

10 7967



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

1059-1271
T-1191

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

**"PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNGISTÁTICAS DE
BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO OBTENIDO DE ENSILADOS
DE DESECHO DE CAMARÓN"**

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Q.B. Ana Patricia Martínez Camacho

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

©Derechos de autor:

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos, especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos, de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Jefe del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.

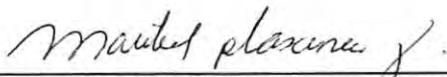
Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente



Ana Patricia Martínez Camacho

Aprobación del Director de Tesis



Dr. Maribel Plascencia Jatomea

Hermosillo Sonora, 11 de junio de 2009

AGRADECIMIENTOS

La vida nos da a las personas, y ellas con su apoyo y su compañía, se hacen parte de la nuestra. Para todos aquellos que son importantes en mi vida: ¡Gracias!

A mis padres, hoy y siempre, tienen mi más profundo amor y agradecimiento. Lo que soy ahora, hasta donde he llegado hoy, es en mayor parte gracias a ustedes, todo se los debo. Me quedo sin palabras para agradecerles lo mucho que han hecho por mí. Los amo siempre.

A mis hermanas, Clau y Ale, son mi alegría, mis amigas de toda la vida, y yo tengo tanto que agradecerles. Quiero estar siempre junto a ustedes. Las quiero muchísimo. A mi prima, ahora más hermana mía que otra cosa, San, por acompañarme y dejarme adoptarte.

A mi familia, toda, completa, son parte de mi dondequiera que voy, sin importar cuanto tiempo pase, siempre están conmigo, en mí, en mis pensamientos. Gracias a la vida que los tengo. Gracias muy especialmente a mi tía Lolys por siempre estar disponible para escucharme, por entenderme, cuidarme y apoyarme todo este tiempo.

A Aarón por tu apoyo constante, por impulsarme y creer en mí. Por la confianza y el cariño que me has dado. Por las metas y las ilusiones que compartimos. Por alegrarme siempre, acompañarme, animarme y por la felicidad que me has regalado. Gracias por estar en mi vida. Te amo.

A mis amigos, porque los amigos nos muestran el rumbo y recorren parte del mismo con nosotros, gracias Iris, Otila, Eber, Leo, por su oído atento, sus atinadas palabras, su tiempo, gracias por su compañía y su amistad que aprecio muchísimo. Los recuerdo siempre con cariño.

A la Dra. Maribel, por todo su tiempo, su apoyo y su confianza constante en mí, por su guía, sus cuidados y todos sus consejos, por no dejarme desanimar nunca y siempre impulsarme a alcanzar más. Le estaré siempre agradecida.

A los doctores Mario Onofre, Abril Graciano, y Marina Ezquerra, por su preciada ayuda y guía, sus comentarios, sugerencias y toda su atención y disposición para colaborar no solo en este trabajo sino en mi formación. Muchísimas gracias por todo.

A las doctoras Erika Díaz, Ofelia Rouzaud e Hisila Santacruz, por todo su apoyo y su entusiasmo en la caracterización de mis muestras y por su paciencia para atender todas mis dudas. A la M.C. Elizabeth Peralta en CIAD por su apoyo con la extrusión y la peletización de las muestras. Al Dr. Carmelo Encinas en DIPM por su ayuda con el extrusor de muestras pequeñas para las películas.

A Coty, Mary, Silvia, y a todos los profesores y trabajadores del DIPA, por hacer de mi estancia aquí agradable y provechosa. A mis compañeros de lab, de trabajo y de tema: Tavo, Flor, Edissa y Analine por toda su ayuda y su colaboración en este trabajo, por su compañía durante todo este tiempo haciendo todo el trabajo más fácil y agradable.

A CONACYT por becarme para hacer el posgrado y darme así la oportunidad de seguir con mi educación.

Y a todos los que de algún modo, sabiéndolo o no, me ayudaron, me apoyaron y estuvieron conmigo, e influyeron directa o indirectamente en este logro, muchas gracias.

RESUMEN

El ensilado de desechos de camarón, para la obtención de quitina por vía biológica, es método alternativo eficaz que permitió la obtención de quitosano de calidad similar a uno comercial de mediana viscosidad, con un peso molecular bajo (100 kDa) y un grado de desacetilación adecuado (64.61%) para su utilización en alimentos como antimicrobiano. El quitosano obtenido por esta vía presentó efecto fungistático sobre *A. niger* que, aunque menor (47.26%), no fue significativamente diferente al presentado por un quitosano comercial (56.16%). Las películas elaboradas con dicho quitosano también tuvieron un efecto fungistático sobre el hongo, pero menor (15.49%) que el quitosano en solución, lo que indica interacción de los grupos amino de la molécula con el resto de los componentes de las películas. Las películas tuvieron buenas propiedades mecánicas, presentando un efecto significativo de la adición de sorbitol como plastificante en la elongación de las mismas. Mientras que las películas extrudidas presentaron mayores valores de elongación, siendo más moldeables y elásticas que las películas de quitosano por evaporación de solventes. Además, la miscibilidad de los componentes de las mezclas para la elaboración de las películas fue buena, como lo demostraron los estudios de calorimetría y de espectroscopía de infrarrojo. Sin embargo, la actividad fungistática de las películas extrudidas no se determinó en base al crecimiento radial, si no al diámetro de esporas del hongo, sin encontrarse diferencia significativa entre las diferentes formulaciones, así como con las películas por evaporación. En todos los casos, la presencia de las películas aumentó el diámetro de las esporas, lo que indica una afectación a nivel morfológico del hongo, no obstante, son necesarios más estudios para determinar el efecto sobre la morfología de cada una de las diferentes películas.

CONTENIDO

	Página
DERECHOS DE AUTOR.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	xi
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Generalidades de Quitina y Quitosano.....	4
Estructura Química.....	5
Fuentes de Quitina y Quitosano.....	6
Obtención de Quitina y Quitosano.....	6
Métodos de Obtención de Quitina.....	9
Métodos Químicos.....	9
Métodos Biológicos.....	11
Ensilados.....	11
Ensilado Fermentado.....	12
Ensilado Ácido.....	12
Métodos de Obtención de Quitosano.....	13
Método Químico.....	14
Método Biológico.....	15
Propiedades Fisicoquímicas del Quitosano.....	16
Peso Molecular.....	16
Grado de Desacetilación.....	17
Viscosidad.....	18
Solubilidad.....	19
Aplicaciones del Quitosano.....	20
Biopelículas de Quitosano.....	24
Métodos de Elaboración.....	28

Por Evaporación de Solventes “Casting”	28
Por Extrusión.....	29
Propiedades Biológicas del Quitosano y sus Películas.....	31
Actividad Antiviral.....	31
Efecto Repelente e Insecticida.....	32
Actividad Antimicrobiana.....	33
Aplicaciones y Perspectivas de las películas de Quitosano como Empaques para Alimentos.....	35
JUSTIFICACION.....	38
OBJETIVO GENERAL.....	39
Objetivos Particulares.....	40
HIPOTESIS.....	40
MATERIALES Y METODOS.....	40
Etapa 1: Obtención y Caracterización de Quitosano.....	43
Ensilado Fermentado para la Obtención de Quitina.....	43
Obtención del quitosano.....	43
Caracterización del Quitosano.....	43
Humedad.....	44
Proteína Total.....	44
Ceniza.....	45
Viscosidad y peso molecular mediante viscosidad intrínseca... ..	45
Grado de desacetilación por FTIR.....	46
Actividad fungistática de quitosanos sobre crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	47
Crecimiento radial.....	48
Germinación de esporas.....	48
Etapa 2: Elaboración y Caracterización de Películas de Quitosano.....	49
Elaboración de películas de quitosano por evaporación de solvente.....	49
Elaboración de películas de quitosano por extrusión.....	50

Propiedades morfológicas de las películas de quitosano.....	51
Espesor de las películas.....	51
Espectroscopía de infrarojo (FTIR) sobre películas.....	51
Calorimetría diferencial de barrido.....	51
Propiedades mecánicas de las películas de quitosano.....	52
Etapa 3: Actividad Fungistática de las películas de quitosano.....	52
Crecimiento radial en películas de quitosano.....	52
Parámetros morfométricos (Diámetro de Hifas y Esporas).....	53
Diseño experimental y análisis estadístico.....	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
Etapa 1: Obtención y Caracterización de Quitosano.....	55
Caracterización del Quitosano.....	56
Grado de Desacetilación.....	57
Peso Molecular.....	59
Actividad Fungistática de quitosanos sobre <i>Aspergillus niger</i>	60
Crecimiento Radial.....	61
Germinación de Esporas.....	63
Etapa 2: Elaboración y Caracterización de Películas de Quitosano.....	66
Grosor.....	69
Propiedades Mecánicas.....	69
Calorimetría Diferencial de Barrido.....	74
Espectroscopía de Infrarrojo Transformada de Fourier (FTIR).....	77
Etapa 3: Actividad Fungistática de las Películas de Quitosano.....	79
Crecimiento Radial.....	80
Parámetros Morfométricos (Diámetro de Hifas y Esporas).....	83
Diámetro de Hifas.....	84
Diámetro de Esporas.....	85
CONCLUSIONES.....	88
RECOMENDACIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Titulo	Pagina
1	Estructura química de la (a) quitina, (b) quitosano y (c) celulosa.....	5
2	Distribución de la quitina en la matriz de crustáceos.....	10
3	Desacetilación química de la quitina para la obtención de quitosano.....	13
4	Extrusor de un tornillo y partes más importantes.....	30
5	Diagrama general del procedimiento.....	42
6	Técnicas de inoculación para análisis fungistático de películas de quitosano, (a) inoculación del hongo debajo de la película e (b) inoculación de hongo por arriba de la película.....	53
7	Espectros de infrarrojo para quitosano comercial de media viscosidad (QM), de baja viscosidad (QB) y quitosano de ensilado (QE).....	59
8	Efecto de los quitosanos sobre la extensión radial de las colonias de <i>Aspergillus niger</i> , a 25° C.....	61
9	Efecto de los quitosanos sobre la germinación de esporas de <i>A. niger</i> a 25° C.....	63
10	Películas de quitosano obtenidas por evaporación de solventes.....	67
11	Películas extrudidas de quitosano y LDPE (CX), de quitosano, LDPE y 1% adhesivo (CY), y de quitosano, LDPE y 10% adhesivo (CZ).....	68
12	Curvas de esfuerzo vs deformación de las películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes. QE: películas de quitosano de ensilado, QES: películas de quitosano de ensilado con sorbitol, QM: películas de quitosano comercial, QMS: quitosano comercial con sorbitol y Control: película de celofán.....	71
13	Curvas de esfuerzo vs deformación de películas de quitosano extrudidas, AX: película extrudida de LDPE, AY: película extrudida	

	de LDPE y 1% adhesivo, AZ: película extrudida de LDPE y 10% adhesivo, CX: película extrudida de quitosano y LDPE, CY: película extrudida de quitosano, LDPE y 1% adhesivo, y CZ: película extrudida de quitosano, LDPE y 10% adhesivo.....	73
	Termogramas de calorimetría diferencial de barrido de las películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes.	
14	qm: película de quitosano comercial de media viscosidad, qms: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, qe: película de quitosano de ensilado y qes: películas de quitosano de ensilado con sorbitol.....	75
	Espectros de FTIR de películas de quitosano elaboradas por: (a) evaporación de solventes, y (b) extrusión. QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol. AX: película extrudida de LDPE, AY: película extrudida de LDPE y 1% adhesivo, AZ: película extrudida de LDPE y 10% adhesivo, CX: película extrudida de quitosano y LDPE, CY: película extrudida de quitosano, LDPE y 1% adhesivo, y CZ: película extrudida de quitosano, LDPE y 10% adhesivo.....	78
15	Crecimiento radial de <i>A. niger</i> en películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes por (a) inoculación por debajo y (b) por arriba de la película. QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol y Control: película de celofán.....	82
16	Hifas de <i>A. niger</i> a 10h de incubación a 40x en las diferentes películas: a) control de celofán, b) película (QE) de quitosano de ensilado sin sorbitol, c) película (QES) de quitosano de ensilado	
17		

con sorbitol, d) película (QM) de quitosano comercial de media viscosidad, e) película (QMS) de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol y f) control de PDA.....	87
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Título	Pagina
1	Contenido de quitina en diferentes organismos.....	7
2	Aplicaciones del quitosano.....	21
3	Aplicaciones del quitosano en la industria de alimentos.....	23
4	Películas y cubiertas de quitosano aplicadas a diversos alimentos y su efecto sobre los mismos.....	26
5	Películas de quitosano y sus características investigadas.....	36
6	Formulación de las mezclas de quitosano, adhesivo y LDPE, para la elaboración de películas extrudidas.....	50
7	Caracterización proximal de los quitosanos.....	56
8	Propiedades fisicoquímicas de los quitosanos.....	57
9	Velocidad de extensión e índice fungistático de quitosano en el crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> a 25°C.....	62
10	Velocidad de crecimiento e índice fungistático en el crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> a 25°C.....	64
11	Claves y formulaciones de las películas de quitosano por evaporación de solventes y por extrusión.....	66
12	Propiedades mecánicas y grosor de las películas de quitosano por evaporación y extrusión.....	70
13	Temperaturas de transición vítrea de películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes.....	76
14	Velocidad de extensión e índice fungistático de películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes en el crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> a 25°C.....	80
15	Diámetro de esporas e hifas de <i>A. niger</i> en presencia de películas de quitosano, inoculación por debajo de la película.....	84

INTRODUCCION

Los empaques de alimentos tienen como función primordial proteger al producto contra el medio exterior. Existen diferentes materiales que pueden emplearse como empaques para alimentos y a los cuales se les pueden incorporar sustancias activas con la intención de mejorar su funcionalidad.

Una de las sustancias activas mayormente incorporadas a los materiales de empaque son los compuestos con actividad antimicrobiana. Sin embargo la adición de estos compuestos puede afectar las propiedades físicas del propio empaque demeritando principalmente sus cualidades mecánicas. Además el antimicrobiano puede reducir su capacidad al someterse junto con el material de empaque a los procesos de elaboración del mismo (Han, 2000). Por ello se buscan materiales para la elaboración de empaques para alimentos con actividad antimicrobiana propia. Uno de estos materiales es el quitosano, un polisacárido catiónico natural derivado de la quitina, otro polisacárido natural que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos e insectos y en las paredes celulares de algunos hongos (Coma y col., 2003).

El quitosano es un compuesto con propiedades antimicrobianas y filmogénicas que lo convierten en un material con capacidad para emplearse como empaque de alimentos. Además, es biocompatible y biodegradable, haciéndolo ventajoso con respecto a materiales plásticos de difícil reciclaje o reutilización.

Se estima que solo se recupera o recicla menos del 15% de los materiales plásticos desechados. Esto debido a que los empaques plásticos usados para alimentos no se pueden reutilizar para el mismo fin por razones sanitarias por lo que deben destinarse a alguna otra función (Arandes y col., 2004). Así, la producción de envases plásticos supera la de su reciclaje y reutilización lo que genera un grave problema de contaminación, por ello el auge en el desarrollo de nuevos materiales de empaque biodegradables.

El quitosano, además, es comestible y no tóxico por lo que es posible desarrollar cubiertas y películas comestibles para alimentos con dicho material.

Las películas y cubiertas de quitosano han sido probadas con éxito a nivel experimental sobre una amplia variedad de alimentos desde huevos, frutas cortadas y peladas, lácteos y carnes (Bhale y col., 2003; El Ghaouth y col., 1992b; Chien y col., 2007a; Coma y col., 2003; Wu y col., 2000; Chien y col., 2007b) en los cuales este compuesto demostró tener un efecto protector contra la contaminación y deterioro por microorganismos, así como un aumento en el tiempo de vida útil y en la calidad de dichos alimentos con respecto a aquellos que no fueron tratados.

El quitosano probó ser también efectivo en el control del desarrollo de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* (Coma y col., 2003; Tsai y col., 2002), entre otras, y de hongos como *Sclerotinia sclerotium*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger* (El Ghaouth y col., 1991 y 1992a; Zivanovic y col., 2003; Vargas y col., 2006; Martínez-Camacho, 2006; Sebtí y col., 2005; Cheah y col., 1997; Li y Yu, 2001).

Los mecanismos de la actividad antimicrobiana del quitosano no se conocen completamente, pero se han propuesto al menos tres en la que la mayoría de los investigadores coinciden. Estos tienen que ver mayormente con la interacción y alteración de las membranas celulares por la presencia de los grupos amino cargados positivamente en el biopolímero.

No obstante, la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano no ha sido bien documentada, y resulta un poco más compleja debido a la presencia de otros compuestos en las películas. Entre estos se han probado agentes plastificantes como sorbitol, glicerol, etilenglicol, entre otros, con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de dichas películas (Hosokawa y col., 1990; Caner y col., 1998; Fernández-Cervera y col., 2004; Sébastien y col., 2006), así como compuestos naturales como ácidos orgánicos, almidones, aceites esenciales de plantas, vitaminas y minerales, entre otros (Srinivasa y col., 2007b; Zivanovic y col., 2005; Park y Zhao, 2004). La presencia de estos compuestos pudiera alterar la disponibilidad de los grupos amino cargados positivamente en el quitosano y afectar a su vez su actividad antimicrobiana, lo cual se suma a otros factores tales como la

permeabilidad al oxígeno y otros gases en las películas, que a su vez pueden influir negativa o positivamente en el efecto antimicrobiano.

Con el fin de aportar nuevos conocimientos acerca del efecto de la forma en la que se encuentra el quitosano y de su método de obtención sobre la actividad antimicrobiana del mismo, en este trabajo se utilizaron dos métodos de obtención de quitosano: uno por vía química y otro por vía biológica, así como 2 métodos de elaboración de películas. Se comprobó y comparó el efecto fungistático del quitosano y de las películas de quitosano sobre el crecimiento de un hongo comúnmente relacionado con el deterioro de alimentos como es *Aspergillus niger*. Asimismo, se analizaron parámetros importantes en el desarrollo de empaques como son las propiedades mecánicas y térmicas de las películas elaboradas.

Los datos obtenidos proporcionan información sobre las características de las películas de quitosano y las diferencias debidas tanto al método de obtención del mismo como al de la elaboración de las películas. Lo anterior ayudo a definir las técnicas más adecuadas para la obtención de un material a base de quitosano, apto para emplearse como empaque de alimentos y que conserve a demás su característica antimicrobiana inherente.

ANTECEDENTES

Generalidades de Quitina y Quitosano

La quitina es el principal componente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, también se encuentra en las paredes celulares de ciertos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, y en algas como las diatomeas (Coma y col., 2003; Pastor e Higuera, 2004). Es un polisacárido natural, de tonalidad blanca-amarillenta, rígido y no elástico (Dutta y col., 2002), estructuralmente parecido a la celulosa, siendo el segundo polímero más abundante y más ampliamente distribuido en seres vivos después de esta. Se calcula que su tasa de regeneración en la biosfera es de casi el doble de la celulosa (Goycoolea y col., 2004). Se estima que cada año se producen en la naturaleza alrededor de 100 billones de toneladas de quitina presente en crustáceos, insectos, moluscos y hongos, lo cual convierte a la quitina en la fuente de biomasa disponible en el planeta menos explotada (Tharanathan y Kittur, 2003).

El quitosano es uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales. Se deriva de la quitina mediante la desacetilación de la misma en condiciones muy alcalinas y a altas temperaturas (Hosokawa y col., 1990; Pastor e Higuera, 2004; Rabea y col., 2003). Es un polímero biodegradable, no tóxico, biocompatible, semipermeable, con propiedades filmogénicas y antimicrobianas, lo que lo convierte en un material versátil y con un gran potencial como empaque de alimentos (Khan y col., 2000). Además presenta la habilidad de ligar lípidos y metales como cobre, zinc, plomo, vanadio y hierro, y puede extender la vida de anaquel de productos alimenticios frescos y con alta actividad de agua como frutas, verduras y carnes (Jeon y col., 2002).

Estructura Química.

Tanto la quitina como el quitosano están formados por cadenas lineales de monómeros de glucopiranosas unidas por enlaces β -(1-4). La diferencia entre la estructura química del quitosano, poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas], y la de la quitina, poli[β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosas], radica en el carbono número 2, en donde la quitina posee un grupo acetoamida, mientras que en el quitosano ese grupo es desacetilado resultando en un grupo amino (Pastor e Higuera, 2004).

La estructura de ambos biopolímeros es muy parecida a la celulosa (Figura 1), lo que hace que tengan propiedades similares a esta. La configuración β -1,4 del enlace provoca la estructura rígida y sin ramificaciones de estas moléculas.

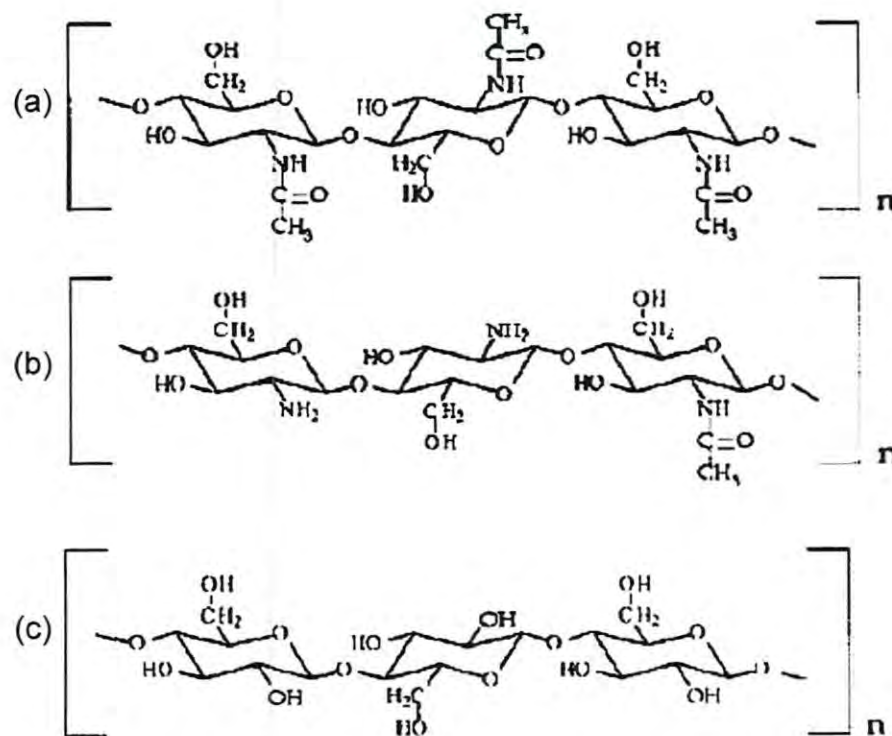


Figura 1. Estructura de la (a) quitina, (b) quitosano, y (c) celulosa. Fuente: Knaul y col., 1998.

La abundancia de los grupos hidroxilo y amino altamente reactivo en el quitosano, o del grupo acetoamida en la quitina, y su tendencia a formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, resultan en la formación de agregados lineales con un amplio grado de cristalinidad. Esto contribuye a la fuerza mostrada por las estructuras quitinosas y a que sean prácticamente insolubles en agua. La estructura química de estos compuestos influye también en el peso molecular llegando a alcanzar los 10^6 Daltons (Prashanth y Tharanathan, 2007).

Fuentes de Quitina y Quitosano

El quitosano existe de forma natural en algunos hongos pero en menor proporción que la quitina, por lo que es necesario someterla a un proceso de desacetilación para obtener el quitosano (Pastor e Higuera, 2004). A pesar de la amplia distribución de la quitina en la naturaleza (Tabla 1), la principal fuente comercial la constituyen los desechos de camarón y cangrejo provenientes mayormente de las industrias de enlatado de estos alimentos (Rinaudo, 2006; Kumar, 2000).

Obtención de Quitina y Quitosano

El quitosano es obtenido comercialmente de los desechos quitinosos, es decir del cefalotórax de crustáceos, principalmente de camarón, cangrejo y langostino. También se ha demostrado que es posible extraerlo de jaiba y de la pluma del calamar, así como de ciertos hongos e insectos (Young y col., 1998; Beaney y col., 2005; Chandumpai y col., 2004; Ai y col., 2008). El proceso de obtención de quitosano comprende dos etapas principales, la primera es la extracción de la quitina de los desechos de crustáceos y la segunda la conversión de ésta en quitosano.

Tabla 1. Contenido de quitina en diferentes organismos.

Fuente	Contenido quitina (%)	Referencia
<u>Crustáceos</u>		
Cangrejo (Cancer)	72.1 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003.
Cangrejo (Carcinus)	64.2 ^b	Tharanathan y Kittur, 2003.
Cangrejo rey (Paralithodes)	35.0 ^b	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo azul (Callinectes)	14.0 ^a	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo (<i>Sylla cerrrata</i>)	23.0 ^b	Oudor-Odote y col., 2005
Camarón (Crangon)	69.1 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Camarón de Alaska	28.0 ^d	Tharanathan y Kittur, 2003
Camarón (<i>Penaeus</i> spp)	13.1-23.2 ^b	Cira y col., 2002
Langosta (Nephrops)	69.8 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta (Homarus)	60-75 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta (<i>Panilirus ornatus</i>)	15.71 ^b	Oudor-Odote y col., 2005
Gamba	67.9-97.0 ^c	Beaney y col., 2005
Gamba (<i>Penaeus monodon</i>)	22.18 ^b	Chandumpai y col., 2004
Gamba (<i>Penaeus indicus</i>)	28.0 ^b	Oudor-Odote y col., 2005
<u>Moluscos</u>		
Concha deproteinizada de Krill	40.2	Tharanathan y Kittur, 2003
Concha de ostra (<i>Ostrea edulis</i>)	3.6	Tharanathan y Kittur, 2003
Concha de almeja	6.1	Tharanathan y Kittur, 2003
Pluma de calamar	41.0	Tharanathan y Kittur, 2003
Pluma de calamar (<i>L. lessoniana</i>)	36.06 ^b	Chandumpai y col., 2004
Pluma de calamar (<i>L. formosana</i>)	36.55 ^b	Chandumpai y col., 2004

a. Peso cuerpo húmedo; b. peso cuerpo seco; c. peso cutícula orgánica; d. peso total cutícula húmeda; e. peso seco de pared celular; f. peso micelio seco.

