

METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE QUITOSANA A BAJAS TEMPERATURAS A PARTIR DE QUITINA DE LANGOSTA

M. A. Ramírez, G. Cabrera, A. Gutiérrez y Tania Rodríguez

ABSTRACT. The effect of alkali/chitin ratio, temperature and reaction time on chitosan obtained from lobster chitin under homogeneous conditions was investigated. Conversion of chitin to chitosan through time was evaluated by means of soluble material determination in acetic acid. Acetylation degree and viscosimetric molecular weight expressed by relative viscosity of chitosans were determined. The best treatment was the one using an alkali/chitin ratio of 140 mL.10 g⁻¹ at 30°C and six days of reaction time. In addition, chitosan characteristics were compared with a SIGMA reagent product and differences were only appreciated at the desacetylation degree. Antifungal activities of chitosan from the best treatment and SIGMA chitosan were compared and there were not significant differences between them, but with the control treatment.

Key words: chitin, chitosan, polymer obtention, antifungal activity

INTRODUCCION

La quitosana es un biopolímero lineal de residuos de glucosamina unidos por enlaces β(1-4). Esta sustancia realmente no se encuentra en forma de un homopolímero, como se considera, sino como un copolímero de unidades de (2-acetamida 2-desoxiglucosa) y (2-amino 2-desoxiglucosa, cuya relación da lugar al concepto de grado de acetilación (Rahtke y Hudson, 1994). Este compuesto tiene una gran aplicación en diferentes ramas de la medicina, la industria y la biotecnología (Popieszny *et al.*, 1994 y Mi *et al.*, 1997).

En la agricultura, su aplicación potencial se basa en su doble cualidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de hongos y bacterias fitopatógenas (El Ghaouth *et al.*, 1994 y Pombo, 1996), así como activar mecanismos de defensa en las plantas estrechamente relacionados con la inducción de resistencia sistémica al ataque de

RESUMEN. Se estudió la influencia de la proporción álcali/quitina, temperatura y tiempo de reacción en la obtención de quitosana en condiciones homogéneas, a partir de quitina comercial cubana. Se evaluó la conversión de quitina a quitosana mediante la determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético. Las quitosanas que se obtuvieron se caracterizaron en cuanto a su grado de desacetilación y masa molecular viscosimétrica, expresada como viscosidad relativa, resultando el mejor tratamiento donde se utilizó la proporción álcali/quitina de 140 mL.10 g⁻¹, una temperatura de 30°C y seis días de tiempo de reacción. Adicionalmente, se compararon las características generales de los productos obtenidos con las de la quitosana reactivo SIGMA, sólo encontrándose diferencias apreciables en el grado de desacetilación. También se comparó, de forma preliminar, la actividad antifúngica de la quitosana obtenida en el mejor tratamiento con la de la quitosana SIGMA, no encontrándose diferencias significativas entre ambas, pero sí con el tratamiento control.

Palabras clave: quitina, quitosana, obtención de polímeros, actividad antifúngica

microorganismos (Benhamou *et al.*, 1994). Estos usos vienen dados fundamentalmente por su alto contenido de aminas, que le confiere una naturaleza policationica de alta densidad de carga, además de su elevada masa molecular (Rane y Hoover, 1993)

La quitosana se obtiene principalmente de la desacetilación alcalina de la quitina, la cual constituye el mucopolisacárido más abundante de la naturaleza, donde se encuentra formando parte de la pared celular de los hongos, la cutícula de los insectos y el exoesqueleto de los crustáceos (Roberts, 1992). En Cuba, la quitina se obtiene comercialmente a partir del exoesqueleto de langosta cubana (*Panulirus Argus*), que constituye un producto de desecho, altamente contaminante, de la industria pesquera. En el país, existe una amplia fuente de materia prima para la producción de quitina, pues sólo de langosta se capturan al año 11 500 t, de las cuales 3 500 pertenecen al exoesqueleto (MIP, 1996).

