



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE QUITOSANO POR EL MÉTODO
QUÍMICO A PARTIR DEL HONGO SETA (*PLEUROTUS
OSTREATUS*) Y SU CARACTERIZACIÓN**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Química

Presenta:

GUADALUPE CUAHUIZO HUITZIL

Director de Tesis:

M.I. MARIA JUANA PAREDES BAUTISTA

Puebla, Pue. JUNIO 2016



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/1049/2015
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. GUADALUPE CUAHUIZO HUITZIL
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Química cuyo título es el siguiente:

“OBTENCIÓN DE QUITOSANO POR EL MÉTODO QUÍMICO A PARTIR DEL HONGO SETA (PLEUROTUS OSTREATUS) Y SU CARACTERIZACIÓN”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: M.I. María Juana Paredes Bautista
Co-Director de Tesis: Dra. Claudia Santacruz Vázquez

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será ÚNICAMENTE POR UN AÑO.

ATENTAMENTE
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., 22 de septiembre del 2015


M.I.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ E. DE LOS MONTES
SECRETARIA ACADÉMICA



C.c.p. Director de Tesis: M.I. María Juana Paredes Bautista
Co-Director de Tesis: Dra. Claudia Santacruz Vázquez
Minutario Facultad de Ingeniería Química

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251

CTAI01



**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla**
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



CIUDAD UNIVERSITARIA

C.P. José Juan Morales Rodríguez
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Química

Guadalupe Cuahuizo Huitzil

Quién presenta como tema de tesis:

“OBTENCIÓN DE QUITOSANO POR EL MÉTODO QUÍMICO A PARTIR DEL HONGO SETA (*PLEUROTUS OSTREATUS*) Y SU CARACTERIZACIÓN”

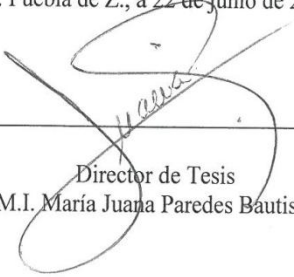
La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 22 de junio de 2016


Director de Tesis
M.I. María Juana Paredes Bautista

Dedicatoria

*A mis padres por su comprensión y apoyo a largo de todos estos años y porque sin su motivación nunca hubiera llegado hasta aquí.
A mi hermano Rene por darme su apoyo constante.*

Agradecimientos

A mis padres por su comprensión y apoyo a largo de todos estos años.

A mi hermano Rene por darme su apoyo constante.

Agradezco a dios por darme la vida.

A la M.I María Juana Paredes Bautista por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su proyecto de investigación.

A la Dra. Claudia Santacruz Vázquez, la Dra. Verónica Santacruz Vázquez y la Dra. María Emelia Zamora López por haber contribuido en el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	VIII
INTRODUCCION	XIV
JUSTIFICACIÓN.....	XV
OBJETIVO GENERAL	XVI

CAPITULO 1

ANTECEDENTES.....	1
Quitosano	1
Propiedades del quitosano	2
Propiedades fisicoquímicas del quitosano	4
Propiedades químicas de quitosano	5
Cuaternización.....	5
Reacciones con aldehídos y cetonas	6
Quelación de varios iones de metales de transición.....	6
Propiedades biológicas de quitosano	7
Biodegradable	7
Biocompatible.....	7
No tóxico.....	7
Hemostático.....	8
Antitumoral	8
Actividad Antimicrobial.....	9
Actividad antioxidante.....	9
Obtención de quitosano	9
Método Químico	10
Método Enzimático	110
Obtención de quitosano a partir de camarón	11
Obtención de quitosano en hongos	121

Mecanismo de obtención del quitosano a partir del hongo.....	133
Extracción de QS de micelios por diferentes métodos.....	15
Grado de desacetilación del quitosano	19
Valoración potenciométrica	19
Valoración potenciométrica lineal	211
Métodos Espectroscópicos	222
Espectroscopia infrarroja (IR)	222
Espectroscopia de rayos X	288
Espectroscopia UV-Vis	29
Espectroscopia de RMN	30
Aplicaciones del quitosano	322
Actividad antimicrobial.....	322
Regeneración de tejido.....	333
Actividad antitumoral.	333
Industria de películas comestibles.....	355
Inmovilización de enzimas.....	355
Tratamiento de aguas crudas	366

CAPITULO 2

METODOLOGÍA	388
Comparación del proceso de obtención de crustáceos y micelios de hongo...388	
Obtención de quitosano por el método de Nwe et al., (2010)	399
Identificación del polímero	399
Determinación del grado de desacetilación	40
Valoración potenciométrica	40
Valoración potenciométrica lineal	411
Espectroscopia Infrarroja (IR).....	422

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	433
Obtención de QS de Pleurotus ostreatus.....	433
Etapas del proceso de obtención de quitosano	455
Desacetilación de la Quitina	50
Solubilización y precipitación de Quitosano	50
Identificación del polímero en píleo y estipe	50
Caracterización del QS	522
Grado de desacetilación por valoración potenciométrica del píleo	522
Grado de desacetilación del QS (obtenido de píleo) por valoración potenciométrica lineal	544
Grado de desacetilación del QS píleo y estipe por espectroscopia IR	566
CONCLUSIONES	588
BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Unidad estructural de la quitina.
- Figura 2.** Unidad estructural del quitosano.
- Figura 3.** Hongo seta con sus partes principales.
- Figura 4.** Desacetilación de la QN.
- Figura 5.** Adición nucleofílica del grupo hidroxilo.
- Figura 6.** Eliminación del grupo amino.
- Figura 7.** Equilibrio ácido - base entre el ácido carboxílico y la amina.
- Figura 8.** IR espectro de la QN, representación de las diferentes líneas base mencionadas en la literatura.
- Figura 9.** Proceso de obtención de QS en crustáceos y micelios de hongo.
- Figura 10.** Metodología para la extracción de QS de micelios.
- Figura 11.** Diagrama de bloques para la obtención de QS de *Pleurotus ostreatus*.
- Figura 12.** Desacetilación de píleo.
- Figura 13.** Desacetilación de estipe.
- Figura 14.** Desacetilación de semilla.
- Figura 15.** Lavados con agua desionizada.
- Figura 16.** Pastas después de una serie de lavados.
- Figura 17.** Filtración de las pastas.
- Figura 18.** Sobrenadantes.
- Figura 19.** Precipitación del QS.
- Figura 20.** Espectro de IR del QS píleo obtenido del hongo seta *Pleurotus ostreatus*.
- Figura 21.** Espectro de IR del QS estipe obtenido del hongo seta *Pleurotus ostreatus*.

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Curva de titulación del QS extraído de *Pleurotus ostreatus*.

Grafica 2. Criterio de la primera derivada.

Grafica 3. Curva de valoración lineal.

Grafica 4. Curva de valoración lineal de pH ~2 a pH < 6.

