

## **Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura.**

**J.B.Dima<sup>1,2</sup>, C. Sequeiros<sup>2</sup>, N.E. Zaritzky<sup>1,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA - CONICET- UNLP). <sup>2</sup>Centro Nacional Patagónico (CONICET-CENPAT). <sup>3</sup>Depto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería (UNLP). \*e-mail: zaritkynoemi@gmail.com; jimenabdima@gmail.com

**Resumen.** El procesamiento de crustáceos en la provincia del Chubut genera residuos sólidos de difícil disposición (exoesqueletos), que constituyen un contaminante ambiental. Estos residuos poseen una composición rica en quitina, de la cual se obtienen derivados como el quitosano (QS), que por sus propiedades funcionales y fisicoquímicas, presentan aplicaciones muy variadas. El quitosano puede prepararse líquido, en escamas, en polvo, o formando micropartículas. En el presente trabajo se optimizó el proceso de obtención de quitina y quitosano a partir de diferentes fuentes (cangrejos, langostino y calamar de la zona de Madryn y Rawson). Para la obtención de quitina los exoesqueletos molidos fueron despigmentados, descalcificados y desproteinizados. Para la obtención de quitosano la quitina fue desacetilada con NaOH al 50% a 120°C. El grado de desacetilación del quitosano fue de 90,2% para langostino y calamar y del 86,2% para cangrejo. El peso molecular resultó del orden de  $2 \times 10^5$  Da y  $6 \times 10^4$  Da para crustáceos y calamar. Por otro lado se obtuvieron micropartículas de quitosano utilizando tripolifosfato de sodio (TPP) como agente reticulante, obteniéndose tamaños de partículas  $< 1 \mu\text{m}$ .

Se evaluó además el efecto antimicrobiano del quitosano y las micropartículas de QS sobre el patógeno, *Vibrio alginolyticus*, común en maricultura. El quitosano en solución como las micropartículas mostraron un efecto inhibitorio a concentraciones de 0,125% y 0,05% respectivamente. Además, las micropartículas tuvieron un efecto bactericida sobre el

patógeno. Se puede observar que los desechos de exoesqueletos de crustáceos patagónicos constituye un tema importante en la revalorización económica de residuos para la región.

**Palabras claves:** Quitosano, Micropartículas de QS, Propiedades antimicrobianas.

## 1. Introducción

La Industria Pesquera de la Provincia de Chubut cuenta con la captura y el procesamiento de un conjunto tradicional de mariscos, entre los cuales se incluyen los crustáceos. El porcentaje de desembarcos de crustáceos en los últimos años en las ciudades de Puerto Madryn y Rawson representaron mas de 2000 Ton/ anuales, alcanzando en el 2011 cerca de 3500 Ton /anuales (MAGYP, 2011). El mayor porcentaje de captura corresponde al langostino, seguido por la centolla y el camarón; a estas deben sumarse nuevas especies de crustáceos, como los cangrejos, industrializadas incipientemente por las flotas artesanales de estas ciudades, pero que representan capturas de varias toneladas anuales. En el procesamiento de los mismos para el aprovechamiento del músculo comestible, se generan residuos sólidos de difícil disposición (exoesqueletos), que se van acumulando en basurales, constituyendo un contaminante ambiental. Sin embargo, estos residuos tienen una composición rica en componentes como la quitina, el carbonato de calcio y pigmentos (carotenoides). La quitina que posee el exoesqueleto de dichos crustáceos es un componente clave debido a su amplio espectro de aplicaciones industriales y es un residuo que puede ser valorizado si se diseña y aplica un método de extracción adecuado. Las técnicas de extracción de quitina reportadas son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente. La composición del material de partida varía notablemente de una especie de crustáceo a otra, o bien dentro de la misma especie, encontrándose caparazones gruesos y carbonatados, en contraposición a otros de láminas calcáreas delgadas (Tsaih y Chen, 2003). La mayor parte de las técnicas desarrolladas para la extracción de quitina se basan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y remoción de la materia inorgánica (parte calcárea). Algunos incluyen una decoloración

de la quitina extraída, mediante una extracción con solvente o la oxidación de los pigmentos remanentes. La quitina es una sustancia muy clara, blanquizca o amarillenta, y se puede presentar tanto en polvo como en escamas. Se la puede procesar para obtener derivados, de los cuales el más conocido y de mayor aplicación es el quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación parcial de la quitina, por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino a altas temperaturas (Fig. 1). El mismo está compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicos (Parada y col. 2004). El quitosano se caracteriza biológicamente por su biocompatibilidad (polímero natural no tóxico, biodegradable a los componentes normales del cuerpo) y por su bioactividad. Debido a sus propiedades funcionales y fisicoquímicas, se le ha podido identificar una enorme cantidad de aplicaciones que abarcan áreas tan variadas como: alimentación, medicina, agricultura, cosmética, farmacia, entre otras múltiples funciones, todas ellas beneficiosas (Covas, 2006).

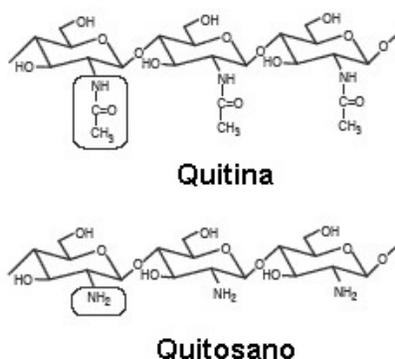


Fig. 1. Fórmulas de la quitina y el quitosano.

La amplia variedad de sus funciones se correlaciona con un alto número de productos en el mercado. El quitosano puede utilizarse en solución, en escamas, en polvo, en hilo de suturas, en bandas sanitarias o como micropartículas. Las micropartículas de quitosano se pueden obtener por diversas técnicas, entre ellas, por gelificación iónica, donde nano y micropartículas se forman por interacciones electrostáticas entre las cadenas de quitosano con carga positiva y polianiones empleados como agentes de reticulación (Calvo y col., 1997).