Tabla 1. (Continuación) Contenido de quitina en diferentes organismos.

Fuente	Contenido quitina (%)	Referencia
<u>Hongos</u>		
<i>Aspergillus niger</i>	42.0 ^e	Tharanathan y Kittur, 2003
	24.01 ^f	Wu y col., 2005
<i>Penicillium notatum</i>	18.5 ^e	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>P. chrysogenum</i>	20.1 ^e	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Agaricus bisporus</i> (champiñón blanco común)	27 ^b	Wu y col., 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.9 ^e	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Mucor rouxii</i>	44.5	Tharanathan y Kittur, 2003
	13.25 ^f	Wu y col., 2005
<i>Lactarius vellereus</i> (champiñón)	19.0	Tharanathan y Kittur, 2003
<u>Insectos</u>		
Cucaracha (<i>Periplaneta americana</i>)	2.0 ^d	Tharanathan y Kittur, 2003
Cucaracha (<i>Blatella</i> sp.)	18.4 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Escarabajo (Coleoptera)	27-35 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Mosca (Diptera)	54.8 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Mariposa sulfurada común (<i>Colias philodice</i>)	64.0 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Mosca azul larva (<i>Calliphora erythrocephala</i>)	12.0 ^b	Oudor-Odote y col., 2005
Gusano de cera (<i>Galleria melonella</i>)	33.7 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003

a. Peso cuerpo húmedo; b. peso cuerpo seco; c. peso cutícula orgánica; d. peso total cutícula húmeda; e. peso seco de pared celular; f. peso micelio seco.

La primera etapa suele realizarse mediante un proceso químico que emplea soluciones de HCl y NaOH (Goycoolea y col., 2004). Sin embargo también es posible obtener quitina mediante un proceso biológico empleando bacterias ácido-lácticas que provocan la fermentación y conduce a la hidrólisis de proteínas, o bien bacterias proteolíticas con actividad quitinolítica. Los procesos biológicos para la obtención de quitina permiten minimizar la degradación química de la misma, disminuir el uso de sustancias químicas nocivas, y además generan menores cantidades de residuos contaminantes, por lo que son más seguras para el medio ambiente. (Plascencia-Jatomea, 2000; Goycoolea y col., 2004).

Métodos de Obtención de Quitina

Debido a que la quitina se encuentra covalentemente asociada a diferentes compuestos, como minerales, lípidos y proteínas, en los organismos que la contienen (Figura 2), es necesaria la aplicación de métodos drásticos para poder remover el material quitinoso. Se han desarrollado algunos métodos para la obtención de quitina y quitosano a gran escala (Tharanathan y Kittur, 2003). El más utilizado en la industria es el método químico, que involucra el uso de ácidos y álcalis a altas concentraciones y temperaturas.

Métodos Químicos.

El método usado a nivel industrial para la obtención de quitina consiste en un proceso químico de hidrólisis de la proteína y remoción del material inorgánico. En algunos casos se incluyen también pasos de decoloración, usando extracción por solventes o una oxidación química de los pigmentos remanentes. Generalmente los métodos químicos emplean grandes cantidades de agua y energía, y generan desechos corrosivos; además dificultan la recuperación de otros productos de alto valor comercial como proteínas y pigmentos (Beaney y col., 2005).

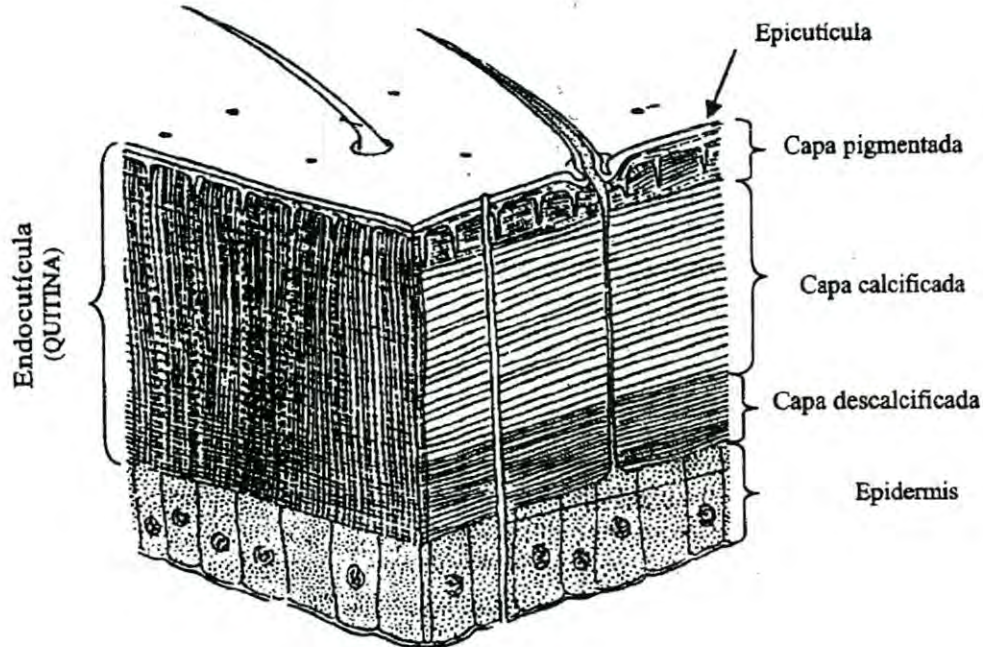


Figura 2. Distribución de la quitina en la matriz de crustáceos. Fuente: Pastor e Higuera, 2004.

El proceso de extracción de la quitina puede iniciarse ya sea con la remoción del material mineral o con la desproteínización. Si la fuente tiene una alta cantidad de material proteínico soluble que se desea recuperar, entonces se prefiere realizar la desproteínización primero, y si el material tiene un alto contenido de minerales entonces se prefiere eliminar estos antes (Goycoolea y col., 2004).

La desproteínización química en crustáceos se lleva a cabo usando generalmente soluciones de NaOH a temperaturas entre los 65 y 100° C durante 1 a 24 horas. Las condiciones óptimas dependerán del tipo de crustáceo. Sin embargo cuando el tratamiento se hace por un periodo más prolongado de tiempo y bajo condiciones más severas, se suele presentar depolimerización y desacetilación de la quitina, así como modificaciones no deseadas en las proteínas (Goycoolea y col., 2004).

La desmineralización consiste básicamente en la remoción del carbonato de calcio, y del fosfato presente en menor cantidad. Esto se realiza mediante un tratamiento

ácido con soluciones diluidas de HCl a temperatura ambiente. El tiempo de tratamiento, la concentración de las soluciones y la cantidad a usar de las mismas, puede variar dependiendo del tipo de materia prima. Empero se ha observado que a tiempos mayores de 24 horas de tratamiento, se presenta depolimerización y desacetilación (Goycoolea y col., 2004).

En el caso de los crustáceos existe también una variabilidad en el contenido de minerales dependiendo de la especie y de la estación del año, por lo que es necesario considerar la cantidad presente en la materia prima, para usar la suficiente proporción de ácido que permita la remoción del mineral sin llegar a alterar la quitina. Después de la desproteínización y desmineralización de la materia prima puede llevarse a cabo o no un proceso de decoloración en el cual se suelen usar solventes como etanol, éter, acetona, cloroformo, así como agentes blanqueadores como el peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio.

Método Biológico.

Los métodos biológicos para la obtención de quitina son una alternativa a los métodos químicos, ya que éstos emplean químicos corrosivos en alta cantidad y temperatura, así como alto gasto de agua y energía, generando considerables volúmenes de agua alcalina con alta demanda de oxígeno biológico (Rao y Stevens, 2005; Beaney y col., 2005).

Los métodos biológicos pueden emplear extractos enzimáticos, o bien, aislados de enzimas, y fermentación microbiana (Beaney y col., 2005).

Ensilados.

El ensilado consiste en un tratamiento de la biomasa por medio de la adición de ácidos orgánicos como el ácido láctico, o inorgánicos como el ácido sulfúrico, conociéndose este método como ensilado ácido; o bien por medio de la fermentación con bacterias ácido lácticas que producen el ácido *in situ* a partir de una fuente barata de azúcares lo que se denomina ensilado fermentado (Goycoolea y col., 2004). Los ácidos utilizados ayudan a conservar el material inhibiendo el crecimiento de organismos no deseados (Plascencia-Jatomea, 2000).

Este proceso es especialmente ventajoso en el tratamiento de desechos de cabeza de camarón, ya que permite la remoción de proteínas y pigmentos de alto valor comercial presentes, así como menores insumos de energía, agua y productos químicos, por lo que se considera un pre-tratamiento en las operaciones de extracción de quitina (Goycoolea y col., 2004).

Ensilado fermentado. La fermentación de los desechos de camarón usando bacterias ácido-lácticas, resulta en una fracción sólida que contiene la quitina cruda y en la producción de un líquido rico en proteínas, minerales y pigmentos naturales de camarón (Rao y Stevens, 2005). Se ha propuesto como alternativa para el tratamiento de desechos de productos marinos como los de camarón, ya que tiene la ventaja de ser menos costoso, y usar integralmente los desechos al permitir la separación de productos con alto valor comercial como pigmentos y proteínas además de la quitina (Cira y col., 2002).

La materia prima se suele mezclar con azúcares fermentables que favorecen el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas, las cuales pueden estar presentes naturalmente en el material o ser añadidas a este. Dichas bacterias producen ácidos (generalmente ácido láctico), que disuelven parte de los minerales presentes en el desecho (principalmente CaCO_3) y antibióticos que destruyen bacterias dañinas e incrementan el tiempo de almacenamiento del desecho, así como un espectro de proteasas que separan la proteína del complejo sólido quitina- CaCO_3 mediante una hidrólisis parcial (Plascencia-Jatomea, 2000; Rao y Stevens, 2005).

Ensilado ácido. Este ensilado se obtiene al añadir ácidos ya sean orgánicos o inorgánicos a la materia prima, con la finalidad de disminuir el valor del pH lo suficiente como para prevenir el deterioro del material por acción microbiana. Este proceso se realiza generalmente en forma líquida, ya que las estructuras tisulares son degradadas por los ácidos añadidos, dando un producto líquido rico en proteínas y otros compuestos solubles, y un sedimento donde se encuentra la quitina y que puede representar del 40 al 60% del total del ensilado (Plascencia-Jatomea, 2000).

La fermentación ácido-láctica puede emplearse junto con tratamientos químicos como alternativa a los tratamientos puramente químicos para la extracción de la quitina ya que reducen la cantidad de álcali y ácido necesaria para su obtención (Cira y col., 2002).

Métodos de Obtención de Quitosano

Una vez que la quitina ha sido obtenida, el siguiente paso es su conversión a quitosano para lo cual es necesario desacetilarla (Figura 3), es decir, hidrolizar los grupos acetoamida de la quitina hasta grupos amino, que es el grupo funcional característico del quitosano. La desacetilación puede lograrse empleando métodos químicos o biológicos, estos últimos mediante el uso de enzimas desacetilasas.

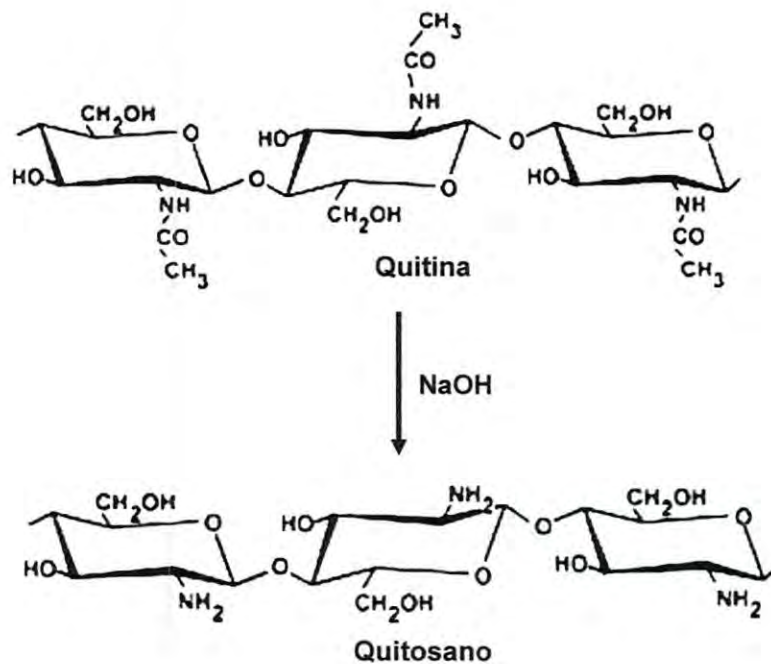


Figura 3. Desacetilación química de la quitina para la obtención de quitosano. Fuente: Shahidi y col., 1999.

Método Químico.

Este proceso suele emplear soluciones alcalinas (generalmente de NaOH o KOH) muy concentradas y tratamiento térmico a alta temperatura (60°C o más). Estas severas condiciones de reacción se deben a la baja reactividad de la quitina, ocasionada por la configuración *trans* de los grupos acetoamida respecto al grupo hidroxilo del carbono 3 del anillo piranósico del monómero; la presencia de puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amida de las cadenas adyacentes del monómero; y a la compactación de las cadenas en la estructura cristalina de la quitina que dificultan el acceso del álcali a los sitios reactivos de la molécula (Goycoolea y col., 2004).

La desacetilación completa difícilmente se alcanza y tampoco es necesaria, puesto que la solubilidad en soluciones de ácido diluido se logra con 60% de desacetilación. La desacetilación puede realizarse de dos formas: homogénea o heterogénea. La primera se lleva a cabo con un pre-tratamiento de hinchamiento y una posterior disolución completa de la quitina en frío (0° C) con NaOH, seguida de la desacetilación a temperatura cercana a la ambiente durante largo período de tiempo. Esto hace que la desacetilación se realice en toda la cadena del polímero y sea más uniforme la distribución de los grupos amino.

El proceso heterogéneo se efectúa a alta temperatura por corto período de tiempo sobre la quitina sólida en medio alcalino. La reacción suele presentarse en las regiones amorfas del polímero haciendo que la distribución de los grupos amino no resulte uniforme (Goycoolea y col., 2004). En la industria este es el proceso que se sigue comúnmente.

De esta forma, el quitosano obtenido no es una unidad química única y definida, sino un conjunto de polisacáridos que varían entre si en su composición (número y distribución de grupos amino) y tamaño molecular. Dichas variaciones se deben a las condiciones del proceso, las cuales a su vez cambiarán dependiendo de la fuente de donde se haya extraído la quitina (Goycoolea y col., 2004).

Método biológico.

Se realiza mediante el uso de enzimas. La quitindeacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de quitina a quitosano mediante la desacetilación de los residuos N-acetilglucosamina. Fue identificada y parcialmente purificada de extractos del hongo *Mucor rouxii* por Araki e Ito (1975). Desde entonces se ha reportado la presencia de esta enzima en otros hongos como *Aspergillus nidulans*, *Absidia coerulea* y *Colletotrichum lindemuthianum* (Goycoolea y col., 2004; Tsigos y col., 2000). La enzima es una glicoproteína que se secreta tanto en la región periplásmica como en el medio de cultivo. Además, exhibe una notable estabilidad térmica, siendo su temperatura óptima de 50°C con una alta especificidad por los enlaces β -(1,4) y polímeros de N-acetil-glucosamina solubles en agua. Sin embargo varía considerablemente en el peso molecular y tiene un amplio rango de pH (Tsigos y col., 2000).

La efectividad de la enzima disminuye radicalmente (de 9.5 a 0.5% de efectividad) cuando se usa como sustrato quitina amorfa. Pero si se utiliza quitosano parcialmente desacetilado soluble en agua, la efectividad llega hasta 97%, lo que indica que es necesario un pretratamiento de la quitina cristalina, que favorezca la accesibilidad de la enzima a los grupos acetamida de la molécula (Tsigos y col., 2000; Goycoolea y col., 2004).

Aunque aún no se ha optimizado el proceso enzimático, tiene la ventaja de producir quitosano con mayor uniformidad en cuanto a su grado de desacetilación y polimerización, a diferencia del proceso químico, en donde estos fenómenos ocurren al azar (Kafetzopoulos y col., 1993; Tsigos y col., 2000).

Propiedades Fisicoquímicas del Quitosano

La presencia de grupos amino en la estructura de la molécula de quitosano, convierte a este polímero en un polieléctrolito catiónico natural con un pKa de alrededor de 6.5, lo que le confiere propiedades muy particulares. Además, la presencia de los grupos amino e hidroxilo, permite su modificación química fácilmente (Krajewska, 2001).

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano afectan su funcionalidad y, además, varían dependiendo de la fuente y método de obtención de la quitina, del método y las condiciones de desacetilación de la misma, así como de los métodos y condiciones de determinación de las características fisicoquímicas, entre otros factores (Cho y col., 1998).

Las principales propiedades fisicoquímicas del quitosano son la solubilidad, viscosidad, peso molecular y grado de desacetilación, todas ellas estrechamente relacionadas (No y col., 2002).

Peso Molecular.

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

Existen diferentes métodos para la determinación del peso molecular tanto en quitina como en quitosano, como son la viscosimetría, la dispersión de la luz y la cromatografía de permeabilidad en gel.

La determinación precisa del peso molecular de los polisacáridos es difícil, debido al amplio rango de distribución del peso molecular, la desviación termodinámica de las condiciones ideales, la diversidad estructural y las fuertes interacciones intermoleculares presentes en el polímero (Tsaih y Chen, 1999).

El método más usado comúnmente es la determinación indirecta mediante viscosimetría por ser un método sencillo y rápido, además de no requerir

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

El peso molecular afecta la actividad que presente el quitosano como espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color, grasa y agua, vehículo de liberación, entre otras aplicaciones (Argüelles y col., 2004; No y col., 2000).

Grado de Desacetilación.

El grado de desacetilación, el cual consiste en el porcentaje de grupos amino libres en el quitosano, es la característica que permite la solubilidad de la molécula, su bioactividad así como en el desempeño de muchas de las aplicaciones del polímero. De hecho, el quitosano se define como la quitina que ha sido desacetilada en un 60-75% o más, punto en el cual se vuelve soluble en ácidos orgánicos (Argüelles y col., 2004; Khan y col., 2002). La versatilidad del quitosano depende mayormente de la alta reactividad química de los grupos amino en la molécula. Dado que el grado de desacetilación depende mayormente del método de purificación y las condiciones de reacción, es esencial caracterizar al quitosano determinando su grado de desacetilación antes de su utilización.

Existen varios métodos para la determinación del grado de desacetilación del quitosano entre ellos la titulación potenciométrica, la prueba de ninhidrina, espectroscopia de infrarrojo cercano, cromatografía líquida de alta resolución, resonancia magnética nuclear, espectroscopia de UV primera derivada,

espectroscopia de infrarrojo y la difracción de rayos X de polvo (Khan y col., 2002; Wu y Zivanovic, 2008; Zhang y col., 2005). Sin embargo el valor del grado de desacetilación puede verse afectado por la técnica de determinación empleada, además de que existen tratamientos como el de la ninhidrina, que destruyen la muestra o bien, que requieren estandarización y equipos costosos.

Uno de los métodos más usados para determinar el grado de desacetilación es la espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR), debido que tiene numerosas ventajas como ser un método relativamente rápido, flexible al permitir el uso de diferentes proporciones de absorción para diferentes valores de acetilación, y que no requiere la disolución de la muestra en un solvente acuoso (Khan y col., 2002; Kasaai, 2008). Se han propuesto diferentes mejoras al método de espectroscopia de infrarrojo para la determinación del grado de desacetilación del quitosano, entre ellas el uso de líneas base y/o nuevas bandas de absorción. Una de estas propuestas consiste en la utilización líneas base empleando una combinación de bandas de absorción: la de amida I (1655 cm^{-1}) y la del grupo hidroxilo (3450 cm^{-1}). Sin embargo, la precisión de los resultados obtenidos de esta forma puede variar dependiendo de la preparación de la muestra, de las condiciones experimentales y del instrumento (Lavertu y col., 2003).

Viscosidad.

El quitosano forma soluciones viscosas en varios ácidos orgánicos. La viscosidad de la solución obtenida depende del peso molecular, grado de desacetilación, concentración, temperatura, pH, la fuerza iónica y el solvente ácido utilizado. La determinación de la viscosidad permite una aproximación al peso molecular del quitosano puesto que la viscosidad puede relacionarse con el peso molecular (Park y col., 2002; Argüelles y col., 2004, Rabea y col., 2003).

El método de viscosimetría permite obtener el valor de la viscosidad intrínseca del quitosano, así como el peso molecular promedio del mismo mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, que relaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular. La viscosimetría no es un método absoluto para determinar el peso

molecular por lo que se suelen utilizar constantes, sin embargo es un método sencillo (Argüelles y col., 2004).

La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, por lo tanto su determinación se realiza extrapolando a una concentración de cero. La magnitud de la viscosidad intrínseca depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el disolvente y de las condiciones de análisis, principalmente de la temperatura (Parada y col., 2004). En el caso del quitosano, la viscosidad intrínseca es mayor a la que presentan otros polímeros de peso molecular similar, lo que se atribuye a la rigidez de los enlaces β -(1,4) en la molécula (Hwang y Shin, 2000).

Solubilidad.

El quitosano es insoluble en agua pura y en solventes orgánicos, pero es soluble en soluciones acuosas diluidas de ácidos orgánicos y minerales a condiciones específicas (Park y col., 2002). Esta disolución, a diferencia de la quitina, es posible por la protonación de los grupos amino libres a lo largo de la cadena del polímero, generando así la correspondiente sal de quitosano en solución (Argüelles y col., 2004). Por lo tanto las cargas positivas presentes a lo largo de la molécula, determinan en gran medida el comportamiento del quitosano en solución. Sin embargo no es únicamente el grado de desacetilación lo que influye en la solubilidad, sino la distribución de los grupos amino en conjunto con el peso molecular (Rinaudo, 2006).

Dado que la desacetilación de la quitina da como resultado una estructura irregular debido a la semicristalinidad de la misma, la distribución de los grupos amino a lo largo de la cadena del polímero es también azarosa.

El grado de solubilidad del quitosano no solo varía en función del grado de desacetilación, y del peso molecular, sino también de otros factores como son del tipo de solvente, la temperatura, el pH, el pK y la fuerza iónica del ácido donde se disuelva así como de la concentración iónica (Argüelles y col., 2004; Rinaudo, 2006). El carácter polielectrolítico del quitosano influye en sus propiedades hidrodinámicas,

ácido-base, conductimétricas y reológicas, así como en la difusión y ósmosis, entre otras.

Aplicaciones del Quitosano

Debido a las peculiares propiedades fisicoquímicas del quitosano, que a su vez influyen en sus características funcionales y biológicas como su acción antimicrobiana, este polímero tiene múltiples aplicaciones en muy diversos campos. Además es posible usarlo en diferentes formas como polvos, soluciones, geles, películas o membranas (Pastor e Higuera, 2004).

En la Tabla 2 se resumen varias de las aplicaciones del quitosano en industrias tan diversas como la cosmética, la farmacéutica y la alimenticia entre otras.

El quitosano ha encontrado una importante aplicación en el tratamiento de aguas residuales al remover los sólidos suspendidos, ya sea desechos del procesamiento de vegetales o iones metálicos provenientes de industrias químicas como el plomo, cadmio, mercurio y cobre. Los mecanismos propuestos para la capacidad quelante del quitosano son la floculación y la coagulación, que ocurren debido a las cargas positivas presentes en el polímero que pueden combinarse con las cargas negativas de dichos compuestos. La eficiencia del proceso, por lo tanto, dependerá mayormente del pH en el que se encuentre el quitosano, aunque también pueden intervenir factores como la cantidad y calidad del mismo, así como la concentración y tamaño de la partícula a separar (Pastor e Higuera, 2004).

Tabla 2. Aplicaciones del quitosano.

Industria	Aplicación
Cosmética	Tratamiento del acné Mantenimiento de humedad de la piel Reducir la estática del pelo Cuidado dental Disminuir líneas de expresión Lentes de contacto
Papelera y textil	Resistencia al quebrado de papel Mejora el brillo del papel Resistencia al deterioro microbiano o enzimático Mejora biodegradabilidad materiales plásticos Mayor impermeabilidad del papel Menos absorción de grasa Mejora propiedades antiestáticas en papel fotográfico Mejorar viscosidad de colorantes y tintas en telas Mayor estabilidad y resistencia color en telas
Biomedicina	Actividad inmunológica y antitumoral Homeostático y anticoagulante Curación (vendas) Bacteriostático/fungistático Anticolesterolémico Sedante de sistema nervioso central Ayuda a regenerar tejido conjuntivo Acelera formación de osteoblastos
Tratamiento de aguas	Floculación para clarificar agua Remoción de iones metálicos y residuos orgánicos Reducción de olores
Agricultura	Activador de mecanismos de defensa en plantas Estimulación de crecimiento en plantas Liberación de agroquímicos y nutrientes en suelo Cubierto de semillas contra congelamiento Mejora germinación de semillas Protege de daño microbiano
Separaciones cromatográficas	Separación de enzimas Cromatografía de gases y columna

Fuente: Shahidi y col., 1999; Agulló y col., 2003; Agulló y col., 2004; Pastor e Higuera, 2004; Peniche y col., 2004.