Sin embargo, la preparación y el empleo generalizado de la quitosana se han visto limitados, debido a que la mayoría de las técnicas de obtención se realizan en condiciones heterogéneas, que implican el empleo de reactores cerrados con instalaciones especiales para el uso

Ms.C. M. A. Ramírez y Tania Rodríguez, Investigadores de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios"; Ms.C. G. Cabrera y A. Gutiérrez, Investigadores Agregados del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

de gases inertes y elevadas temperaturas, usualmente mayores que 100°C (Focher *et al.*, 1992 y Pombo *et al.*, 1995). Adicionalmente, se ha observado que la actividad biológica de las quitosanas obtenidas a bajas temperaturas (menores de 50°C) en condiciones homogéneas difieren de las obtenidas por otros métodos (Borges *et al.*, 1998).

En este trabajo se hace un estudio de algunas condiciones de reacción, para la obtención de quitosana en condiciones homogéneas (bajas temperaturas). Se discute cuál es el tratamiento más efectivo para lograr una quitosana completamente soluble que posea la mayor masa molecular posible y se comparan las características estructurales y biológicas de los productos obtenidos con una quitosana comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las quitosanas se obtuvieron a partir de la quitina comercial cubana suministrada por el laboratorio farmacéutico «Mario Muñoz». En los tratamientos se emplearon dos proporciones de hidróxido de sodio 50 %/quitina: 140 mL.10 g⁻¹ y 210 mL.10 g⁻¹ y dos temperaturas de la reacción: 30 y 40°C. Se tomaron muestras a los tres, cuatro, cinco, seis y siete días, las que se filtraron a presión reducida, se lavaron con agua y alcohol hasta pH neutro y se secaron en una desecadora.

El porcentaje de material soluble en ácido acético (HAc) se determinó por disolución de 1g de polímero en 100 mL de HAc 1 %(v/v) en agua, según Alimuniar y Zainuddin (1994).

El grado de acetilación se determinó por valoración potenciométrica, de acuerdo a Muzarelli (1977). Para ello, se disolvió 0.25 g del polímero en 30 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0.3 N y se valoró con NaOH 0.2 N. La viscosidad específica, como medida del peso molecular viscosimétrico, se determinó a disoluciones del polímero 1 % (m/v) en HAc 1 %(v/v) agua, para lo cual se empleó un viscosímetro Ostwald y un baño termostataado a una temperatura de 25±0.2°C.

Se determinó, además, el contenido de cenizas según Pombo (1996) y el contenido de proteínas residuales por el método de MicroLowry descrito por Sun (1994).

Los tratamientos ensayados se muestran a continuación:

1. 140 mL NaOH 50 %/10 g quitina a 30°C
2. 210 mL NaOH 50 %/10 g quitina a 30°C
3. 140 mL NaOH 50 %/10 g quitina a 40°C
4. 210 mL NaOH 50 %/10 g quitina a 40°C

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. Las medias se compararon por el empleo de la prueba de Rangos Múltiples de Duncan y se determinaron los intervalos de confianza en otros casos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La quitosana, a diferencia de la quitina, es soluble en soluciones ácidas diluidas (Rathke y Hudson, 1994); esta propiedad puede aprovecharse para estudiar el proceso de conversión química de quitina a quitosana, a través de la determinación del porcentaje de producto soluble en disolución acuosa 1 % (v/v) de ácido acético en el tiempo. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Porcentaje de solubilidad de los productos obtenidos en HAc 1 % (v/v) agua

Tiempo (días)	Tratamientos			
	1	2	3	4
3	18±2	60±2	28±2	74±1
4	34±1	91±1	42±1	95±1
5	69±2	100±0	84±22	100±0
6	100±0	100±0	100±0	100±0
7	100±0	100±9	100±0	100±0

Como se observa, al incrementar la relación NaOH/quitina ocurre un aumento de la cantidad de sustancia soluble en ácido acético, lo cual se evidencia de la comparación de los tratamientos 1 y 2 ó 3 y 4, donde se incrementó la relación NaOH/quitina de 140 mL.10 g⁻¹ a 210 mL.10 g⁻¹. Se puede apreciar, además, que a partir del quinto día en los tratamientos 2 y 4, la quitina ha sido transformada en quitosana, según sugiere su completa solubilización en la disolución de ácido acético, aunque se observan valores de solubilidad elevados desde el cuarto día de reacción, mientras que en los tratamientos 1 y 3, este fenómeno sólo ocurrió al sexto día de reacción.