En los últimos años las micropartículas de quitosano están siendo investigadas en diferentes áreas científicas, ya sea: como portadoras de fármacos por vía oral, con el objetivo de mejorar la asimilación de los fármacos con bajas características de absorción (Hamamura y col., 2010); para su utilización como bioadsorbente de metales dado su pequeño tamaño versus su gran superficie de contacto, lo que hace que presenten mayor capacidad para atrapar iones metálicos (Liu y col., 2009); como sistema para liberación de proteínas, mostrando una excelente capacidad de atrapamiento de proteínas y una mejora de la absorción de péptidos (Grenha y col., 2005) o como agente antibacteriano (Du y col., 2009; Wei y col., 2009). Las propiedades que le dan la capacidad de acción al quitosano dependen principalmente de su grado de acetilación y su peso molecular por lo que resulta de fundamental importancia el conocimiento de estos parámetros para cualquier estudio.

Las aplicaciones del quitosano como agente antimicrobiano resultan importantes en diferentes campos. La maricultura, que se refiere al cultivo, manejo y cosecha de organismos marinos en su hábitat natural o dentro de cercas especialmente construidas (FAO, 2003) debe enfrentarse a problemas como microorganismos patógenos que afectan la viabilidad del recurso, con lo cual se trabaja en diferentes áreas para su control. Entre los patógenos de mayor problemática en maricultura se encuentra el *Vibrio alginolyticus*, bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Vibrionaceae* y al género *Vibrio*. De este grupo es el más halófilo de todos ya que es capaz de crecer en concentraciones de hasta 10% de sal. El reservorio de este microorganismo lo constituyen las aguas (principalmente las saladas) y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar. El *Vibrio alginolyticus* es uno de los principales causantes de las grandes mortalidades provocadas por la vibriosis en peces, moluscos y crustáceos marinos, provocando serias pérdidas económicas para la acuicultura (Liu y col., 2012).

La industria alimentaria cada vez amplía más el uso de productos naturales como conservadores, debido a los diferentes problemas que los compuestos químicos tienen sobre la salud de los consumidores. Por esta razón, el carácter antibacteriano del quitosano lo hace muy utilizado en la agricultura y en el área de alimentos dado su biocompatibilidad y no toxicidad.

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) optimizar el proceso de obtención de quitina y quitosano a partir de crustáceos patagónicos (langostinos y cangrejos) y plumas de calamar; ii) caracterizar el grado de acetilación y peso molecular de los quitosanos obtenidos; iii) producir micropartículas de quitosano utilizando la técnica de gelificación iónica; iv) determinar el poder antimicrobiano del quitosano en solución y de las micropartículas obtenidas.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Obtención de quitina y quitosano**

La materia prima utilizada fue proporcionada por la empresa “Madryn Mariscos” SRL y el Restaurant “El Náutico” de la ciudad de Puerto Madryn. Para la extracción de quitina y quitosano se utilizaron caparazones de crustáceos: langostinos (*Pleoticus muelleri argentine*) y cangrejos (*Ovalipes trimaculatus*); y plumas de calamar.

**Obtención de la quitina:** Los exoesqueletos de crustáceos, molidos y tamizados, se sometieron primero a un proceso de despigmentación química con una mezcla de agua y acetona en la proporción 1:3. Para ello se colocó la muestra (con un tamaño de partícula entre 0,5 y 1mm) en un recipiente provisto de agitación magnética, y se realizaron 3 lavados de 30 min c/u a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y enjuagó con agua destilada. Como segundo paso, el producto obtenido en la fase anterior se sometió a una descalcificación con ácido clorhídrico 1,5 M, en una relación masa/volumen 1:15, a temperatura ambiente y con agitación constante, durante 3 h y 8 h para langostino y cangrejo respectivamente. Finalmente, se procedió a filtrar y lavar la muestra con abundante agua destilada. Por último, se realizó el proceso de desproteización, el cual se llevó a cabo mediante el empleo de hidróxido de sodio (NaOH) al 4,5%, con una relación masa /volumen de disolución básica de 1:15. El proceso se realizó durante 3 horas, a 70°C y con agitación constante. El producto obtenido se purificó filtrando la muestra y realizando sucesivos lavados con abundante agua destilada hasta lograr la eliminación del exceso de base. El producto se secó en estufa a 65°C por 24 h y se lo denominó Quitina. En el caso particular de las plumas de calamar sólo fueron sometidas al proceso de desproteización.

**Obtención del quitosano:** Este es un proceso de modificación química de la quitina, en el cual las unidades acetilo son eliminadas. Para ello la misma fue tratada con NaOH al 50% a 120°C durante 3h. Posteriormente, la muestra fue filtrada, realizando sucesivos lavados con abundante agua destilada, hasta lograr eliminar la alcalinidad del medio. El producto se secó en estufa a 65°C por 24 h y se lo denominó Quitosano.

## **2.2. Determinación del grado de desacetilación del quitosano por valoración potenciométrica**

El grado de desacetilación (DD%), es una de las propiedades más importantes en la caracterización del quitosano, pues dependiendo de su valor el polímero tendrá diferentes aplicaciones (Cocoletzi y col. 2009). El grado de acetilación, es el porcentaje de grupos acetilos aún presentes en la cadena de quitina parcial o totalmente desacetilada. El contenido de grupos acetilo (-COCH<sub>3</sub>) residuales (grado de acetilación), o presencia de grupos aminos (NH<sub>2</sub>) (grado de desacetilación), pueden ser determinados por varios métodos; entre los más utilizados se encuentran el método potenciométrico y la determinación por espectroscopía infrarroja (FTIR). La titulación potenciométrica es uno de los métodos más simples utilizado por la industria del quitosano debido a su bajo costo en reactivos y equipamiento (Hernández, 2004). Para la determinación del grado de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas, se utilizó la técnica original descrita por Broussignac (1968) y ampliamente utilizada en la actualidad. Para la determinación del contenido de grupos amino de las distintas muestras de quitosano se procedió a la disolución de 0,5g de cada uno de ellas, en 20ml de HCl 0,3M. A continuación, se tituló con una solución de NaOH 0,1M. La valoración potenciométrica se llevó a cabo midiendo el cambio de pH cada 2ml de base añadida; la adición se realizó de forma lenta y con agitación continua para homogenizar la solución. Las mediciones se llevaron a cabo con un pHmetro Hanna Instrument, el cual se calibró a pH 4, 7 y 9. Las medidas se realizaron por duplicado. El valor de DD% del quitosano se obtuvo a través de la ecuación propuesta por Broussignac (1968) donde:

$$DD(\%) = \left( \frac{203M_{eq}}{1 + 42M_{eq}} \right) \quad (1)$$

siendo  $M_{eq} = \frac{N\Delta V}{w}$  donde  $\Delta V$  es la diferencia entre los dos puntos de inflexión del gráfico pH vs volumen de NaOH, N es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso en gramos de la muestra seca de quitosano utilizada, 203 es la masa molar de la glucosamina y 42 es la masa molar del grupo acetilo.

### **2.2.1. Caracterización de quitina y quitosano por espectroscopía infrarroja (FTIR)**

Para la caracterización de la quitina y el quitosano obtenidos se utilizó espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Por su sencillez, la espectroscopía infrarroja es quizás el método más empleado en la determinación cuantitativa del DD% de quitosano. Esta técnica considera la variación de absorbancia en la banda que corresponde al grupo carbonilo  $\text{-C=O}$ , a  $1655\text{cm}^{-1}$ , característica de la quitina, como una medida de la disminución de los acetilos. Esta banda conforme se produce la reacción va disminuyendo en su intensidad, es decir, que el grupo acetilo va desapareciendo en la quitina, mientras que se va formando el quitosano (Cocoletzi y col. 2009). Los análisis de caracterización de quitina y quitosano por espectroscopía infrarroja, fueron realizados en el Centro de Investigación y Desarrollo en Procesos Catalíticos (CINDECA), utilizando un Espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier (Bruker IFS 66). Las muestras se prepararon para su análisis en forma de pastillas con bromuro de potasio (KBr). Las mismas se preparan moliendo una pequeña cantidad del polímero finamente dividido (2mg) conjuntamente con 100mg de bromuro de potasio, la mezcla se prensa para obtener una pastilla, la cual se seca al vacío durante toda la noche. El método consiste en correlacionar la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con el porcentaje de N-acetilación del quitosano. En este trabajo se usó el método de correlación propuesto por Brugnerotto y col. (2001), donde el grado de acetilación del quitosano fue calculado a partir de la integración de bandas características a  $1320\text{ cm}^{-1}$  y  $1420\text{ cm}^{-1}$  de acuerdo a la Ecuación 2, dicha correlación ha sido utilizado con frecuencia en la literatura (Hamamura y col 2010). A partir de los espectros FTIR se toma como banda característica a la localizada a  $1320\text{ cm}^{-1}$ , y como referencia la banda a  $1420\text{ cm}^{-1}$ , obteniendo una correlación lineal que viene expresada por la siguiente relación:

Según este método el grado de desacetilación DD(%) se calcula por la siguiente ecuación:

$$DD(\%) = 100 - [31,92(A(1320\text{cm}^{-1})/A(1420\text{cm}^{-1})) - 12,20] \quad (2)$$

donde  $A(1320\text{cm}^{-1})$  y  $A(1420\text{cm}^{-1})$  son las absorbancias de los picos del espectro IR del quitosano.

### 2.3. Evaluación del peso molecular promedio viscosimétrico

En soluciones poliméricas diluidas la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  es una medida del tamaño de una molécula en solución. La viscosidad intrínseca tiene unidades de volumen/masa y está directamente relacionada con el peso molecular promedio del polímero en solución. Depende no sólo del tamaño de la macromolécula sino también de su conformación y de la naturaleza del solvente. Para fluidos newtonianos se emplean viscosímetros capilares del tipo Ostwald entre otros, y basándose en la ley de Hagen -Poiseuille, se mide el tiempo de caída del solvente puro ( $t_0$ ) y la solución ( $t$ ) en un tubo capilar entre dos marcas fijadas, a una temperatura determinada. Debido a que en viscosimetría capilar las concentraciones utilizadas son muy pequeñas, se considera que la densidad de la solución es similar a la densidad del solvente. A partir de los tiempos de escurrimiento se pueden determinar las viscosidades dinámicas. Se puede determinar así la viscosidad relativa ( $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \approx \frac{t}{t_0}$ ) donde  $\eta$  es la viscosidad de la solución polimérica y  $\eta_0$  la del solvente puro. Asimismo se obtienen la viscosidad específica ( $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$ ) y la viscosidad reducida ( $\eta_{red} = \eta_{sp}/c$ ) donde  $c$  es concentración del polímero. La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  se determina extrapolando los valores de viscosidad reducida a valores de concentración de polímero tendiendo a cero.

Se llevó a cabo la determinación del peso molecular promedio viscosimétrico del quitosano mediante la técnica de viscosimetría capilar descrita por Rinaudo y col. (1993) utilizando un viscosímetro de Ostwald y la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS). Para ello, quitosano al 0,5% fue disuelto en buffer ácido acético 0,3 M /acetato de sodio 0,2M a 25°C, permaneciendo bajo agitación mecánica durante toda la noche. A partir de esta solución stock se prepararon diluciones

de concentraciones comprendidas entre 0,5% y 0,065% a las cuales se les determinó la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ). Las viscosidades se obtuvieron de cada dilución con un viscosímetro Ostwald colocado en un baño termostático a 25C° y midiendo el tiempo de caída para la solución buffer y las diferentes soluciones de quitosano. Una vez calculada la viscosidad intrínseca, extrapolando a  $c=0$  se puede determinar el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) de un polímero a partir de la Ecuación de MHKS (Ec. 3), que plantea la dependencia de  $[\eta]$  con el peso molecular promedio.

$$[\eta] = k M_v^a \quad (3)$$

donde  $k$  y  $a$  son constantes empíricas válidas sólo para un sistema establecido de solvente - polímero, las cuales dependen de la naturaleza del polímero, del sistema disolvente utilizado y la temperatura. El peso molecular viscosimétrico a partir de la ecuación de Mark-Houwink fue determinado utilizando los parámetros hallados por Rinaudo y col. (1993).

