6.9ml	11.5ml	10.2ml
E	10.9ml	20.1ml	8.4ml	7.2ml	12.0ml	9.8ml
F	11.7ml	22.2ml	9.0ml	8.1ml	12.3ml	8.5ml

Esta tabla muestra los resultados de la Fuerza de tensión ejercida a las heridas de los ratones. Se utilizaron 36 ratones, los que fueron ubicados en 6 grupos de 6 ratones respectivamente. A su vez cada grupo se dividió en el % de quitosano (0.25, 0.5 y 1), un control (vaselina y cicatricure) y un blanco. Finalmente por el método de tensión se midió el gasto de agua destilada (ml.) para abrir nuevamente la herida, así se determinó el efecto cicatrizante. (Figura N° 28 y Cuadro N° 5 del ANEXO)

**Cuadro N° 2 Análisis de varianza del quitosano obtenido de crustáceos y *Aspergillus niger***

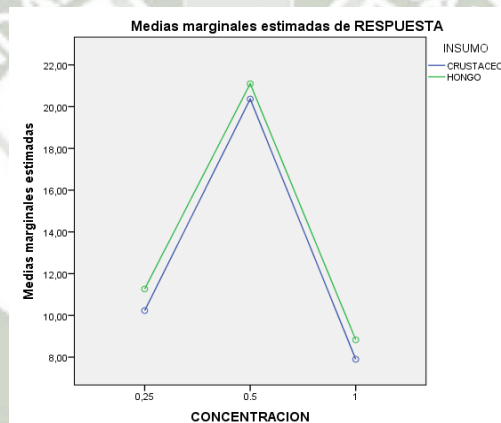
**Análisis de varianza del quitosano obtenido de crustáceos y hongos**

Variable dependiente: Efecto cicatrizante por el Método por tensión

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
CONCENTRACION	516,563	2	258,282	569,042	,000
INSUMO	3,645	1	3,645	8,031	,015
CONCENTRACION INSUMO	,070	2	,035	,077	,926
Error	5,447	12	,454		
Total	3701,770	18			

a. R al cuadrado = ,990 (R al cuadrado ajustada = ,985)

El análisis de varianza indica que hay diferencia significativa entre las concentración (0.5, 0,25 y 1) usada de los insumos empleados (quitosano de crustáceos o quitosano de hongos)



**Gráfico N° 4 Medias marginales estimadas vs. Concentración de quitosano**

**Cuadro N° 3 Análisis de Dunnett entre los insumos utilizados (vaselina, cicatricure y blanco vs el hongo a 0.5)**

T de Dunnett (bilateral) <sup>b</sup>	VASELINA	HONGO	-13,6667*	,62539	,000
	CICATRICURE	HONGO	-9,1333*	,62539	,000
	BLANCO	HONGO	-11,5667*	,62539	,000

Con respecto al análisis de Dunnett se observa que hay diferencia significativa entre los insumos y el hongo, siendo este último mejor.



**Cuadro N° 4 Análisis de comparación de medias entre los insumos probados (vaselina, blanco, cicatricure, Hongo)**

	INSUMO	N	Subconjunto			
			1	2	3	4
HSD	VASELINA	3	7.4000			
Tukey	BLANCO	3		9.5000		
	CICATRICURE	3			11.9333	
	HONGO	3				21.0667
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

El insumo proveniente del hongo tiene mejor poder cicatrizante que el insumo o el quitosano extraído del crustáceo. Y que su máximo poder cicatrizante se consigue cuando la concentración es 0.5%. Kojima et al., 2004; Pastor, 2004; Minagawa, Okamura, Shigemasa, Minami y Okamoto, 2007; Alsarra, 2009 indican que el grado de desacetilación, es importante, ya que se requiere que el quitosano tenga un grado parcial de desacetilación ((60-90%), a fin que se degrada más lentamente que los de grado bajo. Una degradación demasiado rápida puede ocasionar una reacción inflamatoria durante el proceso de curación de la herida, incrementando así el tiempo de cicatrización.

El grado de desacetilación del quitosano obtenido del hongo fue de 92.18 %, mientras que el quitosano obtenido de crustáceos fue de 79.83%, esta sería la principal razón por la que el quitosano obtenido de hongo presenta mejor efecto cicatrizante.