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Extracción de QS de micelios por diferentes métodos.
- Tabla 2.** Coeficientes de correlación de la relación A_M/A_R vs DD.
- Tabla 3.** Coeficientes de correlación de la relación A_M/A_R vs DD (Método de línea base).
- Tabla 4.** Diámetros de inhibición.
- Tabla 5.** Recomendaciones generales para la aplicación del QS.
- Tabla 6.** Características de las pastas después de la desacetilación.
- Tabla 7.** Cantidad de NaOH para la precipitación del QS.
- Tabla 8.** Rendimientos de QS.
- Tabla 9.** Valoración potenciométrica del QS píceo.
- Tabla 10.** Valoración potenciométrica lineal del QS píceo.
- Tabla 11.** DD del píceo y estipe por IR.

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación del DD por valoración potenciométrica.

Ecuación 2. Calculo del porcentaje de grupos amino.

Ecuación 3. Calculo de la función $f(x)$ de los correspondientes volúmenes de NaOH.

Ecuación 4. Determinación del DD por valoración potenciométrica lineal.

Ecuación 5. Calculo de \emptyset .

Ecuación 6. Correlación de A_{1320}/A_{3450} .

Ecuación 7. Correlación de A_{1320}/A_{1420} .

Ecuación 8. Coeficientes de regresión A y B para predecir la DA.

Ecuación 9. Calculo del DA para muestras con DA entre 0 y 55%.

Ecuación 10. Calculo del DA para grados de acetilación entre 0 y 100 %.

Ecuación 11. Calculo del DD por el método de línea base, utilizando las bandas de adsorción de A_{1560}/A_{3430} .

Ecuación 12. Calculo del DD por el método de línea base, utilizando las bandas de adsorción de A_{1655}/A_{2920} .

Ecuación 13. Calculo del DD por el método de línea base, utilizando las bandas de absorción de A_{1655}/A_{2880} .

Ecuación 14. Calculo del DA por la primera derivada de UV

Ecuación 15-17. Calculo del DA comparando la integral del carbono de metilo/protones del grupo acetilo.

Ecuación 18. Ecuación general para determinar el DD.

RESUMEN

En este trabajo se realizó la extracción de quitosano (QS) a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* conocido comúnmente como hongo “seta”; adquirido en la empresa Setas del bosque, S del R.L. de la ciudad de Puebla, se retomó el método de Nwe (2010) para la obtención de QS del píleo, estipe y semilla del hongo seta. Los rendimientos obtenidos son de 0.86 %, 0.024 %, 0 % respectivamente en base seca de 40g, 30g y 100g. Para el proceso de desacetilación de la quitina (QN) se utilizó NaOH 11M, T= 45°C, tiempo 12 h; posteriormente el QS se disolvió en CH₃COOH 0.35 M, T=75 °C y 3h y para que precipite el QS se utilizó NaOH a una concentración 1M, hasta alcanzar un pH=10.

Las propiedades fisicoquímicas del QS afectan su funcionalidad y éstas a su vez varían dependiendo de la fuente y método de obtención de la QN. El grado de desacetilación (DD) es una de las características químicas más importantes que influyen en muchas de sus aplicaciones (ingeniería de tejido, conservación de alimentos, tratamiento de aguas residuales, inmovilización de enzimas etc.), por tal motivo es esencial determinar el DD antes de su utilización.

Existen diversos métodos para determinar el DD del QS: Valoración potenciométrica, Espectroscopia Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear, UV primera derivada, difracción de rayos X, entre otros. Sin embargo el DD puede ser afectado por la técnica empleada.

Sin embargo en la gran mayoría de los laboratorios se carece de equipo tan costoso para hacer las determinaciones por lo que una técnica, rápida y de bajo costo se requiere para determinar DD del QS extraído del píleo y estipe, que es Valoración Potenciométrica (VP). El inconveniente de este método es que es impreciso por lo que optamos por utilizar otra técnica que no tenga tanto margen de error y ésta es Valoración Potenciométrica Lineal (VPL) y Espectroscopia Infrarroja (IR). Al realizar la valoración potenciométrica por los métodos descritos se obtuvieron 57.06%, 88.80% (95.86%) y 77.33% de DD respectivamente para el

píleo. Debido a que el rendimiento de QS del estipe fue muy bajo únicamente se determinó el DD por IR dando como resultado un 80.70% de DD.

El DD del QS extraído del estipe es mayor debido a que las cadenas complejas quitina/quitosano-glucono de la pared celular de las setas se rompen más fácilmente bajo las condiciones de extracción empleadas, permitiendo mayor cantidad de QS extraído, sin embargo para el píleo se requieren otras condiciones de obtención para tener un mayor grado de DD.

INTRODUCCION

El polisacárido quitina (QN) y su producto desacetilado quitosano (QS), actualmente han recibido gran interés por su potencial aplicación en agricultura, biomedicina, biotecnología y la industria alimentaria debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y bioactividad (Tao *et al.*, 2005), también puede ser manipulado para preparar soluciones viscosas controladas como: geles, membranas, micro-esferas y nanopartículas (Becerra *et al.*, 2011). El grado de desacetilación es una de las características químicas más importantes que influye dentro de sus aplicaciones, este a su vez depende directamente de las condiciones del proceso de obtención.

La quitina es el componente principal del caparazón de los crustáceos, cutículas de insectos, y la pared celular de algunos hongos tales como *Lentinula edodes*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Gongronella bluteri*, *Absidia orchidis*, han sido investigadas para la producción de QN y QS.

La producción de QN y QS a partir de fuentes fúngicas ha atraído mayor atención en los últimos años, debido a que las setas tienen niveles más bajos de materia inorgánica (carbonato de calcio) en comparación con el caparazón de los crustáceos, por lo que no requiere el tratamiento adicional de desmineralización durante el proceso de obtención de QS. La principal ventaja es que la producción de la seta puede ser obtenida durante todo el año en invernaderos en comparación con la obtención de QS a partir de desechos de crustáceos las cuales son estacionales (Balanta *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo es comparar los rendimientos de QS extraído de pileo, estipe y semilla del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*), una vez obtenido el biopolímero se caracteriza el DD por valoración potenciométrica, valoración potenciométrica lineal, y espectroscopia infrarroja (IR), con la finalidad de dar un valor agregado a los desechos de las setas y proponer posibles usos dependiendo del DD.

JUSTIFICACIÓN

El mercado de hongos comestibles está en expansión en nuestro país, por tal motivo, cuando se empacan los cuerpos fructíferos de las cepas se separan los hongos maltratados y/o deformes, que en la mayoría de los casos se les corta el estipe debido a su dureza al ser masticados por lo no tienen preferencia en su consumo, éstos residuos a su vez pueden ser utilizados para la extracción de QS. Actualmente, los volúmenes de producción en México ascienden a más o menos 62,374 toneladas anuales de hongos comestibles frescos. Nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica y cuenta con los avances tecnológicos en este aspecto, ya que genera alrededor del 80.8% de la producción total de esa región, seguido por Brasil (7.7%) y Colombia (5.2%), ubicándose como el 13º, productor a nivel mundial (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares, generando alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 500,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

Los hongos comestibles que se cultivan o procesan comercialmente en México son: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma*, *Ustilago*, *Grifola* (Martínez-Carrera *et al.* 2010,).