#### **2.4. Elaboración de micropartículas de quitosano (QS) con tripolifosfato (TPP)**

Debido a la toxicidad del glutaraldehído y otras moléculas orgánicas utilizadas en la síntesis de geles con uniones covalentes, se propuso la utilización de la técnica de gelificación iónica, utilizando tripolifosfato como agente reticulante. Las micropartículas de quitosano se prepararon tomando como base el procedimiento reportado por Calvo y col., (1997). Para ello se realizaron diversas pruebas con el fin de obtener el tamaño de las partículas en suspensión deseado, variando la concentración de QS y de TPP. Se prepararon soluciones de QS en ácido acético (AcH) a las siguientes concentraciones 1%, 0,5%, 0,25% y 0,125%. Siendo la concentraciones del AcH 1,75 veces mayor que la de quitosano. Por otro lado se prepararon soluciones de TPP en agua a 0,05%, 0,075%, 0,1% y 0,25%. Luego, bajo agitación magnética constante y a temperatura ambiente, se agregó gota a gota, con ayuda de una jeringa insulínica, 1 mL de solución acuosa de TPP a 3 mL de la solución quitosano. Durante la obtención de las micropartículas se identificaron visualmente tres sistemas diferentes: una solución clara, una suspensión opalescente y agregados. En la suspensión opalescente se observó la presencia de micropartículas. Las mismas se recolectaron por centrifugación a

10000rpm durante 15 minutos. El tamaño de la partícula se determinó por observación en un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips X-L 30, en el Servicio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Plata.

## **2.5. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)**

Para la determinación del poder antimicrobiano del quitosano y de las micropartículas de quitosano se empleó el método de las diluciones seriadas dobles en medio líquido. Se evaluó el poder inhibitorio sobre el patógeno *Vibrio alginolyticus* (Gram-negativo). Para ello se prepararon tubos estériles con 5ml de medio de cultivo triptona soya (TS) con NaCl al 1,5% (m/v). En el caso del quitosano en solución se partió de una concentración inicial de quitosano (QS) al 1% en AcH llevado a pH 4,8 con NaOH 0,5M. Luego 5 ml de la solución de QS se colocaron en los tubos con TS, se homogeneizaron y se realizaron las sucesivas diluciones. Luego se les añadió 160µl del patógeno *V. alginolyticus* ( $9,6 \times 10^7$  UFC/ml), los tubos se homogeneizaron nuevamente y se incubaron en estufa a 25°C por 24h. Para el caso de las micropartículas de QS se partió de una concentración al 0,4% (m/v) en agua y se realizó el mismo procedimiento utilizado para el quitosano en solución. Los controles fueron preparados adicionando ácido acético pH 4,8 y agua destilada estéril en lugar de la solución de QS y micropartículas, respectivamente. Ambos con y sin el patógeno. Dado que el quitosano al pH del medio de cultivo produce una turbidez en los tubos es difícil determinar la inhibición del crecimiento microbiano visualmente, por lo cual, el grado de inhibición se observó sembrando el contenido de todas las diluciones en placa al igual que para la determinación de la CBM. Para ello 10µl de cada tubo seriado fue sembrado en placas estériles con agar-TS con sal e incubadas a 25°C toda la noche. La menor concentración de quitosano soluble o micropartículas que no mostró crecimiento en placa fue considerada como la CBM.

## **3. Resultados y Discusión**

### **3.1. Rendimientos de quitina y quitosano**

El rendimiento en quitina en función del peso del material triturado resultó de 15,7%, 21,9% y 33,5% para cangrejo, langostino y calamar, respectivamente. Los rendimientos hallados estuvieron dentro del rango observado por diferentes autores (Covas, 2006;

Marmol y col., 2004; Chandumpai y col., 2005) reportándose valores de quitina de 15,5% para el cangrejo *Chionectes opilio*, de 24,01% para camarón (*penaeus vannamei*) y del 36,05% para el calamar (*Loligo lessoiana*). El rendimiento en quitina de exosqueletos de crustáceos depende de la materia prima de partida y del ajuste de las variables de la técnica implementada (Cocoletzi y col. 2009; Covas, 2006). El quitosano obtenido en todos los casos representó en promedio el 76,8% de la quitina inicial, el cual se encuentra dentro de los valores reportados en la literatura (Covas, 2006; Marmol y col., 2004).

### **3.2.1. Determinación del grado de desacetilación por valoración potenciométrica**

El contenido de grupos amino en las muestras de QS se determinó por titulación potenciométrica. Se disolvió el polímero en una concentración conocida de ácido clorhídrico y se valoró la mezcla con hidróxido de sodio, tal como se describió anteriormente. El grado de DD% alcanzado se determinó según la Ec. (1). Los resultados de las titulaciones para las muestras tratadas (cangrejos, langostinos y calamar) con NaOH 50% (m/v), se muestran en las Figura 2. En todos los casos se produce una curva de titulación con dos puntos de inflexión cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada. La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponden a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano (ver Fig 1). El grado de desacetilación obtenido fue de 90,2% para langostino y calamar y de 86,2% para cangrejo. Dichos valores se encuentra dentro del rango de los valores del quitosano comercial (Hernández, 2004; Parada y col. 2004). La quitina con más de un 50% de desacetilación es considerada quitosano, por otro lado, algunos autores, lo definen como tal ante un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente, en el caso del quitosano de uso comercial, se establece que el grado de desacetilación se encuentre comprendido entre el 60 y 95% (Hernandez, 2004; Parada y col. 2004).