Tanto el grado de desacetilación como el contenido de proteínas que tiene el quitosano obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger* hace que su comportamiento frente a la cicatrización se mucho mejor que los demás productos probados en este trabajo (cicatricure, vaselina)

## CONCLUSIONES

1. Se logró extraer y desacetilar la quitina contenida en la pared celular del hongo *A. niger*, el cual presenta mejores propiedades físico químicas y de cicatrización, el quitosano extraído a partir de esta fuente fúngica natural es en definitiva una alternativa excelente para que este biopolímero sea considerado como una gran herramienta para el proceso de cicatrización de heridas.
2. Al comparar las propiedades fisicoquímicas del quitosano extraído a partir del hongo *A. niger* frente al quitosano extraído a partir de crustáceos, se observa la lectura en el espectrofotómetro del IR, en ambos tipos de quitosano se detectaron los siguientes grupos funcionales: metileno e hidroxilo, además en el quitosano fúngico se detectó una amida; en cuanto al grado de desacetilación del quitosano fúngico (92.18%) es superior al grado de desacetilación hallado del quitosano extraído a partir de crustáceos (79.83%), si se encontró entre ellos una diferencia significativa. A su vez el porcentaje de proteínas hallado en el quitosano fúngico fue de 41.12% y el de crustáceos fue de 40.06%, no se encontró entre ellos una diferencia significativa. En cuanto al porcentaje de humedad hallado en el quitosano fúngico fue de 10.19% y el de crustáceos fue de 8.31%, no se encontró entre ellos una diferencia significativa. Sin embargo el porcentaje de ceniza en quitosano extraído a partir de crustáceos (2.92%) es superior al quitosano fúngico (0.83%), a su vez también el porcentaje encontrado de materia insoluble en el quitosano extraído a partir de crustáceos (2.58%) es mayor que el

encontrado en el quitosano fúngico (1.34%), aquí si se encontró una diferencia significativa en ambas propiedades Finalmente, al analizar la viscosidad de ambos quitosanos con el fin de determinar el peso molecular del polímero en cada caso, el quitosano fúngico tuvo un peso molecular mayor ( $3.88 \times 10^6$  gr/mol) frente al ( $3.77 \times 10^6$  gr/mol) del quitosano extraído a partir de crustáceos.

3. Se logró preparar ungüentos a base de quitosano extraído a partir del hongo *A. niger* y a partir del quitosano extraído a partir de crustáceos a diferentes concentraciones 0.25%, 0.5% y 1% y al ser comparados con Cicatricure, un blanco y vaselina, se obtuvo un mejor poder cicatrizante del ungüento a base del quitosano fúngico a una concentración de 0.5%.





### RECOMENDACIONES Y/O SUGERENCIAS

- Investigar sobre un método de recuperación de proteínas a partir del efluente de desecho generado en el proceso de desproteínización, las cuales pueden ser utilizadas por ejemplo como suplemento en comida animal de pollos y pescado.
- Continuar con el estudio sobre el efecto cicatrizante del quitosano a partir de otras especies.
- Continuar con el estudio de la actividad cicatrizante del ungüento a base de quitosano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ACCENSI F. (2000).** Aportación al conocimiento de *Aspergillus* Sección *Nigri*. Departamento de Patología y Producción animal de la Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
2. **AGULLÓ, E. MATO, R., PENICHE, C. TAPIA, C. HERAS, A. SAN ROMÁN, J. ARQUÉLLES, W. GOYCOOLEA, F. MAYORGA, A. NAKAMATSU, J. y A.P. DE ABRAM. (2004).** Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
3. **ALZATE L., CUERVO R., VALENCIA M. (2014).** Extracción y caracterización de quitosano fúngico experimental y comercial, como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Universidad San Buenaventura, Cali, Colombia.
4. **ANCHISI, C., MELONI, M., MACCIONI, A. (2006).** Chitosan beads loades with essential oils in cosmetic formulations. *Journal of cosmetic science*. Vol. 57, pp. 205 – 214.
5. **A.O.A.C. (1984).** “Official Methods of Analyses” 13<sup>th</sup> Edition. Referenciado por: HERNÁNDEZ C., I. ÁGUILA A., (et al.). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, Universidad Autónoma de Puebla, *Superficies y Vacío* 22(3) 57-60, México, septiembre de 2009.
6. **A.O.A.C. (2005).** “Official Methods of Analyses” Cap. 32 Pág. 2, 18<sup>th</sup> Edition. Referenciado por: TELLO, E. (2017). Evaluación del quitosano obtenido a partir de escamas de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por métodos químicos y biológicos. UNSA. Arequipa. Perú.
7. **ALSARRA I. (2009).** Chitosan Topical Gel Formulation in the Management of Burn Wounds. *International Journal Biological Macromolecules*, 45(1), 16–21
8. **ARANAZ, I., MENGÍBAR, M., HARRIS, R., PAÑOS, I., MIRALLES, B., ACOSTA, N., GALED, G. y HERAS, A. (2009).** Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*. Vol. 3, Número 2, pp. 203-230.
9. **ARENAS, R. (2014).** “Micología médica ilustrada”
10. **ARGÜELLES W. (2004).** “Caracterización de quitina y quitosano”. En *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*”. 1ª edición

