

## Quitosano derivado de quitina de langosta: actividad antioxidante y antimicrobiana

Zoe Palazón López<sup>1a</sup>, Nilia de la Paz Martín-Viña<sup>1b</sup>, María de los Ángeles Bécquer<sup>2c</sup>, Mirna Fernández Cervera<sup>2d\*</sup>, José Raúl Pérez Mora<sup>1c</sup>, Orestes Darío López Hernández<sup>3f</sup>, Antonio Nogueira Mendoza<sup>1g</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Ave. 26 # 1605 e/ Puentes Grandes y Boyeros, La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Centro de Investigaciones Biológicas (CIEB), Universidad de La Habana, Calle 222 # 2317 e/ 23 y 31, La Lisa, La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Facultad de Ciencia e Ingeniería de los Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ave de Los Chasquis y Rio Payamino, Ambato 180207, Ecuador

Correos electrónicos:

<sup>a</sup>zoe.palazon@cidem.cu

<sup>b</sup>nilia.delapaz@cidem.cu

<sup>c</sup>mabecquer@ifal.uh.cu

<sup>d</sup>mirnafc@ifal.uh.cu

<sup>e</sup>jose.perez@cidem.cu

<sup>f</sup>od.lopez@uta.edu.ec

<sup>g</sup>antonio.nogueira@cidem.cu

\* Autora correspondiente: mirnafc@ifal.uh.cu; mirnafc@gmail.com

Recibido: 7 de marzo de 2024

Revisado: 6 de junio de 2024

Aceptado: 13 de junio de 2024

### RESUMEN

**Introducción:** El quitosano posee propiedades como antimicrobiana y antioxidante, que lo convierten en un compuesto interesante para diversas aplicaciones. **Objetivo:** Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana del quitosano, derivado de quitina de langosta (*Panulirus argus*), y el acetato de quitosano. **Métodos:** Se determinó la capacidad antioxidante de disoluciones de quitosano usando los métodos de capacidad reductora del hierro férrico (FRAP) y la capacidad secuestradora del radical (DPPH). Se evaluó la influencia de la concentración (0,5, 1,0 y 2,0 % (m/v)) del polímero y su sal de acetato en la actividad antimicrobiana. Las concentraciones

mínimas inhibitorias y microbicidas se determinaron a través del método de las diluciones seriadas y la actividad antimicrobiana por el de difusión en agar. Se utilizaron cepas atenuadas de microorganismos Gram positivos, Gram negativos, hongos y levaduras. **Resultados:** Las disoluciones de quitosano mostraron actividad antioxidante moderada, siendo mayor para el acetato de quitosano. La actividad antimicrobiana aumentó con el incremento de la concentración del biopolímero y su sal. Tanto el quitosano, como su sal de acetato, presentaron un efecto inhibitorio sobre los microorganismos Gram positivos y Gram negativos, así como los hongos. **Conclusiones:** Se demuestran las potencialidades de ambas materias primas para su empleo en productos farmacéuticos y cosméticos.

*Palabras claves:* acetato de quitosano, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, quitosano.

## SUMMARY

### Chitosan derived from lobster chitin: antioxidant and antimicrobial activity

**Introduction:** Chitosan has antimicrobial and antioxidant properties, which make it an interesting compound for various applications. **Aim:** To evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of chitosan, derived from lobster chitin (*Panulirus argus*), and chitosan acetate. **Methods:** The antioxidant capacity of chitosan solutions was determined using the ferric iron reducing capacity (FRAP) and radical scavenging capacity (DPPH) methods. The influence of the concentration (0.5, 1.0 and 2.0% (w/v)) of the polymer and its acetate salt on the antimicrobial activity was evaluated. The minimum inhibitory and microbicidal concentrations were determined through the serial dilution method and the antimicrobial activity by agar diffusion. Attenuated strains of Gram positive and Gram negative microorganisms, fungi and yeasts were used. **Results:** Chitosan solutions showed moderate antioxidant activity, being higher for chitosan acetate. The antimicrobial activity increased with increasing concentration of the biopolymer and its salt. Both chitosan and its acetate salt had an inhibitory effect on Gram positive and Gram negative microorganisms, as well as fungi. **Conclusions:** The potential of both raw materials for their use in pharmaceutical and cosmetic products is demonstrated.

*Keywords:* antimicrobial activity, antioxidant activity chitosan acetate, chitosan.