En las últimas dos décadas, se registró una notable expansión de la cadena agroalimentaria de los hongos comestibles, funcionales y medicinales, concentrada territorialmente en la región central de México. Esta plataforma de producción está ubicada en 14 Estados de la república principalmente: Coahuila, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

En el periodo 1991-2011, se observó un incremento de 590.2 % en la producción nacional de hongos frescos, pasando de 9,036 toneladas en 1991 a 63,374 toneladas en 2011. Los champiñones blancos y cafés representan el 95.1% de la producción nacional. Por su parte, las “setas” representan el 4.86% de la

producción nacional de hongos frescos y son producidos, a pequeña y gran escala, en los Estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz, y Yucatán (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

Actualmente, aunque el champiñón (*Agaricus*) ocupa el primer lugar, tanto *Pleurotus* como el shiitake (*Lentinula edodes*) compiten por el segundo y tercer lugar en la producción comercial de hongos comestibles a nivel mundial. Es probable que la producción comercial de *Pleurotus* continúe incrementándose en corto plazo, por las siguientes razones: 1) Existen un gran número de especies potencialmente cultivables (*ostreatus*, *levis*, *djamor*, *abalonus*); 2) Las tecnologías de producción son relativamente sencillas y de bajo nivel de inversión; 3) Se han desarrollado cepas comerciales con amplio rango de temperaturas de fructificación y sustratos de cultivo; y 4) Las fructificaciones son bien aceptadas por los consumidores en muchos países (Mora, V., & Martínez-Carrera, D., 2007).

OBJETIVO GENERAL

Obtener QS con un grado de desacetilación de 80% a partir de píleo (sombrero), estipe (pie) y semilla del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*) adquiridos en Setas del bosque, S del R. L. y comparar sus rendimientos.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

Quitosano

El QS es un polímero lineal formado por monómeros de glucosamina y en menor medida de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β 1-4, su denominación química, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 2-amino-2-Desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil glucosamina) (Rodríguez *et al.*, 2009). El QS es un producto natural derivado de la QN, que es un polisacárido presente en el exoesqueleto de artrópodos y zooplancton marinos, formando parte de la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras, también está presente en las alas y cutícula de especies de insectos, siendo importante señalar que la QN es el segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa (Balanta *et al.*, 2010), Hernández (2004).

Cuando se modifica la estructura de la QN (figura 1) removiendo los grupos acetilo unidos al grupo amino del Carbono C2 en el anillo del glucano por medio de una hidrólisis alcalina a elevadas temperaturas se produce el (1→4)-2-amino-2-deoxi- β -D-glucano (Glucosamina) y (1→4)-2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucano (N-Acetil-glucosamina), conocido como QS (figura 2) con predominio de la glucosamina (Rico, 2013).

El QS es obtenido a través de la desacetilación parcial en estado sólido bajo condiciones alcalinas con hidróxido de sodio concentrado. El objetivo de realizar la desacetilación es obtener un compuesto de características fisicoquímicas de notable interés (elevada proporción de grupos amino libres, mayor solubilidad comparada con la QN, biocompatibilidad y biodegradabilidad) (Balanta *et al.*, 2010; Rico, 2013).

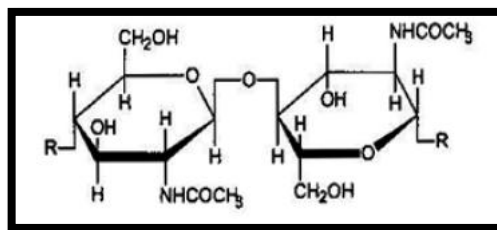


Figura 1. Unidad estructural de la QN ((Maza, & Hernández 2007)

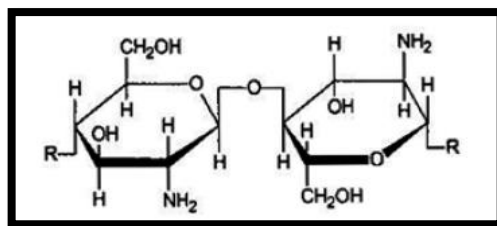


Figura 2. Unidad estructural del QS (Maza, & Hernández 2007)

Propiedades del quitosano

Se define el QS y la QN como solubles o insolubles en ácido acético a 0.1 mol/L respectivamente o por el grado de desacetilación (DD). La QN con más de un 50 % de desacetilación es considerada como QS e incluso otros la definen como tal ante un DD superior al 60 %. En el caso del QS, se establece que el DD se encuentra comprendido entre 60-98 % (Hernández, 2004).

Dependiendo del DD, la QN contiene de 5 a 8 por ciento (w/v) de nitrógeno, que es el principal componente en la formación de grupos amino alifáticos primarios presentes en el QS (Kumar *et al.*, 2004).

Es de particular interés la característica del QS de cargarse positivamente en un medio ácido asumiendo un rol único entre los glucanos, siendo los grupos amino responsable de esta densidad de carga positiva que hace al biopolímero soluble en sistemas acuosos. El carácter policationico del polímero también es responsable de las interacciones de carga con las superficies aniónicas, lo que es crucial en las propiedades bioadhesivas del QS. Una propiedad importante del QS es su estructura rígida, caracterizado por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, el cual le confiere una buena estabilidad térmica (Hernández, 2004; Rodríguez *et al.*, 2009).

La solubilización se produce por la protonación de $-NH_2$ en el C-2 de la unidad de repetición de D-glucosamina, mediante el cual el polisacárido se convierte en un polielectrolito en medios ácidos. La protonación del QS en presencia de ácido acético y ácido clorhídrico muestra que el grado de ionización depende del pH y el pK del ácido. La solubilización del QS con un grado de acetilación (DA) bajo se produce durante un grado de ionización (α) alrededor de 0.5; en HCl, que corresponde a un pH de 4.5-5. Cabe mencionar que el QS es insoluble en agua (pH=7) (Rinaudo, 2006; Kumirska *et al.*, 2011).

El QS es soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6.0 debido a que el QS puede considerarse una base fuerte y los grupos amino primarios tienen un valor de pKa de 6.3. La presencia de los grupos amino indican que el pH altera sustancialmente el estado de carga y las propiedades del QS. Cuando el pH aumenta por encima de 6 las aminas se desprotonan, ocasionando que el polímero pierda su carga y se convierta en insoluble. La transición entre soluble-insoluble ocurre alrededor de pH entre 6 y 6.5. A medida que el valor de pKa depende del grado de N-acetilación, la solubilidad del QS depende del DD y el método de desacetilación utilizado (Pillai *et al.*, 2009).

Las diversas funciones reportadas sobre el QS están relacionadas principalmente con la presencia de los grupos amino libres en cada residuo monomérico de su molécula. Estas funciones se atribuyen a las tres formas estructurales fundamentales en que se puede encontrar la molécula: la cristalina hidratada, la cristalina anhidra y no cristalina o amorfa.

El QS forma sales de ácidos cuando reacciona con diversos ácidos, igualmente forma complejos con iones metálicos de transición. Sin embargo, estas reacciones se hacen posible, cuando la molécula del QS tiene una forma cristalina hidratada o no cristalina. Mientras que muestras de QS ricas en cristales no se disuelven con facilidad en disolventes como ácido acético en solución acuosa. Para funciones químicas o fisicoquímicas es más conveniente tener una estructura del QS no cristalina (Rodríguez *et al.*, 2009; Kozo *et al.*, 1993).