11. **AUSUBEL, BRENT, KINGSTON, MOORE, SEIDMAN, SMITH AND STRUHL. (1994).** Current protocols in molecular biology, Current Protocols, Brooklyn, N.Y.
12. **BALTODANO L., YAIPEN J. (2006).** “Obtención, caracterización y diseño de una forma farmacéutica semisólida (ungüento) a base de quitosano con efecto cicatrizante”. Universidad Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
13. **BARDALAYE, P., NORDIN, J. (1976).** Galactosaminogalactan from cell walls *Aspergillus niger*. Journal of Bacteriology. 125: 655-669.
14. **BARRA, A., ROMERO, S. Y BELTRAMINO, B. (2012).** Obtención de quitosano. Provincia de Santa Cruz. Sitio argentino de Producción Animal. Disponible en [http://www.produccionanimal.com.ar/produccion\\_peces/piscicultura/173-Quitosano.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/173-Quitosano.pdf)
15. **BECERRA J., VALDIVIA B., AGUILAR C., MARTINEZ J., CONTRERAS J., CUELLAR C. (2011).** Quitosán fúngico. Fuentes y Propiedades. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
16. **BEGOÑA M. (2015).** El papel de la nutrición en la cicatrización de las heridas. Trabajo de la Escuela Universitaria de Enfermería de Leioa. Vizcaya. España.
17. **BENAVENTE, M., MORENO, L., y MARTINEZ, J. (2011).** Sorption of heavy metals from gold mining wastewater using chitosan. Journal of the Taiwan institute of chemical engineers. Vol. 42, Número 6, pp. 976 – 988.
18. **BERGHOFF F. (2011).**”Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo”. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
19. **BILLMEYER W. (2008).** Ciencia de los polímeros. Parte I: Cadena de polímeros y sus características. Capítulo I. La ciencia de las macromoléculas, pp 3-14.
20. **BRUSCA, R. C., BRUSCA, G. J. (2005).** Invertebrados, 2ª edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
21. **CARRILLO, L. (2003).** LOS HONGOS DE LOS ALIMENTOS Y FORRAJES. Universidad Nacional de Salta-Argentina. ISBN 987-9381-19-X. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/homgos/htextocubierta.pdf>
22. **CASTRO N., VIDAL C. (2015).** “OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO DEL EMERITA ANALOGA A ESCALA PILOTO”. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.

23. **CERCENADO E., MARÍN M., INSA R., BOUZA E. (2010).** Emerging linezolid resistance: dissemination of the cfr gene among Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis and inability of the Etest method for detection. 50<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Boston, MA, USA. American Society for Microbiology. Abstr. C2-1490.
24. **CORTIZO A. (2011).** Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
25. **COMA (2003).** Generalidades de quitina y quitosano. Capítulo 2. Versión pdf. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19407/capitulo2.pdf>
26. **CONDE M. (2007).** Las promesas de la quitina. el segundo polímero natural más abundante. Revista ambiente plástico. Disponible en <http://www.ambienteplástico.com>
27. **CRESTINI C., KOVAC B., GIOVANNOZZI-SERMANNI G. (1996).** Production and isolation of chitosan by submerged and solid state fermentation from *Lentinus edodes*. Biotechnol. Bioeng. 50: 207-210
28. **CHIEN P. J., SHEU F., HUANG W.T., SU M. S. (2007).** Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. Food chemistry. 102:1192-1198
29. **CHEN Z.P., CAI Y., PHILLIPSON J.D. (1994).** Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. Planta Med. 60(6):541-545.
30. **DUTTA (2002).** Generalidades de Quitina y Quitosano. Capítulo 2. Disponible en : <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19407/capitulo2.pdf>
31. **ENOCH S., LEAPER DJ. (2007).** Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. Investigaciones Andinas. vol. 12. número 20. Basic science of Wound Healing. Surgery 2007; 26: 31 – 37
32. **ESCOBAR D., OSSA C., QUINTANA M., OSPINA W. (2013).** Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.
33. **FERNÁNDEZ B., David (2011).** Estudio del método de evaporación lenta para la fabricación de películas poliméricas basadas en quitosano y glicerol orgánico. Tesis de Maestría. Universidad Javeriana, Colombia.