## RESUMO

### Quitosana derivada de quitina de lagosta: atividade antioxidante e antimicrobiana

**Introdução:** A quitosana possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o que a torna um composto interessante para diversas aplicações. **Objetivo:** Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana da quitosana, derivada da quitina da lagosta (*Panulirus argus*), e do acetato de quitosana. **Métodos:** A capacidade antioxidante das soluções de quitosana foi determinada utilizando os métodos de capacidade redutora de ferro férrico (FRAP) e capacidade de eliminação de radicais (DPPH). Foi avaliada a influência da concentração (0,5, 1,0 e 2,0% (m/v)) do polímero e seu sal acetato na atividade antimicrobiana. As concentrações inibitórias e microbicidas mínimas foram determinadas através do método de diluição seriada e a atividade antimicrobiana por difusão em ágar. Foram utilizadas cepas atenuadas de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, fungos e leveduras. **Resultados:** As soluções de quitosana apresentaram atividade antioxidante moderada, sendo maior para o acetato de quitosana. A atividade antimicrobiana aumentou com o aumento da concentração do biopolímero e seu sal. Tanto a quitosana quanto seu sal acetato tiveram efeito inibitório sobre microrganismos Gram positivos e Gram negativos, bem como fungos. **Conclusões:** Está demonstrado o potencial de ambas as matérias-primas para a sua utilização em produtos farmacêuticos e cosméticos.

*Palavras-chave:* acetato de quitosana, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, quitosana.

## INTRODUCCIÓN

El quitosano, obtenido por desacetilación de la quitina, es un polímero con estructura de hélice con grupos amino reactivos, lo que ofrece muchas posibilidades de modificación e interacciones iónicas. Se caracteriza por ser biodegradable, biocompatible y de baja toxicidad [1].

Posee diferentes propiedades bioactivas, como las antimicrobianas, antiinflamatorias, tensoactivas, antitumorales, mucoadhesivas, cicatrizantes y antioxidantes, que lo convierten en un compuesto interesante para aplicaciones en diferentes campos, como la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, la agricultura, la medicina, la industria textil y papelería, la química y el medio ambiente [1, 2].

El quitosano y sus oligómeros actúan como antioxidantes por el secuestro de radicales de oxígeno. Esta actividad depende tanto de su masa molecular (Mm) como de su grado de desacetilación (GD). Los oligómeros de baja Mm y alto GD tienen mayor actividad antioxidante que los de alta Mm. Los grupos hidroxilos y aminos activos en el quitosano pueden reaccionar con los radicales libres, pues en su estructura posee tres fuentes de hidrógeno libres en las posiciones C-2(NH<sub>2</sub>), C-3(OH) y C-6(OH), respectivamente [1, 3].

El quitosano obtenido de la desacetilación de la quitina es un antioxidante aún más potente. Se ha descrito que la actividad antioxidante del quitosano aumentó en 2,5 veces cuando el tiempo de desacetilación se incrementó de 60 a 120 min. Esto demuestra que su actividad antioxidante está correlacionada con el GD. Las aminos suelen ser antioxidantes más potentes que las amidas [4].

Aunque los mecanismos de acción antioxidante de las moléculas de quitosano aún no están del todo claros, entre algunas razones, se justifica por su capacidad para formar complejos con muchos metales de transición. Las cadenas de quitosano son capaces de retrasar la oxidación lipídica mediante la quelación de iones de Fe<sup>2+</sup> a través de sus grupos amino o hidroxilos, inhibiendo así la capacidad oxidante de este metal o su conversión en iones Fe<sup>3+</sup> [4, 5].

La presencia de los grupos aminos (-NH<sub>2</sub>) está intrínsecamente ligada a la actividad antioxidante del quitosano. La disponibilidad de un par de electrones libres en este grupo funcional da lugar a la captación de protones H<sup>+</sup> desde el medio, los cuales, posteriormente son cedidos a los radicales libres que forman parte de la cadena de reacciones que constituyen la degradación oxidativa, formando moléculas más estables y evitando la concreción de dicho fenómeno. En quitosanos de elevada Mm, la actividad antioxidante se relaciona, de manera más representativa, a un efecto quelante de metales pro-oxidantes. De este modo, puede considerarse que actúa como antioxidante tipo I y tipo II [4].

Este biopolímero ha demostrado ser antifúngico ante un amplio espectro de patógenos, provocando la inhibición total o parcial de estos según la especie fúngica, considerándose que existe una posible dependencia entre el grado de polimerización y de desacetilación del quitosano y el nivel de inhibición que provoca [1].

Además, posee carácter antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*) y Gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Proteus vulgaris*) [6, 7].

La langosta es la fuente natural menos empleada internacionalmente, sin embargo, en Cuba existen plantas procesadoras de este crustáceo, empleándose como fuente de obtención de este biopolímero, y sus sales, lográndose procesos amigables con el medio ambiente [8, 9].

Existen evidencias de la actividad antioxidante de disoluciones de acetato y de lactato de quitosano, así como de su actividad antimicrobiana y antifúngica [10-13]. En sentido general, se sugiere su uso seguro por no presentar toxicidad (aguda y crónica), ser un producto no irritante para la piel y los ojos, no carcinógeno, no tóxico para la reproducción y con actividad antígenotóxica [14].