El carácter hidrofílico e hidrofóbico del QS, dado por los grupos amino y N-acetilamino respectivamente, hacen de este polímero un contribuyente potencial a la estabilidad de las emulsiones. El carácter básico del QS combinado a otras propiedades de él como la posibilidad de obtener QS con distintas viscosidades, la facilidad para modificarlas químicamente, además de resultar un producto biodegradable y biocompatible hacen del QS un producto con una amplia gama de aplicación en distintas ramas como la biomedicina, biotecnología, medicina, tratamiento de aguas, industria alimenticia, floculación y coagulación de proteínas y aminoácidos (Hernández, 2004).

Propiedades fisicoquímicas del quitosano

Las propiedades fisicoquímicas de soluciones de QS pueden ser controladas por el manejo de las condiciones de extracción como temperatura, pH, fuerza iónica, concentración y disolvente. El grado de sustitución de los grupos hidroxilo y los grupos amino o el grado de cuaternización de los grupos amino también influyen en las propiedades mecánicas y biológicas de las muestras de QS (Kumirska *et al.*, 2011).

El QS en forma de amina libre es insoluble en agua a pH neutro. Sin embargo, es soluble en ácidos: acético glacial, bromhídrico, iodhídrico, nítrico; perclórico y clorhídrico diluidos, pero insoluble en ácido sulfúrico diluido a temperatura ambiente. Lleva un gran número de grupos amino a lo largo de su cadena, por lo tanto, es capaz de formar complejos múltiples. A pH ácido, la protonación de grupos $-NH_2$ los convierte a $-NH_3^+$, que puede asociarse con polianiones para formar complejos y sitios aniónicos que se unen a células de bacterias y hongos de las superficies de las paredes inhibiendo el crecimiento microbiano. A niveles de pH más altos (> 4), puede formar complejos con los colorantes y metales pesados. Al adquirir carga positiva la amina, el QS aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones acidas diluidas formando sales ya que el pKa del grupo amino en el QS es 6,5 (Embuscado *et al.*, 2009; García *et al.*, 2008).

El peso molecular del QS depende de la fuente de obtención, y el DD, así como varios factores que afectan el proceso de obtención como alta temperatura, concentración de álcali, tiempo de reacción, tratamientos previos de la quitina, tamaño de partícula, y la concentración de oxígeno disuelto entre otros (Kucukgulmez *et al.*, 2011).

Dependiendo del tipo de purificación del QS: neutra, acetato y clorhidrato cuya diferencia es la solución que usan para precipitar el QS (hidróxido de amonio, acetato de sodio y cloruro de sodio respectivamente); se obtienen diferentes características de solubilidad. Todas las muestras analizadas son solubles en soluciones de ácido acético, pero las obtenidas como clorhidrato son completamente solubles en agua (Signini *et al.*, 2001).

La viscosidad se relaciona directamente con la temperatura y el tiempo de desacetilación de la QN. Se obtiene una mayor viscosidad con baja temperatura y con tiempos cortos de desacetilación (Kucukgulmez *et al.*, 2011).

Propiedades químicas de quitosano

El grupo amino da lugar a reacciones químicas tales como cuaternización, reacciones con aldehídos y cetonas (para dar Base de Schiff), quelación de metales, etc (Pillae *et al.*, 2009).

□ Cuaternización

Debido a que el QS posee un valor de $pK_a \sim 5,6$, siendo soluble solo en soluciones ácidas con valores de $pH < 6$, se ha buscado extender el intervalo de pH donde se pueda utilizar dicho biopolímero en solución, para dar una mayor aplicabilidad. Un material con una mayor densidad de carga generaría seguramente una mayor solubilidad, una de las rutas propuestas para lograr este objetivo es lograr una alta eficiencia en la cuaternización de los grupos amino en las cadenas del polímero. Existen diversos métodos de cuaternización de los grupos amino primario y secundario, algunos de los cuales ya se han aplicado con éxito, obteniéndose diferentes derivados alquilados. Uno de los métodos más usados para realizar esta modificación hace uso de la preparación de intermediarios monoalquilados tipo base de Schiff's para su posterior alquilación

exhaustiva usando ioduro de metilo. Normalmente los productos obtenidos mejoran sustancialmente su solubilidad en agua con relación al QS virgen (Lárez 2003).

□ **Reacciones con aldehídos y cetonas**

Una de las reacciones típicas de los aldehídos es la adición nucleófila, donde la presencia del grupo carbonilo ($C = O$), le proporciona al mismo un sitio reactivo para que se produzca este tipo de adición, debido principalmente a la capacidad que posee el oxígeno para aceptar una carga negativa. Es de esta manera como este tipo de compuestos son más susceptibles al ataque por reactivos nucleofílicos ricos en electrones, como es el caso del QS, que debido a la presencia de grupos amino de tipo primario con un par de electrones libres, permiten la formación de un enlace con el carbono carbonílico deficiente en electrones (Perentena *et al.*, 2015).

Las bases de *Schiff* se forman cuando una amina primaria reacciona con un aldehído o una cetona en condiciones específicas. Estructuralmente, una base de *Schiff* (también conocido como imina o azometina) es un análogo de nitrógeno de un aldehído o cetona en la que el grupo carbonilo ($C=O$) ha sido sustituido por una imina o grupo azometina (Perentena *et al.*, 2015).

□ **Quelación de varios iones de metales de transición**

El QS es un buen agente quelante de iones metálicos y para ello requiere los grupos $-OH$ y $-O$ de los residuos de D-glucosamina como ligantes, y al menos 2 o más grupos amino de una misma cadena para unirse a un mismo ion metálico. Este polímero se caracteriza por un elevado número de grupos aminos libres que son muy reactivos para la quelación de cationes metálicos a pH más o menos neutros. Los grupos amino libres del QS resultan mucho más efectivos para acomplejar los iones metálicos que los grupos acetilo de la QN. La propiedad catiónica del QS hace que el polímero sea muy eficiente en la adsorción de iones metálicos por interacciones electrostáticas. (Montero *et al.*, 2010).

Propiedades biológicas de quitosano

Las propiedades biológicas del QS dependen fuertemente de su solubilidad en agua y otros solventes. En su forma cristalina, el QS es normalmente insoluble en soluciones acuosas por encima de pH 7; sin embargo, en ácidos diluidos, los grupos amino libres se protonan facilitando la solubilidad de la molécula. El pKa de los grupos amino primarios depende estrechamente del grado de N-acetilación (DA), la solubilidad del QS es también dependiente de DA (Kumirska *et al.*, 2011).

□ Biodegradable

El QS puede ser degradado *in vivo* por varias proteasas (lisozima, papaína, pepsina etc.). Su biodegradación conduce a la liberación de oligosacáridos no tóxicos de longitud variable que puede ser posteriormente incorporado a glicosaminoglicanos y glicoproteínas, a las vías metabólicas o se excreta. La cinética de degradación parece estar inversamente relacionada con el grado de cristalinidad que es controlada principalmente por el DD. Por otra parte, la distribución de los grupos acetilo también afecta ya que la ausencia de grupos acetilo o su distribución homogénea (al azar en lugar de bloque) da como resultado índices muy bajos de degradación enzimática, varios estudios informaron que la longitud de las cadenas (Mw) también afecta a la velocidad de degradación (Aranaz *et al.*, 2009).