34. **FERNÁNDEZ F. (2004).** Guía práctica de producción de Setas (*Pleurotus spp.*). Fungitec Asesorías. Guadalajara, Jalisco. México.
35. **FONG L. (2012).** Evaluación del grado de conversión de quitina a quitosano procedente del exoesqueleto del abdomen del camarón (*Litopenaeus Vannamei*) en función del contenido de nitrógeno total medido durante la hidrólisis alcalina a nivel laboratorio. (Tesis de grado). Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
36. **GACEN J., GACEN I. (1996).** Quitina y quitosano. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera (U.P.C.). Boletín intexter N°110. Úbeda, España.
37. **GARCÍA C. (2017).** “Obtención de quitosano a partir de exoesqueleto de langostino blanco (*Litopenaeus Vannamei*), para el tratamiento de efluentes industriales. Universidad Señor de Sipán. Pimentel, Perú.
38. **GARCÍA M. (2003).** Cultivo de setas y trufas. Cuarta edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
39. **GARCIA T., ROCA J. (2008).** Industrialización de los crustáceos para la obtención de quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo>.
40. **GEISER, D.M. (2008).** Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, 12: 1-6.
41. **GIRALDO J.D. (2003).** Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/277302110\\_propiedades\\_obtencion\\_caracterizacion\\_y\\_aplicaciones\\_del\\_quitosano](https://www.researchgate.net/publication/277302110_propiedades_obtencion_caracterizacion_y_aplicaciones_del_quitosano)
42. **GOBUR D. (2013)** Los artrópodos y sus características. Disponible en <http://www.imaginaryciencia.com>
43. **GOCHO H., SHIMIZUB H., TANIOKAC A., CHOUC T.J., NAKAJIMAL T. (2001).** *Carbohydr. polym.*, 41, 87
44. **GOMEZ R., MURILLO R. (2006).** “Espectroscopia Infrarroja”. Universidad Autónoma de México. México.
45. **GOMEZ H., ZAPATA A., TORRES E., TENORIO M. (2014).** Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. SENASA. PERÚ.
46. **GOYCOOLEA F.M., REMUÑAN –LÓPEZ C., ALONSO, M.J. (2009).** Nano partículas a base de polisacáridos: quitosano. Universidad de Santiago de Compostela. España.



47. **GUEVARA M., URCIA F., CASQUERO J. (2007).** Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de salud. Instituto nacional de salud. Lima, Perú.
48. **GUIBAL (2006).** Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology* 38, 43-74
49. **HELANDER I., NURMIAHO-LASSILA E., AHVENAINEN R., RHOADES J., ROLLER S. (2001).** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71: pp 235-244.
50. **HERNANDEZ H., AGUILA E., FLORES O., VIVEROS E.L., RAMOS E. (2009).** Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. Universidad Autónoma de Puebla. México.
51. **HIDALGO C., FERNÁNDEZ M., NIETO OM., PANEQUE AA., FERNÁNDEZ G., LLÓPIZ JC. (2009).** Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista. Iberoamericana de Polímeros*; Vol. 10: pp 1-17.
52. **HONG KYOON N., YOUNG IN CHO., HYEUNG R., MEYERS S. (2000).** “Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15psi/121 °C”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 48, Número 6, pp. 2625–2627.
53. **HORTA, A (1982).** “MACROMOLÉCULAS”. UNED. Madrid, España.
54. **HOSOKAWA (1990)** Characterization of molecular species of liver microsomal carboxylesterases of several animal species and humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277: 219-227.
55. **HOWES E., SOOY J., HARVEY S. (1929).** The healing of wound as determined by their tensile strength J.A.M.A. The Journal of the American Medical Association. 1929
56. **HUGGINS ML. (1942).** *Chem. Soc.*, 64, 2716. referido por: Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* Vol. 5(1), Marzo de 2004.
57. **JACOME L., HERNANDEZ M., COLIN C., ORTEGA S., CERON G., FRANCO R., (2014).** Tinciones básicas en el laboratorio de microbiología”. Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ). Xochimilco, México.
58. **JOOYEOUN, J., YANYUN, Z. (2011).** “Characteristics of deacetylation and depolymerization of  $\beta$ - chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens”. *Carbohydrate research.* Vol. 346, Número 13, pp.1876-84.