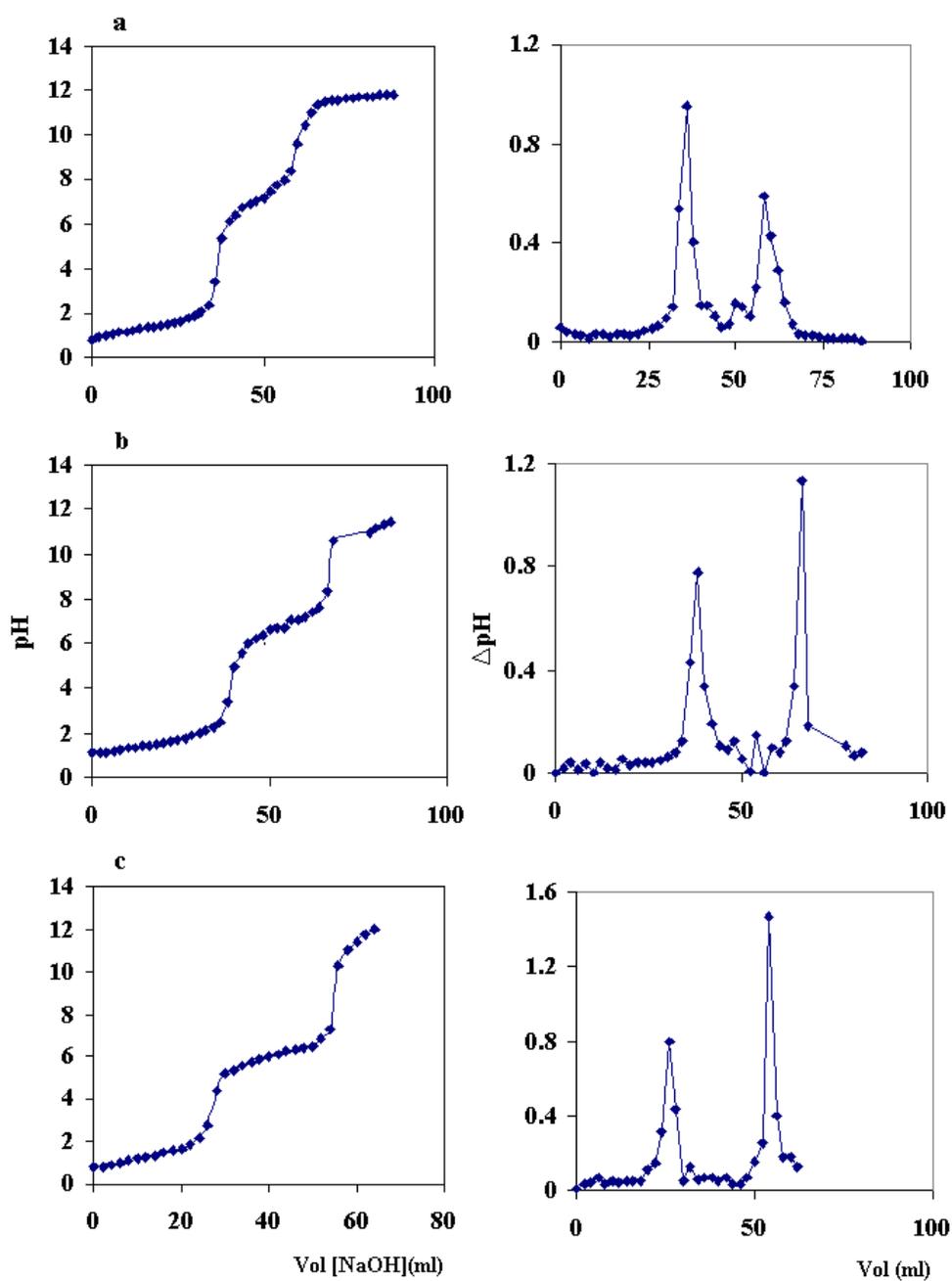


Fig. 2. Curvas de titulación del quitosano obtenido: a) Cangrejo; b) Langostino y c) Calamar. En las gráficas de la derecha se muestran los picos máximos que corresponden a los puntos de inflexión de la curva de titulación.

### 3.2.2. Determinación del grado de desacetilación por espectroscopía infrarroja

La Figura 3 muestra a modo de ejemplo el espectro de transmitancia FTIR del quitosano obtenido para exosqueleto de langostino desacetilado utilizando hidróxido de sodio al 50%.

En el espectro se pueden apreciar bandas características: a  $3450\text{cm}^{-1}$  (tensión del grupo -OH),  $3292\text{cm}^{-1}$  (tensión del grupo N-H), 2919 y  $2862\text{cm}^{-1}$  (tensión del grupo C-H),  $1655\text{cm}^{-1}$  (Amida I),  $1580\text{cm}^{-1}$  (doblaje del grupo -NH<sub>2</sub>),  $1313\text{cm}^{-1}$  (Amida III),  $1154\text{cm}^{-1}$  (tensión del puente C-O-C),  $1082\text{cm}^{-1}$  y  $1032\text{cm}^{-1}$  (vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranósica).

Del espectro FTIR se obtuvieron los valores de transmitancia. Dichos valores fueron convertidos a absorbancia y aplicando la Ec. (2), se determinó el grado de desacetilación el cual resultó del 86,9%. Dicho resultado es congruente con el obtenido previamente por titulación potenciométrica. Por lo tanto, ambos métodos representan una buena estimación del grado de desacetilación del quitosano obtenido.