A pesar de las múltiples aplicaciones del quitosano y sus derivados en el campo biomédico y farmacéutico, la diversidad de fuentes y procesos de obtención, la caracterización incompleta y variabilidad de los quitosanos comerciales, aún no se encuentra aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés).

Teniendo en cuenta la necesidad de profundizar en las propiedades del biopolímero derivado de quitina de langosta (*Panulirus argus*), que permitan el desarrollo de productos farmacéuticos y cosméticos seguros, en el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana del quitosano y el acetato de quitosano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos químicos

Como ingredientes activos se emplearon quitosano y acetato de quitosano, suministrados por la Planta de Producción de Productos Naturales y Sintéticos del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, Cuba). Se emplearon tres lotes de cada uno, elaborados según los procedimientos descritos para el quitosano y el acetato de quitosano, los que cumplieron con los parámetros físicos y químicos establecidos [8, 9]. La masa molecular del quitosano fue de 310 000 g/mol y el grado de desacetilación fue de 77,63 % (Lote 10001), 79,63 % (Lote 11001) y para el lote 11002 de 77,86 %. El quitosano comercial empleado fue PRIMEX con un grado de desacetilación de 85,6 % (Primex Ingredients ASA, Noruega). El grado de desacetilación molar para los tres lotes de acetato de quitosano fue de 57,36 % (Lote 12001), 57,69 % (Lote 12002) y para el lote 12003 de 58,92 %.

## Actividad antioxidante de disoluciones de quitosano y acetato de quitosano

### *Preparación de las disoluciones de quitosano*

El quitosano fue disuelto en disoluciones de ácido acético al 1,0 % (v/v), con agitación magnética durante 2 h, obteniendo disoluciones de quitosano a las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para el caso del acetato de quitosano también se emplearon disoluciones a las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La actividad antioxidante *in vitro* del biopolímero y su sal se determinó mediante técnicas bioquímicas, a través de los ensayos de Capacidad Reductora del Hierro Férrico (FRAP) y la Capacidad Secuestradora del Radical (DPPH).

### Capacidad Reductora del Hierro Férrico (FRAP)

El método se fundamenta en la reducción del complejo TPTZ –  $\text{Fe}^{3+}$  a la forma ferrosa por la acción de las sustancias antioxidantes presentes en las disoluciones de quitosano. La reacción fue monitoreada midiendo la absorbancia a 593 nm [15]. El ensayo FRAP consistió en añadir 900  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP a un tubo de ensayo al que se le adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de quitosano a las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se empleó un lector de placas de 96 pocillos (SUMA, Cuba).

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible (SpectronicGenesys 2, LR 45227, EE. UU.), después de transcurridos 4 min. Como estándar se usó una disolución de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Alemania) como control positivo. El FRAP se expresó como  $\mu\text{M}$  equivalentes de ácido ascórbico.

### Capacidad secuestradora del radical (DPPH)

El método se basa en la reducción del radical estable 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) por la acción de compuestos antioxidantes que contienen grupos -OH, que decoloran dicho reactivo [16]. En tubos de ensayo se mezclaron 1,5 mL de una disolución etanólica de DPPH (0,075 mg/mL) con 750  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de quitosano a diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min, midiendo la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV-visible (SpectronicGenesys 2, LR 45227, EE. UU.). Se empleó un lector de placas de 96 pocillos (SUMA, Cuba).

El valor de concentración de muestra requerida para disminuir el 50 % de la concentración del radical DPPH ( $\text{CI}_{50}$ ) de las disoluciones de quitosano, se calculó usando la curva de dosis contra porcentaje de inhibición. Los resultados fueron expresados

como el porcentaje de decoloración de la disolución de DPPH (% DPPH), utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DPPH} = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0 \quad (1)$$

donde:  $A_0$  es la absorbancia del control y  $A_1$  es la absorbancia de la muestra. Con fines comparativos, el Trolox 20 % (Sigma-Aldrich, Alemania) fue utilizado como antioxidante de referencia.

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU.). Los datos se expresaron como Media/Desviación estándar (X/DE) de al menos tres ensayos independientes ( $n = 3$ ). En todos los casos se consideraron diferencias significativas los valores de  $p < 0,05$ .

### Actividad antimicrobiana del quitosano y el acetato de quitosano

Las cepas microbianas empleadas eran cultivos pertenecientes a las colecciones del Laboratorio de Microbiología del CIDEM y de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Micrococcus flavus* NCTC 7743, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231.

### Pruebas de pureza microbiológica

Las pruebas de límite microbiano para la evaluación de la pureza microbiológica de las muestras de quitosano y su sal de acetato, se realizaron según lo descrito para medicamentos no estériles [17].

