

Efecto de la reducción del peso molecular de quitosano obtenido de plumas de pota (*Dosidicus gigas*) utilizando dos métodos de despolimerización sobre su capacidad antimicrobiana

Effect of the reduction in the chitosan molecular weight produced from giant squid (*Dosidicus gigas*) pen using two methods of depolymerization on their antimicrobial capacity

Enoc Moreno¹; Ruben Alfaro²; Victor S. Guzmán²;
John Rimaycuna¹; Gerardo J. F. Cruz^{1,*}

Resumen

En esta investigación se obtuvo quitosano de diferente peso molecular (M_w), usando ultrasonido con tiempos de exposición de 30, 60 y 90 minutos a una temperatura de 30, 45 y 60 °C, e irradiación ultravioleta (UV) con tiempos de exposición de 1, 2 y 3 minutos en presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a concentraciones de 1, 2 y 3 %, como métodos de despolimerización del quitosano nativo extraído de la pluma de *Dosidicus gigas* (pota o calamar gigante), con un grado de desacetilación de 85,5 % y un peso molecular equivalente a 1 0554 78 Da. El tratamiento con ultrasonido a 40 kHz no generó una variación significativa en el M_w del quitosano, sin embargo, en el tratamiento con irradiación UV+ H_2O_2 por 2 y 3 minutos se observó una disminución significativa del M_w hasta 431 536 Da. Se evaluó también la capacidad antimicrobiana (A_c) del quitosano con diferente M_w frente a *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva) y *Klebsiella oxytoca* (bacteria Gram negativa). El análisis de la A_c refleja que para *S. aureus* la inhibición es estadísticamente igual, asimismo el quitosano sonificado por 30 minutos a 30 y 45 °C y el quitosano irradiado por 3 minutos con H_2O_2 al 3 %, generan inhibición significativa frente a *K. oxytoca*.

Palabras clave: Quitosano; despolimerización; ultrasonido; radiación; capacidad antibacteriana.

Abstract

In this study, chitosan samples with different molecular weights (M_w) were obtained from native chitosan (deacetylation degree of 85.5 percent and a molecular mass of 1 0554 78 Da) made of *Dosidicus gigas* (giant squid) pens. Different depolymerization methods were carried out, including ultrasound treatment with exposition times of 30, 60 and 90 minutes combined with three temperatures levels 30, 45 and 60 °C, ultraviolet radiation (UV) with exposure times of 1, 2 and 3 minutes in presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) in three concentrations 1, 2 and 3 %. The ultrasonic treatment (40 kHz) did not generate a significant variation in the M_w of the native chitosan. Treatments consisted of ultraviolet radiation combined with H_2O_2 with exposure times of 2 and 3 minutes significantly decrease M_w up to reach 431 536 Da. Additionally, the antimicrobial capacities (A_c) of the chitosan samples with different molecular weights against to *Staphylococcus aureus* (gram-positive bacterium) and the *Klebsiella oxytoca* (gram-negative bacterium) were evaluated. The analysis demonstrates that the inhibition of the samples for the *Staphylococcus aureus* is statistically the same. The sonicated chitosan (exposed during 30 minutes with temperatures of 30 and 45 °C) and the irradiated chitosan (exposed during 3 minutes with H_2O_2 of 3 %) generate a significant inhibition against *Klebsiella oxytoca*.

Keywords: Chitosan; depolymerization; ultrasound; radiation; antibacterial capacity.

1 Laboratorio de Análisis Ambiental, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes, Perú.

2 Departamento de Biología y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Tumbes, Perú.

* Autor correspondiente: gcruz@untumbes.edu.pe (G. Cruz).