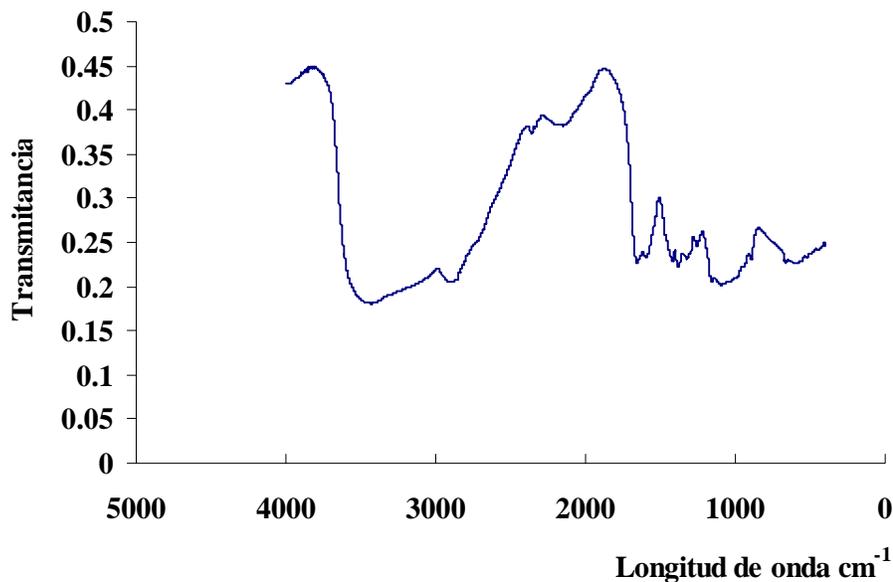


Fig. 3. Espectro infrarrojo (IR) para quitosano de exosqueleto de langostino

En la Figura 3 se hace evidente la aparición de la banda del grupo amino a  $1621\text{cm}^{-1}$  y se observa una mejor definición en las bandas de los grupos -OH a  $3450\text{cm}^{-1}$  y -NH a

$3254\text{cm}^{-1}$ , debido precisamente al proceso de desacetilación a la que fue sometida la muestra.

### 3.3. Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico

Con el fin de verificar que las concentraciones utilizadas en las mediciones por viscosimetría capilar fueron realizadas en régimen diluido se procedió a determinar la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , aplicando la ecuación de Huggins que relaciona la viscosidad reducida ( $\eta_{sp}/c$ ) con la concentración (c):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K_H [\eta]^2 c \quad (4)$$

En la figura 4 a,b se puede observar el grado de linealidad de la Ecuación de Huggins para langostino y calamar respectivamente. A partir de la graficas se obtuvieron los valores de la viscosidad intrínseca como la ordenada al origen de la Ec. (4) de Huggins.

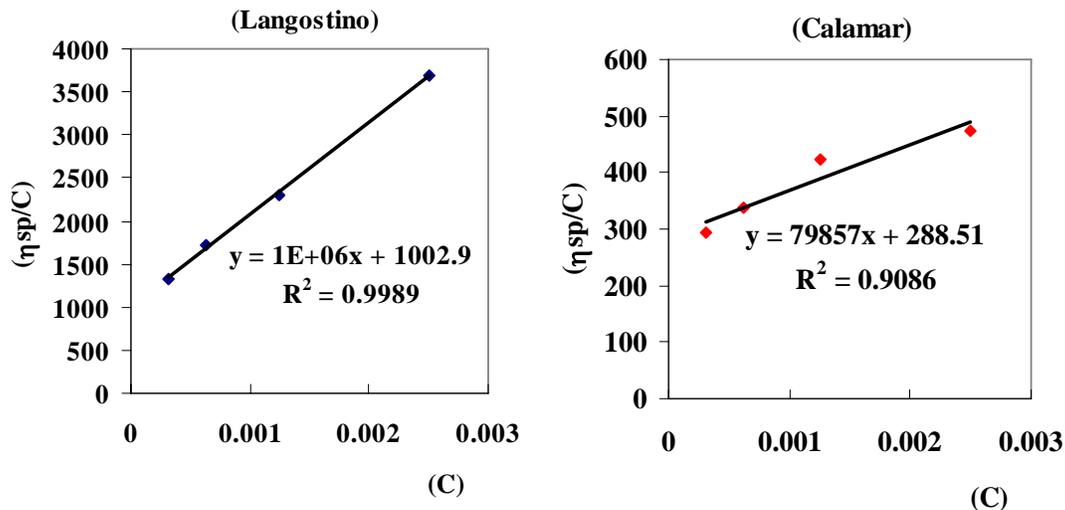


Fig. 4. Ecuación de Huggins aplicada a soluciones de quitosano de langostino y calamar para la obtención de la viscosidad intrínseca.

La viscosidad intrínseca del quitosano en buffer ácido acético 0,3 M /acetato de sodio 0,2M a 25°C fue determinada gráficamente, aplicando la técnica de viscosimetría capilar para la determinación del peso molecular de las muestras de quitosano. El peso molecular viscosimétrico se determinó a partir de la Ec. (3) de MKHS utilizando los parámetros hallados por Rinaudo y col (1993);  $K = 0,082$  y  $a = 0,76$ . El peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) resultó de  $2,39 \times 10^5$  Da,  $3,10 \times 10^5$  Da y  $6,64 \times 10^4$  Da, para quitosano

de langostino, cangrejo y calamar respectivamente. Los valores hallados se encuentran dentro de los reportados por diferentes autores para diferentes fuentes de quitosano ( $1 \times 10^5$  g/mol y  $5 \times 10^5$  g/mol) (Rinaudo y col., 1993; Araya y col., 2010).