### Preparación del inóculo

Los microorganismos de prueba se cultivaron en tubos con agar inclinado Triptona Soya Agar (TSA) y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), según las características de los mismos. Concluido el periodo de incubación el crecimiento fue removido con 5 mL de disolución salina 0,9 % (estéril). La concentración del inóculo microbiano se ajustó al patrón 0,5 de la escala McFarland [18] correspondiente a  $10^5$  ufc/mL para bacterias y  $10^4$  ufc/mL para levaduras.

### Determinación de la actividad antimicrobiana

Se empleó el método de difusión en placas de medio de cultivo Triptona Soya Agar para las bacterias y en medio Sabouraud Dextrosa Agar para las levaduras, previamente

inoculados con los microorganismos de prueba [19]. Se realizaron pozos de 6 mm de diámetro, utilizando un perforador estéril, colocando 100  $\mu$ L de las muestras a ensayar, a las concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 %, tanto para el quitosano como para el acetato de quitosano, respectivamente. Las placas se incubaron durante 24 h a 32-35 °C para las bacterias y 24-48 h a 30 °C para las levaduras.

La actividad antimicrobiana de las muestras se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada pozo, empleando para ello el lector de zona Fisherlily (EE. UU.). Se determinaron los valores promedios de los halos de inhibición, para el quitosano y su sal de acetato, para cada uno de los microorganismos evaluados. Con fines comparativos también se evaluó, bajo las mismas condiciones, el quitosano comercial PRIMEX.

Se consideró un resultado positivo cuando el halo de inhibición era igual o mayor a 8 mm de diámetro alrededor de cada pozo.

#### **Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Microbicida**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada muestra se determinó por el método de diluciones seriadas [18] en medio Triptona Soya Caldo y Sabouraud Dextrosa Caldo. Los tubos con las diluciones de quitosano se inocularon con los microorganismos de prueba y se incubaron a 37 °C para las bacterias y a 22 °C para las levaduras. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron las lecturas correspondientes. Los resultados obtenidos se compararon con los tubos de medio de cultivo inoculados con los microorganismos de prueba, sin quitosano o sin acetato de quitosano, sometidas a iguales condiciones.

Transcurrido el período de incubación se hicieron resiembras de 0,1 mL, en placas Petri con medio agarizado selectivo, realizando el conteo de las colonias. La menor concentración de la muestra capaz de producir un daño sobre la célula microbiana fue definida como la Concentración Mínima Microbicida (CMM).

Se utilizaron como control diluciones estándar de Bacitracina, Gentamicina, Neomicina, Nistatina y Vancomicina, sustancias con actividad antimicrobiana reconocida frente a los microorganismos empleados en el estudio.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Actividad antioxidante del quitosano y el acetato de quitosano**

La evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de las disoluciones de quitosano y su sal, por los dos métodos empleados, se presenta en la Tabla 1. Los resultados de

la capacidad antioxidante a Trolox, ensayo DPPH, muestran que, aunque con menor actividad secuestradora de este radical, respecto al patrón, en las condiciones experimentales empleadas y las concentraciones analizadas, el quitosano presentó un porcentaje de decoloración indicativo de capacidad antioxidante moderada, con un valor de  $CI_{50}$  de  $28,09 \pm 0,035 \mu\text{L}/\text{mL}$ , calculado por regresión lineal a partir de la ecuación:  $Y = 2,0852X - 7,5813$ , con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0,9932. Sin embargo, el acetato de quitosano alcanzó un bajo porcentaje de decoloración para las concentraciones ensayadas.

**Tabla 1.** Capacidad antioxidante de las disoluciones de quitosano y el acetato de quitosano

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	DPPH		FRAP
	Densidad óptica	% de inhibición	$\mu\text{M}$ equivalentes de ácido ascórbico
Disoluciones de quitosano			
5	0,534/0,308	4,87	0,061/0,021
10	0,467/0,000	11,35	0,217/0,006
15	0,349/0,000	22,81	0,340/0,006
20	0,257/0,148	31,74	0,614/0,003
25	0,123/0,000	44,80	0,741/0,003
30	0,080 /0,001	55,05	0,905/0,002
Disoluciones de acetato de quitosano			
5	0,545/0,215	3,7	0,063/0,01
10	0,543/0,000	3,9	0,107/0,001
15	0,539/0,134	4,3	0,146/0,002
20	0,535/0,100	6,2	0,166/0,002
25	0,520/0,000	6,9	0,202/0,003
30	0,590/0,115	8,1	0,215/0,002

X/DE: Media/Desviación estándar: n=3

A partir del método FRAP, se corroboró que la actividad antioxidante de las disoluciones de quitosano aumentó con el incremento de su concentración, alcanzándose el valor máximo de  $0,905 \pm 0,002 \mu\text{g}$  equivalente de ácido ascórbico, a la concentración de  $30 \mu\text{L}/\text{mL}$ . De igual forma, la sal mostró un incremento de la capacidad reductora del  $\text{Fe}^{3+}$ , con el aumento de la concentración de la disolución, pero menor respecto al quitosano, para igual concentración.