Introducción

El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina. La quitina es muy abundante en la naturaleza y forma parte de la pared celular de ciertos hongos y levaduras. La quitina es el componente más importante en los exoesqueletos de los artrópodos (crustáceos e insectos) y en la rádula de los moluscos (parte de la boca que les permite raspar los alimentos), así como del pico de cefalópodos como pulpos y calamares. La quitina también es el principal constituyente de la pluma del calamar y la pata. Sin embargo, y pese a su amplia distribución y disponibilidad en la naturaleza, la quitina está sub-explotada. Actualmente, sólo se extrae de manera comercial a partir de los caparazones de crustáceos, principalmente de cangrejos, langostas, krill y langostinos (Nakamatsu, 2012).

El quitosano es una fuente renovable importante con mucho potencial debido a las diversas propiedades que posee siendo un polímero biodegradable, biocompatible, no tóxico ni alergénico y con actividad antimicrobiana. Estas propiedades, junto a su fácil disolución facilita su procesamiento, asimismo dependiendo del tratamiento al que haya sido sometido, el quitosano puede tener pesos moleculares superiores al millón de daltons, dando lugar a soluciones sumamente viscosas y haciéndolo un biomaterial con innumerables aplicaciones.

El quitosano, principal derivado de la quitina, se obtiene industrialmente mediante tratamiento de desacetilación química o enzimático. Dependiendo de las condiciones de reacción, se obtienen quitosanos de diferentes pesos moleculares y grados de desacetilación. Estas variables los hacen útiles para diversas aplicaciones. Actualmente, son usados como productos alternativos en el ámbito de la tecnología agrícola como bioestimulantes en el control de plagas y en la protección de semillas y frutos, se utiliza en cosmetología, dadas sus

propiedades regenerativas de los tejidos y su potente acción bactericida, en alimentación por ser floclulantes de proteínas y lípidos, y por su acción anti-colesterolémica, entre otras (Abram, 2004).

Cabe recalcar que tanto el peso molecular como el grado de desacetilación influyen tremendamente en las propiedades del producto, por lo que es muy importante su control y medición. El quitosano con grados de desacetilación elevados se disuelve fácilmente (aunque lentamente) en soluciones acuosas ligeramente ácidas. El medio ácido protona los grupos aminos libres del polisacárido formando un polielectrolito de carácter catiónico, facilitando su solubilidad en agua.

La propiedad antimicrobiana del quitosano y sus derivados aun con resultados contradictorios, ha recibido considerable atención en los últimos años. Tal aplicación se deriva de la carga catiónica de la molécula de quitosano dando lugar a la unión agresiva sobre la superficie celular microbiana, lo que lleva a la contracción gradual de la membrana de la célula y finalmente a la muerte. Se han propuesto varias explicaciones posibles para la actividad antimicrobiana, a saber la molécula policatiónica de quitosano interactúa con los componentes de la pared celular predominantemente aniónicos (lipopolisacáridos y proteínas) del microorganismo, lo que resulta en la fuga de componentes intracelulares debido a cambios en permeabilidad de la barrera; la prevención de la entrada de los nutrientes en la célula; la unión a ADN, y por lo tanto la inhibición de ARN y la síntesis de proteínas; y la unión a través de interacciones hidrófobas. El quitosano muestra una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias grampositivas, gram-negativas y hongos (Vishu *et al.*, 2005).

Se requiere un estudio detallado para explorar la relación entre la actividad

antimicrobiana de quitosano, su peso molecular y la concentración. En la presente investigación se evalúa la variación en la capacidad antimicrobiana del quitosano obtenido a partir de plumas de Pota (*Dosidicus gigas*) por la reducción de su peso molecular usando

dos métodos de despolimerización, asimismo el mejor método de despolimerización para la reducción del peso molecular; teniendo como producto final los parámetros técnicos de un quitosano con mejor capacidad antimicrobiana.