59. **KARUNARATNE D. (2012).** The Complex World of Polysaccharides. Recuperado de <http://doi.org/10.5772/2947>
60. **KHALAF, S.A. (2004).** Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*. 6: 1033-1036
61. **KHAN, W. PRITHIVIRAJ, B., SMITH, D.L. (2002).** Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetic*. McGill University. Quebec, Canada.
62. **KOJIMA, K. (2004).** Effects of Chitin and Chitosan on Collagen Synthesis in Wound Healing. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(12), 1595–1598
63. **KONG, M., XI GUANG CHEN, KE XING, HYUN PARK (2010).** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of food microbiology*, 144:51-63
64. **KUMAR DUTTA, P., DUTTA, J., TRIPATHI, V. (2004).** Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, Department of chemistry, Motilal Nehru National Institute of Technology, *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol. 63, pp 20 -31.
65. **KUMAR, M., MUZZARELLI, R., MUZZARELLI C., SASHIWA H., DOMB A. (2004).** Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem. Rev.* 104 6017-6084.
66. **LAREZ VELÁSQUEZ, C. (2006).** Quitina y quitosano: Materiales del pasado para el presente y futuro. *Avances en química*. Vol. 1, Número 2, pp.15- 21
67. **LÁREZ VELÁSQUEZ, C. (2003).** Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Vol. 4 (2) 91-109
68. **LEZAMA L., S. GÓMEZ B., J. (2014).** Determinación, Valorización y cuantificación de quitosano a través del exoesqueleto del camarón para coagulante, fertilizante, fungicida y bactericida natural. Universidad de San Buenaventura. Santiago de Cali, Colombia.
69. **LÓPEZ A., RIVAS J. (2010).** Degradación de películas plastificadas de quitosano contenidas a partir de conchas de camarón., *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.*, Vol.25. Número 2, pp. 133-143
70. **LOPEZ C., HERNANDEZ R., SUAREZ C., BORRERO M. (2008).** Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos

agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

71. **LÓPEZ F. (2004).** Fundamentos de polímeros. VI Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química. Universidad de Los Andes. Venezuela.
72. **MARMOL Z., PAEZ G., RINCON M., ARAUJO K., AIELLO C., CHANDLER C., GUTIERREZ E. (2011).** “Quitina y Quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones”. Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela.
73. **MARTIN J., DAVIS G. (2001).** An Updated Classification of the Recent Crustacea. Natural History Museum of Los Ángeles Country.
74. **MARTÍNEZ, A., CORTEZ J., EZQUERRA A., GRACIANO F., RODRÍGUEZ M., CASTILLO M., YÉPIZ M., PLASCENCIA (2010).** Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. Carbohydrate polymers, 82:305-315
75. **MATSUMOTO K. (2011).** Producción de quitina y quitosano, nuevo proceso biotecnológico para la obtención de quitina y quitosano, Universidad Autónoma Metropolitana. México.
76. **MAZA I., HERNÁNDEZ J. (2007).** Caracterización fisicoquímica de quitosano para su aplicación como biosorbente de metales”. Revista de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingenierías. REVCUNI 11(1), pp 1-5
77. **MIDWOOD K., WILLIAMS L., SCHWARZBAUER J. (2004).** Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. Journal of Biochemistry & Cell Biology.
78. **MINAGAWA T., OKAMURA Y., SHIGEMASA Y., MINAMI S., OKAMOTO Y. (2007).** Effects of Molecular Weight and Deacetylation Degree of Chitin/Chitosan on Wound Healing. Carbohydrate Polymers, 67(4), 640–64
79. **MING-TSUNG YEN, YU-HSIU, TSENG.RUEI-CHIAN, LI. JENG-LEUN, MAU. (2007).** Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. Iwt-food Science and Technology, Vol. 40, pp. 255- 261.
80. **MORALES J., ROJAS D. (2005).** Polímeros sintéticos y naturales. Pontificia Universidad Católica de Chile. Chile.
81. **NO H.K., MEYERS S.P. (2000).** Application of chitosan for treatment of waste-waters, rev. environ. contam. toxicol. 163 pp 1-28.
82. **ORANTES A. (2015).** Los crustáceos y sus características principales. Disponible en <http://loscrustaceosysuscaracteristicas.html>

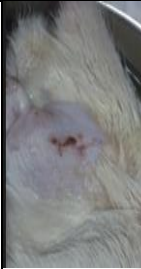
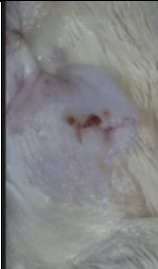