Otro de los campos con mayor interés en el uso de quitosano es la biomedicina, en la formulación de vendajes, materiales de curación, microencapsulación de fármacos, y en la formación de tejidos como cartílago, huesos, piel, tendones y ligamentos (Pastor e Higuera, 2004). Algunas de las características que hacen al quitosano atractivo para este campo de aplicación son sus propiedades mecánicas, su facilidad de manipulación, su biodegradabilidad y su biocompatibilidad. Lo anterior debido a que es un compuesto heteropolisacárido lineal y aniónico, químicamente similar a los compuestos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos, por lo que también tiene ciertas actividades biológicas similares. Además posee un carácter básico y una carga positiva a pH ácido, por lo que puede interactuar con las superficies celulares y las proteínas plasmáticas (Peniche y col., 2004).

Una de las industrias con mayores posibilidades de aplicación del quitosano es la alimenticia, donde se puede utilizar para diversos objetivos (Tabla 3):

- Como agente gelificante, ya que gelifica a pH mayor al de su pK, incrementando la viscosidad de los alimentos.
- Como fibra dietaria, ya que retiene grasas y agua hasta 20 veces su peso.
- Como agente antioxidante debido a su capacidad de quelar metales que son catalizadores de las reacciones de oxidación de las grasas.
- Como emulsificante, y agente estabilizador de emulsiones ya que puede actuar como emulsificante primario debido a su naturaleza polielectrolítica amfifilica.
- Como emulsificante secundario al incrementar la viscosidad de la fase continua.
- Como agente estabilizador de color debido a su afinidad por varios colorantes.
- Como agente conservador debido a su acción antimicrobiana sobre bacterias y hongos contaminantes de alimentos, ya sea inhibiéndolos o retardando su crecimiento (Shahidi y col., 1999; Agulló y col., 2003).

El quitosano posee también la capacidad de formar cubiertas o películas cuando se deja evaporar la solución del polímero sobre una superficie. Esto ha permitido su

utilización como cubiertas protectoras para alimentos y una posible aplicación como empaque comestible y biodegradable. Además, su actividad antimicrobiana posibilita la conservación de los alimentos empacados o tratados con el biopolímero (Agulló y col., 2003).

Tabla 3. Aplicaciones del quitosano en la industria de alimentos.

Aplicación	Efecto
Aditivo	Clarificación y desacidificación de bebidas de frutas Prologar sabor Control de textura Agente emulsificante Agente espesante y estabilizante Estabilizador de color Antioxidante Gelificante
Calidad nutricional	Fibra dietaria Efecto hipocolesterolémico Reducir absorción de grasa Agente antigrastritis Formulaciones para alimento bebés
Agente conservador	Antibacterial Antifúngico/fungistático
Películas y cubiertas comestibles	Reducción en producción de etileno y dióxido de carbono Control de transferencia de humedad Control de oxidación enzimática en frutas Barrera protectora contra el medio Liberación controlada de antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes y otros Protección antimicrobiana Aumento de la vida de anaquel

Fuente: Shahidi y col., 1999; Agulló y col., 2004; Rinaudo, 2006.

Los materiales que se han empleado para empaque de alimentos, como las películas de polietileno, tienen la desventaja de aumentar la condensación de agua que

favorece el crecimiento de hongos, ser fermentables debido a la reducción del oxígeno, no ser biodegradables y no controlar el desarrollo microbiano (Shahidi y col., 1999).

El uso de películas de quitosano puede extender la vida de anaquel de aquellos productos en los que se empleen debido a su acción antimicrobiana, a la reducción de la producción de etileno y dióxido de carbono relacionados con el deterioro de los vegetales, y a la permeabilidad al agua que impide su acumulación y el aumento del crecimiento de hongos (Shahidi y col., 1999).

Los estudios en ese sentido se han concentrado en su aplicación a frutas y vegetales, y solo algunos se han realizado sobre productos de origen animal como pescado, huevo y carne (Jeon y col., 2002; Bhale y col., 2003).

Los usos de películas de únicamente quitosano y/o de quitosano no modificado químicamente, son limitados debido a su alta permeabilidad al agua y a su fragilidad. Sin embargo las películas de quitosano pueden ser modificadas empleando diferentes compuestos con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y permeables de las mismas (Park y col., 2002). Es por ello que la tendencia en la investigación sobre las películas de este polímero es el uso de composites de quitosano, en donde se pueden emplear diferentes compuestos ya sean naturales o sintéticos, para mejorar las características de las películas tanto mecánicas y morfológicas, como antimicrobianas y de conservación de alimentos.

Biopelículas de Quitosano

Las soluciones viscosas de quitosano pueden emplearse para la elaboración de películas al dejar evaporar el solvente (Park y col., 2002). De esta forma se pueden obtener películas individuales o bien recubrimientos sobre los productos en los que se deje evaporar las soluciones.

Las películas de quitosano son biodegradables, biocompatibles, delgadas, flexibles, duraderas, fuertes, resistentes y difíciles de romper, tienen valores moderados de

permeabilidad al agua y son buena barrera para la permeabilidad del oxígeno, disminuyen la velocidad de respiración de los alimentos en donde se prueban, retrasan el proceso de maduración de los vegetales debido a la reducción de etileno y dióxido de carbono, y además inhiben el desarrollo de microorganismos (Agulló y col., 2003). Pueden ayudar a conservar y controlar las características morfológicas, fisiológicas y fisicoquímicas de los alimentos en los cuales se utilizan (Shahidi y col., 1999).

La mayoría de las propiedades mecánicas de las películas de quitosano son comparables con las de varios polímeros comerciales de mediana fuerza, como los celulósicos (Jeon y col., 2002). Las propiedades mecánicas y permeables de las películas de quitosano pueden ser controladas eligiendo el peso molecular y el sistema de solvente más adecuados, aún y cuando no se hayan utilizado compuestos plastificantes para su elaboración (Park y col., 2002).

Dado que el quitosano es inocuo, sus biopelículas pueden ser comestibles o no, dependiendo del tipo de compuestos con el que se mezcle para obtenerlas. Por las anteriores razones, dichas películas han sido probadas sobre una gran variedad de alimentos como frutas frescas cortadas y enteras, carne, huevo, y productos lácteos (Tabla 4).

Otra de las características importantes de las películas de quitosano es su biodegradabilidad, la cual ha sido probada en industrias como la del papel en la elaboración de películas de celulosa y quitosano (Hosokawa y col., 1990), en la farmacéutica para la elaboración de medicamentos encapsulados con una película o membrana de quitosano y para la elaboración de vendajes que tienen una buena adhesividad a una gran variedad de células de mamíferos, entre otras aplicaciones. Además, estas películas son susceptibles a degradarse en el organismo por acción de la enzima lisozima,

En la cavidad oral, las películas de quitosano nativo son degradadas por enzimas como lisozimas y amilasas, y mucho más rápidamente que las películas elaboradas con quitosano entrecruzado (Etienne y col., 2005). Además, dicha degradación depende del grado de desacetilación del quitosano, ya que un quitosano totalmente desacetilado no es sensible a la acción de la enzima (Peniche y col., 2004).

También se ha visto que las películas biodegradables elaboradas de quitosano y otros compuestos como el almidón, poseen una matriz homogénea, una estructura estable con buenas propiedades mecánicas y permeables (García y col., 2006).

Tabla 4. Películas y cubiertas de quitosano aplicadas a diversos alimentos y su efecto sobre los mismos.

Tipo de película	Alimento o producto	Efecto	Referencia
Cubierta	Fresa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Menor tasa de respiración y síntesis de antocianinas y etileno. ▪ Inhibición de germinación de esporas, elongación de tubulo germinal y crecimiento radial de <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i>. ▪ Cambios morfológicos en los hongos. 	El Ghaouth y col., 1991 y 1992a; Zivanovic y col., 2003; Vargas y col., 2006
	Tomate, pepino y pimiento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Menor tasa de respiración, producción de etileno y pérdida de peso. ▪ Preservación de firmeza, acidez y color. ▪ Inhibición de crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i> por pérdida de aminoácidos y proteínas y de <i>A. niger</i> en tomate. 	El Ghaouth y col., 1992b; Martínez-Camacho, 2006.
	Zanahoria	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reducción de crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y tamaño de las lesiones. 	Cheah y col., 1997
	Semilla de trigo dorado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumenta germinación de semilla en un 5% y resistencia a <i>F. graminearum</i>. ▪ Reduce en 50% la infección por <i>F. graminearum</i> 	Reddy y col., 1999
	Durazno entero	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduce incidencia de <i>Monilinia fructicola</i>. ▪ Frutos firmes, mayor acidez titulable y contenido de vitamina C. 	Li y Yu, 2001.
	Uva de mesa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disminuye infección por <i>B. cinerea</i> a temperatura ambiente y de refrigeración. ▪ Disminución de síntesis de etileno. 	Romanazzi y col., 2002; Zivanovic y col., 2003
	Papaya pelada y cortada	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disminuye desarrollo de bacterias mesófilas, hongos y levaduras por al menos 14 días de almacenamiento. ▪ Prolonga firmeza y color por más tiempo. 	González-Aguilar y col., 2005
	Mandarina entera	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduce producción de etileno, la blandura y la absorción de agua. 	Fornes y col., 2005.
	Pitaya roja y mango pelado y rebanado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Extiende vida de anaquel. ▪ Retarda pérdida de agua y calidad sensorial ▪ Inhibe crecimiento de microorganismos ▪ Aumenta contenido sólidos solubles, acidez titulable y ácido ascórbico. 	Chien y col., 2007a; Chien y col., 2007b.

Tabla 4. (Continuación). Películas y cubiertas de quitosano aplicadas a diversos alimentos y su efecto sobre los mismos.

Formulación	Alimento o producto	Efecto	Referencia
Cubiertas y películas por evaporación de solventes.	Carne de res para hamburguesa precocida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Películas reducen la pérdida de agua pero no controlaron la oxidación lipídica. 	Wu y col., 2000.
Películas de quitosano por evaporación	Sobre superficie de boloña, jamón y pastrami	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Películas retrasan o inhiben completamente crecimiento de Enterobacterias y <i>S. liquefaciens</i>. 	Ouattara y col., 2000.
	Filetes de bacalao, arenque y salmón.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduce pérdida de agua por descongelación y la oxidación lipídica. ▪ Mantiene cuenta total de microorganismos en límites aceptables por más tiempo. 	Jeon y col., 2002; Sathivel, 2005.
Cubiertas	Queso	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibición al 100% de crecimiento de <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> y de 77% de <i>P. aeruginosa</i>. Posible interacción con RNA. 	Coma y col., 2003.
	Huevo entero	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Previene pérdida en peso. ▪ Preserva y prolonga calidad del huevo en almacenamiento. 	Bhale y col., 2003; Kim y col., 2006.
	Carne de carnero y tocino entreverado cocidos.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protege de crecimiento de bacterias y hongos hasta por 28 días de almacenamiento a temperatura ambiente. ▪ Disminuye oxidación lipídica. 	Rao y Stevens, 2005.

a calidad de las películas elaboradas con quitosano puede verse afectadas por diferencia en las fuentes de quitina usada para obtener quitosano, las propiedades del mismo, los solventes utilizados, los métodos de preparación de las películas, y los tipos y cantidades de copolímeros y plastificantes utilizados (Fernández-Cervera y col., 2004).

Métodos de Elaboración.

Las películas de quitosano pueden prepararse por simple evaporación de los solventes usados para su disolución, o bien, mediante la extrusión del polímero con otros materiales como polímeros termoplásticos con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas.

Por evaporación de solventes ("Casting").

El método más antiguo y más recurrido para la obtención de películas de quitosano es la evaporación de solventes mejor conocido como "Casting", que fue patentado en 1936. Éste consiste en la disolución de quitosano en una solución acuosa diluida de ácido orgánico, la cual posteriormente se vierte sobre una superficie lisa. En un principio se trataba de una superficie de vidrio limpia y seca, ahora se pueden usar superficies de materiales plásticos inertes para que no reaccionen con el polímero u otros compuestos presentes en la solución. Una vez vaciadas, las soluciones se dejan evaporar hasta que se forma una película (Rigby, 1936). Desde entonces este ha sido el método más utilizado método para la formación de películas de quitosano. Durante el secado de las soluciones de quitosano, la concentración del polímero disuelto aumenta, por lo que las moléculas deben alinearse y compactarse, resultando en la formación de un gel seguido por la formación de la película en sí. Al mismo tiempo que se está formando la película, la fuerza iónica aumenta provocando una mayor asociación entre el polieléctrolito y el contraion del solvente, por lo que la naturaleza del solvente utilizado puede influir en las interacciones intra e intermoleculares que se presenten al momento de formar la película (Bégin y Van Calsteren, 1999).

Las cubiertas de quitosano pueden prepararse básicamente bajo el mismo principio de las películas por evaporación, sin embargo, las cubiertas se logran cuando los productos son sumergidos en una solución de polímero diluida y luego se dejan secar haciendo que el polímero quede sobre la superficie del producto. Las soluciones empleadas para cubiertas suelen ser más diluidas (0.1%, 0.5% a 1%) que las empleadas para la preparación de películas por evaporación (de 1%, 1.5%, 2%).

El método de evaporación de solventes es sencillo y práctico sin embargo es difícil controlar el grosor y la homogeneidad de las películas obtenidas.

Por extrusión.

Extrudir significa forzar o empujar un material a través de una pequeña abertura.

Son diversos los materiales que se pueden someter a un proceso de extrusión desde metales y cerámicas hasta alimentos, pasando por los materiales poliméricos o plásticos (Rauwendaal, 2002).

La extrusión es uno de los tratamientos más importantes en polímeros. Las películas comestibles o biodegradables que son extrudidas aumentan su valor comercial y presentan más ventajas que las elaboradas por evaporación. En el caso de los plásticos son varios los productos que se pueden elaborar mediante extrusión como son tuberías, mangueras, fibras y películas. Este proceso también se utiliza para mezclar y formular compuestos de plástico y producir materia prima como los gránulos de concentrado de algún compuesto (Ramos, 1993).

En una patente por Rigby (1936), se probó un método por extrusión para elaborar filamentos de quitosano. Dicho proceso consistió en hacer pasar una solución de quitosano a través de un pequeño orificio en un baño coagulante, compuesto de acetato e hidróxido de sodio y detergentes en agua, y el cual fue calentado a 70°C para obtener los filamentos que luego fueron secados. Este método, sin embargo, no es el mismo que se utiliza actualmente, que emplea equipos especializados conocidos como extrusores, en los cuales el material es introducido constantemente a la tolva, mezclado mediante un tornillo y empujado a presión hacia un pequeño orificio de salida conocido como "dado", que es donde se le da la forma que se desea al material extrudido.

El proceso de extrusión puede involucrar varias operaciones como calentamiento, enfriamiento, alimentación del material a extrudir, compresión, reacción, mezclado, fusión, homogenización, amorfizado (conversión de las regiones cristalinas del material en regiones amorfas), cocinado y moldeado (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008).

Las secciones del extrusor (Figura 4) se pueden dividir en tres principales:

- 1) Zona de alimentación, donde el material de baja densidad y en forma de gránulos o "pellets" es introducido en el cañón o tubo del extrusor, donde lentamente se comprime liberando aire.
- 2) Zona de amasado con una posterior compresión y en donde existe un mayor grado de llenado, aumenta la presión y la temperatura así como la densidad del material.
- 3) Zona de calentamiento, donde se dan las mayores velocidades de cizalla, mayores temperaturas y presiones, y se logra la textura final, color, densidad y propiedades funcionales del producto.

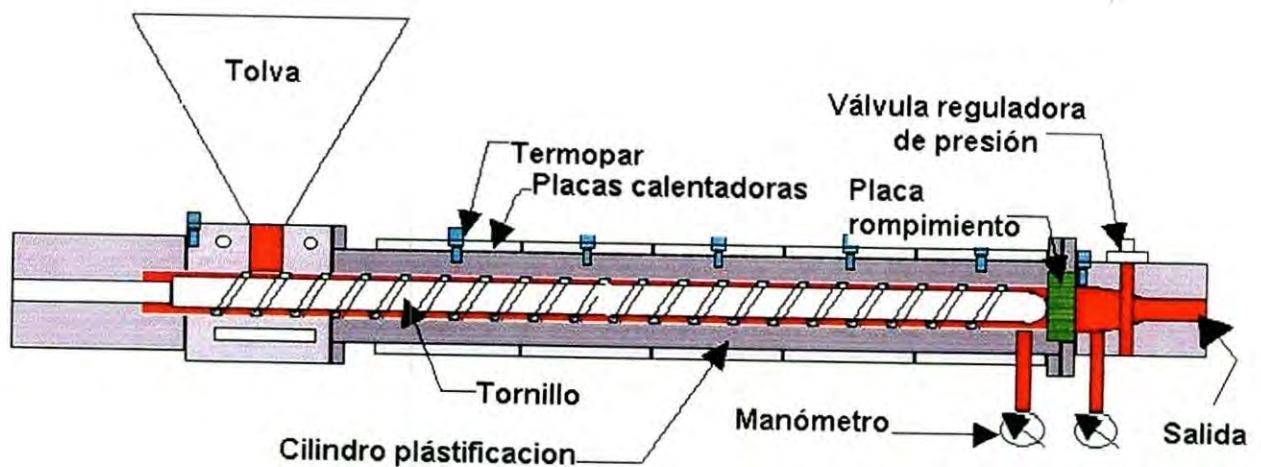


Figura 4. Extrusor de un tornillo y partes más importantes. Fuente: Bolur, 1998.

Existen varias variables que pueden intervenir en el proceso de extrusión como son la velocidad del tornillo, la localización y dimensión de los elementos del transportador/amasador, la proporción de diámetro/longitud del tornillo, la temperatura del proceso, el contenido de humedad del material, la velocidad de alimentación y el tamaño y forma del orificio de salida, entre otros. Todas estas variables pueden afectar las características deseables en el producto final como contenido de humedad, las propiedades mecánicas y de barrera, el color, el grosor,

entre otras, por lo que deben controlarse las condiciones de extrusión (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008).

Los materiales utilizados en el proceso de extrusión son por lo general termoplásticos, porque estos se suavizan cuando se calientan y se transforman en fluidos, que posteriormente se endurecen cuando se enfrían volviéndose sólidos. Es por ello que los equipos para extrudir calientan la muestra hasta fundirla por medio de fricción o de calentadores eléctricos colocados alrededor y a lo largo del barril del extrusor (Ramos, 1993).

Existen pocos estudios en donde se hayan elaborado películas de quitosano mediante un proceso de extrusión, sin embargo se ha demostrado que es posible obtener películas con buenas propiedades tanto mecánicas como de biodegradabilidad y microbiológicas mediante este proceso (Ratajska y Boryniec, 1999; Plascencia-Jatomea, 2004).

Propiedades Biológicas del Quitosano y sus Películas

Debido a su composición y estructura química, entre otros factores, el quitosano es un polímero biocompatible y con diversas propiedades biológicas actualmente en estudio. Entre estas podemos mencionar su actividad antiviral, anticarcinogénica, repelente de insectos, formadora de tejidos, y su actividad antimicrobiana.

Actividad Antiviral.

Se ha observado que el quitosano induce la respuesta contra enfermedades virales en plantas, inhibe infecciones virales en células animales y previene la multiplicación de bacteriófagos en cultivos de microorganismos infectados. Esta actividad depende del grado de polimerización, del grado de desacetilación, del valor de la carga positiva, y de las características químicas de las moléculas.

Los principales factores que hacen que el quitosano impida las infecciones por fagos son la desactivación y la inhibición particular de la producción de bacteriófagos a

nivel celular. Se ha sugerido que la actividad antiviral se puede dar por varios mecanismos; uno es la disminución de la viabilidad de las células bacterianas, ya que los fagos necesitan de células viables para su propagación. Otro mecanismo consiste en la neutralización del grado de infección de los fagos maduros y el bloqueo de la replicación de los fagos virulentos (Chirkov, 2002).

El quitosano puede ser usado para la inducción de fago-resistencia en cultivos industriales de microorganismos y prevenir así la fago-lisis indeseable, causada por contaminación del inóculo por bacteriófagos virulentos (Rabea y col., 2003).

Se ha demostrado que también puede inhibir la infección viral en diferentes tipos de plantas, independientemente del tipo de virus que provoque la infección (Chirkov, 2002). En el caso de la actividad antiviral en plantas, el quitosano mostró dependencia de la concentración empleada, siendo mayor el efecto a mayor concentración del biopolímero. El peso molecular es también otro de los factores que influyen en la propiedad antiviral, siendo ésta mayor a más alto peso molecular (Chirkov, 2002).

Actividad Repelente e Insecticida.

Otra de las propiedades importantes del quitosano es su capacidad de repeler insectos. Aunque la principal aplicación del quitosano en la agricultura consiste en mejorar los rendimientos agronómicos, ya sea por mejorando la germinación de las semillas recubiertas con el polímero o bien, mediante la protección de las semillas del ataque de hongos (Pastor e Higuera, 2004), este también presenta actividad repelente de insectos.

La actividad insecticida del quitosano se demostró primero con insectos de la clase Lepidóptera, con el gusano de la hoja de algodón *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armígera*, y *Plutella xylostella*; y en áfidos como *Aphis gossypii* y *Myzus persicae*, entre otros (Zhang y col., 2003).

Los oligómeros de quitosano probados sobre dichos organismos mostraron una menor actividad insecticida que el propio polímero, sin embargo, para el caso de larvas de *Spodoptera littoralis*, el quitosano muestra menor actividad insecticida que sus derivados modificados químicamente: el N-alkil quitosano y N-bencil quitosano.

Estos derivados poseen además actividad fungicida contra *Botrytis cinerea* y *Pyricularia grisea* (Rabea y col., 2005).

Las diferencias en el efecto insecticida entre los quitosanos y sus derivados químicos y sus oligómeros no han sido del todo comprendidas. Los derivados químicos de quitosano con propiedades insecticidas o fungicidas pueden ser buenas alternativas al uso de insecticidas de amplio espectro y altamente persistentes, ya que el quitosano no es tóxico para humanos, y tiene una matriz biodegradable (Rabea y col., 2005).

Cota-Arriola (2007) demostró que las películas de quitosano también tienen efecto repelente e insecticida en *Rhyzopertha dominica*, un insecto plaga de trigo almacenado. Las películas elaboradas con quitosano obtenido a partir de quitina de crustáceos extraída mediante método biológico (ensilado), provocaron una mayor mortalidad del insecto en menor lapso de tiempo comparada con películas de quitosano de quitina extraída por método químico y con películas de celofán tomadas como control. El quitosano proveniente del tratamiento biológico del desecho de camarón, presentó mayor grado de desacetilación que el obtenido por tratamiento químico del desecho, pero un peso molecular intermedio similar al quitosano de vía química, por lo que el efecto del peso molecular no fue determinante en la repelencia y efecto insecticida sobre *R. dominica*.

El mecanismo de acción del quitosano sobre los insectos no ha sido completamente explicado, aunque varios investigadores suponen que el biopolímero puede afectar las enzimas digestivas, interferir con el proceso de muda de la cutícula o bien, inducir la actividad de quitosanasas en el cuerpo de los insectos rociados con el polímero ocasionando su muerte, y alterar la producción y/o regulación de hormonas en los insectos en los que se ha probado (Zhang y col., 2003; Rabea y col., 2005).

Actividad Antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana del quitosano está influenciada por varios factores como son el tipo de quitosano, su grado de polimerización, el peso molecular, la viscosidad, el grado de desacetilación, la composición química y nutritiva del sustrato, y las condiciones ambientales, entre otros (Rabea y col., 2003). Es por eso que la acción

antimicrobiana puede variar dependiendo de los sustratos, tipos de microorganismos y características del propio quitosano como son su peso molecular y grado de desacetilación, principalmente. La acción antimicrobiana puede proceder de diferentes maneras; hasta el momento son tres las teorías sobre los mecanismos de acción antimicrobiana, las cuales dependen mayormente del peso molecular del mismo.

El primer mecanismo planteado menciona que las cargas positivas presentes en la cadena polimérica del quitosano, debidas al grupo amino en la misma, interactúan con las cargas negativas de los residuos de macromoléculas como lipopolisacáridos y proteínas; en las membranas de las células microbianas, interfiriendo con el intercambio de nutrientes entre el exterior y el interior de la célula afectando así el metabolismo de la misma. También es posible que compita con el calcio por los sitios electronegativos de la membrana, comprometiendo su integridad y ocasionando la salida de material intracelular y causando la muerte de la misma (Möller y col., 2004; Rodríguez y col., 2005).

El segundo mecanismo propone que el quitosano actúa como agente quelante formando complejos con trazas de metales indispensables para el metabolismo de la célula, ya que se ha visto que el quitosano es capaz de atrapar ciertos metales, lo que hace que se inhiba el desarrollo microbiano (Roller y Covill, 1999).

El tercer mecanismo establece que el quitosano inhibe la acción de varias enzimas, ya que interfiere con la síntesis de proteínas. Esto porque el quitosano de bajo peso molecular es capaz de entrar en el núcleo mismo de la célula e interactuar con el ADN, interferir con la síntesis de ARN mensajero (ARNm), y por lo tanto afectar la síntesis de proteínas (Rabea y col., 2003).

Estos mecanismos han sido propuestos para el quitosano que se encuentra en solución y en contacto directo con el microorganismo. No obstante, el mecanismo de acción antimicrobiana de las películas de quitosano no ha sido del todo aclarado y es necesario un estudio más detallado al respecto.

En el caso de las películas elaboradas con quitosano la actividad antimicrobiana se ha probado *in vitro* sobre diferentes microorganismos como hongos, bacterias y levaduras, e *in vivo* al cubrir diferentes tipos de alimentos (Tabla 4).

Aplicaciones y Perspectivas de las Películas de Quitosano como Empaques para Alimentos

A pesar de la antigüedad del método de elaboración de películas de quitosano (Rigby, 1936), las investigaciones al respecto no se continuaron sino hasta mediados de los años 70's, cuando en 1977, Austin y Brince, usaron quitosano de cangrejo para elaborar fibras y películas (Tabla 5). Esta pausa en las investigaciones sobre películas de quitosano, se debió principalmente al desarrollo de la industria de los plásticos.

Para los años 30's se extendió el uso de los primeros materiales plásticos: el celofán, el rayón, el polipropileno, el poliestireno y el nylon (ACC, 2007).