Materiales y métodos

Se extrajo quitosano a partir de cartílago (pluma) de pota de acuerdo al procedimiento descrito por García (2013), con algunas modificaciones. La obtención del polímero se llevó a cabo en dos procesos: desproteinización y desacetilación. Primero las plumas de potas secas y molidas a tamaño de partícula de 1,5 μm se trataron con una solución de NaOH al 10 % en proporción 1:15 w/v por 90 minutos, con temperaturas entre 65 a 70 °C en agitación constante; finalizado este proceso se lavó con abundante agua corriente hasta alcanzar pH 7. La desacetilación se realizó con una solución de NaOH al 50 % en proporción 1:10 w/v a una temperatura de 95 a 100 °C durante 2 h, manteniendo agitación constante.

La humedad y cenizas del polímero se determinaron por análisis gravimétrico proximal de acuerdo a la norma ASTM F 2103-01 (2001). Para determinar la humedad se colocó una muestra de 2 g de quitosano en la estufa a 105 °C durante 3 h hasta que el peso fue constante; se calculó el porcentaje de humedad de acuerdo a la diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra seca. Para determinar cenizas se colocó una muestra sin humedad de 2 g de quitosano en el horno mufla a 800 °C durante 6 h. Se midió el porcentaje de cenizas por diferencias de peso.

La despolimerización con ultrasonidos se realizó según lo descrito por Baxter *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de quitosano de 0,01 g/mL en una solución al 1 % de ácido acético; se agitó el quitosano en la solución durante un

periodo de 12 h antes del tratamiento con sonicación. Para los experimentos se empleó un limpiador ultrasónico (WiseClean® Typ WUC - A03H) con una frecuencia de 40 kHz. En todos los casos se modificó el tiempo de exposición al ultrasonido: 30, 60, y 90 minutos; y la temperatura de reacción de: 30, 45 y 60 °C, manteniendo constante la intensidad de sonido; luego se precipitó el quitosano en solución, usando una solución de NaOH 2 M y se lavó con agua destilada hasta alcanzar pH 8, se secó a 60 °C por 24 h y se redujo de tamaño hasta obtener un polvo fino.

En el tratamiento combinado H_2O_2 y radiación UV usado para despolimerizar el quitosano se siguió la metodología descrita por Hien *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de quitosano de 0,01 g/mL en una solución al 1 % de ácido acético, agitando el quitosano en la solución durante un periodo de 12 h antes del tratamiento con radiación. Se irradió en un fotoreactor diseñado a partir de una caja herméticamente cerrada y de color negro, adecuada con una fuente de radiación UV Ultra-Vitalux OSRAM (220 V, 300 W), con una tasa de dosis de radiación ionizante de 13,6 Gy/s. Se modificó el tiempo de exposición a la radiación UV a 1, 2 y 3 minutos, y la concentración inicial del H_2O_2 de 1, 2 y 3 %, manteniendo constante la intensidad de radiación UV; luego se precipitó el quitosano, añadiéndole una solución de NaOH 2 M, se lavó con abundante agua destilada hasta alcanzar pH 8, se secó a 60 °C por 24 h y con la ayuda de un mortero se redujo el tamaño de partí-

cula. El peso molecular y grado de desacetilación se determinaron por viscosimetría capilar y titulación potenciométrica según Parada *et al.* (2004). Para esto, se relaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular encontrado usando la ecuación de Mark-Houwink.

La viscosidad intrínseca se determinó a partir de una solución de 2,5 mg/mL de quitosano en una solución buffer 0.2 M de ácido acético y 0,1 M de acetato de sodio, de la cual se hacen diluciones: 1/2, 1/4 y 1/8 con el mismo buffer. Se empleó un viscosímetro Ubbelohde-ASTM serie N° 1B, equipado con un baño para viscosímetro Thermocap Plus marca Fungilab, con capacidad de regular la temperatura en $\pm 0,01$ °C a temperatura constante de 30 °C. Se determinó el tiempo de caída de las disoluciones de quitosano por cinco veces de forma repetitiva y a partir de la ecuación de Poiseuille, se calculó su viscosidad. El grado de desacetilación se determinó usando 0,125 g de quitosano en 25 mL de HCl 0,1 N; se agitó hasta su disolución, se tituló con NaOH 0,1 N midiendo la variación de pH hasta llegar a un volumen de 30 mL aproximadamente y se obtuvo la curva de titulación con los datos de pH versus volumen de gasto de NaOH. Para determinar la capacidad antimicrobiana del quitosano sin despolimerizar y despolimerizado frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