### 3.4. Obtención de micropartículas de quitosano con TPP

Con el fin de obtener micropartículas de QS con un tamaño del orden de los micrómetros o nanómetros se realizaron diversas pruebas variando la concentración de QS y de TPP. Una suspensión opalescente, donde se encuentran las micropartículas, se obtuvo espontáneamente en un rango de concentración de QS entre 1,25 y 2,5 mg/ml con TPP entre 1,0 y 2,5 mg/ml. Concentraciones de TPP muy bajas presentaron una apariencia translúcida mientras que concentraciones de quitosano alta ( $>0,5\%$ ) mostraron presencia de agregados. Estos rangos de concentraciones fueron observados por otros autores (Calvo y col., 1997; Hamamura y col., 2010; Yu y col., 2013) para la formación de nanopartículas. El tamaño de las micropartículas obtenidas fue visualizado en un microscopio electrónico de barrido. El tamaño de las partículas puede variar en función de las diferentes relaciones de concentración de QS y TPP ensayadas (Yu y col., 2013). Para una relación de quitosano- TPP de 1,25 mg/ml-2,5 mg/ml se observaron tamaños de partículas cercanas a 500 nm (Fig. 5a) mientras que para una relación de quitosano- TPP de 2,5 mg/ml-2,5 mg/ml el tamaño resultó cercano a los 100 nm (Fig. 5b).

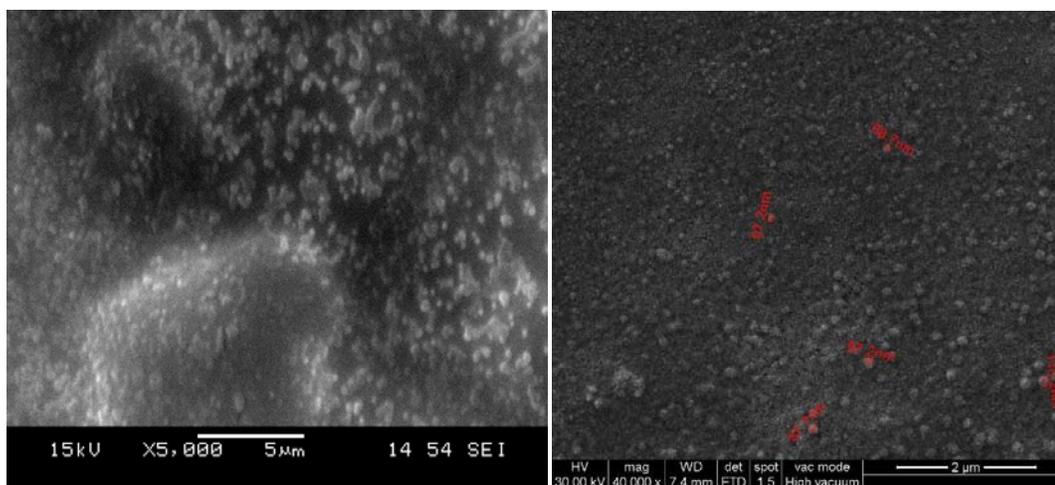


Fig. 5. Micrografías de micropartículas de quitosano a) relación quitosano- TPP de 1,25 mg/ml-2,5 mg/ml; b) relación quitosano- TPP de 2,5 mg/ml-2,5 mg/ml.

### 3.5. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

Como se mencionó anteriormente, el patógeno *Vibrio alginolyticus* es uno de los principales causantes de las grandes mortalidades provocadas por la vibriosis en peces, moluscos y crustáceos marinos, provocando serias pérdidas económicas para la acuicultura. El quitosano en solución y las micropartículas de QS mostraron un grado de inhibición contra el *V. alginolyticus* a concentraciones iguales y mayores a 0,125% y 0,05%, respectivamente. La CBM del quitosano en solución fue 0,5% mientras que para las micropartículas de quitosano la CBM se encontró a partir del 0,1% al no observarse colonias presentes (Fig. 6a,b).

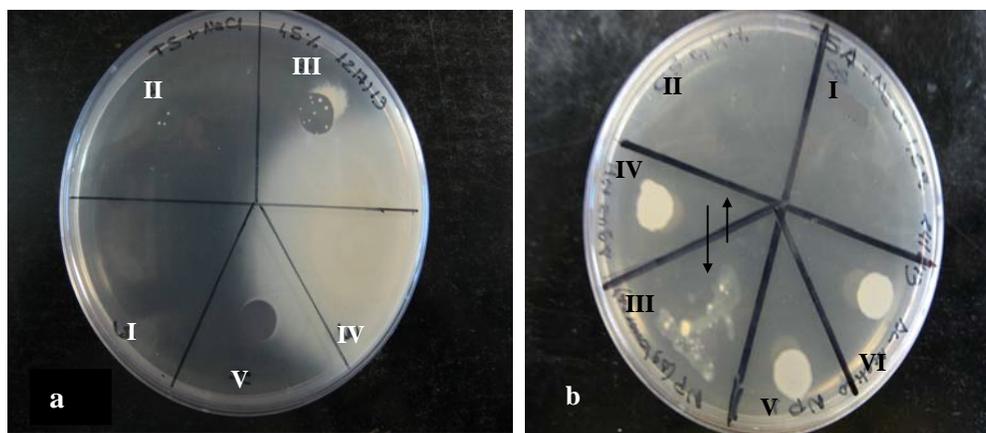


Fig. 6. Acción bactericida de quitosano sobre el *V. alginolyticus* a) Quitosano en solución: (I) 0,5%; (II) 0,25% (III) 0,125%; (IV, V) Controles positivos y negativos. b) Micropartículas de Quitosano (I) 0,2%; (II) 0,1%; (III) 0,05%;(IV) 0,025% (V, VI) Controles.

Se puede observar que las micropartículas de quitosano fueron mejores agentes antibacterianos contra el *V. alginolyticus* que el quitosano en solución. El mecanismo de acción antimicrobiano del quitosano no está totalmente dilucidado, y dentro de los mecanismos propuestos, diferentes autores coinciden que una de las razones es su carácter catiónico. A valores de pH menores a 5,5 los grupos amino del QS se encuentran protonados reaccionando fuertemente con los grupos aniónicos de los lipopolisacáridos y proteínas ubicadas en la superficie de las bacterias Gram-negativas (Helander y col., 2001; Rabea y col., 2003). El modo de acción del quitosano consistiría en que éste se une, mediante interacción iónica, a la superficie de la célula bacteriana alterando la pared celular y la permeabilidad de la membrana externa, y de este modo

afectando la función celular de las bacterias Gram-negativas. Esto provocaría la liberación de los componentes intracelulares y finalmente la muerte celular (Helander y col., 2001; Liu y col., 2004).