Durante la segunda guerra mundial el suministro de caucho natural, seda y látex disminuyó, por lo que los diversos países se vieron obligados a encontrar formas sintéticas que pudieran sustituirlos eficientemente y fueran lo suficientemente accesibles, por eso el desarrollo de nuevos materiales plásticos se vio muy favorecido.

Algunos materiales plásticos se vieron directamente involucrados en la industria armamentista, como es el caso del polietileno al servir de material aislante para los radares en las aeronaves de guerra y para el cableado de las telecomunicaciones. Esto debido a la ligereza y maleabilidad del polímero que permitió reducir el peso de los equipos radares y aumentar su movilidad (ACC, 2007). Cuando finalizó la guerra, la industria de los plásticos era tal que se aplicaron en diferentes industrias, como la alimenticia en el desarrollo de empaques, y en la propia maquinaria industrial, lo que potenció aun más su crecimiento y versatilidad. La mayor desventaja de los plásticos es su nula o escasa biodegradabilidad y el tiempo que tardan en reintegrarse en el ambiente, volviéndose materiales contaminantes y ocasionando un gran problema ecológico, debido también a la gran cantidad de materiales plásticos que existen.

Tabla 5. Películas de quitosano y sus características investigadas.

Formulación	Técnica de elaboración	Propiedades reportadas	Referencia
Quitosanos con 68 ácidos diferentes	Evaporación de solventes y filamentos por extrusión	Solubilidad	Rigby, 1936 .
Quitosano de cangrejo	Evaporación	Cristalización	Austin y Brince, 1977 .
Quitosano con glicerina como plastificante	Evaporación	Permeabilidad y mecánicas	Pittalis, y col., 1984 .
Quitosano con celulosa y glicerol	Evaporación	Mecánicas, permeabilidad al agua y biodegradabilidad en suelo	Hosokawa y col., 1990 .
Quitosano, pectina, ácido láctico y glicerol	Evaporación	Mecánicas, permeabilidad	Hoagland y Parris, 1996 .
Quitosano en ácido acético, propiónico, fórmico y láctico; y polietilenglicol como plastificante	Evaporación	Mecánicas y permeabilidad a oxígeno y vapor de agua	Caner, y col., 1998 .
Películas simples: Quitosano y ácidos acético y propiónico, Películas compuestas: quitosano ácido láurico y/o cinamaldehído	Evaporación	Antimicrobianas sobre enterobacterias y sobre carne procesada (jamón y boloña)	Quattara y col., 2000 .
Quitosano y amilosa de almidón de maíz y glicerol, sorbitol y eritrol	Evaporación	Mecánicas y cristalización	Fernández-Cervera y col., 2004 .
Quitosano, glicerol, etilenglicol y polietileno y propileno glicol	Evaporación	Mecánicas, permeabilidad, térmicas	Suyatma y col., 2005 .
Quitosano con ácido poliláctico y polietilenglicol	Evaporación	Mecánicas, permeabilidad, fungistáticas sobre <i>A. parasiticus</i> , <i>flavus</i> , <i>ochraceus</i> , y <i>F. moniliforme</i> , <i>F. graminearum</i>	Sébastien y col., 2006 .
Quitosano, ác. esteárico y palmítico, polietilenglicol, sorbitol y glicerol	Evaporación	Mecánicas y permeabilidad al vapor de agua	Srinivasa y col., 2007b .

Estos materiales pueden ser reciclados y convertidos de nuevo a otros materiales de la misma naturaleza, sin embargo la tasa de reciclaje es mucho menor a la de producción de los mismos. Se estima que solo el 15% de los plásticos residuales se reciclan (Arandes y col., 2004). Esta baja proporción de reciclaje puede deberse entre otras razones a:

- La baja densidad del plástico hace necesario romper el empaque para poder manejarlo, elevando el coste de transporte.
- La diferente composición de los materiales plásticos, exige una separación en familias antes de reciclarse.
- La baja tasa de reutilización directa de los materiales plásticos (1-2%), debido a los requerimientos de calidad de los productos que impiden su reutilización en la fabricación de nuevos envases para alimentos por razones sanitarias (Arandes y col., 2004).

Debido a estos problemas con los envases plásticos y a la creciente demanda por sistemas de empaque más eficientes con los cuales el alimento requiera un tratamiento mínimo con agentes químicos, se ha favorecido el estudio de compuestos antimicrobianos de origen natural que se incorporen en los envases, así como el uso de polímeros funcionales para la elaboración de los mismos (Dutta y col., 2009). Dentro de estos materiales poliméricos el quitosano resulta atractivo para utilizarse como empaque de alimentos, debido a su origen natural y sus propiedades filmogénicas, antimicrobianas y de biodegradabilidad.

Las películas de quitosano puro poseen propiedades mecánicas deficientes, por lo que con el tiempo se empezaron a probar mezclas de quitosano con agentes plastificantes (Pittalis y col., 1984; Caner y col. 1998; Park, y col. 2001; De Britto y col., 2005), así como otros compuestos naturales para mejorar también sus propiedades antimicrobianas (Tabla 5).

Se ha analizado sobre bacterias como sobre hongos patógenos de alimentos la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano encontrándose que dicha actividad está influenciada por el peso molecular y grado de desacetilación del quitosano, la presencia de otros compuestos con actividad antimicrobiana en las películas, entre otros factores (El Ghaouth y col., 1991; Zhou y col., 1998; Ouattara y col., 2000; Coma y col., 2003; Park y Zhao., 2004; Zivanovic y col., 2007; Kim y col., 2007).

Las películas de quitosano, ya sea en forma de envases o como cubiertas, se han probado en diferentes alimentos con el objetivo de conservar sus cualidades sensoriales e higiénicas de calidad adecuada para el consumidor, encontrando

buenos resultados tanto en el aumento del tiempo de vida útil como en la conservación de la calidad de dichos productos (Tabla 4).

A pesar de la investigación que se ha hecho hasta el momento en esta área, son pocos los estudios que cubren integralmente las propiedades mecánicas, morfológicas y antimicrobianas de las películas de quitosano, características que son indispensables en el diseño de empaques de alimentos eficaces en la conservación y en el mantenimiento de la calidad de los mismos.

JUSTIFICACION

La vida de anaquel de los productos alimenticios ha sido uno de los principales problemas en la industria de alimentos. Varias investigaciones buscan métodos de conservación capaces de extender la vida útil de los productos. Se han empleado muy diversas técnicas pero en años recientes, el uso de materiales sintéticos como los plásticos, para la elaboración de empaques para alimentos, ha sido muy recurrido. Sin embargo, la creciente preocupación por la conservación del medio ambiente ha propiciado la búsqueda de materiales naturales biodegradables, que no sean nocivos con la naturaleza ni con el consumidor, y que además sean capaces de conservar los alimentos y aún más, extender su vida de anaquel (Ratajska y Boryniec, 1999). En este sentido, la elaboración de empaques derivados de compuestos naturales que cumplan con los requisitos del consumidor y eviten la contaminación es todo un reto, y un área de estudio que se amplía constantemente.

Uno de esos materiales naturales capaces de ser utilizados como empaques es el quitosano. El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina, que a su vez se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y en las paredes celulares de algunos hongos. Es posible obtenerlo tanto por una extracción química, como por una biológica usando fermentación bacteriana, lo que supone menor producción de desechos agresivos al medio ambiente y la recuperación de compuestos de alto valor

comercial como proteínas y pigmentos, entre otros (Cira y col., 2002; Beaney y col., 2005; Rao y Stevens, 2005).

Se ha comprobado que se pueden obtener películas, fibras, esferas, geles, entre otros a partir de quitosano (Wawro y col., 2006). Las películas de quitosano son flexibles, resistentes, transparentes e incoloras. Estas cualidades dependen mayormente de la estructura del polímero (Wiles y col., 2000).

El uso del quitosano como empaque para extender la vida de anaquel de los alimentos se debe a que este polímero posee actividad antimicrobiana además de actuar como barrera a los elementos externos al alimento (Sebti y col., 2005). Esto supone una gran ventaja, puesto que las películas elaboradas no requieren de la adición de agentes antimicrobianos, son fáciles de elaborar y poseen buenas propiedades mecánicas, además de que son naturales, no tóxicas y biodegradables. En la bibliografía no existen estudios detallados que evalúen, de manera integral, la correlación entre las propiedades mecánicas, morfológicas y la actividad antifúngica del biopolímero.

Se considera que el método de elaboración de películas, así como el procedimiento de obtención del quitosano de los desechos de camarón, afectan las propiedades mecánicas y antimicrobianas de las mismas, de tal forma que se deben conocer para establecer las condiciones que permiten la obtención de un empaque apto para la conservación de alimentos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar actividad fungistática de biopelículas de quitosano obtenido a partir de quitina extraída mediante ensilado orgánico de desecho de camarón sobre *Aspergillus niger*

Objetivos Particulares

1. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de quitosanos obtenidos a partir de quitinas extraídas por ensilado orgánico y por método químico a partir de desechos de camarón.
2. Comparación de las propiedades mecánicas, morfológicas y estructurales de las películas de quitosano elaboradas por evaporación y por extrusión.
3. Evaluar el efecto fungistático de los quitosanos y las películas de quitosanos sobre *Aspergillus niger*
4. Relacionar propiedades estructurales de las películas de quitosanos con su efecto fungistático.

HIPÓTESIS

Las biopelículas de compositos de quitosano obtenido de quitina procesada biológicamente, poseen propiedades mecánicas similares a las películas de quitosano comercial puro, además de actividad antifúngica sobre *A. niger* que lo hacen factible para uso como empaque en alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Se empleó desecho de camarón (cefalotórax), proveniente de la Planta Congeladora "Costamar", ubicada a la altura del kilómetro 54 de la carretera a Bahía de Kino, Sonora. Una vez recolectado el desecho, se transportó en hielo y se almacenó en congelación a -20°C hasta su procesamiento en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), a fin de extraer la quitina mediante tratamiento biológico (ensilado), la cual fue posteriormente convertida a quitosano. Para la elaboración del ensilado se utilizó una cepa de bacterias aislada de desecho de

camarón (Jaime-Quijada, 2008). El procedimiento experimental (Figura 5), se realizó en tres etapas:

Etapa 1: obtención de quitosano y caracterización fisicoquímica y fungistática mediante pruebas *in vitro*.

Etapa 2: elaboración y estudio de las propiedades mecánicas, estructurales, y térmicas de películas de quitosano.

Etapa 3: propiedad fungistática de las películas de quitosano mediante pruebas *in vitro*.

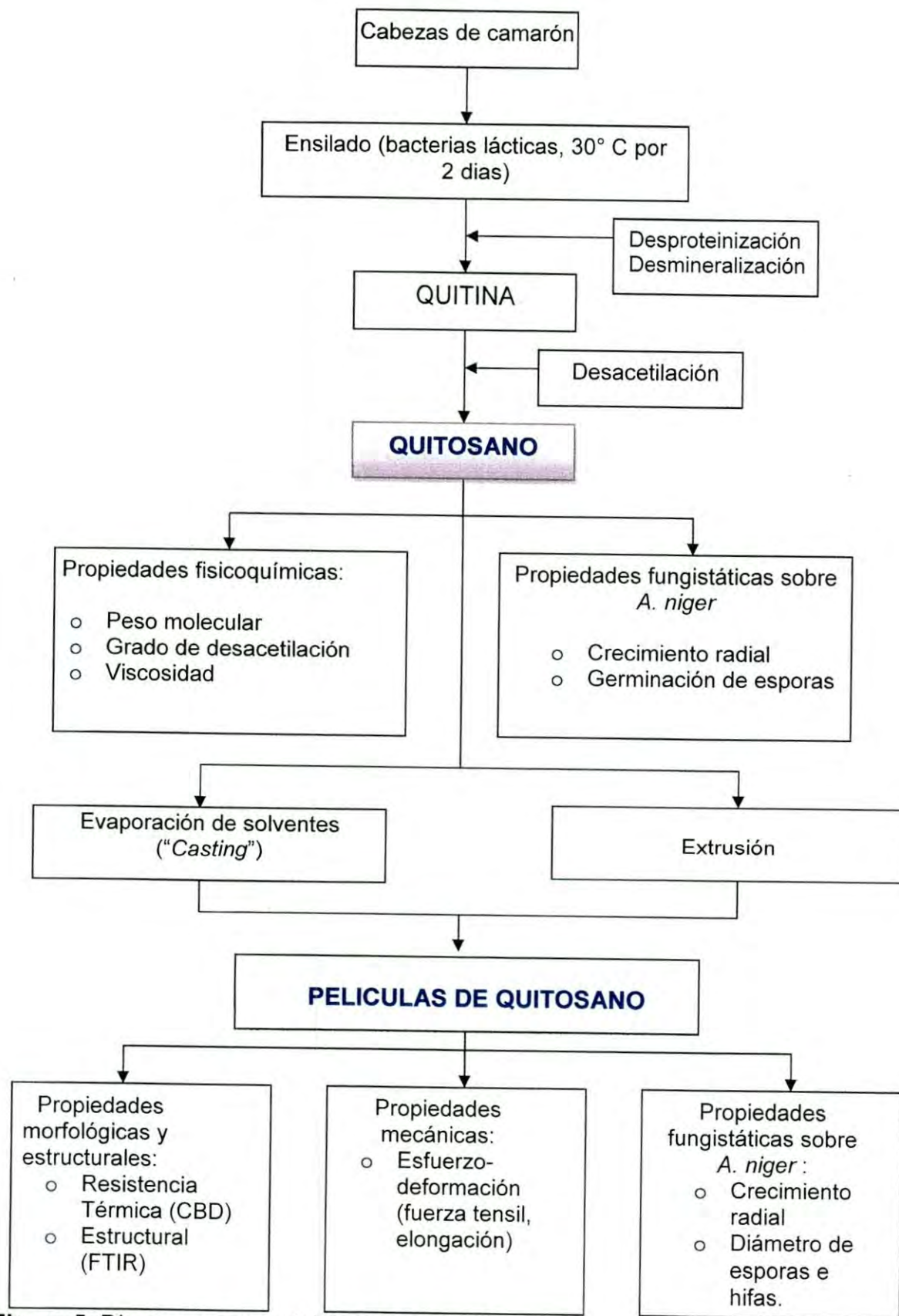


Figura 5. Diagrama general del procedimiento.

Etapa 1:

Obtención y Caracterización de Quitosano

El primer paso en la obtención del quitosano es la extracción de la quitina del desecho de camarón. Para ello se realizó un ensilado fermentado de los desechos de camarón.

Ensilado Fermentado Para la Obtención de Quitina.

Se utilizó desecho de camarón fresco y molido, el cual se mezcló con sacarosa como fuente de carbono, ácido láctico al 10% (v/v) y un inóculo de bacterias aisladas de cabeza de camarón. La mezcla resultante se homogeneizó e incubó a 30° C durante 48 horas, tras lo cual se retiró y se lavó con agua corriente. El desecho lavado se dejó secar y se desproteinizó empleando una solución de NaOH al 2%, posteriormente se desmineralizó con una solución de HCl al 2%, y así se extrajo la quitina (Plascencia-Jatomea, 2000).

Obtención del quitosano.

Una vez aislada la quitina del desecho, se realizó la desacetilación de la misma para obtener el quitosano. La desacetilación se hizo por método químico y de forma heterogénea. La quitina se sometió a un tratamiento con solución de NaOH al 60%, mezclando mecánicamente durante 6 días a 35° C (Moreno-Villa, 2008). El quitosano resultante fue neutralizado, lavado y secado, antes de determinar la composición química proximal y el rendimiento.

Por otro lado, se utilizó quitosano comercial marca FlukaBiochemica (Japón) como quitosano obtenido por método químico mediante el uso de ácidos y álcalis concentrados y altas temperaturas.

Caracterización del Quitosano.

Luego de obtenido el quitosano, se caracterizó químicamente en primer lugar y posteriormente se evaluó su actividad antifúngica.

Para la caracterización química se determinó el contenido de proteína total, la cantidad de cenizas y la humedad, así como el peso molecular, el grado de desacetilación y la viscosidad del quitosano.

Humedad. La humedad es un parámetro importante en el quitosano, que se obtiene en el laboratorio como los comerciales, puesto que existen diferencias en el contenido de agua (Argüelles y col., 2004). La determinación se hace gravimétricamente, pesando las muestras de quitosano comercial y de quitosano obtenido mediante ensilado y sometiénolas a calentamiento en estufa a 100-105° C. El porcentaje de humedad se determinó según la técnica de la AOAC, (2005), mediante la ecuación 1:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(\text{Peso muestra} - \text{Peso muestra seca})}{\text{Peso muestra}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Proteína total. En el exoesqueleto de insectos y crustáceos la quitina se encuentra asociada a proteínas. En el caso de los crustáceos la quitina se ubica en la endocutícula junto con minerales, principalmente calcio y pigmentos como melaninas y carotenoides. La proteína que se aísla de estas fuentes es de buena calidad y alto valor económico. Además, la quitina destinada a usos farmacéuticos y alimenticios debe estar lo más libre posible de otros compuestos, para asegurar la más alta pureza necesaria para las aplicaciones biológicas (Percot y col., 2003). Por ello la importancia de la desproteínización y de la eficiencia del mismo.

La determinación del contenido de proteína total se realiza mediante un pre-tratamiento de la muestra, mediante una extracción previa de la proteína con una solución de KOH al 2%, en proporción sólido/KOH de 1:20, a 90°C durante 2 horas. El extracto proteico obtenido se separó del material insoluble en KOH, en filtración por medio de un embudo de vidrio (Argüelles y col., 2004). El contenido de proteína en la solución de KOH se determinó por el método de micro-Kjeldahl, usando un factor de 6.25 (No y col., 2003) y la ecuación 2 del método de la AOAC (2005):

$$\text{proteína (\%)} = \frac{\text{mlHCl} \times N\text{HCl} \times 0.01401 \times 6.25 \times 100}{\text{g muestra}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Ceniza. El contenido de ceniza es indicativo del contenido de materiales inorgánicos presentes y de la calidad del proceso de obtención de la quitina de las fuentes. El contenido mineral de los residuos de los crustáceos oscila entre 30 y 55%. Está constituido por carbonato de calcio principalmente, y en menor proporción por fosfato de calcio. La proporción de materia inorgánica en los caparazones de crustáceos es variable según la especie y la estación del año (Goycoolea y col., 2004). Por ello es importante adecuar las condiciones de desmineralización para asegurar la máxima remoción del material mineral.

El contenido de materia inorgánica se determinó por gravimetría sometiendo a la muestra a un calentamiento a 600°C durante al menos dos horas. El porcentaje de cenizas se determinó con la técnica de la AOAC (2005) y la ecuación 3:

$$\text{Ceniza (\%)} = \frac{(\text{Peso muestra} - \text{Peso ceniza})}{\text{Peso muestra}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Viscosidad y peso molecular mediante viscosidad intrínseca. El peso molecular del quitosano se determinó indirectamente mediante la viscosidad intrínseca (η), la cual se obtuvo a partir de la medición de la viscosidad relativa (η_{rel}).

Para cada muestra de quitosano se prepararon 4 diluciones en ácido acético 0.3M con 0.2M de acetato de sodio. Posteriormente se les determinó el tiempo de paso por un viscosímetro capilar Ubbelohde a 25°C en un baño de agua (González-Aguilar y col., 2005; Hwang y col., 2002). El valor de la viscosidad relativa se calculó con la ecuación 4:

$$(\eta_{\text{rel}}) = \frac{t_x}{t_s} \quad (\text{Ecuación 4})$$

En donde t_x corresponde al tiempo de paso de la solución del quitosano y t_s es el tiempo de paso del solvente.

El valor de la viscosidad intrínseca se determinó utilizando los valores de la viscosidad relativa, mediante la extrapolación gráfica conjunta de las curvas obtenidas en las ecuaciones de Huggins, Kramer y punto crítico, a una concentración teórica de polímero igual a 0.

Posteriormente se calcularon los valores del peso molecular a partir de los valores de la viscosidad intrínseca, empleando la ecuación 5 de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = KMw^a \quad (\text{Ecuación 5})$$

En donde K y a son las constantes empíricas, con valores de 3.04×10^{-5} y 1.26, respectivamente, y Mw es el peso molecular. Las constantes fueron determinadas para el sistema de solventes empleado así como para las condiciones de temperatura a la cual se realizó el análisis (Rinaudo y col., 1993).

Grado de desacetilación por FTIR. La determinación del grado de desacetilación del quitosano se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR).

Para la técnica se mezclaron aproximadamente 40-60mg de polvo de quitosano y 120 mg de KBr y se trituraron en un mortero por 10 minutos. Se compactaron aproximadamente 40 mg de la mezcla usando la prensa hidráulica del espectro de infrarrojo a una presión de 8 Ton por 60 segundos. Se obtuvo el espectro de las muestras de quitosano empleando un rango de frecuencia de 4000 a 400cm^{-1} (Uriarte, 2007). El análisis de los espectros infrarrojos se realizó mediante la técnica descrita por Khan y col., (2002), empleando líneas base para corregir los valores de absorción de las bandas amida I (1655cm^{-1}) y del grupo hidroxilo (3450cm^{-1}). La ecuación 6 se utilizó para determinar el grado de desacetilación:

$$GD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times \frac{100}{1.33} \right] \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde A_{1655} es la absorbancia a 1655 cm^{-1} , A_{3540} es la absorbancia a 3450 cm^{-1} mientras que 1.33 es el valor de la proporción A_{1655}/A_{3540} para un quitosano completamente acetilado.

Actividad fungistática de quitosanos sobre el crecimiento de Aspergillus niger. La cepa de *Aspergillus niger* proveniente de la colección NRRL-3, se inoculó en matraces y/o tubos de ensayo con agar papa dextrosa (PDA) que se incubaron a 30°C durante 5 días hasta que se desarrollaron las esporas, las cuales se resuspendieron utilizando solución Tween 20 al 0.1% (v/v) y se agitaron por 5 minutos. Posteriormente se realizó un conteo de esporas utilizando la cámara Nuebauer para ajustar la concentración a 1×10^5 esporas por mililitro. Se utilizaron dos técnicas de inoculación para el análisis de la actividad fungistática de los quitosanos:

1. Inoculación por picadura. Esta técnica fue empleada para realizar la prueba de crecimiento radial. El inóculo se tomó con la punta de una asa bacteriológica y luego se depositó en el centro de la placa con el agar mediante una picadura sin tocar el fondo de la placa (El Ghaouth y col., 1992b).
2. Inoculación por siembra en césped. Esta técnica fue utilizada para las pruebas de germinación de esporas. Se tomaron $12\mu\text{L}$ de la suspensión de esporas del hongo con una concentración de 1×10^5 esporas/mL, que fueron depositados en el centro de la placa y esparcidos por toda la superficie usando una varilla de vidrio estéril (Plascencia-Jatomea, 2004).

Se empleó medio de cultivo PDA (DIFCO, USA), el cual se utilizó para hacer las pruebas de actividad fungistática en el hongo, así como también para mantener las esporas activas. Se suspendieron 39g del medio sólido por cada 1000mL y se clarificó por calentamiento y agitación magnética. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C .

Para el caso del tratamiento control (sin quitosano), el medio ya estéril y atemperado se vació en placas Petri desechables. Para los tratamientos con quitosano se mezclaron soluciones de quitosano comercial de media viscosidad (QM) (420 kDa y

78.03% grado de desacetilación) y de quitosano proveniente de la quitina extraída por ensilado (QE) (100 kDa y 63.61% grado de desacetilación) a una concentración de 2.82g/L en ácido acético 0.1M para las pruebas de crecimiento de *Aspergillus niger* (Martínez-Camacho, 2006). Las soluciones se mezclaron ya estériles con el medio PDA aún líquido, y después dicha mezcla se vació en placas Petri desechables (Bell y col., 1998).

Para la determinación del efecto fungistático de los quitosanos sobre *A. niger* se evaluaron los parámetros de crecimiento del hongo, es decir la extensión radial, la germinación de esporas y velocidad de crecimiento.

Crecimiento radial. Esta prueba se realizó empleando placas con PDA sobre el cual se inoculó por picadura al hongo en el centro de la placa. Para esta prueba se utilizaron placas con quitosano comercial (QM) y de ensilado (QE) ambos a una concentración de 2.82g/L. También se emplearon placas control de PDA sin quitosano, así como placas con ácido acético 0.1M como control ácido.

El diámetro de la colonia del hongo se midió cada 24 horas hasta que el tratamiento control alcanzó el diámetro de la placa (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Se calculó entonces el índice de actividad fungistática sobre el crecimiento radial del hongo, mediante la ecuación 7:

$$\% \text{ Índice fungistático} = 1 - \left[\frac{R_I}{R_C} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde R_c es el radio promedio de la colonia en el medio control, y R_i es el radio de la colonia en el medio con quitosano (Guo y col., 2006).

Germinación de esporas. Para esta prueba se utilizó también medio sólido PDA, donde se inocularon 12 μ L de la suspensión de esporas del hongo *A. niger* a una concentración de 1×10^5 esporas por mililitro por medio de siembra en placa. Se

emplearon placas de PDA con QMV en una concentración de 2.82g/L, así como placas control de PDA sin quitosano.

Las placas inoculadas se incubaron a 25°C y se realizaron conteos de esporas germinadas. Las esporas germinadas son aquellas cuyo túbulo germinal tiene una longitud del doble o más del diámetro de la espora. El conteo se realizó a diferentes intervalos de tiempo, hasta que en el tratamiento control las esporas germinadas llegaron al 100% (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Se determinó entonces el índice de actividad fungistática sobre la germinación de esporas mediante la ecuación 8:

$$\% \text{ Índice fungistático} = 1 - \left[\frac{S_i}{S_c} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde S_c es el porcentaje de esporas germinadas en el medio control, y S_i es el porcentaje de esporas germinadas en el medio con quitosano (Guo y col., 2006).