Estos resultados coincidieron, de forma general, con los reportados [11-13], donde los valores de la capacidad de secuestro de radicales libres de las disoluciones de quitosano

y su sal de acetato fueron superiores al 30 %, respecto al patrón empleado, incrementándose con el aumento de la concentración de quitosano y el tiempo de reacción de los ensayos. El acetato de quitosano no mostró una actividad antioxidante efectiva, según las condiciones evaluadas.

La capacidad antioxidante del quitosano puede explicarse por varios mecanismos. Uno de ellos es la capacidad de secuestro de radicales libres por acción del nitrógeno en el C-2. Esta capacidad de secuestro está relacionada con el hecho de que los radicales libres pueden reaccionar con los iones  $H^+$  provenientes de los iones  $(NH_3^+)$  de las moléculas estables [11, 12].

### **Actividad antimicrobiana del quitosano y el acetato de quitosano**

Al evaluar la calidad microbiológica de las muestras, empleando la técnica de límite microbiano, no se detectó la presencia de microorganismos contaminantes en ninguno de los lotes evaluados. En el proceso de obtención del quitosano se emplea una temperatura de mezcla de 80 °C y reacción de 100 °C /15 min dobles, se lava el polímero con agua purificada hasta neutralidad, y se seca por un tiempo de 4 h a 100 °C. El acetato de quitosano se obtiene por el método de secado por aspersión, a temperatura de entrada  $160 \pm 5$  °C y salida  $100 \pm 5$  °C [8, 9]. Por lo tanto, las condiciones del proceso de obtención, tanto del quitosano como del acetato de quitosano, favorecen la calidad del producto final y que se cumplan los límites establecidos para materias primas de origen natural y no estériles.

El efecto antimicrobiano del quitosano varía conforme al microorganismo en estudio, siendo diferente para hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Lo anterior podría estar fuertemente ligado a las estructuras externas características de cada microorganismo [20].

Con la prueba de difusión en agar se observó la variación de la inhibición a las diferentes concentraciones de quitosano utilizadas (Tabla 2). Nótese que para el quitosano la inhibición se hace visible a partir de la concentración de 0,5 %, no detectándose inhibición para las especies de *Micrococcus* empleadas en el estudio, a esa concentración. Sin embargo, cuando la concentración aumentó la actividad antimicrobiana se hizo visible para todos los microorganismos empleados.

Este comportamiento varió cuando se empleó la sal de acetato de quitosano (Tabla 3), donde con la concentración de 0,5 % ya hay valores de inhibición del crecimiento microbiano para todos los microorganismos, principalmente frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus epidermidis*, comprobándose su actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos [6, 7].

**Tabla 2.** Actividad antimicrobiana del quitosano

Microorganismo	Promedio de los halos de inhibición (mm)		
	0,5 %	1,0 %	2,0 %
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	ND	6,6	8,4
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	ND	6,5	8,3
<i>Micrococcus flavus</i> NCTC 7743	ND	6,7	8,6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	6,8	8,3	10,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	6,2	8,0	10,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	6,2	8,5	10,4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7,5	8,2	11,8
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8,2	9,8	11,3
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	9,9	11,0	12,9
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	9,8	11,6	13,2
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	9,2	10,7	12,3

ND: no se detecta

**Tabla 3.** Actividad antimicrobiana del acetato de quitosano

Microorganismo	Promedio de los halos de inhibición (mm)		
	0,5 %	1,0 %	2,0 %
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	7,6	9,8	12,5
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	7,7	9,6	12,4
<i>Micrococcus flavus</i> NCTC 7743	7,9	9,8	12,8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	10,9	11,8	13,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10,6	11,0	12,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	11,2	11,9	13,8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10,7	11,3	13,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11,4	12,2	13,3
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	13,9	14,6	16,5
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	13,9	14,4	16,9
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13,1	13,9	15,8

La sal de acetato de quitosano fue obtenida a través del proceso de secado por aspersión, lo que favorece la disminución del tamaño de las partículas y, por ende, una mayor solubilidad, respecto al quitosano base, favoreciendo su actividad antimicrobiana.