83. **ORZÚA-GONZÁLES M., AGUILAR-GONZALES C., RODRIGUEZ-HERRERA R. (2009).** “Velocidad de crecimiento de aspergillus niger sobre diferentes residuos agroindustriales”. Departamento de Investigación en Alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila. México
84. **OKUYAMA K., NOGUCHI K., KANENARI M., EGAWA T., OSAWA K., OGAWA (2000).** Structural diversities of chitosan and its complexes, carbohydr. polym. 41 (3) pp 237-247.
85. **PARADA, L., CRESPIÓN G., MIRANDA R., KATIME E. (2004).** Revista latinoamericana polímeros. 5, 1
86. **PASTOR A., HIGUERA (2004).** Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. En: Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú: Proyecto CYTED IV: (19):29-312.
87. **PASTOR, A. (2004).** Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Universidad Pontificia Católica del Perú. pp.29-312.
88. **PAZ N., FERNÁNDEZ M., LÓPEZ O., NOGEUIRA A., GARCÍA C., PÉREZ D., TOBELLA J., MONTES DE OCA Y., DÍAZ D. (2012).** Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. Revista Iberoamericana de Polímero., 13, 3
89. **RAMÍREZ C., DELGADO E., ANDRADE J. (2016).** Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. Journal CIM. Vol. 4. Núm. 1. Disponible en: <https://www.researchgate.net>
90. **RAMÍREZ M., RODRÍGUEZ A., ALFONSO LUIS G., PENICHE, C. (2010).** Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. Biotecnología Aplicada. Vol.27. Número. 4; pp 270-276.
91. **RAVI KUMAR M, MUZARELLI R., MUZARELLI C., SASHIWA H., DOMB .J. (2004).** “Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives”. Chemical Reviews, 104 (12): 6017-6084.
92. **REVISTA CRECES (1985)** “Quitina”
93. **RINAUDO, 2006; KUMAR 2000.** Chitosan based biomaterials. Vol 1. Fundamentals. Edited by J. Amber Jennings and Joel D. Bumgardner. Cap. 9. Production of electrospun Chitosan for biomedical applications, pp 211
94. **ROBERTS G. (1998).** Chitin Chemistry; Ed. Macmillan Press Ltd.: London.

95. **ROMERO, J., RODRÍGUEZ M., PÉREZ R. (2000).** *Pleurotus ostreatus*. Importancia y tecnología del cultivo. Grupo de Nutrición, Universidad de Cienfuegos Carlos Rafael Rodríguez. Cuatro caminos, Ciudad de Cienfuegos. Cuba.
96. **ROWE R., SHESKEY P., QUINN M. (2009).** “Chitosan”. En Handbook of Pharmaceutical Excipients. Italia. Pharmaceutical Press. Versión electrónica.
97. **SANTIAGO F. (2011).** Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.
98. **SASTOQUE L., MERCADO M., MARTÍNEZ M., QUEVEDO B., PEDROZA A. (2007).** Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 6 N° 2 pp 137-146. REFERIDO por: Quitina y Quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/235431334\\_Quitina\\_y\\_Quitosano\\_polimeros\\_amigables\\_Una\\_revisión\\_de\\_sus\\_aplicaciones](https://www.researchgate.net/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revisión_de_sus_aplicaciones).
99. **SEIFERT K., GAMS W., CROUS P., SAMUELS G. (2000).** Molecules, morphology and classification: towards monophyletic genera in the Ascomycetes. *Studies in Mycology* 45: 1-230
100. **SHIRAI K. (2011).** “Quitosano”. Unidad Iztapalapa. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.
101. **SIMOES N., MASCARO M., ORDOÑEZ U., ARDISSON P. (2010).** Crustáceos. Biodiversidad y Desarrollo Humano. Yucatán, México.
102. **SMITH S., DUELL D., MARTIN B. (2009).** Cuidado de la herida y apósitos. Técnicas de enfermería clínica. De las técnicas básicas a las avanzadas. 7ª ed. Madrid, pp. 874-914.
103. **STEVENS W., CHEYPRATUB P., HAIQING S., LERTSUTTHIWONG P., CHUEN HOW, CHANDRKRACHANG (2012).** Alternatives in Shrimp Biowaste Processing.
104. **STRUSZCZYK M. (2000).** Characterization of chitosan. Carbohydrates as organic raw materials. Vol. 4, pp. 15-19. Referenciado por: Hernández, I. La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones cultivos tropicales, Vol. 25. Núm.3, pp. 97-110. 2004
105. **SUAREZ M., CÓRDOVA C., SÁNCHEZ F., NOEL M., GARCIA, S. (2007).** Empleo de *aspergillus niger* en la biorremediación de ambientes contaminados con Cr