Etapa 2:

Elaboración y Caracterización de Películas de Quitosano

Las películas de quitosano se elaboraron mediante dos métodos: el primero fue por evaporación de solventes o “*casting*” y el segundo por extrusión.

Elaboración de Películas de Quitosano por Evaporación de Solvente.

Se prepararon soluciones en ácido acético 0.1 M de cada uno de los quitosanos a analizar (quitosano comercial de media viscosidad y quitosano biológico) con una concentración de 1%. Las soluciones se pusieron en agitación por 24h a 25° C, se dejaron desgasificar y posteriormente reposar durante al menos 12 horas a 25°C. Enseguida se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos, se vertieron sobre placas de poliestireno, dejándose nuevamente en reposo durante 24 horas a 25°C, sobre una superficie previamente nivelada. Por último, las placas se dejaron secar a

temperatura ambiente hasta evaporación completa del ácido acético usado como solvente. Se adicionó 20% sorbitol (p/p) como agente plastificante, directamente a las soluciones de quitosano y se homogenizó mediante agitación magnética durante 1 hora a 25°C (Plascencia-Jatomea, 2004).

Elaboración de Películas de Quitosano por Extrusión.

Se prepararon mezclas (Tabla 6) de quitosano con polietileno de baja densidad (LDPE) como polímero termoplástico sintético y adhesivo (PRIMACOR 1430, marca DOW). Todas las mezclas se pulverizaron y se extrudieron en una máquina extrusora monohusillo, a nivel planta piloto (Beutelspacher, México, D.F.) a temperaturas de proceso de 145-145-150-150°C (alimentación, rotor, cabezal y dado, respectivamente) y con un tiempo de residencia total de 2 min, a una velocidad de salida de 45 revoluciones por minuto (rpm), para posteriormente pelletizarse. Este proceso favorece la homogeneidad de las mezclas. Los pellets obtenidos se introdujeron en el extrusor para pequeños volúmenes de mezclas (LME Laboratory Mixing Extruder marca ATLAS). La elaboración de las películas de quitosano con LDPE se realizó a 150°C en rotor, y 160°C para el cabezal. La velocidad del motor de salida se ajustó a 120 rpm (Plascencia-Jatomea, 2004).

Tabla 6. Formulación de las mezclas de quitosano, adhesivo y LDPE, para la elaboración de películas extrudidas.

		Adhesivo:LDPE			
		%	0	1	10
Quitosano	0		0:0:100	0:1:99	0:10:90
	5		5:0:95	5:1:94	5:10:85
	10		10:0:80	10:1:89	10:10:80

La proporción para la elaboración de las películas extrudidas fue quitosano:adhesivo:LDPE.

Las películas de quitosano obtenidas por los métodos anteriormente descritos, se mantuvieron a 25°C por un máximo de dos semanas antes de ser analizadas.

Propiedades Morfológicas de las Películas de Quitosano.

Las características morfológicas y de homogeneidad de las películas se determinaron mediante análisis infrarrojo y calorimetría de barrido diferencial. Dichas propiedades se compararon con las del celofán, la cual fue tomada como película control.

Espesor de las películas.

El espesor de las películas de quitosano se obtuvo usando un micrómetro, reportándose el promedio de 10 mediciones al menos en cada una de las películas (Plascencia-Jatomea, 2004).

Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) sobre películas.

El análisis infrarrojo permite analizar la uniformidad de las películas. Para ello las muestras se analizaron superficialmente, obteniéndose los espectros FTIR de las mismas mediante un espectrofotómetro FTIR (Infrarrojo de Transformada de Fourier), a partir del promedio de 16 barridos, usando un intervalo espectral de 4000 a 400cm⁻¹. Se tomaron pequeños fragmentos de las películas para su análisis (Uriarte, 2007).

Calorimetría diferencial de barrido.

Esta técnica permite conocer la estabilidad térmica de las películas de quitosano. Se empleó un calorímetro de barrido diferencial. Se tomaron trozos de las películas hasta completar 10 mg mínimo. Todas las muestras se colocaron en microcápsulas de acero inoxidable, selladas herméticamente con una engargoladora. Se empleó una velocidad de barrido de 10°C/min en un rango de temperatura de 26 a 300°C, usando aire como referencia (Uriarte, 2007). Se obtuvieron los termogramas y la temperatura de transición vítrea (T_g) de cada una de las películas.

Propiedades mecánicas de las películas de quitosano.

Las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación de las películas elaboradas por evaporación de solventes se evaluaron en un Instron (marca United modelo SSTM 5KN, USA). De cada una de las muestras de películas se tomaron tiras de 8cm de largo por 0.5 cm de ancho que se sujetaron por los extremos. La fuerza y la elongación se monitorearon hasta el rompimiento de las películas usando la técnica ASTM D882-94, y se reportaron los valores obtenidos del promedio de tres mediciones mínimo (Jáuregui-Cornejo y col., 2009; Plascencia-Jatomea, 2004).

Para las películas extrudidas se utilizó la norma ASTM D-1708-96, debido a que es adecuada para materiales microtensiles con un comportamiento mayormente plástico que elástico, como es el caso del termoplástico LDPE utilizado en la elaboración de estas películas. Las probetas empleadas en ésta norma tienen una longitud total de 3.5 cm, con el centro adelgazado siendo este de 0.5 cm de ancho, y los costados de 1.8 cm de ancho de los cuales se sujetan las abrazaderas del equipo. Las propiedades mecánicas de todas las películas de quitosano obtenidas se compararon con las de celofán que se tomó como película control.

Etapas 3:

Actividad Fungistática de las Películas de Quitosano

Las propiedades fungistáticas de las películas de quitosano se determinaron *in vitro* usando cepas del hongo *Aspergillus niger*. Se analizaron parámetros de crecimiento (extensión radial y velocidad de crecimiento), así como parámetros morfológicos (diámetro de esporas e hifas) para determinar la actividad fungistática de las películas de quitosano obtenidas por evaporación y por extrusión.

Crecimiento Radial en Películas.

Las películas de quitosano se neutralizaron sumergiéndolas en una solución de NaOH al 0.1% por 5seg, se dejaron secar y se cortaron fragmentos circulares de 6

mm de diámetro. Antes de ser inoculadas, las películas fueron esterilizadas exponiéndolas a luz ultravioleta por 5min por cada lado.

La inoculación para crecimiento radial (CR) se llevó a cabo por dos métodos: por arriba y por debajo de la película (Figura 6). En el primero se colocó la película en el centro del medio y se dejó secar en el flujo de aire de la campana por al menos 15 min, posteriormente se inoculó el hongo depositando una concentración de 1000 esporas/ mL, dejándose secar otros 15min antes de incubarse a 25°C.

En el segundo sistema se depositó primero el inoculo en el centro del medio y se dejó secar por 15 min antes de colocársele encima la película. Las placas por este medio también fueron incubadas a 25°C.

Se midió el diámetro de las colonias cada 24h hasta que el control alcanzó el diámetro total de la placa (5 cm). Se determinó el índice fungistático de acuerdo a la ecuación 7.

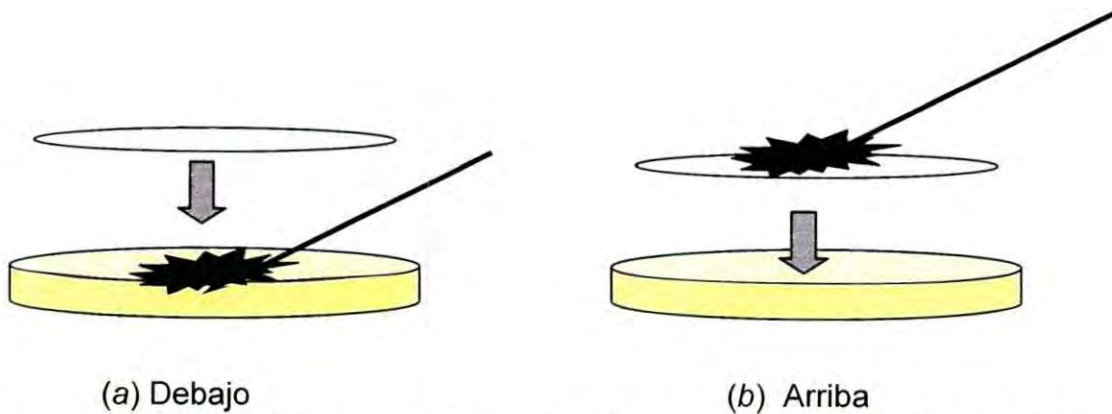


Figura 6. Técnicas de inoculación para análisis fungistático de películas de quitosano, (a) inoculación del hongo debajo de la película e, (b) inoculación de hongo por arriba de la película.

Parámetros Morfométricos (Diámetro de Hifas y Esporas).

Como parámetros morfométricos se determinó el diámetro de hifas de *A. niger* en el CR del mismo y de sus esporas en la etapa de germinación en los distintos tratamientos. Para ello se tomaron imágenes de las observaciones en el microscopio

marca Olympus CX31 (Japón) con una cámara integrada marca Infinity 1 (Media Cybernetics, USA), a un objetivo 40x. El diámetro de hifas y esporas se calculó mediante el análisis de las imágenes utilizando un software analizador de imágenes (Image Pro-Plus versión 6.3 para Windows Media Cybernetics, USA).

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El diseño experimental se dividió en 2 partes. La primera parte permite evaluar las propiedades fisicoquímicas y fungistáticas de los quitosanos obtenidos por ensilado fermentado y por método químico. El diseño consistió en un diseño factorial completamente al azar con dos factores que son los dos tratamientos para la obtención del quitosano y tres repeticiones.

La segunda parte comprendió las propiedades mecánicas, morfológicas, estructurales y fungistáticas de las películas de quitosano. El diseño en esta parte fue factorial, con 5 factores que son los dos tipos de quitosano (por ensilado y por vía química) y los dos tipos de películas (por extrusión y por evaporación) y un control, completamente aleatorio y con 3 repeticiones.

El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete estadístico JMP 5. En la primera parte se realizó una comparación de promedios de los tratamientos, mientras que en la segunda el análisis se dividió en dos, primero se hizo una comparación de promedios con prueba de Tukey de todos los tratamientos, y posteriormente se analizaron excluyendo el control.

RESULTADOS Y DISCUSION

Etapa 1:

Obtención y Caracterización de Quitosano

Obtención de Quitosano.

El rendimiento de quitina a partir de desechos de camarón fresco molido y procesado por ensilado fermentado fue de 2.38%. Rao y Stevens (2005), reportaron un porcentaje de quitina obtenida por fermentación de cabezas de camarón de 4.3-4.5%, encontrando que dicho rendimiento fue similar al obtenido por vía química, pero solo para el caso de las cabezas y no así para el de caparazón de camarón. Sin embargo estos investigadores consideran que este porcentaje de recuperación es bajo, y lo atribuyen a pérdida de quitina durante el proceso de obtención de la misma.

El rendimiento de quitosano a partir del desecho fresco de camarón en este trabajo fue de 1.59%; sin embargo, el rendimiento de quitosano a partir de la quitina aislada fue de 66.81% (base húmeda). Esto indica que más de la mitad de la quitina obtenida fue transformada a quitosano. Es posible que durante el ensilaje existiera cierto grado de depolimerización de la quitina, por acción de algunas enzimas producidas por los propios microorganismos usados para la fermentación (Kumar y col., 2004), lo que ocasionaría a su vez, una disminución en el rendimiento de quitosano obtenido químicamente a partir de la quitina de ensilaje.

Otra razón puede ser la pérdida de quitina que se encuentra en forma de agregados, de un pequeño tamaño de partícula, al momento de realizar los filtrados y lavados durante el proceso de obtención (Rao y Stevens, 2005). Esto reduciría en consecuencia, el porcentaje de quitosano obtenido a partir del desecho procesado. Zakaria y col., (1998) demostraron que un 5.08% de la quitina total presente en desechos de gambas, se perdía en el licor del ensilaje con *Lactobacillus paracasei*. De igual manera, esto pudo haber pasado en el ensilaje realizado en este trabajo, lo que ocasionó un bajo rendimiento de quitina y a su vez de quitosano.

Caracterización del Quitosano.

Una vez obtenido del quitosano se procedió con su caracterización proximal (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización proximal de los quitosanos.

Quitosano	Ceniza (%)	Proteína (%)
QE	0.566 ± 0.045	0.668 ± 0.001
QM	0.103 ± 0.064	0.660 ± 0.008

QE: Quitosano de ensilado, QM: quitosano comercial de media viscosidad.

Se observó un porcentaje mayor de material inorgánico en el quitosano obtenido por ensilado que en el obtenido por vía química. Esto puede deberse al tratamiento del ensilado donde se empleó menor cantidad de ácido para desmineralizar que en un método químico. También es posible que debido a la fermentación estática que se realizó, el ácido láctico producido no logró una mayor desmineralización de la quitina, y por lo tanto el contenido de ceniza residual en el quitosano fue mayor.

Rao y Stevens (2005) reportaron porcentajes de ceniza residual en quitosano de 0.15 a 0.05% usando un reactor de tambor para llevar a cabo la fermentación, en donde el licor y el sedimento, mayormente quitina, se encontraban en movimiento, mejorando la homogenización y permitiendo una mejor penetración del ácido a las cabezas y caparazones de camarón, resultando en una mayor remoción de los minerales.

Se considera que un quitosano es de alto grado de calidad, cuando tiene menos del 1% de contenido de ceniza residual (No y Meyers, 1995). Por lo que el quitosano obtenido de ensilado es de alta calidad y equiparable a la de uno comercial.

En el caso del contenido de proteína residual, no se encontraron diferencias significativas entre el quitosano de ensilado (QE) y el quitosano comercial (QM). El porcentaje reportado fue menor del 1% por lo que se considera que el proceso de

ensilado fue eficiente en la remoción de proteína, que se concentró en el licor que fue descartado. Además, se aplicó una desproteínización posterior al ensilaje para asegurar la máxima remoción posible de los residuos de proteína.

Grado de desacetilación.

Se determinó mediante espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier. Los espectros obtenidos de los polvos de quitosano (Figura 7) fueron analizados para determinar las absorbancias a 1655 y 3450 cm^{-1} longitud de onda. Se empleó una línea base corregida para cada uno de los picos a analizar según la técnica descrita Khan y col., (2002).

Se observó que el grado de desacetilación (Tabla 8) del quitosano de ensilado (QE) fue menor (64.61%) que el del comercial (78.03%).

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de quitosanos.

Quitosano	GD (%)	$[\eta]$ (dl/g)	PM (kDa)
QE	64.61%	2.5768 ± 0.0417	100
QM	78.03%	9.4628 ± 0.0766	480
QB	56.58%	8.1101 ± 0.2746	400

GD: Grado de desacetilación, $[\eta]$: viscosidad intrínseca, PM: peso molecular, QE: Quitosano de ensilado, QM: quitosano comercial de media viscosidad, QB: Quitosano comercial de baja viscosidad.

En un estudio similar, Beaney y col., (2005) obtuvieron quitina por fermentación bacteriana y quitosano a partir de ésta por desacetilación termoalcalina (NaOH a 100°C), reportando valores de desacetilación de 82.22% para el quitosano por vía biológica y 82.19% para el de vía química. Estos valores son similares a los reportados por Sini y col., (2007), quienes obtuvieron quitina a partir de desechos de

camarón usando fermentación con *Lactobacillus subtilis*, y precesándola luego por desacetilación termoalcalina. El quitosano que obtuvieron tuvo un grado de desacetilación de 81%. La diferencia entre los datos reportados por estos investigadores y los obtenidos en este trabajo, pueden deberse a varios factores como son el tipo de desacetilación llevada a cabo, ya que para esta investigación la temperatura usada durante el proceso de desacetilación fue de 35°C. Además, es posible que durante la fermentación, la quitina haya sido parcialmente depolimerizada por acción de enzimas microbianas, lo que consecuentemente pudo reducir la proporción de grupos acetoamida para hidrolizar y disminuir así, el grado de desacetilación final del quitosano.

Una de las consideraciones importantes en esta determinación es la línea base empleada, en este caso se trabajó con la proporción en las bandas A_{1655}/A_{3450} , que se ha reportado adecuada para muestras de quitina y quitosano cristalinas y perfectamente secas. Sin embargo, puede presentar ciertas desventajas puesto que existen dos tipos de grupos amino en la estructura de quitina y/o quitosano, que aparecen en la banda de 1655 cm^{-1} y 1625 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento C=O y C=N de la amida I, respectivamente. La cercanía de ambos picos puede dificultar la determinación del grado de desacetilación, ya que en ciertas muestras de quitosano puede existir superposición o traslapamiento, observándose un único pico (Kassai, 2008).

Existe también otro inconveniente al usar la banda de 1655 cm^{-1} , ya que a cercana a esa longitud de onda (alrededor de 1650 cm^{-1}) aparece un pico correspondiente a los grupos OH de los polisacáridos y de las moléculas de agua, por lo que un incremento en el contenido de agua de la muestras puede aumentar la absorción de la banda, y por tanto hacerla más ancha interfiriendo en el análisis de la misma y en consecuencia afectando la determinación del grado de desacetilación de la muestra (Kassai, 2008).

En la Figura 7 puede apreciarse un ligero ensanchamiento de la banda a la longitud de onda de 3450 cm^{-1} para las muestras de quitosano de ensilado (QE) y de quitosano comercial de media viscosidad (QM), lo que puede atribuirse a una mayor

presencia de enlaces O-H, mayormente debido a puentes de hidrogeno debido a una mayor cantidad de humedad en estas muestras.

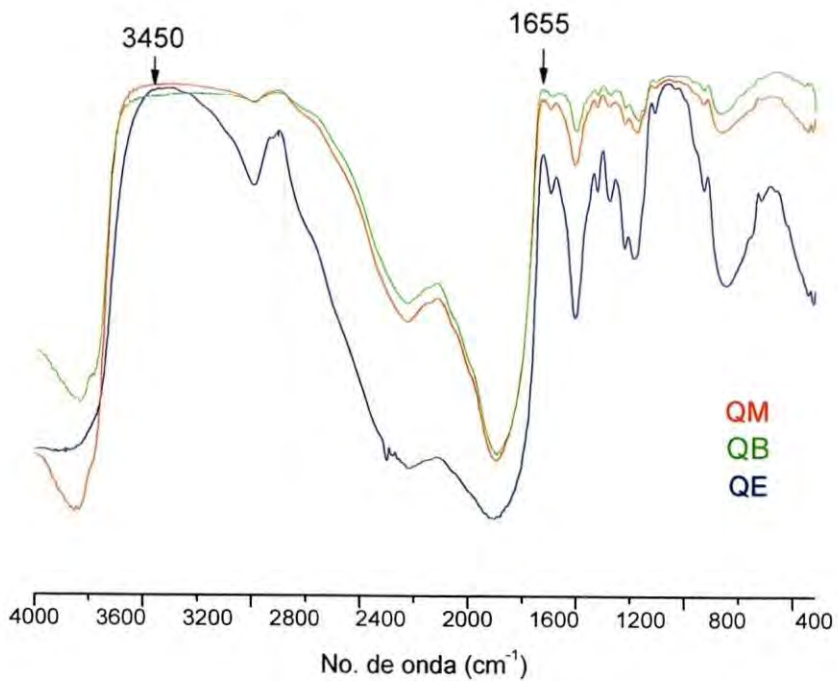


Figura 7. Espectros de infrarrojo para quitosano comercial (QM y QB) y para quitosano de ensilado (QE).

Debido a estas desventajas del método, se recomienda asegurarse de que las muestras a analizar no absorban humedad, dándoles un tratamiento de secado previo al análisis, y realizar un método estándar de comprobación como puede ser NMR, empleando muestras de quitosano de grado de desacetilación conocido.

Peso molecular.

El peso molecular se determinó mediante viscosimetría, por lo que primero se obtuvieron los valores de las viscosidades intrínsecas de los quitosanos.

La determinación del peso molecular del quitosano por viscosimetría ha sido evaluada por varios investigadores. Parada y col., (2004) determinaron el peso

molecular de quitosano obtenido a partir de quitina por vía química, encontrando que el método tienen linealidad y repetibilidad, por lo que se considera adecuado para la determinación. Otra de las consideraciones a tomar cuando se determina el peso molecular mediante la ecuación de Mark-Houwink, es el tipo y proporción de solventes usados para estimar la viscosidad, ya que un cambio en la fuerza iónica de la solución afecta los valores de las constantes y cambia el valor estimado del peso molecular (Tsaih y Chen, 1999).

El quitosano que se obtuvo del ensilado (QE), presentó una menor viscosidad comparado con los quitosanos comerciales analizados en este trabajo (Tabla 8). Esto indica una menor polimerización de este quitosano, lo que afectaría su peso molecular, lo que efectivamente se observó al obtenerse un peso molecular bajo (100kDa), comparado con los quitosanos comerciales etiquetados como de baja y mediana viscosidad. Esto sugiere que el quitosano de ensilado sufre una depolimerización durante el proceso de obtención del mismo lo que afecta su viscosidad y peso molecular.

Beaney y col., (2005) obtuvieron quitosano, a partir de quitina extraída por ensilado, con un peso molecular de 70.3 kDa, mientras que Sini y col., (2007) reportaron un quitosano con un peso molecular de 256 kDa. En ambos casos la quitina fue obtenida mediante un proceso biológico usando una fermentación con bacterias lácticas. Los valores bajos de peso molecular en el quitosano analizado, pueden atribuirse a una depolimerización durante el ensilaje.

Otro factor que puede afectar la determinación del peso molecular por viscosimetría, es la presencia de material mineral, específicamente calcio, que puede influir en la viscosidad del mismo, y por ende, en el peso molecular calculado (Beaney y col., 2005). Como se observa en la Tabla 7, el quitosano de ensilado contiene un mayor porcentaje de material inorgánico residual comparado con el quitosano comercial, lo que puede explicar el mayor valor de peso molecular determinado.

Actividad fungistática de quitosanos sobre *Aspergillus niger*.

El grado de actividad fungistática de los quitosanos sobre el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, es un parámetro importante para considerar su aplicación en la

conservación de alimentos que se ven afectados por este organismo. Dicho parámetro se evaluó mediante el efecto en el crecimiento radial y en la germinación de esporas del hongo.

Crecimiento Radial. Se determinó el radio de la colonia de *A. niger* cada 24 h en cada uno de los tratamientos. El diámetro de la placa fue cubierto por el hongo a las 144 h en el tratamiento control, tiempo al cual se detuvo la cinética. En la Figura 8 se observa que el crecimiento de la colonia del hongo se vio afectada por la presencia de quitosano, siendo más efectivo el quitosano comercial de mediana viscosidad (QM) en disminuir el radio de extensión del hongo. El quitosano de ensilado (QE) tiene también efecto sobre el crecimiento radial del hongo, siendo mayor que el del tratamiento ácido.

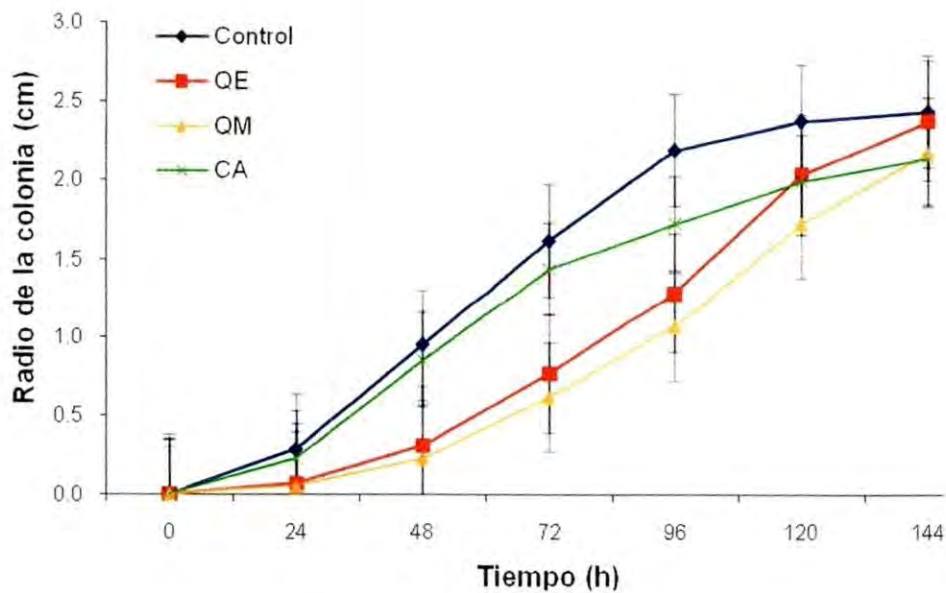


Figura 8. Efecto de los quitosanos sobre la extensión radial de las colonias de *Aspergillus niger*, a 25° C.

En la Tabla 9 se listan las velocidades de extensión radial y el porcentaje de actividad o índice fungistático para los quitosanos y en donde el mayor efecto se vio con el QM (56.164%), aunque no se observó diferencia significativa entre los quitosanos. Sin embargo, es evidente la acción fungistática de los quitosanos sobre el crecimiento radial de *A. niger*. Debido a que en ninguno de los tratamientos con quitosano hubo una inhibición completa, se considera que el efecto del quitosano sobre este hongo es de carácter fungistático. En un estudio realizado por Plascencia-Jatomea y col., (2003) se encontró un porcentaje de inhibición máximo del 73% en el crecimiento de *A. niger* en presencia de quitosano.

Tabla 9. Velocidad de extensión e índice fungistático de quitosanos en el crecimiento radial de *Aspergillus niger* a 25°C.

Tratamiento	Velocidad de extensión radial (cm/h)	Índice fungistático (%)
QE	0.0186	47.260 ^a
QM	0.0158	56.164 ^a
CA	0.0185	29.110 ^b
C	0.0158	—

QE: Quitosano de ensilado, QM: quitosano comercial de media viscosidad, CA: tratamiento con ácido acético, C: tratamiento control. Subíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

En otros estudios empleando hongos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer* (Guo y col., 2006; Rabea y col., 2006; y Hernández-Lazauro y col., 2008) tampoco se alcanzaron porcentajes de inhibición del 100%, a pesar del aumento en la concentración de los diferentes quitosanos y sus derivados empleados en cada estudio. Incluso se ha probado que aumentar las concentración de quitosano

no tiene un efecto mayor en la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (Bell y col., 1998), además está la dificultad de solubilizar el quitosano conforme se incrementa la concentración, lo que limita su aplicación.