□ Biocompatible

Debido a que el QS es un polímero biodegradable natural, no tóxico, biocompatible y posee un efecto antibacterial, lo hace muy interesante para su uso en ingeniería de tejidos, la velocidad de degradación del andamio debe reflejar la tasa de formación de tejido nuevo o sea adecuada para controlar la liberación de moléculas bioactivas. Por tanto, es importante comprender y controlar el mecanismo y la tasa por el cual se degrada cada material.

La velocidad de degradación también afecta a la biocompatibilidad, a tasas muy rápidas de la degradación producirán una acumulación de los amino azúcares y por consiguiente una inflamatoria respuesta, muestras de QS con bajo DD inducen una respuesta inflamatoria aguda mientras que muestras de QS con alto

DD induce una respuesta mínima debido a la baja velocidad de degradación. La degradación aumenta a medida que disminuye DD (Aranaz *et al.*, 2009).

□ **No tóxico**

La toxicidad del QS está relacionada con la densidad de carga de la molécula, si esta aumenta la toxicidad también lo hará. Cuando existen muy pocos puntos de contacto entre la molécula y los componentes de la célula produce un efecto significativamente tóxico, este efecto se encuentra entre 40 y 60% DD (Kean, & Thanou, 2010).

□ **Hemostático**

El QS actúa para controlar el sangrado de tres formas posibles:

1) Por sorción de plasma el QS puede absorber de 50 a 300% de líquido a partir de su peso principal que conduce a la concentración de eritrocitos y plaquetas en el lugar lesionado. La tasa de absorción depende del peso molecular y el DD así como de tipo de material de QS. La tasa aumenta con un alto DD. Sin embargo, la absorción no es el factor principal que puede detener el sangrado.

2) Eritrocitos de coagulación. Los eritrocitos de coagulación están directamente asociados con propiedades hemostáticas. La aglutinación de eritrocitos fue elevada en presencia de QS debido a la reticulación de los eritrocitos. Unidos por cadenas de polímero de QS y despolimerizado para formar un enrejado que capture las células que crean un coágulo artificial.

3) Plaquetas de adhesión. Agregación y activación. Las plaquetas de adhesión y agregación causan la formación de coágulos rápidos sin activación hemostasia sistémica que son mecanismos con los que se controla la pérdida de la sangre del organismo como: formación del tapón plaquetario (las plaquetas cuando se encuentran en la sangre, tienen unos receptores en su membrana, de forma que cuando detectan que en un sitio falta el endotelio y aparece el colágeno, las plaquetas forman la adhesión plaquetaria) (Maksym & Vitalii 2015).

□ **Antitumoral**

La actividad antitumoral del QS se cree que se da por la inhibición del crecimiento de las células tumorales debido principalmente a un efecto de estimulación inmune. Sin embargo, esta propiedad es muy controversial (Aranaz *et al.*, 2009).

Rao, Ming y Jeng (2016) evaluaron la actividad antitumoral de QS de *Shiitake* estipe por diferentes tratamientos de *N*-desacetilación con quitosano comercial de conchas de cangrejo, sus resultados muestran que fue más eficaz el de *Shiitake*, debido a su bajo peso molecular, y altos grados de *N*-desacetilación mejorando mayormente la inhibición sobre las células de cáncer.

□ **Actividad Antimicrobial**

Debido a la carga positiva en el C-2 del monómero de glucosamina por debajo de pH 6, el QS es más soluble y tiene una mejor actividad antimicrobiana, actuando sobre la superficie celular microbiana, llevando a la contracción gradual de la membrana celular y finalmente a la muerte de la célula. Se han propuesto varias explicaciones para la actividad antimicrobiana, una de ellas es que la molécula policatiónica de QS interactúa con los componentes aniónicos predominantes en la pared celular (lipopolisacáridos y proteínas) del microorganismo, que da lugar a la salida intracelular de los componentes debido a los cambios en la permeabilidad; otra teoría es que evita que los nutrientes ingresen a la célula; sobre la entrada de la célula (especialmente QS de bajo peso molecular); uniéndose al ADN, y de ese modo inhibe el ARN y la síntesis de proteínas.

El QS también actúa como un agente quelante que se une selectivamente a trazas de metales y por lo tanto inhibe la producción de toxinas y el crecimiento microbiano (Shahidi *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2007).

□ **Actividad antioxidante**

La quelación de iones metálicos es una de las razones por las que el QS puede ser considerado como un potencial antioxidante natural para la estabilización de lípidos que contienen los alimentos y de esta manera prolongar su vida útil. El QS puede retardar la oxidación de lípidos por quelantes de iones ferrosos presentes

en el sistema, eliminando así su actividad pro-oxidante o su conversión a ion férrico (Aranaz *et al.*, 2009).

Obtención de quitosano

Tradicionalmente, la fuente primaria de QS ha sido la quitina, que a su vez proviene del material residual de la industria pesquera (exoesqueletos de camarón), sin embargo la extracción del polímero se ve limitada, debido a la escasez del material residual en ciertas temporadas del año en tiempos de veda, por esta razón se utilizan fuentes no convencionales como los hongos. El micelio de varias especies de hongos, como en el caso de *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus orizae*, y *Aspergillus niger* han sido empleado como fuente alternativa para la obtención de QS (Balanta *et al.*, 2010).

En la literatura se reportan dos métodos de obtención el químico y el biológico tanto para crustáceos como para hongos (Arbia *et al.*, 2013; Nwe *et al.*, 2010). La obtención del QS se produce por desacetilación de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos o enzimáticos. Sin embargo, las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de partida, el tratamiento previo, y el DD deseado.

□ Método Químico

Método Químico: se puede llevar acabo de dos formas, homogénea y heterogénea.

- a) La desacetilación homogénea. Consiste en que la QN es suspendida en el álcali y la suspensión es refrigerada con hielo para disolver la QN en la solución. Luego se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la del ambiente durante períodos largos de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y que el ataque a los grupos amida sea más uniforme.
- b) La desacetilación heterogénea. Consiste en que las moléculas de QN son dispersadas en una solución alcalina caliente, generalmente de hidróxido de sodio. Las condiciones en las que se lleva a cabo la desacetilación heterogénea pueden reducir la longitud de la cadena, por este motivo es

conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo y aislando el producto en cada etapa. Para disminuir la pérdida de peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante para evitar su despolimerización. Se ha demostrado que mientras que el QS obtenido en el proceso heterogéneo presenta polidispersión del DD de sus cadenas, el obtenido por vía homogénea tienen la misma composición (García *et al.*, 2008).

□ **Método Enzimático**

La ventaja de este método respecto al químico es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, hecho muy apreciado para aplicaciones biomédicas. La quitina desacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de QN a QS por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. La limitación de este método es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de QN insoluble, y por lo tanto es necesario un pre tratamiento (García *et al.*, 2008).