- (VI) y Fenol. Laboratorio de biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
106. **TELLO, E. (2017)**. Evaluación del quitosano obtenido a partir de escamas de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por métodos químicos y biológico. UNSA. Arequipa, Perú.
107. **THARANATHAN, R. N., KITTUR, F. S., (2003)** Chitin the Undisputed Biomolecule of Great Potential. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 43, pp. 61-87.
108. **TOLEDO M. (2014)**. Obtención y caracterización de quitosano a partir de los residuos sólidos de la industria de langostinos. Universidad Nacional Del Callao. Callao, Perú
109. **TORRENEGRA R., RUEDA L. (2011)**. Contribución fotográfica al estudio de microhongos filamentosos del páramo de Guasca. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
110. **TSAIH L., CHEN R. (1999)**. Molecular weight determination of 83% degree of deacetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. Journal of applied polymer science. Journal of Applied Polymer Science.
111. **VELÁSQUEZ C. (2006)**. “Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro”. Mérida, Venezuela
112. **VÍLCHEZ S. (2005)**. Nuevos tratamientos de lana con enzimas. Barcelona España. Universidad de Barcelona pp 100-108.
113. **VINIEGRA-GONZÁLES G., (2003)** Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. Biochemical Engineering Journal, 13, 157-167.
114. **VOGEL A., TATCHELL A., FURNIS B., HANNAFORD A., SMITH P. (1996)**. VOGEL'S Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th Edition. Prentice Hall,

**ANEXOS**

**Cuadro N° 5 Imágenes de los ratones con mejor efecto cicatrizante, dado por el método de tensión**

RATONES	% QUITOSANO (CRUSTACEOS)			CONTROL		BLANCO
	0,25	0,5	1	Vaselina	Cicatricure	
<b>B</b>						
<b>C</b>						
RATONES	% QUITOSANO (HONGO)			CONTROL		BLANCO
	0.25	0.5	1	Vaselina	Cicatricure	
<b>D</b>						
<b>F</b>						

**Cuadro N° 6 Cuadro de Evolución de cicatrización en ratones**

DIA	QUITOSANO (HONGO)			QUITOSANO (GRUSTACEOS)			VASELINA	CICATRICURE	BLANCO
	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1			
0	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.	Enrojecimiento y ligero edema alrededor de la sutura.
1	Aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Ligero aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Ligero aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Gran aumento de tamaño de la herida. Existe aún la presencia de una coloración roja.	Aumento de tamaño de la herida. Empieza a notarse una coloración café en la herida.	Gran aumento de tamaño de la herida. Existe aún la presencia de coloración roja.
2	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Empieza a notarse una coloración café y a disminuir la inflamación.	Evidente disminución de la inflamación y de coloración café.	Empieza a notarse una coloración café y a disminuir la inflamación.
3	Desaparece por completo la inflamación en la herida y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Desaparece por completo la inflamación en la herida y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Desaparece por completo la inflamación en la herida y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Desaparece por completo la inflamación en la herida y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Desaparece por completo la inflamación en la herida y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Desaparece por completo la inflamación en la herida y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Disminuye la inflamación en la herida aún se observa un color café muy ligero.	Desaparece por completo la inflamación y la piel del ratón retoma su coloración normal.	Disminuye la inflamación en la herida, aun se observa un color café muy ligero.

