

Efecto de la modificación enzimática del quitosano con octil galato sobre sus propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana.

I. Procopio Ramos, A. Cuevas Velasquez, J.P. Pérez-Orozco, L. Zavaleta-Avejar
Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Zacatepec. avejarza@hotmail.com

RESUMEN:

En este trabajo se realizó la inserción enzimática de cadenas alquílicas hidrofóbicas en la molécula de quitosano utilizando octil galato y peroxidasa de rábano con el objetivo de proporcionarle propiedades antioxidantes que potencialicen su funcionalidad. Análisis de $^1\text{HRMN}$, potencial ζ , DPPH con espectroscopia fueron usados para determinar el porcentaje molar y grado de desacetilación, densidad de carga y capacidad antioxidante de las macromoléculas modificadas, respectivamente. Se determinó la actividad antimicrobiana de los quitosanos modificados contra *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*, tanto en solución como en recubrimiento. Los resultados mostraron dos grados de inserción, QOG1 y QOG2, que influyen de forma directa en la capacidad antioxidante de las moléculas, el EC_{50} (concentración de antioxidante para reducir el radical en un 50 %) fue de 964 g/kg DPPH para el QOG2 y 2180 g/kg DPPH para el QOG1. Los quitosanos funcionalizados en solución a 0.75 g/L y en recubrimientos fueron eficaces en el control del crecimiento micelial de los agentes fitopatógenos.

Palabras clave: Inserción enzimática, capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana

ABSTRACT:

In this work the enzymatic insertion of hydrophobic alkyl chains into the chitosan molecule using octylgallate and horseradish peroxidase was performed with the objective of providing antioxidant properties that enhance its functionality. Analysis of $^1\text{HRMN}$, potential ζ , DPPH with spectroscopy were used to determine the molar percentage and degree of deacetylation, charge density and antioxidant capacity of the modified macromolecules, respectively. The antimicrobial activity of modified chitosans against *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides*, both in solution and in coating, was determined. The results showed two degrees of insertion, QOG1 and QOG2, which directly influence the antioxidant capacity of the molecules, the EC_{50} (antioxidant concentration to reduce the radical by 50%) was 964 g/kg DPPH for the QOG2 and 2180 g/kg DPPH for QOG1. The functionalized chitosans in solutions with 0.75 g/L and in coatings were effective to controlling the mycelial growth of phytopathogenic agents.

Key words: Enzymatic Insertion, antioxidant capacity, antimicrobial activity

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, hay un creciente interés en el estudio de los polímeros naturales sustentables particularmente en aplicaciones básicas como el embalaje, películas y recubrimientos comestibles que se biodegradan en condiciones controladas de almacenamiento con el fin de atenuar el creciente problema de los desechos de materiales sintéticos a nivel mundial. Además se busca en éstos la baja o nula toxicidad. En este sentido, el quitosano y sus derivados han demostrado un gran potencial como material de embalaje debido a su poder antimicrobiano inherente, baja toxicidad, material formador de película, así como sus propiedades físicas y químicas versátiles tal

como lo han señalado varios investigadores en los últimos tiempos. El quitosano es un derivado desacetilado del biopolímero quitina. Un aspecto relevante y diferenciador del quitosano y que determina muchas de sus propiedades es el hecho de poseer grupos amino libres en sus unidades de repetición.

Como resultado del interés en esta biomacromolécula, se ha propuesto una amplia gama de materiales con base en quitosano por medio de modificaciones químicas o enzimáticas sobre la cadena principal de este polisacárido para mejorar su solubilidad en agua, propiedades antimicrobianas, capacidad floculante, la absorbancia y adhesividad, curación de heridas sin dejar de ser biodegradable y biocompatible, para posibles aplicaciones en biomedicina, conservación de alimentos, el tratamiento de agua (Kumar y col., 2004; Vinšova, y Vavřítová, 2011).

A pesar de la posibilidad de modificar este polímero por medios químicos, las modificaciones enzimáticas ofrecen rutas alternativas, especialmente cuando los materiales se aplicarán a productos alimenticios debido a que se minimizan los peligros asociados con los reactivos tóxicos, además las condiciones de reacción son suaves y amigables con el ambiente.

