

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-glucopiranos], y la de la quitina, poli[β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos], 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.

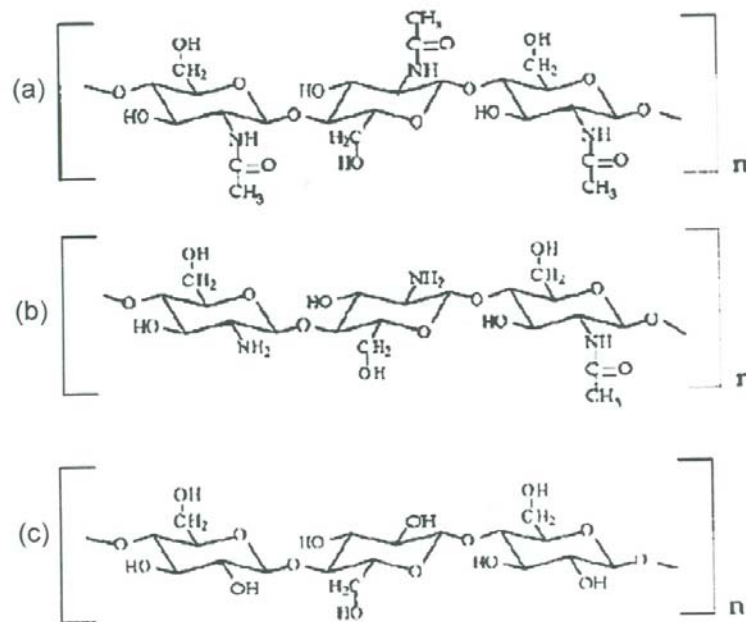


Figura 1. Estructura de la (a) quitina, (b) quitosano, y (c) celulosa. Fuente: Knaut y col., 1998.

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 (<i>Cancer</i>)	72.1 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003.
Cangrejo (<i>Carcinus</i>)	64.2 ^b	Tharanathan y Kittur, 2003.
Cangrejo rey (<i>Paralithodes</i>)	35.0 ^b	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo azul (<i>Callinectes</i>)	14.0 ^a	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo (<i>Sylla cerrrata</i>)	23.0 ^b	Oudor-Odote y col., 2005
Camarón (<i>Crangon</i>)	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 (<i>Nephrops</i>)	69.8 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta (<i>Homarus</i>)	60-75 ^c	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta (<i>Panillirus 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 deproteínizada 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>Blattella</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).

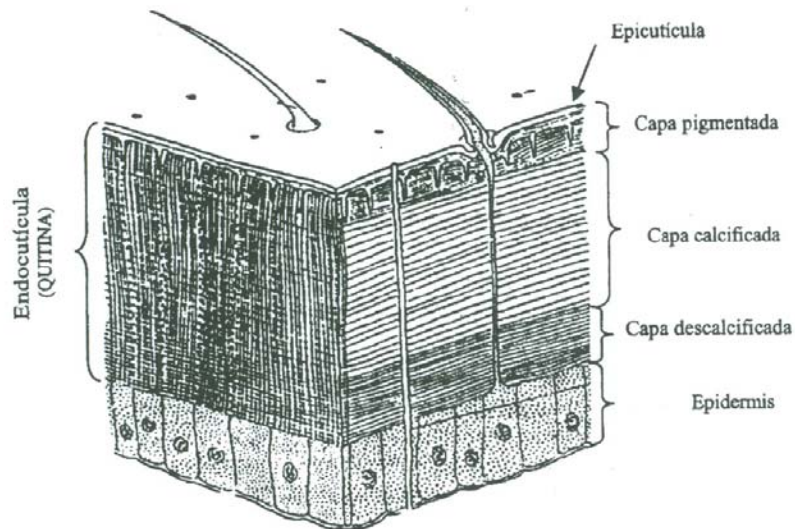


Figura 2. Distribución de la quitina en la matriz de crustáceos. Fuente: Pastor e Higuera, 2004.

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 microbiológica (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.

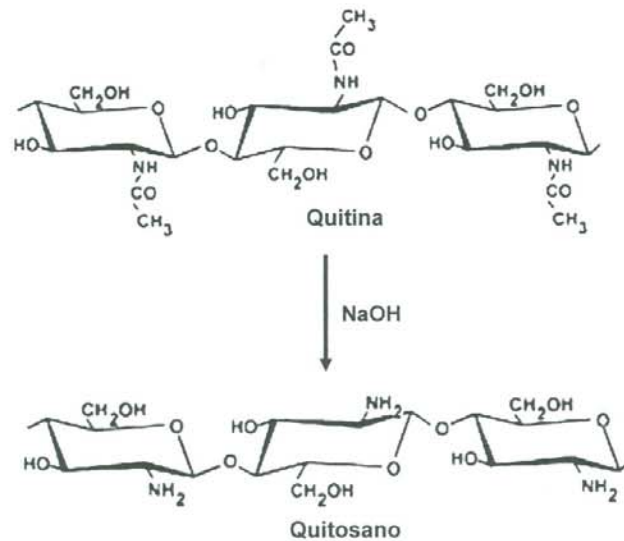


Figura 3. Desacetilación química de la quitina para la obtención de quitosano. Fuente: Shahidi y col., 1999.

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 sí 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 anfifilica.
- 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 anti-grastritis 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. ▪ Extiende vida de anaquel. 	Fornes y col., 2005.
	Pitaya roja y mango pelado y rebanado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 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.

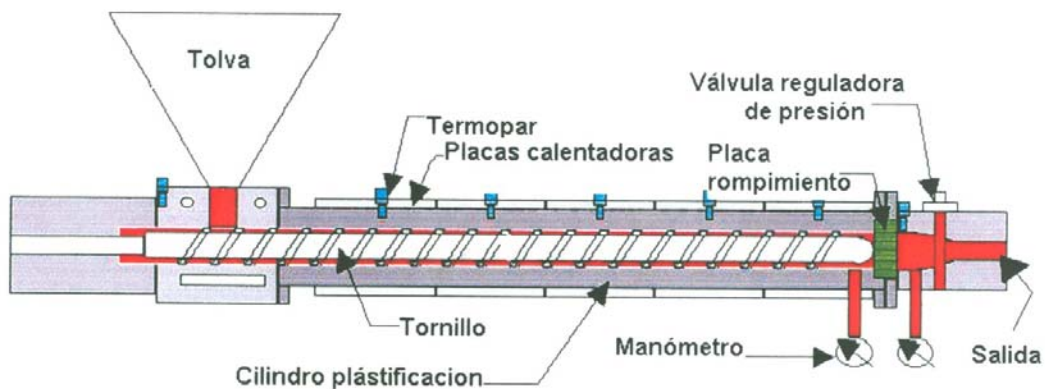


Figura 4. Extrusor de un tornillo y partes más importantes. Fuente: Bolur, 1998.

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-alquil 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
Quitosan 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 polietilén y propilén 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 recicle 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 empaques 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 empaques, 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 empaques 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