Existen y se continúan investigando los mecanismos de acción a través del cual el quitosano ejerce su acción antimicrobiana. Se plantea que en las bacterias Gram positivas el polímero se une a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, ubicados en la pared celular, lo que altera la interacción entre ésta y la membrana celular, induciendo la salida de componentes esenciales y el desequilibrio osmótico de la célula [21]. En las bacterias Gram negativas interactúa, mediante atracciones electrostáticas, con lipopolisacáridos de la membrana externa de la bacteria desestabilizándola, lo cual altera su permeabilidad, tanto de la pared como de la membrana interna, favoreciendo la entrada y salida de componentes celulares esenciales [22]. En el caso de los hongos, los grupos amino de las unidades de glucosamina interactúan con componentes extracelulares de la pared y la membrana celular de los hongos, mediante atracciones electrostáticas, provocando la formación de poros y la salida del contenido intracelular, lo que ocasiona inestabilidad y muerte celular [21, 23].

En las Figuras 1, 2 y 3 se observa el comportamiento del quitosano, derivado de quitina de langosta (*Panulirus argus*) obtenido en Cuba y del quitosano comercial PRIMEX (Noruega). Se aprecia una diferencia en los valores de inhibición, siendo el quitosano comercial el que mejores resultados muestra, tanto para los microorganismos Gram positivos como los Gram negativos, los cuales aumentaron con el incremento de la concentración del biopolímero. Similar comportamiento muestra el quitosano nacional, pues sus valores de inhibición aumentaron al incrementarse su concentración, aunque inferiores a los del quitosano comercial. Esto pudiera atribuirse a las características propias de cada tipo de quitosano utilizado, el tamaño de las partículas, el GD, la solubilidad, entre otros.

La solubilidad del quitosano depende del GD y de la distribución de los grupos acetilos y aminos a lo largo de la cadena [8]. Para el caso que nos ocupa, al presentar un menor tamaño de partícula hay una mejor velocidad de disolución la cual varía entre los quitosanos evaluados (quitosano y quitosano comercial) favoreciendo su actividad antimicrobiana. Similar comportamiento sucede con la sal de acetato de quitosano, obtenida por secado por aspersión, donde además de obtenerse en forma de sal, el proceso de obtención de secado por aspersión, favorece la disminución del tamaño de las partículas y, por ende, el derivado de quitosano obtenido tiene una mayor velocidad de disolución.

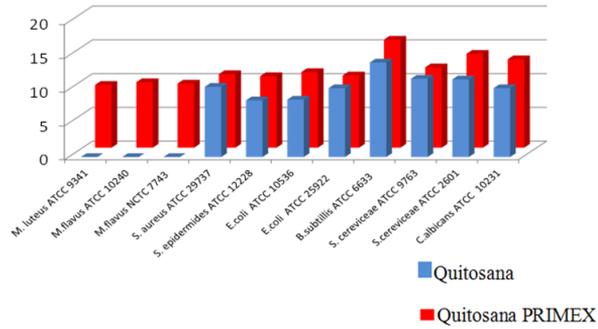


Figura 1. Actividad antimicrobiana del quitosano y el quitosano PRIMEX al 0,5 %.

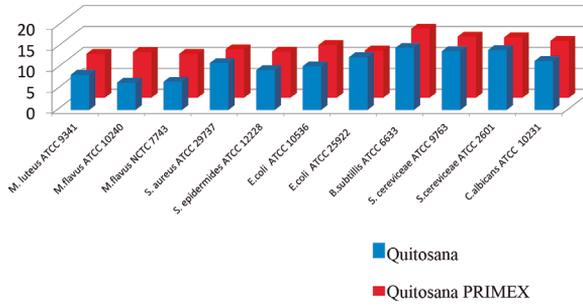


Figura 2. Actividad antimicrobiana del quitosano y el quitosano PRIMEX al 1,0 %.

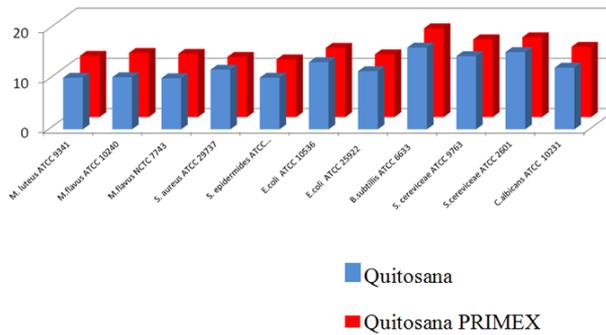


Figura 3. Actividad antimicrobiana del quitosano y el quitosano PRIMEX al 2,0 %.

En relación a las CMI y la CMM del quitosano y el acetato de quitosano (Tabla 4), se aprecia que en todos los casos se logró detener el crecimiento microbiano de todos los microorganismos evaluados. Este comportamiento es similar a lo reportado para las cepas de *Staphylococcus*, *E. coli* y las de levaduras [23]. La acción bactericida solo se evidenció en el acetato de quitosano frente a las cepas de microorganismos del género *Micrococcus*.