La temperatura de reacción también tuvo un efecto estimulador en la conversión de la quitina a derivados solubles en la disolución ácida, ya que al incrementarse esta variable de 30 a 40°C aumentaron los porcentajes de solubilidad en ácido acético del producto de reacción, como se puede comprobar al comparar los tratamientos 1 y 3 ó 2 y 4. Sin embargo, se debe señalar que este efecto fue menos marcado que el de la proporción NaOH/quitina, lo cual se evidencia en el hecho de que los tratamientos comparados con igual proporción álcali/quitina y diferentes temperaturas tales como el 1 y 3 ó 2 y 4, se tornaron completamente solubles aproximadamente al mismo tiempo.

Estos resultados concuerdan con los publicados por Alimuniar y Zainuddin (1994) para la quitina de camarón, quienes encontraron que en condiciones experimentales similares al tratamiento donde se emplea una proporción álcali/quitina de 140 mL.10 g⁻¹ y 30°C, sólo se obtenía un producto soluble en la disolución ácida a los seis días de reacción, mientras que el tiempo necesario para la conversión de la quitina a quitosana disminuía al aumentar la proporción NaOH/quitina y la temperatura.

Teniendo en cuenta que sólo se consideran quitosanas las muestras completamente solubles en disolución ácida, en los estudios siguientes sólo se analizarán éstas.

El comportamiento del grado de desacetilación, o sea, la proporción entre los monómeros: 2-amino 2 desoxi glucosa y 2 acetamido 2-desoxi glucosa, también varió significativamente con los diferentes tratamientos aplicados, como se muestra en la Tabla II. Del análisis de los resultados de la Tabla II, puede notarse que el incremento de la proporción NaOH/quitina provocó un aumento en el grado de desacetilación de la quitosana, lo cual se evidencia al comparar los tratamientos 1 y 2 ó 3 y 4. Se observa, además, que los tratamientos que tuvieron las mayores proporciones NaOH/quitina exhibieron desde el primer momento, un mayor grado de desacetilación que el resto de los tratamientos y los cambios de esta propiedad en el tiempo fueron de mayor magnitud. Este comportamiento pudiera deberse a que un aumento en el volumen de solución provoca un mayor despliegue espacial del polímero, lo que permite que los grupos acetamidos reaccionen de forma más efectiva con el medio alcalino (Alimuniar y Zainudin, 1994).

Tabla II. Grado de desacetilación de las quitosanas en el tiempo

Días	Tratamientos			
	1	2	3	4
5	-	71 b	-	72 b
6	60 c	73 b	61 c	75 b
7	61 c	75 b	63 c	80 a

Ex = 1.35 p<0.05

En sentido general, se observó que en el proceso de desacetilación ocurrió un estancamiento en el aumento del grado de desacetilación, a partir de la primera evaluación, asociado a un aumento de la degradación del polímero. Este fenómeno ha sido descrito por Baxter *et al.* (1992) para procesos similares en condiciones heterogéneas.

La temperatura de la reacción también contribuyó al incremento del grado de desacetilación de los productos obtenidos. Este resultado se hace evidente por la comparación al séptimo día de los tratamientos 2 y 4 donde se elevó la temperatura de reacción con una relación NaOH/quitina de 210 mL.10 g⁻¹ para ambos experimentos o el par 1 y 3 donde también se incrementa la temperatura de reacción, pero se emplea una relación NaOH/quitina de 140 mL.10 g⁻¹. Este hecho experimental pudiera explicarse porque un incremento de la temperatura de reacción disminuye la viscosidad de la solución de álcali y aumenta su reactividad, al intensificar el movimiento de las partículas, lo cual trae como consecuencia que se incremente la velocidad y magnitud de la desacetilación (Chang *et al.*, 1997).

Como sugieren los resultados obtenidos, tanto la proporción NaOH/quitina como la temperatura de la reacción contribuyen a aumentar el grado de desacetilación de las quitosanas. En ese sentido, se observó un cambio más acentuado en el grado de desacetilación al aumentar simultáneamente estas dos variables, como se infiere del análisis del experimento 1 y 4 con valores significativamente diferentes de 61 y 80 %, respectivamente, al séptimo día de reacción.