Obtención de quitosano a partir de camarón

Comúnmente la obtención del QS se realiza a partir de Krill, insectos y caparazones de crustáceos, siendo los camarones la fuente más importante entre ellos. El QS es el principal derivado de la QN, obtenido a través de su deacetilación parcial en estado sólido bajo condiciones alcalinas con hidróxido de sodio concentrado (Rico, 2013).

La obtención del QS se realiza a través de un proceso que consta de cuatro etapas: preparación de la muestra, desproteización, desmineralización, y desacetilación, usando reactivos a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos de reacción. Para la etapa de desproteización se reporta el uso de diferentes reactivos que pueden ser: NaOH, CH₃COOH, y mezcla de CH₃COOH y CH₃COONa; así como variaciones en tiempo y concentración de reactivos a fin de remover las proteínas existentes (Escobar *et al.*, 2013).

Para las etapas de desmineralización y desacetilación, se reporta el uso de HCl y NaOH respectivamente, variando también los tiempos de inmersión y las

concentraciones. Mediante la etapa de desacetilación de la QN se obtiene el QS (Colina *et al.*, 2014).

Obtención de quitosano en hongos

La producción de QS a partir de micelios de hongos tiene mayor ventaja sobre el QS de crustáceos como el grado de acetilación, el peso molecular, la viscosidad y la distribución de carga, siendo además más estable que el de los crustáceos debido a su alto peso molecular (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ Da). Por otra parte el QS producido a partir de micelios fúngicos da peso molecular medio bajo ($1-12 \times 10^4$ Da), que ha sido utilizado como polvo en la absorción de colesterol y como hilo o membrana en muchas aplicaciones médicas. Por estas razones, hay un creciente interés en la producción de QS a partir de hongos (New *et al.*, 2010).

Otras de las ventajas que ofrecen los hongos respecto a la obtención QS de crustáceos, es que se puede obtener todo el año en un ambiente controlado y el proceso de extracción es más simple y menos drástico. Los micelios fúngicos y/o los carpóforos o cuerpos fructíferos de los macromicetos se pueden cultivar en gran escala y, en consecuencia, la QN contenida en la pared celular puede ser más fácilmente aislada, evitando el tratamiento agresivo empleado cuando la fuente de obtención es el exoesqueleto de crustáceos.

La pared celular está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la QN y el glucano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida. La QN se halla formando el complejo quitina-glucano por un enlace glucosídico β (1-3) entre la N-acetilglucosamina y la glucosa (Pontón, 2008; Libardo, 2011).

Comúnmente las setas son conocidas como los cuerpos fructíferos de un conjunto de hongos pluricelulares que incluyen varias especies. En nuestro estudio cuando mencionamos setas nos referimos al hongo del género *Pleurotus ostreatus*.

Los hongos constan de las siguientes partes:

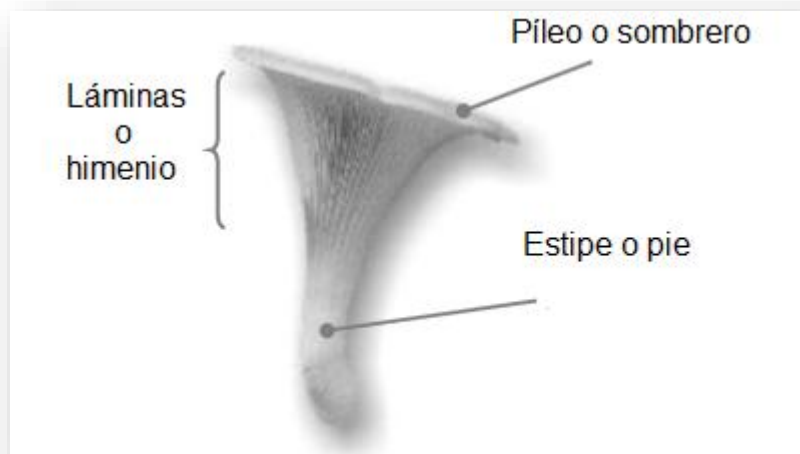


Figura 3 Hongo seta con sus partes principales (Gaitán, et al., 2006)

Wessels (1990) propone que inicialmente la QN y cadenas β -glucano se acumulan individualmente en la pared celular de los hongos y, posteriormente, forman el enlace del interpolímero. La formación de la quitina/quitosano-glucano construye cadenas complejas que resultan en una red reticulada rígida en la pared celular causando un problema considerable para la extracción de QS y glucano por separado. Esta red no se rompe con facilidad en condiciones de extracción suave.

Para la extracción de QS de la pared celular, primero la pared celular es aislada a partir de la biomasa fúngica a través de un tratamiento alcalino con solución diluida de NaOH a temperatura elevada (90-120 °C), en esa solución (de NaOH), se disuelven proteínas, lípidos e hidratos de carbono que son solubles en álcali y la pared celular restante es material insoluble con álcali (MIA). Posteriormente, el QS se separa de MIA por disolución en una solución de ácido (por ejemplo ácido acético 2- 10% a 25-95 °C durante 1-24 h), finalmente la precipitación de QS fúngico se lleva a cabo mediante el aumento del pH 9-10 y el QS es recuperado por centrifugación (Mohamed *et al.*, 2015).

Mecanismo de obtención del quitosano a partir del hongo (Libardo, 2011).

De la QN extraída se obtiene QS mediante la hidrólisis del grupo acetilo, por tratamiento con hidróxido de sodio (figura 4).

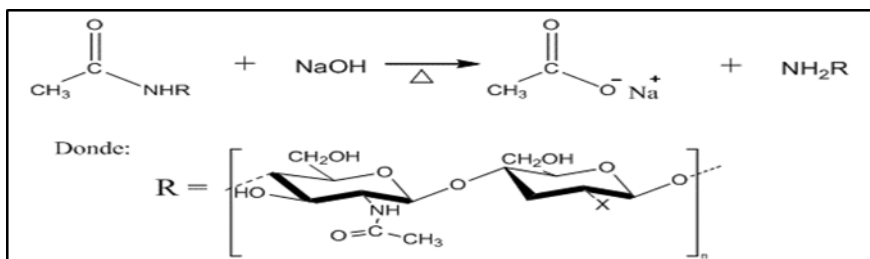


Figura 4. Desacetilación de la quitina

El mecanismo de esta reacción de desacetilación transcurre en tres pasos; el primer paso consiste en un ataque nucleofílico en la posición electrófila del grupo carbonilo de la QN por parte del grupo hidroxilo y formación del intermediario tetraédrico figura 5.

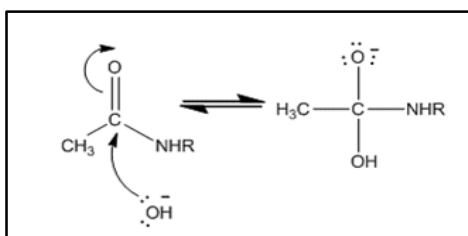


Figura 5. Adición nucleofílica del grupo hidroxilo

En el segundo paso del mecanismo, el intermediario tetraédrico sufre la eliminación del grupo amino (NHR), para la formación del ácido carboxílico correspondiente figura 6.