Con respecto a las modificaciones enzimáticas se han reportado diversos trabajos de inserción de compuestos fenólicos a la molécula de quitosano utilizando tirosinasa (Kumar y col. 1999; Kumar y col., 2000; Chao y col. 2004). En general, se sabe que las peroxidases tienen como ventajas sobre la tirosinasa, su amplia gama de sustratos, así como el pH óptimo de su actividad que está entre 5 y 6, lo cual es sumamente conveniente en modificaciones del quitosano ya que éste solubiliza a pH's por debajo de 6.0. Con base a lo anterior, Vachoud, y col., (2001) demostraron la capacidad de la HRP para injertar dodecil galato (DDG) a la molécula de quitosano mediante la generación de radicales a partir del derivado fenólico a los medios de reacción para formar enlaces estables, principalmente entre el grupo amino y carbonos aromáticos.

En este sentido se realizó la inserción enzimática de cadenas alquílicas hidrofílicas en la cadena del quitosano utilizando octil galato (OG) y peroxidasa de rábano (HRP) como biocatalizador. A los materiales obtenidos se les determinó grado de inserción, porcentaje molar de inserción, potencial ζ , grupos aminos libres. Para predecir el potencial de aplicación del material resultante se estudiaron la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana. La capacidad antioxidante mostró que la reducción en la intensidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) incrementó con el grado de inserción. El quitosano con mayor grado de inserción de OG exhibió una capacidad antioxidante hasta del 81%. Los grupos aminos incrementaron al aumentar el grado de inserción, lo cual está relacionado con mayor actividad antimicrobiana. Los derivados y los recubrimientos tienen efecto fungistático in vitro sobre los hongos fitopatógenos *Rhizopusstolonifer* y *Colletotrichumgloeosporioides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

I) Caracterización fisicoquímica.- Se determinó el grado de desacetilación de los quitosanos funcionalizados mediante Espectroscopia de resonancia magnética de protón (^1H RMN) y usando la ecuación propuesta por Hirai y col., (1991). La densidad de carga de soluciones al 1 % p/v de quitosano nativo y quitosano funcionalizado (QOG1 y QOG2) y 1% V/V de ácido acético se evaluó utilizando un medidor de potencial Z (ZEM3500, Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Worchesire., Inglaterra). La cantidad de grupos amino libres del quitosano funcionalizado se determinó por el método propuesto por Alonso, y col., (2009); y su capacidad antioxidante fue calculada mediante el método de DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidracilo) reportado por Sánchez-Moreno y col., (1998) con algunas modificaciones en un espectrofotómetro UV-visible (515 nm).

II) Caracterización de las propiedades microbiológicas.- Se determinó la actividad antifúngica in vitro del quitosano nativo y funcionalizado en solución y en recubrimientos contra *Rhizopusstolonifer* y *Colletotrichumgloeosporioides*. Para las soluciones, se colocaron discos (5cm de diámetro) de agar con papa-dextrosa (PDA) y cultivo puro del fitopatógeno en cajas Petri; el PDA contenían una solución de quitosano nativo o

funcionalizado a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.25, 0.50 y 0.75 g/L), que se ajustaron a un pH de 5.6 con NaOH 1 N. En el caso de los recubrimientos, se vertió un mL de las soluciones filmogénicas en cajas Petri, se esparció en toda la caja y se dejó secar a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez seco se colocaron discos de agar (3 mm de diámetro) con cultivo puro del fitopatógeno. En ambos casos, las cajas Petri se incubaron a 25 ± 2 °C, midiendo diariamente el diámetro de la colonia en dos direcciones hasta que el hongo cubrió completamente la caja control, y el control contenía solamente PDA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se reportan los resultados de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del quitosanofuncionalizado. Como se puede apreciar, el porcentaje de desacetilación(% DD) fue mayor para el QOG1 que para el QOG2. Esto concuerda con otros trabajos en los que reportan que al incrementar la concentración inicial de los compuestos fenólicos aumenta el grado de inserción a la molécula de quitosano. Sin embargo, los resultados de potencial ζ , los grupos aminos libres y el % molar indican lo contrario, son mayores para el QOG2, esto puede deberse a la presencia de oligómeros de polioctil galato unidos al quitosano o la propagación de octil galato no unidos al polisacárido, además de la inserción monomolecular de octil galato esperada, lo cual es más evidente a mayor concentración de octil galato. Otro aspecto en lo referente al potencial zeta y la determinación de amino libres es que no necesariamente la inserción se podría dar por los grupos amino, sino probablemente también se realice con el carbono aromático.