La influencia de los factores estudiados en el comportamiento de la masa molecular viscosimétrica, puede estudiarse a través de la viscosidad específica de disoluciones de polímeros, aprovechando la relación directa de la viscosidad con la masa molecular, según la ecuación de Mark Houwink. Los resultados encontrados se representan en la Figura 1. Como puede apreciarse, al aumentar la proporción álcali/quitina, con la temperatura y el tiempo de reacción ocurre un decremento de la masa molecular del polímero. Se observa, además, que el efecto de la temperatura de reacción sobre el decremento de la masa molecular de la quitosana fue mucho menor que el correspondiente a la relación álcali/quitina, lo cual se sugiere por la evidencia experimental de que el tratamiento 2 con una menor temperatura de reacción (30°C) pero una mayor relación NaOH/quitina (210 mL.10 g⁻¹) tuvo una menor viscosidad específica y, por consiguiente, una menor masa molecular del polímero respecto al tratamiento 3 con 40°C y 140 mL.10 g⁻¹ respectivamente.

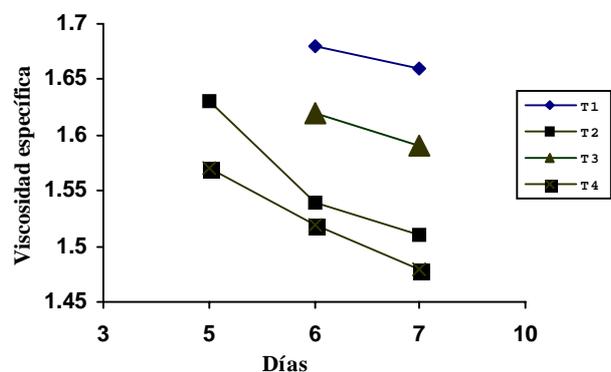


Figura 1. Viscosidad específica de las quitosanas en el tiempo

De forma general, los resultados encontrados pudieran deberse a que tanto el aumento de la temperatura de reacción como la relación álcali/quitina conducen a que los grupos hidroxilos pierdan la selectividad de reaccionar con los grupos acetamidos y actúen apreciablemente sobre los enlaces glicosídicos del polímero, con la consecuente disminución del número de residuos monoméricos enlazados en las cadenas y por lo tanto de su masa molecular (Chang *et al.*, 1997).

También se pudo apreciar que el polímero obtenido con una proporción NaOH/quitina de 140 mL.10 g⁻¹, temperatura de 30°C y seis días de reacción, resultó el de mayor viscosidad específica y, por lo tanto, debe poseer la mayor masa molecular, con una diferencia apreciable sobre el resto de los tratamientos, lo cual está en concordancia con el resultado publicado por Alimuniar y Zainuddin (1994) para la obtención de quitosana a partir de quitina de camarón. Estos autores demostraron que con relaciones NaOH/quitina mayores que 140 mL.10 g⁻¹, para condiciones de reacción homogénea se produce un decremento apreciable de la viscosidad de la quitosana obtenida y de su masa molecular.

La quitosana anteriormente mencionada, también se seleccionó como la mejor de los polímeros obtenidos, por sus características de completa solubilidad, grado de desacetilación y de mayor masa molecular viscosimétrica.

El producto seleccionado (quitosana INCA) se caracterizó parcialmente y se compararon sus características generales con las de la quitosana comercial de la firma Sigma. Los resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Características generales de las quitosanas obtenidas y la quitosana SIGMA

Características	Quitosana INCA	SIGMA
Color	Blanco	Blanco
Contenido de cenizas	0.80 %	0.77 %
Contenido de proteínas	0.08 %	0.1 %
Grado de desacetilación	61 %	90 %

Cada valor es la media de tres repeticiones

Como puede observarse, la quitosana INCA presenta parámetros de calidad, tales como: color, contenido de cenizas y contenido de proteínas residuales similar a la quitosana comercial de la firma SIGMA. Se observaron solamente diferencias significativas en el grado de desacetilación de ambas quitosanas, el cual es mayor para la quitosana SIGMA que para la quitosana INCA.

Este resultado pudiera conducir a la idea de que la quitosana obtenida por este método tiene una menor actividad antimicrobiana que la quitosana SIGMA, a la luz de los resultados obtenidos por autores como Leuba y Stossel (1984), los cuales plantean que a mayor grado de desacetilación mayor es la actividad antimicrobiana de este biopolímero. Para aclarar este punto, se realizó un ensayo preliminar del efecto de ambas quitosanas sobre el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* var *licopersici*.