(Gram-positiva) y *Klebsiella oxytoca* (Gram-negativa) se utilizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar. Inicialmente se preparó una solución de quitosano al 1 % (w/v) en ácido acético 0,1 M, manteniendo la agitación constante durante 6 h a 60 °C. Se adicionó 2,5 μ L de esta solución a discos de 6 mm confeccionados con papel filtro Whatman N° 40 previamente esterilizados, obteniendo una concentración final de 50 μ g de quitosano por disco. Por otro lado, se preparó una suspensión bacteriana ajustada al tubo N° 0.5 de la escala de McFarland, a partir de colonias bacterianas cultivadas por 18 a 24 h en agar nutritivo. Se sembró 1 mL de este inóculo en la superficie seca de las placas de Mueller Hinton y se dejaron secar durante 4 a 5 minutos. Posteriormente, se colocaron los discos individuales de manera uniforme a 25 mm de distancia ya inoculado. Las placas se incubaron a 35 °C por 18 a 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición alrededor de cada disco. Se aplicó un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo, para determinar la diferencia significativa de los métodos de despolimerización aplicados, y un análisis de varianza de un factor para evaluar la diferencia en la capacidad antimicrobiana.

Resultados

En la extracción del quitosano de la pluma de *D. gigas* (Figura 1) del 100% de pluma seca y molida, en el proceso de desproteínización se obtuvo 68,43% de quitina y finalmente con el proceso de desacetilación 43,16% de quitosano seco.

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje promedio de humedad del quitosano equivalente a 12,61 % \pm 0,15 y el contenido de cenizas 14,34 % \pm 0,08.

La relación de pH y el gasto de NaOH en la titulación del quitosano se muestran

en la Figura 2, así como los puntos de inflexión de la primera derivada del pH (Figura 3) que señalan 18 y 23,8 mL como volumen de gasto de NaOH menor y mayor, respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de humedad y cenizas del quitosano de pota

Muestra	% Humedad	% Cenizas
Quitosano de Pota	12,61 \pm 0,15	14,34 \pm 0,08

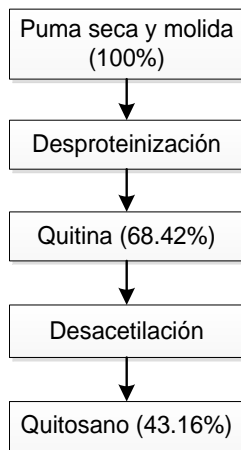


Figura 1. Balance de materia en la obtención de quitosano de *D. gigas*.

En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de grupos amino (NH₂) presentes en el quitosano de pluma de *D. gigas* equivalente a 8,50%, además su grado de desacetilación de 85,47%.

Tabla 2. Grupos amino presentes en el quitosano y grado de desacetilación

Muestra	%NH ₂	%DD
Quitosano de Pota	8,50	85,47

La Figura 4 muestra el gráfico de la viscosidad reducida en relación a la concentración del quitosano de *D. gigas* en solución, graficado a partir de los valores de concentración, tiempo de caída y viscosidad reducida, obtenidos del análisis de viscosidad (Tabla 3).

El peso molecular del quitosano extraído a partir de pluma de *D. gigas* se muestra en la Tabla 4 y equivale a 1 055 478 Da.