Germinación de esporas. La germinación de esporas se midió a diferentes intervalos de tiempo (de 6 horas) obteniéndose la gráfica que se muestra en la Figura 9 donde se observa que hubo un mayor número de esporas germinadas en los tratamientos control y ácido que en aquellos que contenían quitosano. Entre los tratamientos con quitosano el número de esporas germinadas fue similar, encontrándose ambos en un 60% de germinación al final de la cinética, comparado con 100 y 99% de los tratamientos control y ácido, respectivamente

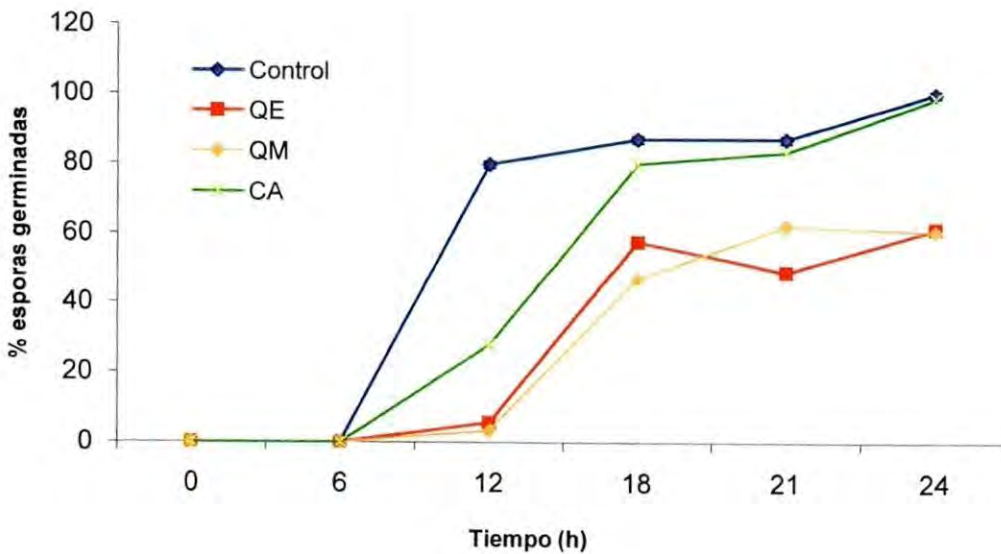


Figura 9. Efecto de los quitosanos sobre la germinación de esporas de *A. niger* a 25°C.

En la Tabla 10 se muestra la velocidad de germinación y el índice fungistático, en el cual no se observaron diferencias significativas entre los quitosanos, aunque se tuvo un porcentaje de 39% contra un 1.25% del tratamiento con ácido acético. En un estudio previo (Martínez-Camacho, 2006), el grado de actividad fungistática del QM sobre la germinación de *A. niger* fue de 47.5%, mientras que el de QB fue de 39.1%, ambos a una concentración de 3g/L, resultados que se aproximan a los obtenidos en este trabajo. Se observa mayor semejanza con el valor obtenido para una quitosano comercial de baja viscosidad (QB) lo cual puede deberse a que tanto este quitosano como el de ensilado (QE) son de bajo peso molecular, y ambos pueden actuar de manera similar en el crecimiento de *A. niger*. Además ambos quitosanos poseen valores similares de grado de desacetilación, lo que puede explicar la similar actividad fungistática reportada en ambos, y estrechamente relacionada con la proporción de grupos amino libres en el polímero.

Tabla 10. Velocidad de crecimiento e índice fungistático de quitosanos en el crecimiento radial de *Aspergillus niger* a 25° C.

Tratamiento	Velocidad de germinación (esporas/h)	Índice fungistático (%)
QE	9.24	38.75 ^a
QM	5.89	39.50 ^a
CA	6.11	1.25 ^b
C	9.26	-

QE: Quitosano de ensilado, QM: quitosano comercial de media viscosidad, CA: tratamiento con ácido acético, C: tratamiento control. Subíndices con la misma letra no son significativamente diferentes (P < 0.05).

En un estudio realizado por Plascencia-Jatomea y col., (2003), se encontró un porcentaje máximo de inhibición de la esporulación de *A. niger* del 40% a una concentración de 5g/L de quitosano, resultados que son similares a los encontrados en este trabajo.

La inhibición en la primer etapa del crecimiento del hongo, como lo es la germinación de esporas, supone una gran ventaja, puesto que más tiempo tardara el hongo en desarrollar colonias sobre el alimento en el que se encuentre, prolongando así su tiempo de vida de anaquel.

El hecho de que no existan diferencias significativas en el efecto fungistático de los quitosanos analizados, es también satisfactorio, pues indica que el proceso biológico seguido para la obtención del quitosano en este trabajo resulta en un producto comparable en calidad y actividad a un quitosano comercial.

El efecto fungistático del quitosano puede deberse a modificaciones morfológicas de las células fúngicas, como lo han demostrado varios estudios en diversos hongos sometidos a la acción del quitosano y observados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Plascencia-Jatomea y col., (2003), encontraron que el quitosano indujo la agregación de las esporas de *A. niger* y cambios morfológicos en las mismas. Un estudio por Hernández-Lazauro y col., (2008) sobre *Rhizopus stolonifer*, mostró que las esporas tratadas con quitosano presentaban un aumento en el número y profundidad de los surcos de las esporas, modificando por lo tanto la estructura de las esporas. Esto podría traer como consecuencia modificaciones en el tiempo de germinación o de terminación de la dormancia (Plascecia-Jatomea y col., 2003).

Muzzarelli y col., (2001), realizaron un estudio del efecto de quitosanos químicamente modificados sobre el crecimiento de *Saprolegnia parasítica*, encontrando, al observar las células por SEM, modificaciones estructurales como distorsión y retracción de las hifas así como alteración severa en el contenido citoplasmático, y disociación o daño en la pared y la membrana celulares.

Plascencia-Jatomea (2004), encontró también deformación de las hifas y daños en la superficie de las mismas cuando se trató *A. niger* con quitosanos.

Estas alteraciones morfológicas pueden resultar en una menor velocidad de germinación y de extensión radial del hongo cuando se le trata con quitosano.

Sin embargo, no se realizaron observaciones de microscopía electrónica en este trabajo por lo que es necesario un estudio más detallado al respecto, sobre todo en el efecto del quitosano sobre la pared y la membrana celular de *A. niger*.

Etapa 2:

Elaboración y Caracterización de Películas de Quitosano

Las películas de quitosano se elaboraron mediante evaporación de solvente y mediante extrusión. Las formulaciones de todas las películas de quitosano se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Claves y formulaciones de las películas de quitosano por evaporación de solventes y por extrusión.

Película	Formulación
QE	Quitosano de ensilado
QES	Quitosano de ensilado y sorbitol 20%
QM	Quitosano comercial de media viscosidad
QMS	Quitosano comercial de media viscosidad y sorbitol 20%
C	Control comercial de celofán
AX	Polietileno de baja densidad (LDPE)
AY	LDPE y 1% adhesivo
AZ	LDPE y 10% adhesivo
CX	LDPE y 5% quitosano comercial de baja viscosidad (QB)
CY	LDPE, 5% QB, y 1% adhesivo
CZ	LDPE, 5% QB y 10% adhesivo

En el caso de las películas por evaporación se usó sorbitol como plastificante debido a que en estudios anteriores se ha observado que las películas de quitosano puro son quebradizas y es necesaria la adición de agentes plastificantes. Los plastificantes son aditivos que se utilizan para mejorar la flexibilidad o plasticidad de los polímeros (Suyatma y col., 2005). Funcionan disminuyendo las fuerzas intermoleculares de los polímeros suavizando la rigidez de la estructura de la película e incrementando la movilidad de las cadenas biopoliméricas lo que mejora las propiedades mecánicas (Srinivasa y col., 2007b). Uno de los plastificantes más usado es el sorbitol, que además de ser una molécula de pequeño tamaño, mejora también la permeabilidad al vapor de agua de las películas.

Para el análisis de las propiedades mecánicas de las películas de quitosano por evaporación de solventes (Figura 10), se cortaron tiras de 8x0.5 cm. Para el análisis de calorimetría se cortaron círculos de 0.6mm de diámetro así como para el análisis estructural mediante espectroscopía de infrarrojo. En el caso de las películas extrudidas, únicamente se realizaron con quitosano comercial de baja viscosidad (QB), puesto que este cumplía con el requisito de tamaño de partículas necesario para su extrusión y posterior quebrado en pellets.



Figura 10. Películas de quitosano obtenidas por evaporación de solventes.

Una vez preparados los pellets en base a las formulaciones establecidas en la Tabla 6, se procedió a la extrusión de los mismos para la obtención de las películas (Figura 11). Cuando se intentó procesar las muestras de las formulaciones con 10g/100g (p/p) de quitosano, la muestra no se fundió correctamente causando el taponamiento del orificio de salida y que no se obtuvieran las películas. Por ello se determinó procesar y analizar las muestras de los tratamientos sin quitosano y las que contenían solo 5g/100g (p/p) del polímero.

Se encontró que las películas de quitosano extrudidas presentaban pequeños grupos o agregados, debido a la acumulación en esos puntos de quitosano, de manera similar a lo reportado por Plascencia-Jatomea (2004) en películas de LDPE y quitosano por extrusión. Además, al igual que en el presente trabajo, observó que las películas perdían homogeneidad y transparencia conforme se aumentaba la concentración de quitosano en las mezclas. Para los análisis se cortaron tiras de las películas extrudidas cubriendo el intervalo de 30min de extrusión, es decir, se tomaron muestras entre los 120 y 180cm de largo total de la tira extrudida. De este mismo sector se tomaron las muestras para el análisis estructural mediante espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier

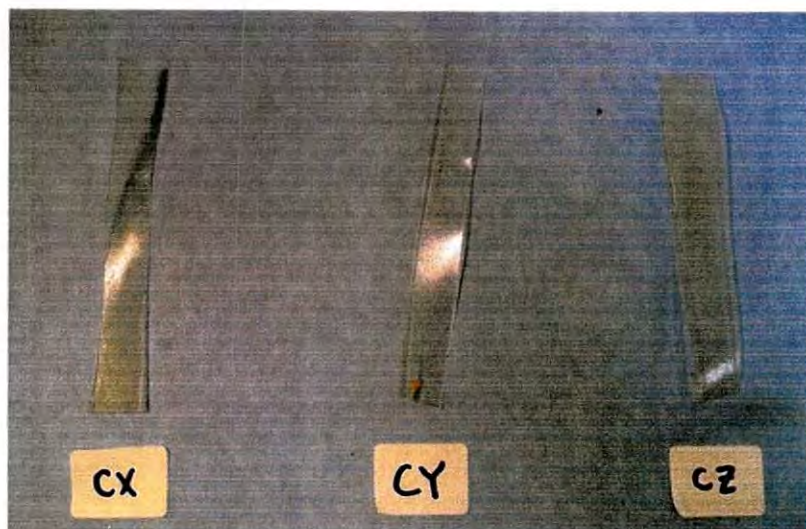


Figura 11. Películas extrudidas de quitosano y LDPE (CX), de quitosano, LDPE y 1% adhesivo (CY), y de quitosano, LDPE y 10% adhesivo (CZ).

Grosor.

El grosor de las películas de quitosano se muestra en la Tabla 12. La adición de sorbitol no modificó significativamente el espesor de las películas, contrario a lo obtenido por Plascencia-Jatomea (2004), donde una adición de 17% sorbitol a la mezcla aumentó el espesor de las películas de quitosano por evaporación. Sin embargo hay diferencia entre los tipos de quitosano, siendo las películas de QM las de mayor grosor. El grosor de las películas es una medida de la densidad de las mismas y que se relaciona con el volumen molecular del anión correspondiente al solvente en el cual se disolvió el quitosano (Bégin y Van Calsteren, 1999). El mayor peso molecular del quitosano comercial de media viscosidad comparado con el quitosano de ensilado, puede explicar el grosor ligeramente mayor en las películas elaboradas con dicho polímero. Es posible también que durante el proceso de evaporación y formación de la película, las soluciones formadoras de películas se gelificaran antes de que las moléculas tanto del polímero como del anión y del plastificante, pudieran alinearse y compactarse. Si se utilizan otros compuestos como plastificantes o agentes antimicrobianos, con un volumen molecular mayor al de anión, en este caso ácido acético, se obtienen películas suaves que pueden ser usadas para elaborar películas multicapas o cubiertas (Bégin y Van Calsteren, 1999). Por otro lado, el grosor de las películas obtenidas por extrusión fue estadísticamente diferente del presentado por las películas por evaporación, siendo más gruesas. No se detectó efecto significativo en el espesor de las películas debido a la incorporación del adhesivo, sin embargo la película AZ (sin quitosano y 10g de adhesivo), presentó un grosor mayor a todas las demás y estadísticamente diferente a las películas con quitosano y adhesivo (CY y CZ), lo que puede sugerir alguna interacción entre ambos compuestos, que resulte en un ligero aumento del espesor de las películas.

Propiedades Mecánicas.

Una de las características más importantes de las biopelículas es su funcionalidad, relacionada con sus características mecánicas como la fuerza de la estructura, que se determina mediante el esfuerzo aplicado al material y la deformación resultante (Rayas y col., 2003).

Los parámetros medidos para determinar la resistencia mecánica de las películas son la fuerza tensil (FT), el porcentaje de elongación (%E) y el módulo de elasticidad (ME). La fuerza tensil indica la tensión máxima que puede soportar una película antes de romperse, el porcentaje de elongación es el cambio máximo en la longitud final de la película antes de que se rompa, y el modulo de elasticidad es una medida que indica la rigidez de la película (Srinivasa y col., 2007a). Las características mecánicas determinadas (porcentaje de elongación y fuerza tensil) para las películas de quitosano se muestran también en la Tabla 12.

Tabla 12. Propiedades mecánicas y grosor de las películas de quitosano por evaporación y extrusión.

Película	Grosor (mm)	Elongación (%)	Fuerza tensil (MPa)
QE	0.027 ± 0.005 ^d	11.48 ± 6.011 ^d	25.16 ± 4.69 ^{cde}
QES	0.015 ± 0.010 ^d	27.77 ± 6.799 ^d	28.91 ± 7.86 ^{cd}
QM	0.040 ± 0.006 ^d	4.67 ± 4.220 ^d	51.85 ± 19.25 ^b
QMS	0.057 ± 0.019 ^d	35.48 ± 32.275 ^{cd}	28.60 ± 10.21 ^c
C	0.032 ± 0.001 ^d	10.56 ± 3.632 ^d	79.98 ± 3.81 ^a
AX	0.167 ± 0.015 ^c	314.683 ± 78.012 ^{ab}	13.26 ± 1.842 ^{de}
AY	0.244 ± 0.053 ^{bc}	359.54 ± 125.764 ^a	14.937 ± 0.831 ^{cde}
AZ	0.402 ± 0.057 ^a	428.447 ± 31.089 ^a	14.317 ± 1.459 ^{cde}
CX	0.340 ± 0.038 ^{ab}	85.357 ± 35.065 ^{cd}	12.72 ± 0.239 ^e
CY	0.198 ± 0.011 ^c	107.94 ± 38.413 ^{cd}	10.533 ± 0.178 ^e
CZ	0.222 ± 0.054 ^c	183.073 ± 16.166 ^{bc}	11.513 ± 0.086 ^e

Subíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$). QE: Quitosano de ensilado, QES: Quitosano de ensilado y sorbitol, QM: Quitosano comercial de media viscosidad, QMS: Quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, C: película de celofán,

El porcentaje de elongación es una medida de la flexibilidad y extensibilidad, en otras palabras, de la elasticidad de la película, y se determina en el punto en donde las

películas se rompen (punto de ruptura) cuando se les somete a un estiramiento, como fue el caso del ensayo de tensión realizado en este trabajo. Se expresa como el porcentaje de cambio entre la longitud original de la probeta (muestra) entre las pinzas del equipo, y la longitud final de la película ya estirada antes de la ruptura (Bourtoom y Chinnan, 2008).

En este parámetro no se observaron diferencias significativas entre las películas de quitosano elaboradas por evaporación con respecto al control de celofán, lo que indica que la flexibilidad de estas películas es similar. La adición de sorbitol como agente plastificante incrementó el porcentaje de elongación en estas películas, lo que indica que este compuesto cumplió su función de plastificar, tal como se observa en la Figura 12 con la disminución del esfuerzo y el aumento en la deformación.

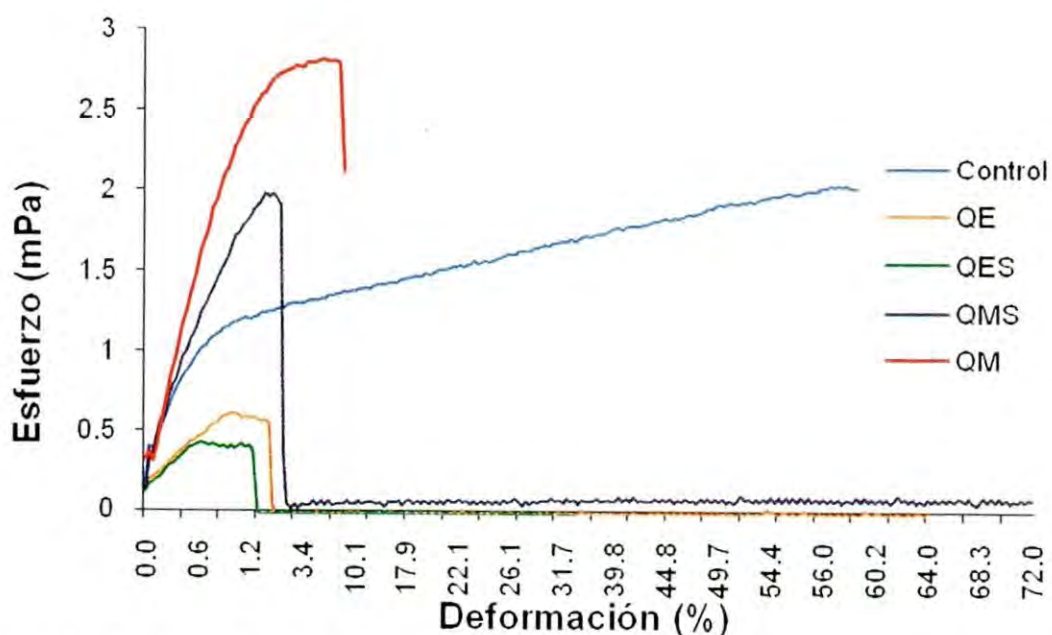


Figura 12. Curvas de esfuerzo vs deformación de las películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes. QE: películas de quitosano de ensilado, QES: películas de quitosano de ensilado con sorbitol, QM: películas de quitosano comercial, QMS: quitosano comercial con sorbitol y Control: película de celofán.

Srinivasa y col., (2007b) encontraron que la adición de sorbitol en las películas de quitosano aumentaba el porcentaje de elongación de 10.84% a 42.50%, tendencia que también se observó en este trabajo en ambos quitosanos. Además las películas con sorbitol resultaron ser más flexibles que las otras películas plastificadas con glicerol y polietilenglicol. Por lo que la plastificación con sorbitol resulta adecuada para mejorar las propiedades elásticas de las películas de quitosano.

Los valores de porcentaje de elongación para las películas por evaporación son bajos comparados con los obtenidos en las películas de quitosano elaboradas por extrusión, en las cuales se observó una disminución del porcentaje de elongación con la presencia del polímero, con respecto a aquellas en donde no se encontraba. Resultados similares se reportaron por Bourtoom y Chinnan (2008), en donde las películas elaboradas de mezclas de almidón de arroz y quitosano tuvieron valores de elongación que disminuían conforme se incrementaba la concentración de quitosano en dichas películas. Sin embargo, estas películas fueron elaboradas por evaporación no por extrusión, por lo que no hay referencia para comparación. Un estudio realizado por Arvanitoyannis y col., (1998), sobre películas extrudidas de almidón, caseinato de sodio y sorbitol, mostró que la adición de sorbitol aumentó el porcentaje de elongación de las películas. Empero, es necesario realizar más estudios sobre el efecto del quitosano en las propiedades mecánicas de las películas extrudidas.

En lo que se refiere a la fuerza tensil, ésta resultó ser menor en las películas extrudidas que en las preparadas por evaporación. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las películas extrudidas, no así para el caso de las películas evaporadas en donde la película de control de celofán presentó fue estadísticamente diferente a las demás, exhibiendo un mayor valor. Es decir que es necesaria la aplicación de una fuerza mayor para lograr la ruptura del material. Mientras que la presencia de quitosano parece disminuir la fuerza tensil en todas las muestras. No se aprecia efecto de la presencia de sorbitol ni de adhesivo en el caso de las películas extrudidas.

En la Figura 13 se muestran las curvas de esfuerzo-deformación para las películas de quitosano extrudidas, en donde se observa que el esfuerzo es mayor en las

películas extrudidas que en las evaporadas, así como la deformación, lo que demuestra sus características más plásticas que en

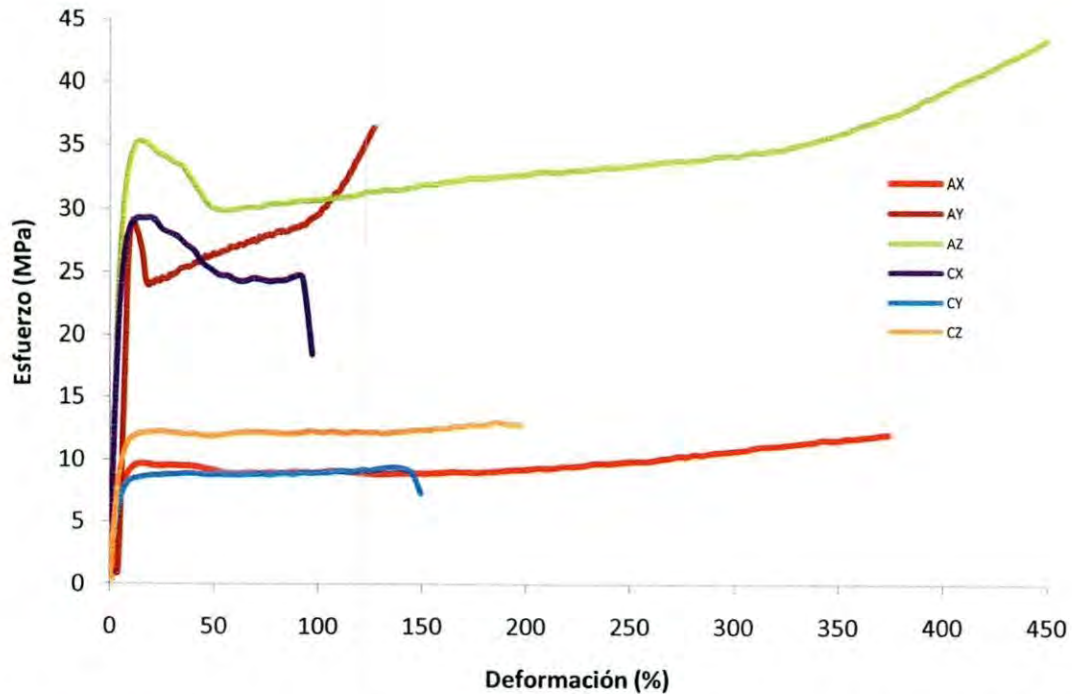


Figura 13. Curvas de esfuerzo vs deformación de películas de quitosano extrudidas, AX: película extrudida de LDPE, AY: película extrudida de LDPE y 1% adhesivo, AZ: película extrudida de LDPE y 10% adhesivo, CX: película extrudida de quitosano y LDPE, CY: película extrudida de quitosano, LDPE y 1% adhesivo, y CZ: película extrudida de quitosano, LDPE y 10% adhesivo.

Plascencia-Jatomea (2004) mostró que las películas extrudidas de quitosano con LDPE fueron más moldeables y más elásticas que aquellas elaboradas por evaporación de solventes, así como ser más resistentes a la elongación y al esfuerzo a la ruptura, sin embargo dichas propiedades fueron disminuyendo conforme se aumentaba la concentración de quitosano en dichas películas.

En general la adición de quitosano disminuyó el esfuerzo necesario para la deformación así como la deformación de las películas antes de su ruptura.

Parece haber una interacción del adhesivo con el quitosano que causa una disminución en el esfuerzo aplicado a las películas extrudidas, ya que las películas con adhesivo y quitosano (CY y CZ) necesitan un menor esfuerzo que en la película sin adhesivo (CX). Además, las películas con adhesivo pero sin quitosano (AY y AZ) tienen un comportamiento similar, mientras que la película sin adhesivo (AX) registra un menor esfuerzo como en el caso de CX. Este comportamiento que indica una posible interacción del adhesivo con el quitosano debe ser investigado más a fondo, para ello se recomienda hacer un análisis de espectroscopía de infrarrojo y de calorimetría de dichas películas, ya que estos análisis pueden ayudar a esclarecer la miscibilidad de las moléculas en la mezcla.

Calorimetría Diferencial de Barrido.

Este análisis se hace para ver la miscibilidad y la estabilidad térmica de las mezclas de quitosano y plastificante, ya que la miscibilidad de estas moléculas en la fase amorfa se puede determinar por parámetros como la temperatura de transición vítrea (Cheung y col., 2002; Sakurai y col., 2000; Peesan y col., 2005). Se realizó un solo calentamiento, 26°C hasta 300°C, para todas las películas. Los termogramas obtenidos para las películas de quitosano plastificadas y no plastificadas elaboradas por evaporación de solventes se muestran en la Figura 14.