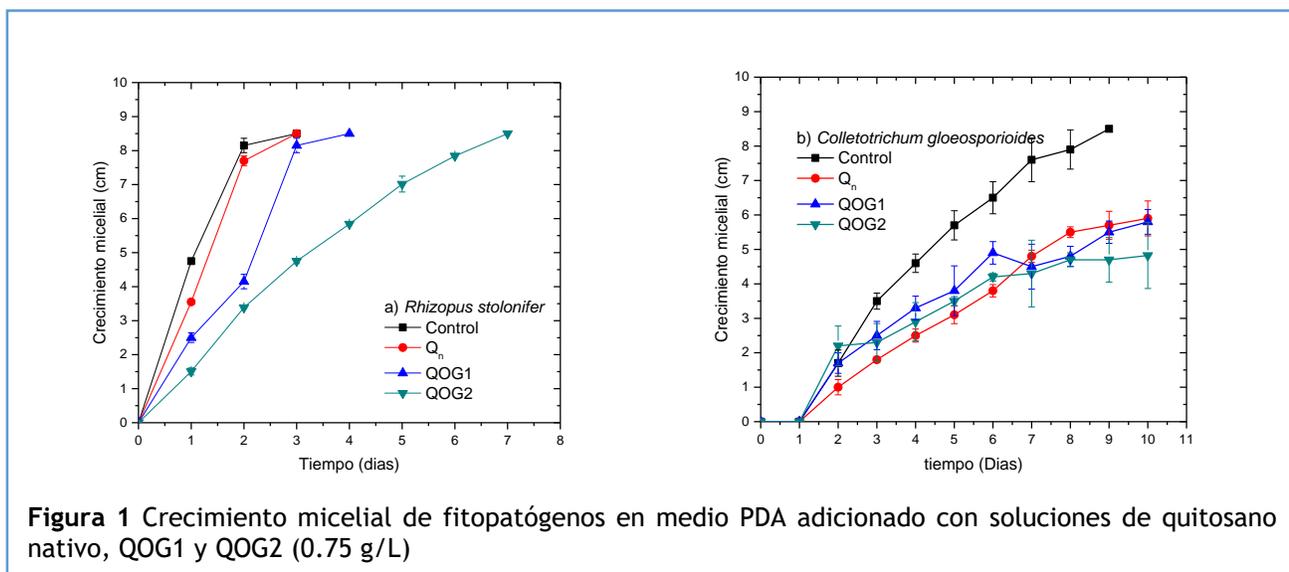
La capacidad de remoción del quitosano nativo fue menor (18.58%) comparada con la de los QOG. Pasanphan y col., (2010) reportaron que el quitosano nativo no presentó capacidad antioxidante, sin embargo en este estudio se encontró que el quitosano nativo si presentó cierta capacidad antioxidante, esta diferencia puede deberse a la fuente de obtención, peso molecular, grado de inserción del polisacárido. La capacidad antioxidante del quitosanofuncionalizado incrementó de acuerdo al porcentaje de inserción y las concentraciones estudiadas alcanzando hasta un 81% cuando se alcanzó la concentración de 1500 g/kg de DPPH. El valor de EC_{50} (concentración de antioxidante para reducir el radical en un 50 %) es un buen indicador del poder antioxidante. El valor máximo de

EC_{50} para la remoción del DPPH obtenido por el método de EPR fue de 964 g/kg DPPH y 2180 g/kg DPPH para el QOG2 y QOG1, respectivamente.

Tabla I. Caracterización fisicoquímica del quitosano nativo y funcionalizado.					
Muestra	% DD	% Molar de inserción	Potencial ζ (mV)	Contenido de grupos amino libres (Abs)	EC_{50} (g/kg DPPH)
Q_n	87.02 \pm 0.53 ^a	--	80.75 \pm 2.19 ^a	0.61 \pm 0.02 ^a	160
QOG1	83.62 \pm 0.46 ^a	4.22 \pm 0.04 ^a	67.70 \pm 0.70 ^b	0.12 \pm 0.07 ^b	2180
QOG2	80.90 \pm 0.98 ^a	11.75 \pm 0.54 ^b	73.55 \pm 0.21 ^c	0.37 \pm 0.01 ^c	964

En la Figura 1 se muestra el crecimiento micelial de los *Rhizopusstolonifer* y de *Colletotrichumgloeosporioides* en presencia de soluciones de quitosano nativo y funcionalizado. El efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial fue afectado por la estructura del hongo y de la cantidad de octil galato injertado en la molécula del quitosano. Para el caso *Rhizopusstolonifer* (Figura 1a) la mayor eficacia en reducir la actividad antifúngica de las soluciones de

QOG2 se explicaría por el hecho de que la “cabeza” y la “cola” del octil galato es similar a la de los alcanoles cuya acción antifúngica principal proviene de su habilidad para desorganizar la función asociada a membrana de las proteínas nativas integrales, al actuar como surfactante no iónicos (Kubo y col., 2001). En el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* sus hifas septadas de pared más gruesa y conidios alargados (Rodríguez-López y col., 2009) favorece la inhibición micelial en todas las soluciones poliméricas, además de que su crecimiento in vitro es más lento (Figura 1b).