Tabla 3. Análisis viscosimétrico de quitosano extraído de pluma de pota

Muestra	Concentración (g/ml)	Tiempo de caída (segundos)	(η_e)/C
Buffer	-	16,69	-
Q ₁	0,0025	428,02	9860,345
Q _{1/2}	0,0012	107,47	4352,490
Q _{1/4}	0,0006	46,19	2829,406
Q _{1/8}	0,0003	30,72	1953,251

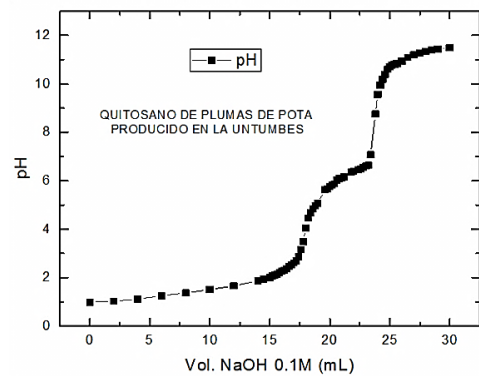


Figura 2. Curva de titulación para el quitosano de pota.

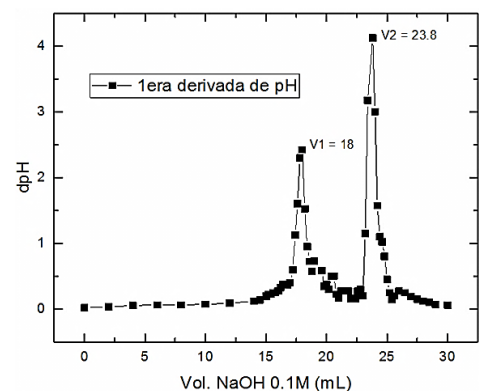


Figura 3. Primera derivada con puntos de inflexión.

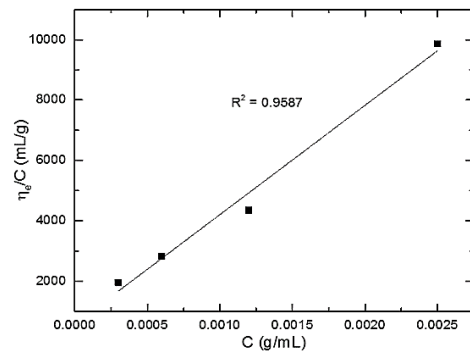


Figura 4. Viscosidad reducida vs concentración para quitosano de *D. gigas*.

Tabla 4. Constantes de Mark-Houwink-Sakurada y peso molecular

Muestra	<i>K</i>	<i>a</i>	[η]	M _w (Da)
Quitosano de Pota	0,0030	0,948	936,83	1 055 478

El peso molecular del quitosano despolimerizado usando ultrasonidos a diferentes condiciones de tiempo y temperatura, se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Pesos moleculares (Da) del quitosano sonificado

	30 °C	45 °C	60 °C
30 minutos	1 182 118,0	1 295 688,3	1 207 468,4
60 minutos	1 295 448,1	1 142 713,6	1 113 539,8
90 minutos	1 234 882,7	1 105 010,8	1 186 779,4

La tabla 6 muestra que el menor peso molecular es 431.535×10^3 Da y corresponde al quitosano despolimerizado usando radiación UV por 2 minutos con H₂O₂ al 3 %.

El tamaño de halo de inhibición microbiana (mm) del quitosano despolimerizado por ultrasonidos frente a *K. oxytoca* se presenta en la tabla 7; se evidencia que la mayor inhibición es generada por el quitosano sonificado por 30 minutos a 30 y 45 °C.