Como se observa en la gráfica, la adición de sorbitol desplaza hacia la izquierda la aparición del primer pico. Sin embargo, el pico presente entre los 60 y 100°C se puede atribuir a la evaporación de agua por lo que la entalpía de este pico representa la energía necesaria para evaporar el agua presente en las películas (Suyatma y col., 2005). Además, las películas de quitosano tienen una mayor afinidad a las moléculas de agua que el quitosano en polvo, quizá debido a la protonación de las moléculas de quitosano en la película (Fernández-Cervera y col., 2004). Es posible que exista interacción entre las moléculas de agua presentes en las películas y el sorbitol lo que hace que cambie la temperatura del primer pico. Debido al efecto que puede tener el contenido de humedad en la determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g) del quitosano en las películas, varios investigadores sugieren realizar dos ciclos de calentamiento y enfriamiento, el primero sin llegar a la temperatura de

degradación térmica del quitosano que se estima entre 200 y 250°C (Sakurai y col., 2000; Dong y col., 2004; Peesan y col., 2005; Suyatma y col., 2005). Sin embargo, todas las películas presentan el inicio del pico de degradación alrededor de los 250°C, temperatura a la cual se ha reportado inicia la degradación térmica del quitosano (Sakurai y col., 2000). Por ello se recomienda que se realice otro análisis hasta al menos 350°C.

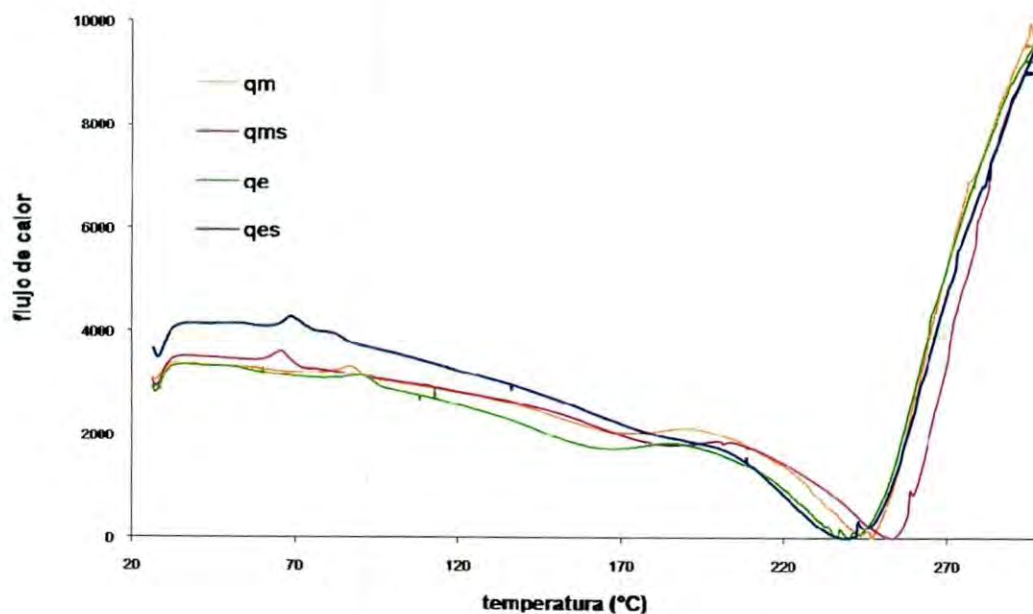


Figura 14. Termogramas de calorimetría diferencial de barrido de las películas de quitosano por evaporación de solventes. qm: película de quitosano comercial de media viscosidad, qms: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, qe: película de quitosano de ensilado y qes: películas de quitosano de ensilado con sorbitol.

En la Tabla 13 se muestran las temperaturas de transición vítrea determinadas para estas películas, donde se observa que no hubo diferencia significativa entre las distintas mezclas y que dicha temperatura se encontró entre 167 y 184°C.

Tabla 13. Temperaturas de transición vítrea de películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes.

Película	Tg (°C)
QM	167.9 ± 33.651 ^a
QMS	172.0 ± 1.414 ^a
QE	169.8 ± 9.242 ^a
QES	184.1 ± 23.342 ^a

Subíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$). QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol.

Cheung y col., (2002) determinaron la Tg de películas de polihidroxibutirato con quitosano resultando de 103°C, que fue única, por lo que estos investigadores concluyeron que los compuestos fueron totalmente miscibles. En este caso solo se encontró una sola Tg por lo que se asume que el sorbitol y el quitosano fueron miscibles. Sakurai y col., (2000) obtuvieron una Tg de 203°C para películas de quitosano en ácido acético. Dong y col., (2004) reportaron una Tg de 140 a 150°C para películas de quitosano con diferente grado de desacetilación sin encontrar un efecto significativo de este sobre la temperatura de transición vítrea. Suyatma y col., (2005) la reportaron a 178°C para películas de quitosano plastificadas con glicerol, resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo.

A pesar de no haber encontrado diferencia significativa debido al tipo de película, se observa que en presencia de sorbitol, las películas QMS y QES tuvieron una ligeramente mayor temperatura de transición vítrea, resultados contradictorios los encontrados por Suyatma y col., (2005), en donde conforme se aumentaba la concentración de plastificante (glicerol, etilenglicol, polietilenglicol y propilenglicol) la Tg disminuía. Es posible, sin embargo, que el plastificante haya contribuido a una

ordenamiento de las cadenas de polímero y a favorecer las interacciones entre el mismo aumentando su carácter cristalino.

Los pequeños cambios en la pendiente de las curvas de los termogramas se explican en base al cambio en el volumen específico o movilidad molecular a la temperatura de transición vítrea que puede ser pequeño debido a la parcial cristalinidad del quitosano (Sakurai y col., 2000; Dong y col, 2004).

Por otro lado, no se realizaron estos estudios para el caso de las películas extrudidas debido a que se llegó al término del tiempo establecido para este trabajo. Se recomienda realizar otro análisis de las películas, incluyendo las elaboradas por extrusión, ampliando el rango de temperatura hasta 350°C mínimo, así como realizar dicho estudio en dos ciclos de calentamiento y enfriamiento para descartar por completo el efecto de la humedad en la determinación de la Tg.

Espectroscopia de Infrarrojo transformada de Fourier (FTIR).

El análisis de FTIR en las películas ayuda a elucidar las interacciones entre las moléculas de quitosano y plastificante. En la Figura 15a se presentan los espectros de las películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes.

El pico más ancho que se observa en los espectros se atribuye a los estiramientos del enlace O-H (desde 3200 hasta 3570 cm^{-1}), que pueden ser de tanto de los enlaces de los grupos OH presentes en la molécula (Coates, 2000) como a los puentes de hidrógeno establecidos en las películas con la humedad presente en las mismas, lo que llevaría a un ensanchamiento de dicho pico.

Se observa sin embargo que las películas QE y QES tienen un ensanchamiento mayor en esa zona, lo que podría atribuirse a una mayor interacción de agua con el polímero. Rueda y col., (1999) encontraron que aún sometiendo las películas de quitosano a un proceso de secado, se observa el pico alrededor de 3400 cm^{-1} ensanchado, lo que indica una fuerte interacción entre los grupos hidroxilo.

Se observa que en las películas elaboradas por extrusión (Figura 15b), dicho pico es más angosto, esto debido a la naturaleza hidrofóbica del LDPE usado como polímero base para la obtención de estas películas.

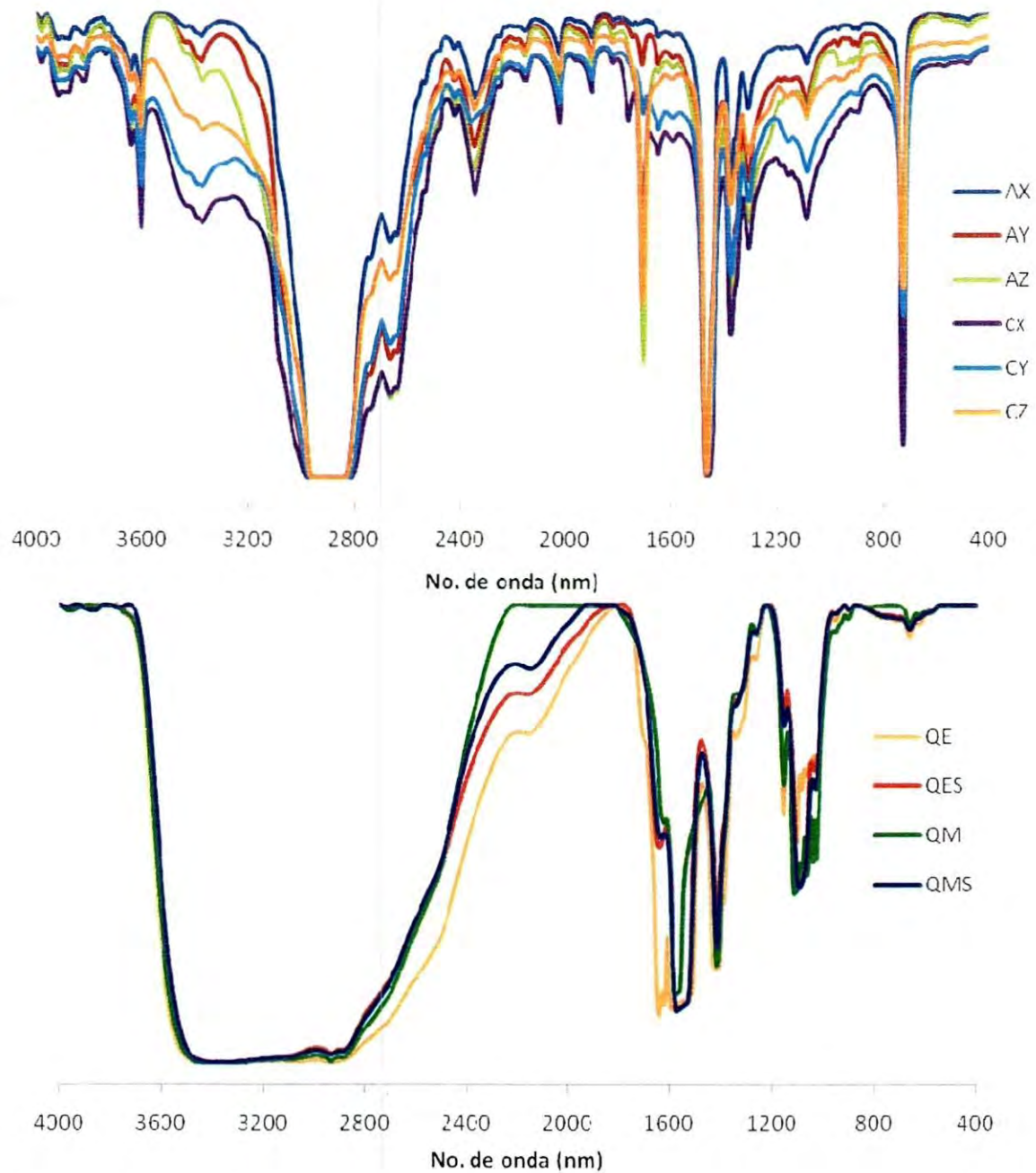


Figura 15. Espectros de FTIR de películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes (a) y (b) por extrusión. QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol. AX: película extrudida de LDPE, AY: película extrudida de LDPE y 1% adhesivo, AZ: película extrudida de LDPE y 10% adhesivo, CX: película extrudida de quitosano y LDPE, CY: película extrudida de quitosano, LDPE y 1% adhesivo, y CZ: película extrudida de quitosano, LDPE y 10% adhesivo.

También se ubicó el pico a 1650 cm^{-1} en el caso de la película, debido al enlace N-H del grupo amino, característico de la molécula de quitosano. Se observa un desplazamiento hacia la derecha en dicho pico para todas las películas, excepto en QE. Park y col., (2001) reportaron la aparición del pico característico del grupo amino del quitosano en películas alrededor de 1570 cm^{-1} . El ligero desplazamiento de este pico sugiere un incremento en los puentes de hidrógeno formados entre el grupo -NH_2 del quitosano y el sorbitol. Sin embargo, la estructura general del espectro no se modifica en mayor grado con la adición de sorbitol, por lo que se asume que hubo una buena miscibilidad de dicho agente plastificante con el quitosano, lo que se corrobora con la calorimetría en donde solo se obtuvo un valor de Tg.

En cuanto a las películas de quitosano extrudidas no se observaron muchas diferencias en los picos. En el caso de las películas CZ y AZ, se observa la aparición de un pico a 1704 cm^{-1} . En dichas películas se tiene la más alta concentración de adhesivo pero en CZ se tiene también quitosano, por lo que dicho pico se puede deber a una interacción entre dichos compuestos, y entre el LDPE, a esa proporción. No se observó el pico característico del quitosano a 1650 cm^{-1} posiblemente debido a una interacción del grupo amino con el resto de los compuestos presentes en la mezcla.

Etapas 3:

Actividad Fungistática de las Películas de Quitosano

La actividad fungistática de las películas de quitosano sobre *A. niger* se determinó mediante el crecimiento radial y la germinación de esporas. Sin embargo la germinación no fue determinada como tal, sino que se analizaron el diámetro de las esporas mediante microscopía, debido a la dificultad de encontrar la cantidad de esporas suficientes para el cálculo de la germinación de las mismas.

Crecimiento Radial.

En el caso de las películas, el crecimiento radial del hongo se determinó mediante las dos técnicas de inoculación descritas en la sección de materiales y métodos. La inoculación sobre la película se hizo para evaluar el efecto de la limitación del paso de oxígeno a través de la misma, en el crecimiento del hongo cuando este se encuentra debajo de la película.

En la Tabla 14 se muestra la actividad fungistática de las películas de quitosano por evaporación así como la velocidad de extensión radial de *A. niger*.

Tabla 14. Velocidad de extensión e índice fungistático de películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes en el crecimiento radial de *Aspergillus niger* a 25°C.

Tratamiento	Inoculación	Velocidad de extensión radial (cm/h)	Índice fungistático (%)
QM	A	0.030	33.33 ^a
	D	0.020	44.52 ^a
QMS	A	0.031	26.94 ^a
	D	0.029	19.68 ^a
QE	A	0.029	15.49 ^a
	D	0.029	9.35 ^a
QES	A	0.030	21.89 ^a
	D	0.029	17.74 ^a
C	A	0.029	-
	D	0.029	-

A: inoculación por arriba de la película, D: inoculación por debajo de la película. Subíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$). QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol y C: película control de celofán.

No se observaron diferencias significativas entre los tipos de películas sobre la actividad fungistática, así como del tipo de inoculación empleado. Tampoco hubo diferencias en lo que se refiere a la velocidad de extensión radial, ni por efecto del tipo de películas ni por el tipo de inoculación. Es posible que la permeabilidad al oxígeno por parte de las películas, permita un crecimiento similar del hongo cuando se encuentra debajo de estas, que como cuando se inocula por encima.

La protección que brindaría un empaque con este material sería igual tanto por dentro como por fuera del mismo. Sin embargo el valor máximo de actividad fungistática de estas películas fue de 44.52% en el caso de las películas de quitosano comercial de media viscosidad sin plastificar (QM), para una inoculación por debajo de la película, lo que sería equiparable al efecto que tendría el empaque hecho con esta película sobre el hongo presente en la superficie del alimento empacado. Los valores de actividad de las películas son similares e incluso ligeramente mayores que los reportados para los quitosanos puros (Tabla 7). Valores más altos pueden deberse al efecto de la película sobre el paso de oxígeno que limita el crecimiento del hongo.

Como se observa en la Figura 16b, la cinética de crecimiento radial llegó a su término a las 96 h en el caso de la inoculación por arriba de la película, 24 h antes que en el caso de la inoculación por debajo (figura 16a). Esto supone un mayor tiempo de protección del empaque contra el hongo que crece en el alimento comparado con el que podría en un determinado caso crecer en el exterior de la película.

También se observa que el radio de la colonia es mayor en las películas de quitosano de ensilado que en el control (película de celofán), en determinados tiempos de muestreo para ambos tipos de inoculación. Mientras que las películas de quitosano comercial de media viscosidad tuvieron un menor radio de la colonia también en ambos tipos de inoculación.

Sebti y col., (2005) determinaron el efecto de las películas de quitosano sobre la germinación de esporas de *A. niger*, encontrando una inhibición completa de las esporas a los 10 días de incubación. Colocaron el inóculo del hongo en agar Sabouraud y sobre este la película de quitosano al 1%.

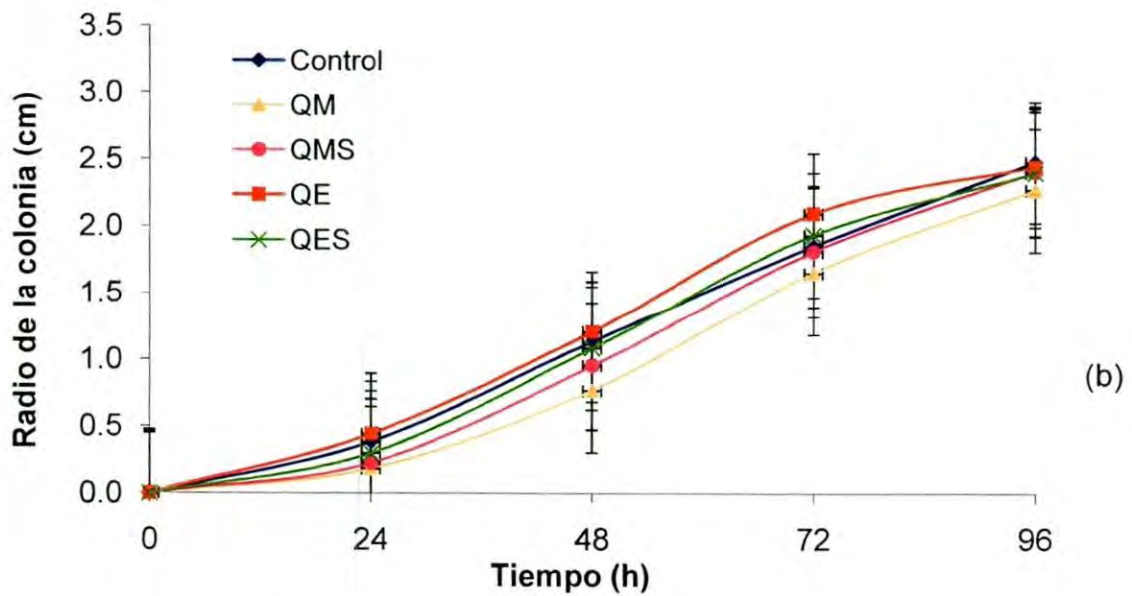
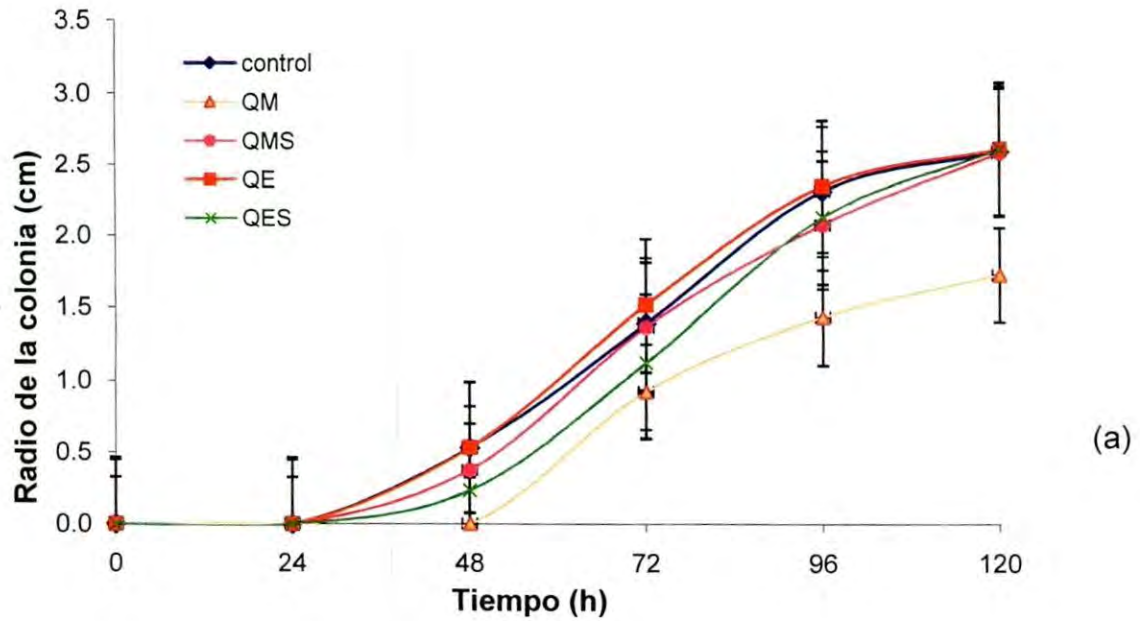


Figura 16. Crecimiento radial de *A. niger* en películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes por (a) inoculación debajo y (b) por arriba de la película. QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol y Control: película de celofán.

Sin embargo, los autores atribuyeron el alto grado de inhibición a una limitación en la disponibilidad del oxígeno debida a la película lo que eventualmente limita también el potencial de germinación de las esporas.

Sebástien y col., (2006) realizaron un estudio de la actividad fungistática de películas de quitosano con polietilenglicol (PEG) y ácido poliláctico (PLA); colocaron las películas sobre la superficie del agar previamente inoculado con *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* y *A. ochraceus*, encontrando inhibición total del crecimiento de dichos hongos cuando el quitosano estaba presente en la mezcla.

Otros investigadores encontraron inhibición significativa en el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, entre otros (Mi y col., 2006; Möller y col., 2004), cuando se les depositaba sobre la colonia, o viceversa, a la película de quitosano o de compositos de quitosano.

Chung y col., (2004) mostraron que las bacterias gran-negativas tienen son más hidrofílicas que las gran-positivas (como *E. coli* y *S. aureus*), lo que favorecía la absorción del quitosano por las células, lo que su vez provocó mayores cambios en la estructura de la pared celular y en la permeabilidad de la membrana, causando la muerte de la célula.

En el caso del efecto del quitosano en la estructura celular de los hongos se ha observado que ocasiona agregación de las esporas, afecta la salida del tubo germinal e interfiere con el paso de nutrientes a través de la membrana. Exámenes de microscopía de epifluorescencia mostraron una probable acción del quitosano sobre los ácidos nucleicos (Plascencia-Jatomea, 2004; Sebtí y col., 2005). Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar el mecanismo de acción del quitosano en forma de películas sobre el crecimiento de hongos, particularmente, sobre *A. niger*.

Parámetros Morfométricos (Diámetro de Hifas y Esporas).

Se determinó el diámetro de hifas y esporas de *A. niger* en presencia de películas de quitosano elaboradas por evaporación de solventes.

Diámetro de hifas.

Para esta determinación se tomaron al menos 5 diámetros por campo de observación en microscopio óptico marca Olympus CX31 (Japón), mediante el análisis de las imágenes con el software analizador de imágenes (Image Pro-Plus versión 6.3 para Windows). En la Tabla 15 se muestran el diámetro de hifas y esporas de *Aspergillus niger* en presencia de las películas de quitosano.

Tabla 15. Diámetro de esporas e hifas de *A. niger* en presencia de películas de quitosano, inoculación por debajo de la película.

Película	Diámetro hifas (μm)	Diámetro esporas (μm)
C	6.261 ± 1.767^{ab}	1.988 ± 0.681^a
QE	5.771 ± 0.577^b	4.454 ± 2.848^a
QES	6.665 ± 0.674^a	4.550 ± 1.883^a
QM	5.865 ± 0.674^b	4.557 ± 1.710^a
QMS	6.940 ± 1.208^a	5.670 ± 1.495^a
AX	—	4.225 ± 1.414^a
AY	—	4.398 ± 1.896^a
AZ	—	5.749 ± 0.970^a
CX	—	2.544 ± 0.152^a
CY	—	9.028 ± 4.690^a
CZ	—	5.555 ± 0.718^a

Subíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$). C: película control de celofán, QE: película de quitosano de ensilado, QES: película de quitosano de ensilado con sorbitol, QM: película de quitosano comercial de media viscosidad, QMS: película de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, AX: película extrudida de LDPE, AY: película extrudida de LDPE y 1% adhesivo, AZ: película extrudida de LDPE y 10% adhesivo, CX: película extrudida de quitosano y LDPE, CY: película extrudida de quitosano, LDPE y 1% adhesivo, y CZ: película extrudida de quitosano, LDPE y 10% adhesivo.

Como se observa en dicha tabla, no hay un efecto significativo de la presencia de las películas de quitosano sobre el diámetro de las esporas. Sin embargo esto puede deberse a que fue difícil encontrar suficientes esporas aun en la superficie de la película como para valorar la determinación. Por otro lado, se observaron diferencias en el diámetro de las hifas, siendo las películas de quitosano sin plastificar diferentes y con un diámetro menor. Esto indica que en presencia de quitosano y plastificante, las hifas sufren un hinchamiento incrementando así su diámetro.

Plascencia-Jatomea (2004) reportó que el quitosano en solución añadido al medio de cultivo, provocaba un incremento drástico del diámetro de las hifas conforme se incrementaba la concentración de quitosano. Dicho aumento pudo deberse a una afección de la pared celular por parte del quitosano o a cambios en la presión y tensión de la pared. El diámetro de las hifas de *A. niger* en quitosano a una concentración de 3g/L fue de 7.8 μm , y en ausencia de quitosano, de 5.9 μm .

En este trabajo es posible que el efecto de las películas de limitar el paso de oxígeno y agua tuviera el efecto contrario y disminuyera el diámetro de las hifas, ya que el hongo fue inoculado sobre el agar y sobre él se colocó la película. Se sugiere el mismo análisis pero en películas, sobre las cuales se inocule el hongo con el fin de descartar la limitante del paso de oxígeno y agua.

Diámetro de esporas.