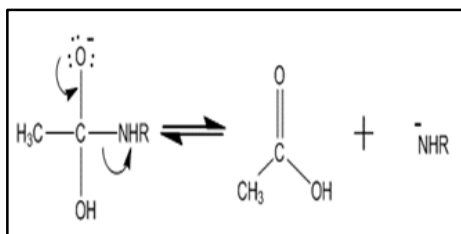


Figura 6. Eliminación del grupo amino

En el tercer paso, la amina (glucosamina) actúa como base desprotonando el ácido. Este equilibrio es muy favorable y desplaza los anteriores equilibrios hacia el producto final figura 7.

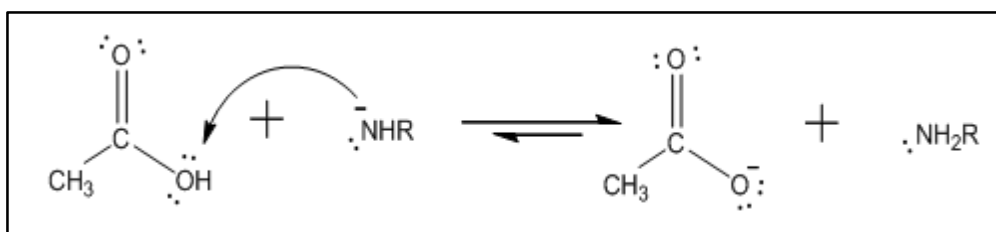


Figura 7. Equilibrio ácido – base entre el ácido carboxílico y la amina.

En la mayoría de los métodos (Tabla 1) utilizan 1M NaOH para eliminar proteínas y otros materiales de la pared celular, posteriormente el QS es extraído con ácido acético al 2%. El rendimiento de QS producido a partir de los micelios de hongos tratados de esta manera es muy bajo. En estas condiciones sólo se libera el QS que se encuentra en la pared celular fuera del complejo quitina/quitosano-glucano (Nwe *et al.*, 2010).

Extracción de QS de micelios por diferentes métodos

Los estudios reportados por los diferentes autores sobre la obtención de QS utilizan para sus estudios diferentes tipos de hongos, empleando el mismo método de extracción; la variación entre los autores es que utilizan distintas concentraciones de los reactivos, medios de cultivo, temperaturas y tiempos (Tabla 1).

Tabla 1. Extracción de QS de micelios por diferentes métodos (Nwe, *et al.*, 2010).

Referencia	Cepa	Desproteínización (NaOH)			Extracción Acido Acético			Rendimiento de quitosano
		Conc:	Temp:	Tiempo	Conc:	Temp:	Tiempo	
Jaworska y Konieczna, 2001	<i>Absidia Orchidis</i>	1M	121 °C	10 min	1 %	-	-	1.84 g/L
Crestini <i>et al.</i> , 1996	<i>Lentinula Edodes</i>	1M	121 °C	15 min	2 %	95 °C	14 h	6.18 g/Kg de paja de trigo
Crestini <i>et al.</i> , 1996	<i>Lentinula Edodes</i>	1M	121 °C	15 min	2 %	95 °C	14 h	120 mg/L
Tan <i>et al.</i> , 1996	<i>G. Butleri</i>	1M	121 °C	15 min	2 %	25 °C	1 h	467 mg/L
Muzzarelli <i>et al.</i> , 1994	<i>A. Coerulea</i>	25%	Hervir	3 h	0.1 %	25 °C	16 h	1800 mg/L
Rane y Hoover, 1993	<i>G. Butleri</i>	1M	121 °C	15 min	2 %	95 °C	12 h	230 mg/L
Rane y Hoover, 1993	<i>A. Coerulea</i>	1M	121 °C	15 min	2 %	95 °C	12 h	480 mg/L
Arcidiacono y Kaplan, 1992	<i>M. Rouxii</i>	1M	121 °C	15 min	2 %	95 °C	-	250 mg/L
Hang, 1990	<i>R. Oryzae</i>	2%	121 °C	15 min	2 %	95 °C	12 h	700 mg/L

Jaworska y Konieczna (2001) investigaron la influencia de iones ferrosos, iones de manganeso, iones de cobalto, tripsina, y QN, como suplemento individual para el medio nutriente, en la actividad *in vivo* de la sintasa-quitina y quitina-desacetilasa para formar QS en el hongo *Absidia Orchidis*.

El hongo se cultivó en un medio de extracto de levadura, peptona y glucosa YPG enriquecido con las sales siguientes (cantidades para 100 ml de H₂O): 0.5 g (NH₄)₂SO₄, 0.1 g K₂HPO₄, 0.1 g de NaCl, 0.5 g MgSO₄ 7H₂O, 0.1 g de CaCl₂. El pH del medio fue de 6.3.

Los rendimientos más altos de QS fueron observados en los cultivos que contienen iones Mn²⁺ y Fe²⁺ que estaban relacionados con el aumento de la producción de biomasa en lugar de un aumento del contenido de QS en la pared celular. Los iones, como activadores de quitina desacetilasa o quitina sintasa *in vitro*, probablemente fueron reclutados en el metabolismo de hongos y no sólo en la activación de la formación de QS. Iones de manganeso y ferrosos bajaron la actividad de quitina desacetilasa; sin embargo, su influencia sobre la actividad de la quitina sintasa era más compleja. Los efectos de la tripsina y la QN en la biomasa y el contenido de la pared celular de QS fueron insignificantes, mientras que los iones de cobalto inhibieron completamente el crecimiento de hongos.

Crestini *et al.*, (1996) se centró en la acumulación del QS en la biomasa durante el envejecimiento en condiciones sumergidas y de estado sólido del hongo *Lentinula edodes*. Para ambas condiciones de fermentación sumergida y de estado sólido el valor máximo de rendimiento de QS se obtuvo a 12 días después de la inoculación, en periodos más largos, los rendimientos de QS disminuyeron lentamente.

Pudo observar que en fermentación en estado sólido el rendimiento fue 50 veces mayor que con fermentación sumergida. Este hallazgo se puede explicar que bajo condiciones de fermentación de estado sólido la biomasa es más concentrada que en fermentación sumergida.

Tan *et al.*, (1996) evaluó el momento óptimo de cosecha de *zygomycetes* utilizando un caldo nutriente que contenía: glucosa (20 g), peptona (10 g), extracto

de levadura (1 g), $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (5 g), K_2HPO_4 (1 g), NaCl (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), por litro de agua destilada y con un pH de 4,5. La fase exponencial tardía para *Gongronella butleri* cepa USDB 0201 era a las 96 h donde la proporción de moléculas de QS libre es relativamente alta, debido al crecimiento activo. Una vez que el cultivo entra en la fase de crecimiento estacionario 120 h, más QS está anclado a la pared celular de las *zygomycetes* mediante la unión de la QN y otros polisacáridos por lo que la extracción se hace más difícil. Por lo tanto, aunque la biomasa de hongos es mayor durante la fase de crecimiento estacionario, se obtiene menos QS.