**Tabla 4.** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas microbicidas (CMM) del quitosano y el acetato de quitosano

Microorganismo	Quitosano		Acetato de quitosano	
	CMI (mg/mL)	CMM (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMM (mg/mL)
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	1,5	-	0,34	1,5
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	2,0	-	0,3	2,0
<i>M. flavus</i> NCTC 7743	2,0	-	0,3	1,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29737	0,3	-	0,14	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,34	-	0,27	-
<i>E. coli</i> ATCC 10536	2,5	-	0,3	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,0	-	0,34	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,27	-	0,2	-
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	0,3	-	0,14	-
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 2601	0,3	-	0,21	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,27	-	0,2	-

La actividad antimicrobiana del quitosano depende de factores como el GD, Mm, temperatura, pH del medio, tipo de microorganismo, entre otros. Para el caso de las bacterias se plantea, que puede tener actividad intra y extracelular, según su Mm y las características del microorganismo. El quitosano de alta Mm es, generalmente, incapaz de penetrar la pared y la membrana celular, por lo que su potencial efecto antimicrobiano implica actuar como quelante de metales esenciales, impidiendo que los nutrientes sean absorbidos de las células extracelularmente, alterando la permeabilidad celular [22]. Sin embargo, la de baja Mm no sólo tiene actividad antimicrobiana extracelular, sino también intracelular, afectando así el ARN, la síntesis de proteínas y la función mitocondrial. Todo esto, unido a las características propias de cada grupo microbiano, hace que su acción antimicrobiana sea altamente dependiente del tipo de microorganismo [23].

En el caso de los hongos, sus propiedades antifúngicas están relacionadas, principalmente, con la interacción del quitosano con la pared celular o membrana celular. Sin embargo, la CMI del quitosano varía y está altamente asociada con la Mm, GD, pH y el tipo de hongo [24-26].

## CONCLUSIONES

Las disoluciones de quitosano mostraron mayor actividad antioxidante que la del acetato de quitosano. Tanto el quitosano, como su sal de acetato, presentaron un efecto inhibitorio sobre los microorganismos utilizados en el estudio y su actividad dependió de la concentración. La actividad antimicrobiana del acetato de quitosano fue superior a la del quitosano. La acción bactericida solo se evidenció frente a las cepas del género *Micrococcus*.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

1. S. Gopi, S. Thomas, A. Pius (editores), *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties*, Elsevier Science Publishing, Philadelphia, PA, 2020, p. 412-446. Doi: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03014-5>
2. N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, G. Crini, Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology and environmental chemistry, *Environmental Chemistry Letters*, **17**, 1667-1692 (2019). URL: <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00904-x>
3. F. Avelelas, A. Horta, L.F.V. Pinto, S.C. Marques, P.M. Nunes, R. Pedrosa, S.M. Leandro, Antifungal and antioxidant properties of chitosan polymers obtained from nontraditional *Polybius henslowii* sources, *Marine drugs*, **17**(4), 239 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/md17040239>
4. S. Gopi, S. Thomas, A. Pius, *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 2: Composites and Nanocomposites from Chitin and Chitosan, Manufacturing and Characterizations*, Elsevier, Amsterdam, 2020, p. 203. Doi: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03015-7>

5. M.F. Oliveira, E.G. Silva, C.A. Câmara, I.A. de Souza, R.S. Amorim, Evaluation of acute toxicity of  $\beta$ -lapachone associated with chitosan as a cytoprotective agent, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **54**(5), 279-287 (2018). Doi: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20180048>
6. M.E. Abd El-Hack, M.T. El-Saadony, M.E. Shafi, N.M. Zaberemawi, M. Arif, G.E. Batiha, A.F. Khafaga, Y.M. Abd El-Hakim, A.A. Al-Sagheer, Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 2726-2744 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>
7. A. Araújo-Vieira, A. Soares dos Santos, A.L. Morais-Ruela, Emulgel baseado em quitosana contendo extrato de *Propolis vermelha* para tratamento de infecções vulvovaginais, *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, **17**(1), 58-77 (2021). URL: <https://revista.uepb.edu.br/BIOFARM/article/view/2231/1823>
8. N.d.l.P. Martín-Viaña, M. Fernández-Cervera, C.M. García-Peña, D. Pérez-Ricardo, A. Nogueira-Mendoza, Y. Montes de Oca Porto, V. Martínez-Espinosa, A.B. Menéndez, Z.C. Palazón-López, Quitosana y sus sales: producción nacional, caracterización y aplicaciones farmacéuticas, *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, **11**(3), 1058-1068 (2021). URL: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/1058/1191>
9. N. de la Paz, M. Fernández, O.D. López, C.M. García, A. Nogueira, L. Torres, W. Turiño, J. Heinämäki, Spray drying of chitosan acid salts: Process development, scaling up and physicochemical material characterization, *Marine Drugs*, **19**(6), 329 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/md19060329>
10. M.A. García, D. Cruz, N. de la Paz, M. Rapado, T. Beldarraín, Influencia de la irradiación gamma en la actividad antimicrobiana de disoluciones y películas de quitosana, *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **24**(2), 49-56 (2014). URL: <https://revcitecal.iiiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/464/390>
11. M.A. García, N. de la Paz, M. Fernández, J.A. Valdés, Evaluación de la actividad antioxidante de disoluciones de sales de quitosana, *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **24**(3), 62-66 (2014). URL: <https://revcitecal.iiiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/345/294>