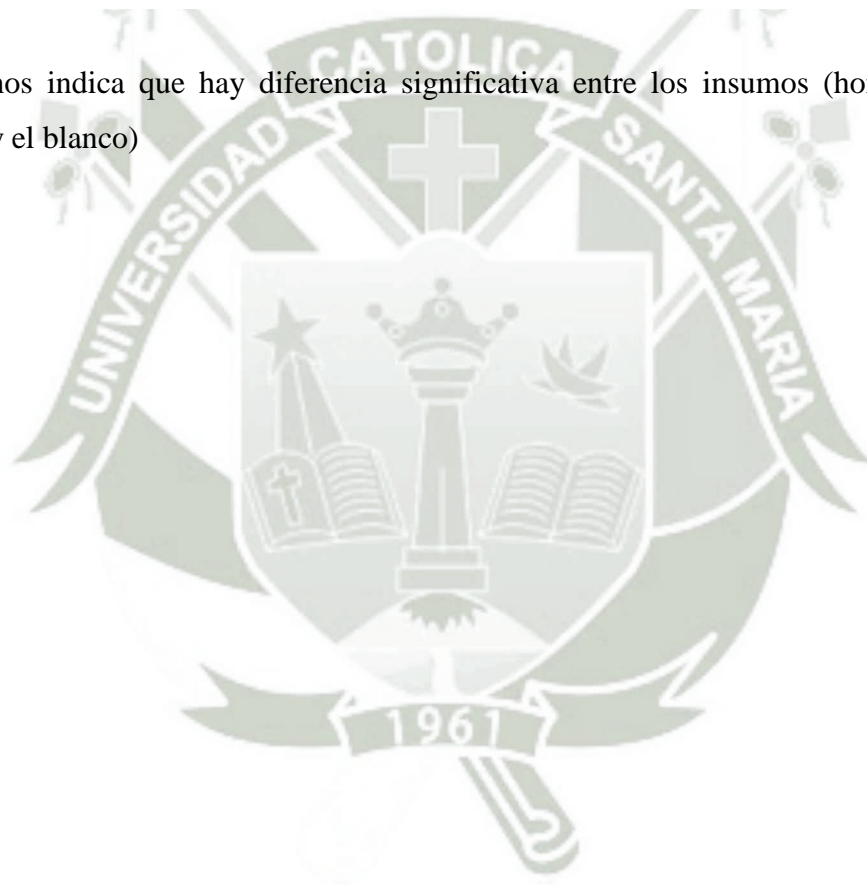


**Cuadro N° 7 Análisis de varianza del quitosano obtenido de Aspergillus niger, Vaselina, Cicatricure y Blanco**

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
INSUMO	326,149	3	108,716	185,312	,000
Error	4,693	8	,587		
Total	2198,350	12			

R al cuadrado = ,986 (R al cuadrado ajustada = ,980)

El cuadro nos indica que hay diferencia significativa entre los insumos (hongo, vaselina, cicatricure y el blanco)





**Figura N° 16 Inoculación del hongo *A. niger* en diferentes sustratos**



**Figura N° 17 Crecimiento del hongo *A. niger* en cascara de naranja**



**Figura N° 18 Crecimiento del hongo *A. niger* en granos de arroz**



Figura N° 19 Crecimiento del hongo *A. niger* en cascaras de arroz



Figura N° 20 Inicio del proceso de extracción de quitosano a partir de crustáceos



Figura N° 21 Inicio del proceso de extracción de quitosano a partir del hongo *A. niger*



Figura N° 22 Quitosano extraído a partir de crustáceos

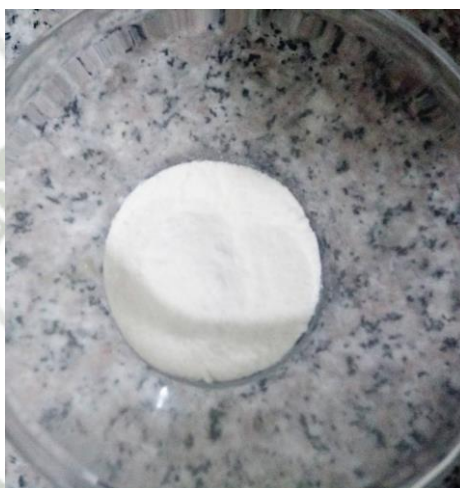


Figura N° 23 Quitosano extraído a partir del hongo *A. niger*

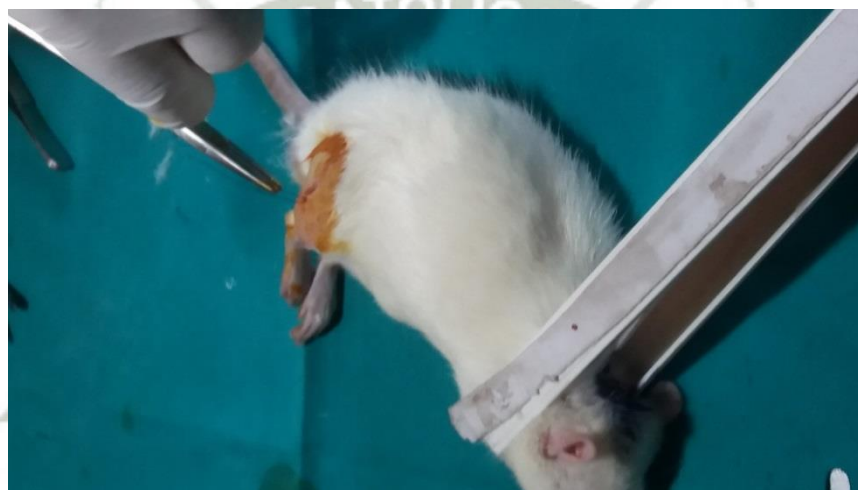


Figura N° 24 Ungüentos producidos a partir del quitosano extraído a partir de crustáceos a diferentes concentraciones



**Figura N° 25 Ungüentos producidos a partir del quitosano extraído a partir del hongo *A. niger* a diferentes concentraciones**

S



**Figura N° 26 Incisión generada en rata**



**Figura N° 27 Sutura del corte**



**Figura N° 28** Aplicación del método de tensión