Tabla 7. Inhibición microbiana (halos en mm) frente a *K. oxytoca*, para el quitosano despolimerizado usando ultrasonidos

Sin Sonicar	30 minutos			60 minutos			90 minutos		
	30 °C	45 °C	60 °C	30 °C	45 °C	60 °C	30 °C	45 °C	60 °C
9.13	11,00	10,00	8,50	9,50	7,88	8,63	7,50	8,50	8,63
8.50	10,50	10,50	8,00	9,00	7,50	8,13	7,63	8,38	8,38
8.50	14,00	13,75	8,50	11,00	7,25	8,00	8,88	7,75	8,00
8.50	14,00	14,00	8,50	11,00	7,25	8,00	8,88	7,75	8,00

Tabla 8. Inhibición microbiana (halos en mm) frente a *S. aureus*, para el quitosano despolimerizado usando ultrasonidos

Sin Sonicar	30 minutos			60 minutos			90 minutos		
	30 °C	45 °C	60 °C	30 °C	45 °C	60 °C	30 °C	45 °C	60 °C
9,13	7,00	7,00	7,13	7,25	7,25	7,00	7,50	7,25	7,38
8,50	7,00	7,00	7,25	7,75	7,38	7,00	7,75	7,00	7,25
8,50	8,50	7,00	8,50	8,25	7,50	7,00	8,25	7,75	7,00
8,50	8,25	8,00	9,25	8,88	8,50	8,00	9,00	8,25	8,00

Tabla 6. Pesos moleculares (Da) del quitosano irradiado en presencia de H₂O₂

	1 %	2 %	3 %
1 minuto	1 265 326,5	720 968,6	1 055 632,4
2 minutos	861 588,2	703 924,6	431 536,0
3 minutos	588 181,1	574 725,4	562 780,9

En la Tabla 8 se evidencia que el tamaño del halo de inhibición del quitosano sonificado en diferentes tiempos y temperaturas presenta semejanza frente a *S. aureus*. Al evaluar el tamaño del halo de inhibición del quitosano irradiado a diferentes condiciones (Tabla 9), se observa que la mayor inhibición frente a *K. oxytoca* (13 mm), es generada por el quitosano irradiado por 3 minutos en presencia de H₂O₂ al 3 %.

En la tabla 10 se evidencia que el tamaño del halo de inhibición del quitosano irradiado en diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de H₂O₂, presenta semejanza frente a *S. aureus*.

Tabla 9. Inhibición microbiana (halos en mm) frente a *k. oxytoca*, para el quitosano despolimerizado usando radiación UV frente a H₂O₂

Sin Irradiar	1 minuto			2 minutos			3 minutos		
	1%	2%	3%	1%	2%	3%	1%	2%	3%
9,13	8,25	9,38	8,63	9,38	9,00	8,50	7,50	8,38	8,00
8,50	7,75	9,50	7,50	8,25	8,75	7,88	7,50	8,38	8,00
8,50	7,00	7,13	7,13	7,25	7,00	7,00	7,25	8,00	13,00
8,50	7,38	7,13	7,13	7,25	7,00	7,00	7,25	8,00	13,00

Tabla 10. Inhibición microbiana (halos en mm) frente a *s. aureus*, para el quitosano despolimerizado usando radiación UV frente a H₂O₂

Sin Irradiar	1 minuto			2 minutos			3 minutos		
	1%	2%	3%	1%	2%	3%	1%	2%	3%
9,13	7,00	7,38	7,88	7,38	7,50	7,25	7,13	7,25	7,38
8,50	7,13	7,75	7,88	7,63	7,13	7,25	7,25	7,25	7,50
8,50	8,50	8,00	8,75	9,50	7,50	8,75	8,50	7,50	9,25
8,50	9,50	9,75	9,63	10,00	8,63	8,88	8,75	8,13	9,50

Discusión

El rendimiento del quitosano extraído de plumas de *D. gigas*, respecto a la quitina obtenida luego de la desproteínización, fue de 63 %, además de presentar una cloración blanca y partícula fina, este resultado es menor al reportado por García (2013) que obtuvo quitosano en forma de gránulos de color blanco amarillento a partir de quitina de pluma de pota con un rendimiento del 85,7%. El quitosano de plumas de *D. gigas* alcanzó un grado de desacetilación de 85,47 %, valor cercano a 86,21 %, reportado por García (2013) quien además afirma que los quitosanos, al presentar grados de desacetilación mayores al 86%, son considerados como de alto grado de desacetilación.