12. M.A. García, N. de la Paz, C. Castro, J.L. Rodríguez, M. Rapado, R. Zuluaga, P. Gañán, A. Casariego, Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antioxidant capacity of chitosan from lobster shells, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **8**(2), 190-200 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.003>
13. C.M. García, M. Fernández, O.D. López, L. Delgado-Roche, A. Nogueira, M. Castiñeira, E.A. Medrano, Spray drying of shark liver oil pool: Effects on physical-chemical properties and antioxidant capacity, *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, **6**(1), 35-44 (2018). URL: [https://jppres.com/jppres/pdf/vol6/jppres17.263\\_6.1.35.pdf](https://jppres.com/jppres/pdf/vol6/jppres17.263_6.1.35.pdf)
14. A. Lagarto, N. Merino, O. Valdes, J. Domínguez, E. Spencer, N. de la Paz, G. Aparicio, Safety evaluation of chitosan and chitosan acid salts from *Panurilus argus* lobster, *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**, 1343-1350 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.030>
15. I.F.F. Benzie, M. Devaki, The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications, en: E. Apak, E. Capanoglu, F. Shahidi (editores), *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, John Wiley & Sons Ltd., 2018, pp. 77-106. Doi: <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>
16. J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J.-O. Defraigne, J. Dommès, Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests, *Food Chemistry*, **113**(4), 1226-1233 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.013>
17. US Pharmacopeia 44 – National Formulary 39, The United States Pharmacopeia Convention, North Bethesda, MD, 2021.
18. M. Guerra-Ordóñez, E. Sánchez-Gavin, M. Gálvez-Blanco, Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L., *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **9**(1) (2004). URL: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962004000100005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000100005&lng=es)
19. J.M.G. Tanomaru, M. Tanomaru-Filho, M. Palhão-Verri, E. Watanabe, I.Y. Ito, Actividad antimicrobiana de diferentes tipos de cemento endodónticos, *Acta Odontológica Venezolana*, **47**(3), 3-10 (2009). URL: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-63652009000300002](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000300002)

20. G. Ayala–Valencia, Efecto antimicrobiano del quitosano: Una revisión de la literatura, *Scientia Agroalimentaria*, **2**, 32-38 (2015). URL: <https://www.researchgate.net/publication/288511705>
21. A. Verlee, S. Mincke, C.V. Stevens, Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, *Carbohydrate Polymers*, **164**, 268-283 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
22. M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *International Journal of Food Microbiology*, **144**(1), 51-63 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
23. C.-L. Ke, Y.-T. Liao, C.-H. Lin, MSS2 maintains mitochondrial function and is required for chitosan resistance, invasive growth, biofilm formation and virulence in *Candida albicans*, *Virulence*, **12**(1), 281-297 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1870082>
24. F. Lopez-Moya, M. Suarez-Fernandez, L.V. Lopez-Llorca, Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(2), 332 (2019). URL: Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>
25. L.G. Silva-Garcia, G.M. de Melo-Guedes, M.L. Queiroz da Silva, D.S.C.M. Castelo-Branco, J.J. Costa-Sidrim, R. de Aguiar-Cordeiro, M.F. Gadelha-Rocha, R. Silveira-Vieira, R.S. Nogueira-Brilhante, Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm, *Carbohydrate Polymers*, **195**, 662-669 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
26. Z. Atai, M. Atai, J. Amini, N. Salehi, *In vivo* study of antifungal effects of low-molecular-weight chitosan against *Candida albicans*, *Journal of Oral Science*, **59**(3), 425-430 (2017). Doi: <https://doi.org/10.2334/josnusd.16-0295>

## COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Z. Palazón-López, N.d.l.P. Martín-Viña, M.d.l.Á. Bécquer, M. Fernández-Cervera, J.R. Pérez-Mora, O.D. López-Hernández, A. Nogueira-Mendoza, Quitosano derivado de quitina de langosta: actividad antioxidante y antimicrobiana, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(3), 863-880 (2024). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n3.119216>