En lo que respecta a los recubrimientos, estos también exhibieron efecto antimicrobiano contra *Rhizopus stolonifer* siendo los recubrimientos de QOG2 y QOG2Gli los que redujeron el crecimiento micelial en un 60 y 80 %, respectivamente comparados con el control (Figura 2a). El efecto de las películas a base de quitosano nativo y quitosanos funcionalizados en el crecimiento micelial del *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 2b) mostraron que el QOG1 y QOG2 sin y con glicerol exhibieron mayor control del crecimiento micelial, reduciendo el crecimiento en un 57 y 80% respectivamente. Esto puede deberse a que los recubrimientos actuaron como barrera limitando la penetración de los tubos germinales del hongo a los nutrientes (Bautista-Baños, y col. 2003).

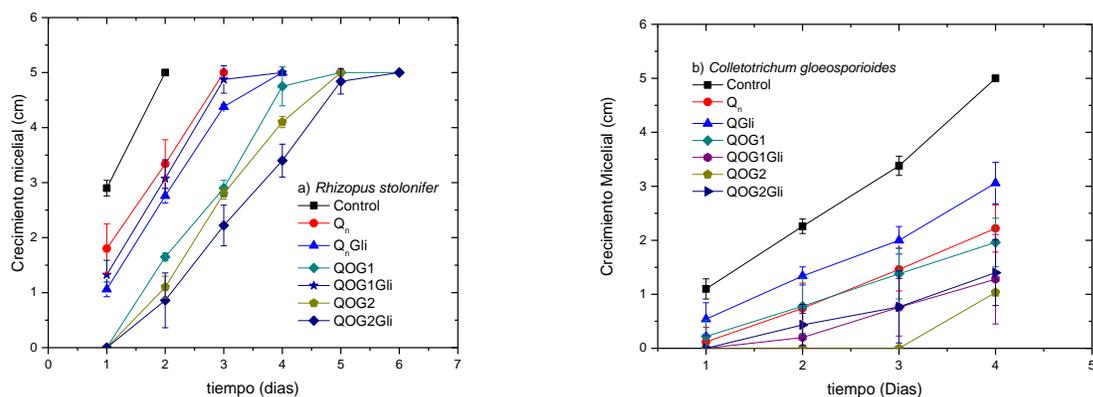


Figura 2 Efecto del recubrimiento comestible elaboradas a base de quitosano nativo (Qn), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol sobre el crecimiento in vitro de fitopatógenos.

CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante de los quitosanosfuncionalizados depende del grado de inserción de octil galato. El EC₅₀ (concentración de antioxidante para reducir el radical en un 50 %) fue de 964 g/kg DPPH y 2180 g/kg DPPH para el QOG2 y QOG1, respectivamente. Los quitosanosfuncionalizados a las concentraciones aplicadas fueron eficaces en el control del crecimiento micelial de los fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J. D., and Shirai, K. 2009. Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 536–543.
- Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M.; Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087–1092.
- Chao, An-Chong; Shyu, Shin-Shing; Lin, Yu-Chuang; and Mi, Fwu-Long. 2004. Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan—to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. *Bioresource Technology*, 91, 157–162.
- Hirai, A.; Odani, H.; and Nakajima, A. 1991. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* 26, 87–94.
- Kubo, I.; Xiao P.; and Fujita K. 2001. Antifungal Activity of OctylGallate: Structural Criteria and Mode of Action. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters* (11) 347 – 350.
- Kumar, G.; Smith, P. J.; and Payne, G. F. 1999. Enzymatic grafting of the natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 63 (2), 154–165.
- Kumar, G.; Bristow, J. F.; Smith, P. J.; and Payne, G. F. 2000. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer*, 41, 2157–2168.
- Pasanphan, W.; Buettner G. R., and Chirachanchai, S. 2010. Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research*, 345, 132–140.
- Rodríguez-López, E. S.; González-Prieto J. M. and Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de fitopatología*, 27, 1, 53 – 63.

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Vachoud L. Chen T., Payne F. G., and Vazquez-Duhalt R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and microbial technology*. 29. 380 -385.
- Vinšova, J. and Vavřítová E. 2011. Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities – a Review. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 3596 – 3607.