#### 4. Conclusiones

Se optimizó el proceso de obtención de quitina y quitosano para diferentes materias primas proveniente de desechos de la industria pesquera (langostinos, cangrejos y plumas de calamar). El rendimiento de quitina varió según la materia prima resultando 15,7%, 21,9% y 33,5% para cangrejo, langostino y calamar respectivamente. El rendimiento en quitosano fue del 76,8% de la quitina inicial. Sólo se logró quitosano trabajando con concentraciones de hidróxido de sodio mayores al 40% y con temperaturas mayores a los 100°C. Los grados de desacetilación obtenidos por método potenciométrico (90,2%-86,4%), se encuentran dentro de los valores reportados para ser considerado Quitosano. El peso molecular, calculado por viscosimetría capilar, fue mayor para los crustáceos que para las plumas de calamar, pudiendo sugerirse para estas últimas un menor tiempo de desacetilación, evitando así la disminución del peso molecular del polímero. Para la obtención de micropartículas de quitosano se utilizó Tripolifosfato como agente reticulante, siendo esta sal mas apropiada para su utilización en sistemas biológicos. El tamaño de las micropartículas varió según la relación entre la concentración de quitosano y la concentración del TPP. Se obtuvo un tamaño de partícula cercano a los 100nm para una combinación de QS y TPP de 2,5mg/ml con 1,0-2,5mg/ml respectivamente.

Tanto el quitosano en solución como las micropartículas, mostraron ser buenos agentes antibacterianos. Para el quitosano en solución se observó un efecto inhibitorio sobre el *V. alginolyticus* a concentraciones de 0,125%. En el caso particular de las micropartículas las mismas mostraron un gran efecto bactericida sobre el patógeno y se necesitaron menores concentraciones para su inhibición (0,05%). El presente estudio aporta información relevante para el aprovechamiento de los desechos de exoesqueletos de crustáceos patagónicos que constituye un tema importante en la revalorización económica de residuos para la región. Por otro lado el desarrollo de nuevos sistemas basados en micropartículas de quitosano permitirá realizar aportes originales en el área

de la obtención de productos con un gran campo de aplicación y contribuir al desarrollo de tecnologías ligadas a la protección de los sistemas biológicos, entre otras potenciales áreas de impacto.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a las siguientes Instituciones: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); Centro Nacional Patagónico (CENPAT), Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de alimentos (CIDCA), y Universidad Nacional de La Plata. A la empresa “Madryn Mariscos” SRL y “El Náutico” de la ciudad de Puerto Madryn.

### **Referencias**

- Araya, A., & Meneses, L. (2011). Influencia de Algunos Ácidos Orgánicos Sobre las Propiedades Físico Químicas de Películas de Quitosano Obtenidas a Partir de Desechos de Cangrejo. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K.D.A., & Roberts, G.A.F., (1992). Improved method for infrared determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14, 166-169.
- Broussignac, P. 1968. Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chim. Ind., Genie Chim*, 99, 1241-1247.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580.
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical research*, 14(10), 1431-1436.
- Chandumpai A., Singhbulporn N., Faroongsarng D., Sornprasit P. (2004). Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers* 58, 467-474.
- Cocozetti, H. H., Almanza, E. Á., Agustín, O. F., Nava, E. V., & Cassellis, E. R. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacíos*, 22(3), 57-60.
- Covas, C.A., (2006). Estudios sobre quitina y quitosano. Trabajo presentado para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de La Habana- Cuba.
- Du, W. L., Niu, S. S., Xu, Y. L., Xu, Z. R., & Fan, C. L. (2009). Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 385-389.
- FAO/ICLARM/IIRR (2003). Agro-acuicultura integrada: manual básico *FAO Documento Técnico de Pesca* N° 407. Roma, FAO. 2003. 159 p.
- Grenha, A., Seijo, B., & Remuñan-López, C. (2005). Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(4), 427-437.

- 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), 235-244.
- Hernández, I. (2004). Revisión bibliográfica: La Quitosana: Un Producto Bioactivo de Diversas Aplicaciones. Cultivos Tropicales. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas* 25(3), 97-110.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International journal of food microbiology*, 95(2), 147-155.
- Liu, X., Hu, Q., Fang, Z., Zhang, X., & Zhang, B. (2009). Magnetic chitosan nanocomposites: a useful recyclable tool for heavy metal ion removal. *Langmuir*, 25(1), 3-8.
- Liu, H., Gu, D., Cao X., Liu Q., Wang, Q. and Zhang, Y. 2012. Characterization of a new quorum sensing regulator luxT and its roles in the extracellular protease production, motility, and virulence in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology*, 194: 439–452.
- Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J., & Rincón, M. (2004). Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*, 4(2), 1-9.
- Parada, L. G., Crespín G. D, Miranda R. & Issa Katime (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1). ISSN-e 0121-6651.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Rinaudo, M., Milas, M., & Dung, P. L. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(5), 281-285.
- Rodríguez Hamamura, N., Valderrama Negron, A., & Alarcon Cavero, H. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 76(4), 336-354.
- Secretaría Nacional de Agricultura Ganadería y Pesca. Informes de desembarques de crustáceos 2005-2011. [www.minagri.gob.ar](http://www.minagri.gob.ar)
- Tsaih, M.L., & Chen, R.H., (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 88, 2917-2923.
- Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y., & Ma, X. (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 344(17), 2375-2382.
- Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., & Shapley, N. C. (2013). Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 425, 31-41.