En el caso del diámetro de las esporas no se observaron diferencias significativas debido al tipo de película analizada; asimismo, no se observa tampoco un efecto de la adición de sorbitol sobre el ancho de las esporas, así como del adhesivo en el caso de las películas extrudidas. Sin embargo, la película control de celofán fue la que menor diámetro de las esporas registró, lo que sugiere que la presencia de quitosano, al menos para el caso de las películas por evaporación, aumenta el diámetro de las esporas, hecho que reportó Plascencia-Jatomea (2004) mediante un análisis de microscopía electrónica de barrido sobre esporas de *A. niger* tratadas con soluciones de quitosano en el medio de cultivo.

En la Figura 17 se aprecia las diferencias presentadas en las estructuras de las hifas del hongo sometido a las películas de quitosano colocadas sobre la colonia del mismo, en microscopía óptica mediante analizador de imágenes. Puede observarse que las hifas en presencia de quitosano son más lisas que las que se presentan en la película control de celofán (figura 17a), se observa también que en la película QES la hifa presenta gran número de cuerpos (vacuolas) al interior de la misma, lo cual no se observó en el resto de las películas.

En necesario un estudio más preciso para observar modificaciones en el nivel de la membrana y pared celular, así como incluir el análisis del efecto de las películas de quitosano extrudidas sobre la morfología del hongo.

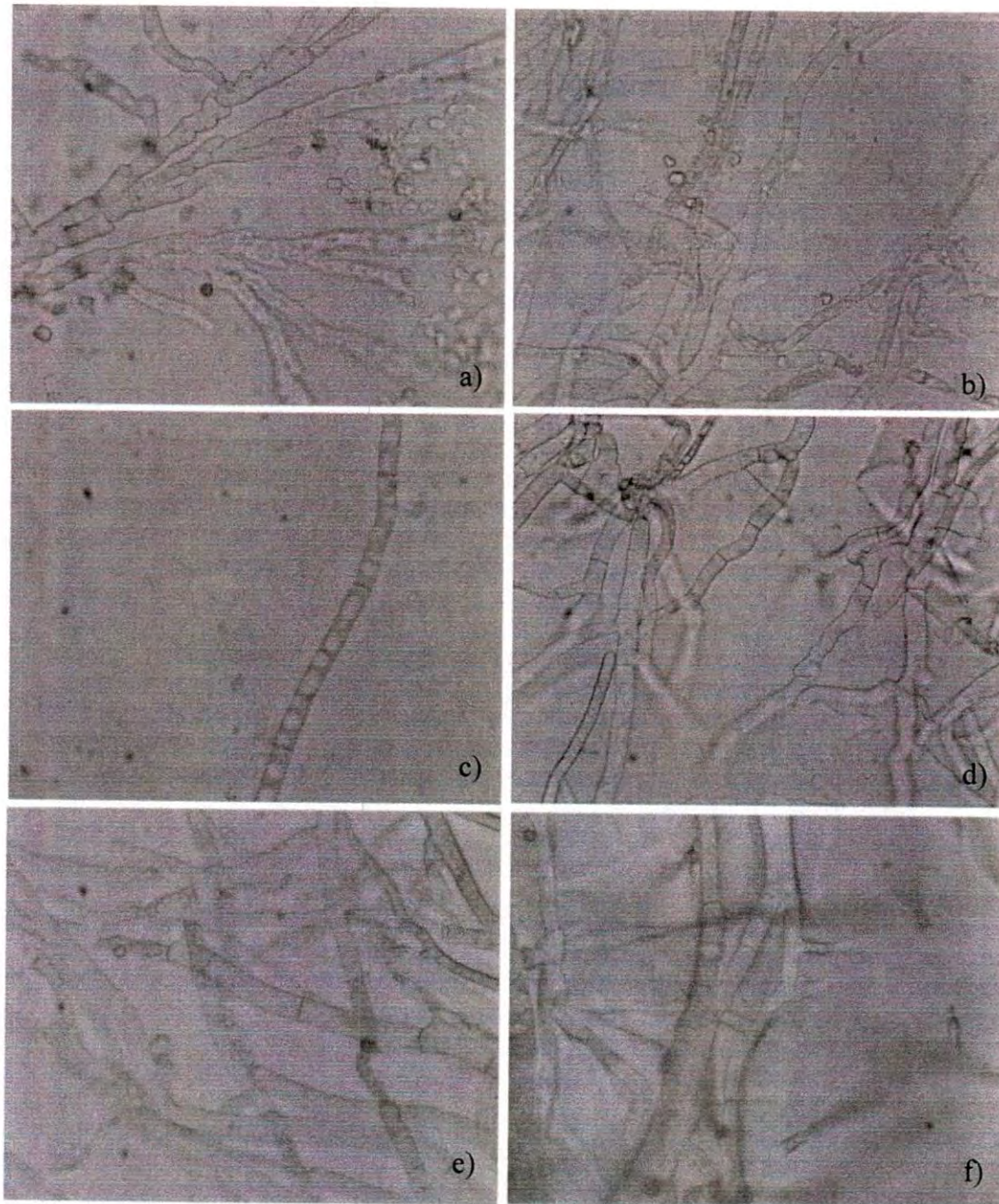


Figura 17. Hifas de *A. niger* a 10h de incubación observadas a 40x, en las diferentes películas: a) control de celofán, b) película (QE) de quitosano de ensilado sin sorbitol, c) película (QES) de quitosano de ensilado con sorbitol, d) película (QM) de quitosano comercial de media viscosidad e) película (QMS) de quitosano comercial de media viscosidad con sorbitol, y f) control de PDA.

CONCLUSIONES

El ensilaje para la obtención de quitina y posteriormente quitosano, es una técnica efectiva que permitió obtener un quitosano de calidad fisicoquímica y actividad fungistática similar al comercial de mediana viscosidad, con la ventaja de la recuperación de otras sustancias de valor comercial de los desechos de camarón y una menor cantidad de residuos contaminantes.

El quitosano proveniente del proceso de ensilado presentó efecto fungistático sobre *A. niger* ligeramente menor (47.26%), pero sin diferencia significativa comparado con el efecto del quitosano comercial de media viscosidad (56.164%).

Por otro lado, las películas de quitosano por evaporación de solventes fueron en general más resistentes a la ruptura, pero menos elásticas que las elaboradas por extrusión, además que no hubo efecto significativo en la actividad fungistática de las mismas. Las películas extrudidas mostraron también buena miscibilidad en sus componentes como lo demostró el análisis por espectroscopia de infrarrojo.

En forma de película, el quitosano tuvo menor efecto fungistático que en solución tanto en su forma en solución, como en película, lo que indica que parte de los grupos funcionales amino de la molécula del polímero interactuaron en la formación de la película con otros compuestos de la mezcla, disminuyendo su bioactividad.

Las películas extrudidas mostraron menor efecto fungistático que las películas por evaporación de solventes, aunque mejores propiedades mecánicas, por lo que podrían ser empleadas en la formulación de empaques para alimentos.

Es necesario ahondar en las características de las películas de quitosano y en su actividad fungistática con miras al diseño de un empaque de alimentos biofuncional, que sea total o parcialmente biodegradable.

RECOMENDACIONES

Se sugiere un estudio más detallado de las propiedades tanto mecánicas, térmicas como estructurales de las películas de quitosano para comprender mejor su interacción con otros compuestos presentes en dichas películas, y el posible efecto del mismo en su actividad antimicrobiana, en este caso en particular, fungistática sobre *A. niger*.

Asimismo, la elaboración de más formulaciones para películas de quitosano por extrusión es altamente recomendable, para determinar la proporción óptima de todos los compuestos involucrados que asegure un alto grado de actividad fungistática. De igual manera se sugieren estudios ms específicos a nivel de microscopía para elucidar un mecanismo de acción fungistático de las películas de quitosano, entre estos métodos se sugieren análisis de microscopía de epifluorescencia y de microscopía electrónica de barrido.

Es también importante considerar el efecto que tiene el tipo de inoculación sobre la actividad fungistática reportada, por ello se recomienda también realizar estudios de permeabilidad al agua y al oxígeno en todas las películas, así como de absorción de agua.

La elaboración de películas de quitosano por extrusión es aún un área poco estudiada pero que parece bastante prometedora en el diseño de un empaque de alimentos con actividad antimicrobiana por sí mismo y con propiedades mecánicas aceptables, elaborado a base de un compuesto natural, no tóxico y biodegradable como lo es el quitosano.

BIBLIOGRAFÍA

- ACC, American Chemistry Council. 2007. Plastic division. Learning center. The history of plastic. Consultado el 15 de marzo de 2009. http://www.americanchemistry.com/s_plastics/doc.asp?CID=1102&DID=4665
- Ai, H., Wang, F., Yang, Q., Zhu, F., y Lei, C. 2008. Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*. *Carbohydrate Polymers*. 72: 419-423.
- Agulló, E., Albertengo, L., Pastor, A. A., Rodríguez, M. S., y Valenzuela, F. 2004. Aplicaciones en alimentación y control ambiental. En: Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Editado por Pastor A. 1° ed. Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp. 312.
- Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., y Albertengo, L. 2003. Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*. 3(10): 521-530.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. Official Methods of Analysis. 18° edn. W. Horwitz y G.W. Latimer editors. AOAC international.
- Arandes, J. M., Bilbao, J., y Valerio, D. L. 2004. Reciclado de residuos plásticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5(1): 28-45.
- Araki, Y., e Ito, E. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *European Journal of Biochemistry*. 55: 71-78.
- Argüelles, W., Heras, A. C., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche, C., y Román, J. S. 2004. Caracterización de quitina y quitosano. En: quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. 1ª ed. Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. 312p.
- Arvanitoyannis, I. S., Nakayama, A., y Aiba, S. I. 1998. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*. 37: 371-382.

Austin, P. R., y Brince, C. J. 1977. Chitin films and fibers. United States Patent.

Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., y Healy, M. 2005. Comparisons of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80: 145-150.

Bégin, A., y Van Calsteren, M. R. 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 26: 63-67.

Bell, A. A., Hubbard J. C., Liu, L., Davis R. M., y Subbarao, K. V. 1998. Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of *Fusarium* yellows of celery. *Plant Disease*. 82(3): 322-328.

Bhale, S., No, H. K., Prinyawiwatkui, W., Farr, A. J., Nadarajah K., y Meyers, S. P. 2003. Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of Food Science*. 68(7): 2378-2383.

Bolur, P. C. 1998. Extrusion of thermoplastics. Technical paper. <http://bolur.plastacia.com>, consultado 10 enero de 2009.

Bourtoom, T., y Chinnan, M. S. 2008. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *Food Science and Technology*. 41: 1633-1641.

Caner, C., Vergano, P. J., y Wiles, J. L. 1998. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science*. 63(6): 1049-1053.

Chandumpai, A., Singhpibulporn, N., Farrongsarng, D. M., y 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.

Cheah, L. H., Page, B. B. C., y Shepherd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of *sclerotinia* rot of carrots. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 25: 89-92.

- Cheung, M. K., Wan, K. P. Y., y Hu, P. H. 2002. Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, $^1\text{H}^1$ and $T_{1\rho}$ CRAMPS. *Journal of Applied Polymer Science*. 86: 1253-1258.
- Chien, P. J., Sheu F., y Yang, F. H. 2007a. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*. 78: 225-229.
- Chien, P. J., Sheu, F., y Lin, H. R. 2007b. Quality assessment of low molecular weight chitosan coating on sliced red pitayas. *Journal of Food Engineering*. 79: 736-740.
- Chirkov, S. N., 2002. The antiviral activity of chitosan (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38(1): 1-8.
- Cho, Y. I., No, H. K., y Meyers, S. P. 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46: 3839-3843.
- Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. C. G., y Lin, J. G. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25 (7): 932-936.
- Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M., y Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 37: 1359-1366.
- Coates, J. 2000. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 10815-10837
- Coma, V., Deschamps, A., y Martial-Gros, A. 2003. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer: antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants. *Journal of Food Science*. 68(9): 2788-2792.

- Cota-Arriola, O. 2007. Obtención y estudio de quitosano y biopelículas funcionales de compositos de quitosano. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. 127p.
- De Britto, D., Campana-Filho, S.P., y Asis, O. B. G. 2005. Mechanical properties of N,N,N-trimethylchitosan chloride films. *Polímeros: Ciencia e Tecnologia*. 15(2): 142-145.
- Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y., y Bi, D. 2004. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*. 93: 1553–1558.
- Dutta, P. K. Tripathi, S., Mehrotra G. K., y Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*. 114 (4): 1173-1182
- Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V., y Dutta, J. 2002. Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science*. C42 (3): 307-354.
- El Ghaouth, A., Arul, J., y Asselin, A. 1992a. Potential use of chitosan in postharvest preservation of fruits and vegetables. *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science. New York, USA. 835p.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., y Asselin, A. 1992b. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*. 82(4): 398-402.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., y Boulet, M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*. 56(6): 1618-1620.
- Etienne, O., Schneider, A., Taddei, C., Richert, L., Schaaf, P., Voegel, J. C., Egles, C., y Picart, C. 2005. Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: an in vitro and in vivo study. *Biomacromolecules*. 6: 726-733.
- Fernández-Cervera, M., Heinämäki, J., Krogars, K., Jörgensern, A.C., Karjalainen, M., Iraizoz-Colarte, A., y Yliruusi, J. 2004. Solid-state and mechanical properties of

aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. The American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) journal of Pharmaceutical Science and Technology. 5(1):1-6.

Fornes, F., Almela, V., Abad, M., y Agusti, M. 2005. Low concentrations of chitosan coating reduce water spot incidence and delay peel pigmentation of Clementine mandarin fruit. Journal of the Science of Agriculture. 85: 1105-1112.

García, M. A. Pinotti, A., y Zaritzky, N. 2006. Barrier and mechanical properties of biodegradable composite films based on corn starch and chitosan. Interamerican Confederation of Chemical Engineering (IACCHE), XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química (CIIQ)/ V Congreso Argentino de Ingeniería Química (CAIQ).

González-Aguilar, G. A., Monroy-García, I. N., Goycoolea-Valencia, F., Díaz-Cinco, M. E., y Ayala-Zavala, F. 2005. Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada. Simposium Nuevas Tecnologías de Conservación y Envasado de Frutas y Hortalizas. Vegetales Frescos Cortados. La Habana, Cuba. Memoria de congreso. Pp.121-133.

Goycoolea F., Agulló, E., y Mato, R., 2004. Fuentes y obtención. En: Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Editado por Pastor, A. 1° ed. Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp. 312.

Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., y Li, P. 2006. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. Carbohydrate Research. 341: 351-354.

Han, J. H. 2000. Antimicrobial food packaging. Food Technology. 54(3): 56-65.

Hernández-Lazaurdo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montevalvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M. y Bello-Pérez, L. A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. Carbohydrate Polymers. 73(4): 541-547.

- Hernández-Izquierdo, V. M., y Krochta, J. M. 2008. Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. *Journal of Food Science*. 73(2): R30-R39.
- Hoagland, P. D., y Parris, N. 1996. Chitosan/pectin limited films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 44(7): 1916-1919.
- Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshinara, K., y Kubo, T. 1990. Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose. *Industrial and Engineering Chemical Research*. 29: 800-805.
- Hwang, J. K., y Shin, H. H. 2000. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*. 12(3/4): 175-179.
- Hwang, K. T., Jung, S. T., Lee, G. D., Chinnan, M. S., Park, Y. S., y Park, H. J. 2002. Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(7): 1876-1882.
- Jaime-Quijada, E. A. 2008. Propiedades mecánicas y fungistáticas de biopelículas de quitosano obtenido a partir de ensilados de cabeza de camarón con balanceo de carbono/nitrógeno. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. 76p.
- Jáuregui-Cornejo, A., Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Castillo-Ortega, M. M., del Castillo-Castro, T., y Plascencia-Jatomea, M. 2007. Propiedades mecánicas y biológicas de películas funcionales de compositos de quitosano, con y sin plastificantes. VI Congreso de Noroeste, II Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. BT08: 98-123.
- Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A., y Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 5167-5178.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A., y Bouriotis, V. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 90: 2564-2568.

- Kasaai, M. R. 2008. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 71: 497-508.
- Khan, T. A., Peh, K.K., y Ch'ng. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 5(3): 205-212.
- Khan, T. A., Peh, K. K., y Ch'ng, H. S. 2000. Mechanical, bioadhesive, strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 3(3): 303-311.
- Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S. K., Weller, C. L., y Hanna, M. A. 2006. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *Journal of Food Science*. 71(3): E119-E123.
- Kim, S. H., No, H. K., y Prinyawiwatkul, W. 2007. Effect of molecular weight, type of chitosan, and chitosan solution pH on the shelf life and quality of coated eggs. *Journal of Food Science*. 72(1): S44-S48.
- Knaul, J. Z., Kasaii, M. R., Bui, V. T., y Creber, K. A. M. 1998. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*. 76 (11): 1699- 1706.
- Krajewska, B. 2001. Diffusional properties of chitosan hydrogel membranes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 76: 636-642.
- Kumar, M. N. V. R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*. 46:1-27.
- Kumar, A. B. V., Gowda, L. R., y Tharanathan, R. N. 2004. Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products. *European Journal of Biochemistry*. 271: 713-723.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M. D., y Gupta, A. 2003. A validated ^1H NMR method for the determination of

the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32: 1149-1158.

Li, H., y Yu, T. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81(2): 269-274.

Martínez-Camacho., A. P. 2006. Efecto antifúngico de quitosanos de diferente viscosidad sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* NRRL-3. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 126p.

Mi, F. L., Huang, C. T., Liang, H. F., Chen, M. C., Chiu, Y. L., Chen, C. H., y Sung, H. W. 2006. Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film crosslinked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(9): 3290-3296.

Möller, H., Grelier, S., Pardon, P., y Coma, V. 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HMPC based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 6585-6591.

Moreno-Villa, F. A. 2008. Aprovechamiento de desechos de camarón (*Litopenaeus vanameii*) y jaiba (*Callinectes arcuatus*) para la obtención y caracterización de productos quitinosos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 112p.

Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Tarsi, R., Miliani, M., Gabbanelli, F., y Cartolari, M. 2001. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomacromolecules*. 2(1): 165-169.

No, H. K., y Meyers, S. P. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan-a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 4(2): 27-52.

No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Hwang, H. J., y Meyers S. P. 2002. Antibacterial activities of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. *Journal of Food Science*. 67(4): 1511-1514.

- No, H. K., Lee, S. H., Park, N. Y., y Meyers, S. P. 2003. Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(6): 7659-7663.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A., y Holley, R. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 139-148.
- Oudor-Odote, P. M., Struszczyk, M. H., y Peter, M. G. 2005. Characterisation of chitosan from blowfly larvae and some crustacean species from Kenyan marine waters prepared under different conditions. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*. 4(1): 99-107.
- Parada, L. G., Crespín, G. D., Miranda, R., y Katime, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5(1): 1-16.
- Park, S. Y., Lee, B., Jung, S. T., y Park, H. J. 2001. Biopolymer composite films based on k-carragenana and chitosan. *Materials Research Bulletins*. 36: 511-519.
- Park, S. Y., Marsh, K. S., y Rhim, J. W. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films, affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*. 67(1): 194-197.
- Park, S.I., y Zhao, Y. 2004. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1933-1939.
- Park, S. I., Daeschel, M. A., y Zhao, Y. 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*. 69(8): M215-M221.
- Pastor, A. A., e Higuera, I. 2004. *Generalidades*. En: Quitina y quitosano: obtención características y aplicaciones. 1ª ed. Ed. Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp. 312.

- Peniche, C., Aguilar, M. R., Aranaz, I., Mayorga, A., Paños, I., Román J. S., y Tapia, C. 2004. Aplicaciones en ciencias de la vida. En: Quitina y quitosano: obtención características y aplicaciones. 1ª ed. Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp. 312.
- Percot, A., Viton, C., y Domard, A. 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*. 4(1): 12-18.
- Peesan, M., Supaphol, P., y Rujiravanit, R. 2005. Preparation and characterization of hexanoyl chitosan/poly lactide blend films. *Carbohydrate Polymers*. 60: 343-350.
- Pittalis, F., Bartoli, F., y Giovannoni, S. 1984. Process for the preparation of chitosan fibers. United States Patent.
- Plascencia-Jatomea, M. 2000. Recuperación de proteínas a partir de desechos de camarón y su aplicación en dietas para acuicultura. Tesis de maestría. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Plascencia Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., y Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*. 3(10): 582-586.
- Plascencia-Jatomea, M. 2004. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D. F. 160p.
- Prashanth, K. V. H., y Tharanathan, R. N. 2007. Chitin/chitosan: modification and their unlimited application potential--an overview. *Trends in Food Science & Technology*. 18: 117-131.
- Rabea, E. I., El Badawy, M., Stevens C. V., Smagghe, G., y Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4(6): 1457-1465.
- Rabea, E. I., El Badawy, M., Rogge, T. M., Stevens, C. V., Höfte, M., Steurbaut, W., y Smagghe, G. 2005. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Management Science*. 61: 951-960.

- Rabea, E. I., El Badawy, M., Rogge, T. M., Stevens, C. V., Steurbaut, W., Höfte, M., y Smaghe, G. 2006. Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan. *Pest Management Science*. 62: 890-897.
- Ramos, L. F. 1993. Extrusión de plásticos. Principios básicos. 1ª edición. Ed. Limusa, S.A. de C.V. 516p.
- Rao, M. S., y Stevens, W. F. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80(9): 1080-1087.
- Ratajska, M, y Boryniec, S. 1999. Biodegradation of some natural polymers in blends with polyolefines. *Polymers for Advanced Technologies*. 10: 625-633.
- Rauwendaal, C. 2002. Polymer extrusión. 4ª edición. Editorial Hanser Verlag. 777p.
- Rayas, J. A., Rodríguez-Vera, R., y Martínez, A., 2003. Medición del módulo de Young en el hule látex usando ESPI. *Revista Mexicana de Física*. 49(6): 555-564.
- Reddy, M. V. B., Arul, J., Angers, P., y Couture, L. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47(3): 1208-1216.
- Rigby, G. W. 1936. Process for the preparation of films and filaments and products thereof. United States Patent Office.
- Rinaudo, M., Milas, M., y Le Dang, P. 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biomacromolecules*. 15: 281-285.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31: 603-632.
- Rodríguez, M. S., Albertengo, L., Debbaudt, A., y Agulló, E. 2005. Uso del quitosano en alimentos. En: Nuevas tecnologías de conservación de productos frescos cortados. Editado por: González, A. G. A., Gardea, A. A., Cuamea, N. F. México. CIAD. 558p.

- Roller, S., y Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 47: 66-77.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., De Venere, D., y Salerno, M. 2002. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grapes. *Journal of Food Science*. 67(5): 1862-1867.
- Rueda, D. R., Secall, T., y Bayer, R. K. 1999. Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*. 40: 49-56.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., y Jeon, Y. J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*. 10: 37-51.
- Sakurai, K., Maegawa, T., y Takashi, T. 2000. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*. 41: 7051-7056.
- Sathivel, S. 2005. Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Science*. 70(8): E455-E459.
- Sebástien, F., Stéphane, G., Copinet, A., y Coma, V. 2006. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactid acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers*. 65: 185-193.
- Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S., y Coma, V. 2005. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science*. 70 (2): M100-M104.
- Sini, T. K., Santhosh, S., y Mathew, P. T. 2007. Study of the production of chitin and chitosan from shrimp shell by *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research*. 342: 2423-2429.

- Srinivasa, P. C., Ravi, R., y Tharanathan, R. N. 2007a. Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by surface response methodology. *Journal of Food Engineering*. 80: 184-189.
- Srinivasa, P. C., Ravi, R., y Tharanathan, R. N. 2007b. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*. 21: 1113-1122.
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., y Copinet, A. 2005. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 3950-3957.
- Tharanathan, R. N., y Kittur, F. S. 2003. Chitin- the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(1): 61-87.
- Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C., y Pan, C. L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*. 68: 170-177.
- Tsaih, M. L., y Chen, R. H. 1999. Molecular weight determination of 83% degree of deacetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*. 71: 1905-1913.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., y Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18: 305-312.
- Uriarte, M. M. H. 2007. Aislamiento parcial y caracterización del colágeno del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y su potencial aplicación como plastificante en la elaboración de biopelículas con quitosano. Tesis de maestría. DIPA. Universidad de Sonora.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., y González-Martínez, C. 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*. 41: 164-171.

- Wawro, D., Ciechanska, D., Steplewski, W., y Bodek, A. 2006. Chitosan microfibrils: preparation, selected properties and application. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*. 14(3): 97-101.
- Wiles, L., Vergano, P. J., Barron, F.H., Bunn, J. M., y Testin, R. F. 2000. Water vapour transmission rates and sorption behaviour of chitosan films. *Journal of Food Science*. 65(7): 1175-1179.
- Wu, Y., Rhim, J. W., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S., y Schnepf, M. 2000. Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coatings and films. *Journal of Food Science*. 65(2): 300-304.
- Wu, T., y Zivanovic, S. 2008. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*. 73: 248-253.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, A., y Sams, C. E. 2004. Chitin and chitosan-value added products from mushroom waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(26): 7905-7910.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., y Sams, C. E. 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 3888-3894.
- Young, I. C., Hong, K. N., y Meyers, S. P. 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3839-3843.
- Zakaria, Z., Hall, G. M., y Shama, G. 1998. Lactic acid fermentation of scampi waste in rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 33(1): 1-6.
- Zhang, M., Tan, T., Yuan, H., y Rui, C. 2003. Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligo-chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 18: 391-400.
- Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., y Zhang, X. 2005. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*. 340: 1914-1917.

- Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C. P., y Neufeld, R. J. 1998. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 342-348.
- Zivanovic, S., Chi, S., y Draughon, F. A. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*. 70(1): M45-M51.
- Zivanovic, S., Li, J., Davidson, M., y Kit, K. 2007. Physical, mechanical and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules*.8(5): 1505-1510.
- Zivanovic, S., Mount, J. R., Draughon, F. A., y Sams, C. E. 2003. Edible chitosan coatings as novel effective biopesticide. Progress report to Southern Region Small Fruit Consortium Research Project. 2p.