El peso molecular del quitosano de *D. gigas* obtenido empleando viscosimetría equivale a $1,055 \times 10^6$ Da, corresponde a un quitosano de alto peso molecular que contiene mayor número de grupos amino protonados en la solución ácida de quitosano. Este resultado es mayor que el obtenido por García (2013) quien obtuvo un quitosano con un peso molecular bajo con $171,42 \times 10^3$ Da. Esto debido a diferencias en el tiempo usado en la desacetilación, así como la purificación del mismo antes de su

caracterización para eliminar residuos que hagan variar los resultados.

El análisis de varianza con 90 y 95% de confiabilidad, refleja que estadísticamente, el quitosano despolimerizado por ultrasonido no presenta diferencia significativa entre los tiempos y temperaturas usados para reducir el peso molecular. Al contrario, el quitosano despolimerizado por irradiación, en el análisis de varianza al 90%, si presenta diferencia estadísticamente significativa en la variación de su peso molecular, provocada por los tiempos de exposición a la radiación UV. El uso del análisis de varianza al 90% para evaluar la diferencia estadísticamente significativa, responde a la variabilidad del método usado para la determinación del peso molecular, además que al 95% el estadístico F calculado y F Tabulado no tienen una diferencia resaltante.

Los resultados de la prueba de tukey al 95 % de confiabilidad, evidencian que el peso molecular obtenido al irradiar el quitosano por 1 minuto, es significativamente diferente al irradiado por 2 y 3 minutos; es decir, los quitosanos irradiados a mayor tiempo (2 y 3 minutos) reducen su peso molecular, mientras que a 1 minuto no ocurre dicha reducción, respecto al inicial.

El análisis de varianza al 95 % de confiabilidad, refleja que la inhibición bacteriana del quitosano sonificado es estadísticamente igual frente a *Staphylococcus aureus*, sin embargo, frente a *Klebsiella oxytoca*, si existe diferencia significativa. En contraste, para el quitosano despolimerizado por irradiación la inhibición bacteriana presenta diferencia estadísticamente significativa en la inhibición de *K. oxytoca*, mientras que para *S. aureus* la inhibición es estadísticamente igual.

Los resultados de la prueba de tukey al 95 % de confiabilidad, refleja que la diferencia de la capacidad antimicrobiana frente a *K. oxytoca* se encuentra en el quitosano despolimerizado con ultrasonidos por 30 minutos a 30 y 45 °C, del mismo modo en el quitosano despolimerizado con radiación UV por 3 minutos, en presencia de H₂O₂ al 3% de concentración.

Los resultados obtenidos, indican una mayor capacidad antimicrobiana de los quitosanos despolimerizados por ultrasonido e irradiación, de diferente peso molecular, frente a *Klebsiella oxytoca* (Figura 5), una bacteria Gram-negativa, esto afirma a lo mostrado por Pérez *et al.* (2014), quienes al evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de soluciones ácidas de quitosano de bajo peso molecular, sobre bacterias Gram-negativas comprobaron que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca* fueron las más susceptibles a los tratamientos. Asimismo, en trabajos realizados por Helander *et al.* (2001), sobre la acción antimicrobiana del quitosano de alto peso

molecular, con bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*); corroboró que el quitosano al tener un ion positivo con una base amino (NH₂), se une a los aniones presentes en la membrana externa de las bacterias e inhibe la absorción y transporte de nutrientes al interior de la célula, generando la muerte de las bacterias.