Los resultados obtenidos demostraron que ambas quitosanas son capaces de inhibir el crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* var *licopersici*, desde el tercer día después de la inoculación, sin diferencias significativas entre ellas pero sí con el tratamiento control. Este comportamiento de ambas quitosanas demuestra que la actividad antimicrobiana del producto obtenido en este trabajo (quitosana INCA) es similar a quitosanas comerciales.

A partir de los resultados presentados en este trabajo, se puede concluir que con una relación NaOH 50 %/quitina de 140 mL.10 g⁻¹, 30°C y seis días de reacción se puede obtener quitosana completamente soluble y con una elevada masa molecular del polímero, a partir de quitina de langosta, o sea, con el empleo de condiciones suaves de reacción en cuanto a presión y temperatura. Este procedimiento permite el uso de reactores de bajo costo y la posibilidad de obtener quitosana con condiciones de equipamiento sencillas.

Adicionalmente, la quitosana obtenida presentó similar actividad antimicrobiana frente a *Fusarium oxysporum* var *licopersici* que la quitosana comercial SIGMA.

Esta constituye la primera comunicación que se conozca en Cuba, sobre un método de obtención de quitosana en condiciones homogéneas, a partir de la quitina cubana, proveniente del exoesqueleto de langosta y a pesar de que utiliza un tiempo de reacción mucho mayor que los métodos convencionales, constituye una técnica alternativa para la obtención de este polímero.

REFERENCIAS

- Alimuniar, A. y Zainuddin, R. An economical technique for producing chitosan. Proceedings from the 6th International Conference on chitosan, Poland, 16-19 August, 1994.
- Baxter, A., et al. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1992, vol. 14.
- Benhamou, N., et al. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*, 1994, vol. 84, no. 12, p. 1432-1444.
- Borges, A., et al. Chitosan and MSB effectively inhibits fungal growth and induced resistance against FOL in young tomato plants. (Tropical Agriculture, en prensa). 1998.
- Chang, L. K., et al. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 1997, vol. 303, no. 3, p. 327-332.
- El Gaouth, A., et al. Chitosan induces systemic resistance against *Phytophthora aphanidermatum* in greenhouse grown cucumber. *Phytopathology*, 1994, vol. 84, no. 9, p. 1120-1127.
- Focher, R., et al. Structural differences between chitin polymorph and their precipitates from solutions. Evidence from CP-MAS ¹³C-NMR, FTIR and FT Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 1992, vol. 17, p. 97-102.
- Leuba, J. L. y Stossel, P. Chitosan and other polyamines. Antifungal activity and interaction with biological membranes. In Chitin in nature and technology 215-222. Eds Muzarelli R. Jeniaux, C. Gooday, G.W. Plenum Press. New York and London. 1984.
- Mi, F. L., et al. Chitosan tablets for controlled release of theophylline: Effect of polymer-drug wet or dry blending and anionic-cationic interpolymer complex. *Journal of Applied Polymer Science*, 1997, vol. 66, p. 13.
- MIP. Informe anual del combinado pesquero de Batabanó, 1996.
- Muzarelli, R. Chitin, Pergamon Press, Oxford 1977, p. 61-62.
- Pombo, R., et al. Actividad *in vitro* de hidrolizados de quitosana sobre hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 3, p. 62-64.
- Pombo, R. Relación estructura-actividad de la quitosana y sus hidrolizados ácidos. Tesis para optar por el grado de Máster en Química Agrícola. ISCAH, La Habana, 1996.
- Popieszny, H., et al. New application of chitosan in agriculture. Proceedings from the 6th International Conference on Chitin Chitosan. Poland. 16-19 August, 1994.
- Rane, K. y Hoover, D. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. *Process Biochemistry*, 1993, vol. 28, p. 115-118.
- Rathke, T. y Hudson, S. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. J.M.S.-REV. MACROMOL.CHEM. PHYS., C 1994, vol. 34, p. 375-437.
- Roberts, F. Chitin Chemistry. London MacMillan Press, 1992.
- Sun, S. MicroLowry method. In: Methods in Plant Molecular Biology and Agricultural Biotechnology. Asian Vegetable Research and Development Center. Council of Agriculture, 1994, p. 9-11.

Recibido: 25 de marzo de 1999

Aceptado: 16 de julio de 1999