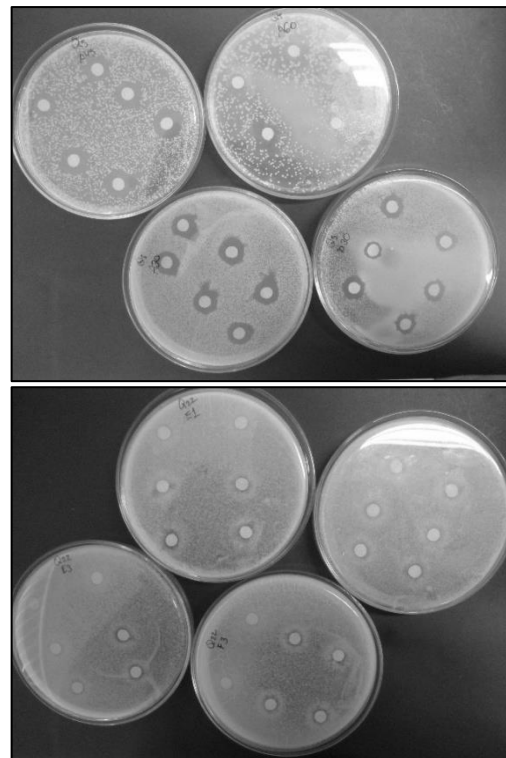


Figura 5. Inhibición bacteriana del quitosano despolimerizado por ultrasonidos e Irradiación frente a *Klebsiella oxytoca* (superior) y *Staphylococcus aureus* (inferior).

Conclusiones

De los dos métodos de despolimerización usados, el que permite obtener mejores resultados es la aplicación de radiación UV en presencia de H₂O₂ a concentraciones de 1, 2 y 3 %, por un tiempo mayor a 1 minuto, siendo el mejor tratamiento la irradiación en presencia de H₂O₂ a una concentración

de 3%. En el quitosano despolimerizado por ultrasonidos no se determinó diferencia significativa entre los diversos tiempos y temperaturas de sonicación.

Se determinó que no existe influencia del peso molecular en el rango estudiado (500000 - 1200000 Da) sobre

la actividad antimicrobiana; sin embargo, la mayor inhibición bacteriana del quitosano de *Dosidicus gigas* despolimerizado es frente a la bacteria Gram negativa *Klebsiella oxytoca*. Esta inhibición se logró con el quitosano

despolimerizado con ultrasonidos por 30 minutos a 30 y 45 °C, y el quitosano despolimerizado con radiación UV por 3 minutos, en presencia de H₂O₂ al 3% de concentración.

Agradecimiento

Al Ministerio de la Producción por el apoyo económico a través del proyecto (PIAP-2-P-490-14) financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad. A la

Universidad Nacional de Tumbes por el apoyo logístico recibido y finalmente al Dr. Julio Santiago Contreras de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su apoyo técnico.

Referencias bibliográficas

- Abram, A.P. 2004. Quitina y quitosano. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- ASTM F 2103-01. 2001. Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications. American Society for Testing and Materials, Estados Unidos. 8 pp.
- Baxter, S.; Svetlana Z.; Jochen, W. 2005. Molecular Weight and Degree of Acetylation of High-Intensity Ultrasonicated Chitosan. *Food Hydrocolloids* 19 (5): 821-830.
- García, J.V. 2013. Estudio de liberación de sulfadiazina de plata desde matrices de quitosanos para su uso como apósitos en quemaduras. Tesis para optar el título de Licenciado en Química, PUCP, Perú.
- Helander, I.M.; Nurmiäho-Lassila, E.L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 71(2-3): 235-244.
- Hien, N.Q.; Phu, D.V.; Duy, N.N.; Lan, N.T. 2012. Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers* 87 (1): 935-938.
- Nakamatsu. 2013. La quitosana. *Revista de Química* 26: 10-12.
- Parada, L.G.; Amashta, I.A.K.; Crespín, G.D.; Miranda, R. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista iberoamericana de polímeros* 5(1): 1-16.
- Pérez, C.; Rojas, J.; Rodríguez, J.; Arrieta, I.; Arrieta, Y.; Rodríguez, A. 2014. Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16(1): 104-110.
- Vishu, K.; Acharya, B.; Mandyam, C.V.; Lalitha, R.G.; Rudrapatnam, N.T. 2005. Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 391(2): 167-175.