Por tal motivo todos los hongos deben ser cosechados en su fase de crecimiento exponencial tardía, cuando la cantidad de QS extraído alcanzó su máximo valor. Esto es porque diferentes hongos tienen diferentes tasas de crecimiento, y el tiempo necesario para que alcancen su fase de crecimiento exponencial tardía también. Si los micelios se recogen en un tiempo de incubación fijo, el QS extraído no podría ser la máxima cantidad.

Los resultados mostraban que *Gongronella butleri* cepa USDB 0201 producía la mayor cantidad de QS extraíble seguido por *Cunninghamella echinulata* y *Gongronella butleri* cepa USDB 0428.

Muzzarelli *et al.*, (1994) se orienta al aislamiento de QS de *Absidia coerulea* cultivada en medio YM (modificado) aeróbicamente que contiene glucosa (1.0%), peptona (0.5%) y extracto de levadura (1.0%) usando solamente hidróxido de sodio 25 °C, sin la necesidad de extraer el QS con la ayuda de la ebullición de ácido acético, debido a que el QS no se encuentra combinado con cantidades de glucanos.

Rane y Hoover (1993) evaluaron los efectos de los componentes de crecimiento y condiciones de cultivo en la producción de QS de *Gongronella butleri* y *Absidia coerulea* en dos medios:

- Medio A. YPD (extracto de levadura 1%, 0.3% de peptona y 0.4% de glucosa)

- Medio B (2% de glucosa, 1% de peptona, 0.1% de levadura extracto, 0.5% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,1% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl , 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.01 CaCl_2).

Los medios de cultivos antes mencionados se utilizaron para comparar la productividad de QS, ambos con una temperatura de 26 °C. Se extrajo mayor cantidad de QS en medio B para *Absidia coerulea* cepas 14076 y 1315, mientras para *Gongronella butleri* cepa 1308 el rendimiento de QS fue menor en el medio B, sin embargo *Gongronella butleri* cepa 8989 en medio A se obtuvo QS con el grado más alto registrado de acetilación ($18.8 \pm 1.6\%$). El grado de acetilación para *Gongronella butleri* cepa 1308 también fue mayor en medio A. *Absidia coerulea* cepas 1315 y 14076 mostraron similares grados de acetilación en ambos medios, con grados de acetilación de 5.8 % y 6.9% respectivamente

También estudio la adición de cobalto a medio B usando *Absidia coerulea* cepa 14076, observando que la suplementación con 0,5 mg de cobalto / 100 ml en medio B incrementó el rendimiento de QS y el grado de acetilación varió de manera insignificante. Por otro lado la fermentación de cultivo continuo en reactor de tanque agitado produjo la mayor cantidad de QS de *Absidia coerulea* cepa 14076 en un aproximado aumento de tres veces la producción de QS en comparación con un cultivo discontinuo.

En el estudio de Arcidiacono y Kaplan (1992) la composición del medio es un factor importante que influye en el rendimiento de biomasa y el peso molecular de distribución (Mw) del QS. Es decir en un medio YPG (extracto de levadura, peptona y glucosa) si se elimina el extracto de levadura o peptona se reduce la biomasa, sin embargo cuando se duplica, el peso molecular aumenta. *Mucor rouxii* en cultivos discontinuos de 10-L crecieron más rápidamente que los cultivos discontinuos de 750 mL. Debido a que los impulsores en el sistema de 10-L pueden transferir nutrientes y el oxígeno disuelto es más eficientemente que por agitación en los cultivos de lotes pequeños.

Adicionalmente se evaluó el ácido clorhídrico, acético y fórmico para la extracción de QS, sin embargo el HCl no fue utilizado ya que el material de la pared celular

de *Mucor rouxii* se convirtió en descolorida y parecía ser degradado durante la extracción. A diferencia el ácido acético extraía mayor cantidad de QS.

Hang (1990) reporta que el tiempo de cosecha del micelio y el medio de cultivo tienen una profunda influencia en el rendimiento de QS extraíble. El rendimiento de QS de micelios *Rhizopus oryzae* cultivadas en medio de arroz produce una mayor cantidad de QS extraíble que las cultivadas en medio de maíz.

En cuanto al tiempo de fermentación alcanzó un nivel máximo después de 72 horas de crecimiento del micelio, más allá de 72 horas el QS extraíble disminuyó notablemente.

Grado de desacetilación del quitosano

Uno de los parámetros más importantes de caracterización para determinar el tipo de biopolímero que se obtiene es su DD el cual nos dirá si lo obtenido es QN o bien QS. Han sido utilizadas varias técnicas de identificación del DD como: valoración potenciométrica, titulación conductimétrica, análisis elemental CHN, IR, UV-Vis, ¹H RMN (Kumirska *et al.*, 2010).

□ Valoración potenciométrica

El método de valoración potenciométrica consiste en medir el potencial (voltaje) en una solución por medio de un electrodo como función de volumen de agente titulante. El potencial que se mide se puede transformar a unidades de concentración de una especie en solución. La ventaja de medir el potencial es que éste se mide por medio de un electrodo que es selectivo a la especie o analito que se quiere determinar. Por lo tanto, el voltaje que se mide en la solución es representativo de la concentración de la especie en solución. Este alto grado de selectividad (señal analítica que puede mostrar un pequeño grupo de analitos en una solución que contiene múltiples especies químicas) se debe a la propiedad física del electrodo con que se mide el voltaje. Una ventaja del uso de potencimetría es que la determinación del punto final es mucho más precisa que el determinado con indicadores visuales (Oyola, 2014).

Las medidas basadas en el volumen de valorante producen un cambio rápido del potencial cerca del punto de equivalencia, es decir el valorante se agrega en

grandes incrementos durante la fase inicial de la valoración, incrementos que son cada vez menores conforme se acerca el punto de equivalencia. Pueden usarse varios métodos para determinar el punto final, el más directo consiste en una gráfica directa del potencial en función del volumen de reactivo, otro es calcular el cambio de potencial por volumen unitario de valorante (es decir, $\Delta E/\Delta V$), lo cual equivale a estimar la primera derivada numérica de la curva de valoración (Skoog *et al.*, 2005).

□ Valoración de un ácido fuerte con una base fuerte

Para construir la curva hipotética que resulta de valorar una disolución de un ácido fuerte con una base fuerte se deben efectuar tres tipos de cálculos. Cada uno de ellos corresponde a una etapa distinta de valoración: (1) preequivalencia, (2) equivalencia y (3) postequivalencia. En la etapa de preequivalencia, la concentración del ácido se calcula a partir de su concentración inicial y al cantidad de base que se añade. En el punto de equivalencia, los iones hidronio e hidróxido están presentes en concentraciones iguales y la concentración de iones hidronio se deriva directamente de la constante del producto iónico del agua. La concentración analítica del exceso de base se determina en la etapa de postequivalencia, y se supone que la concentración de iones hidróxido es igual a la analítica (Skoog *et al.*, 2005).

La valoración potenciométrica, consiste en disolver el QS en ácido clorhídrico diluido para que ocurra la protonación del grupo amino libre del QS y luego realizar una valoración con hidróxido de sodio hasta que el pH de la solución se estabilice, lo cual permite obtener una curva de titulación del QS, la cual presenta dos puntos de inflexión, cuyos valores se obtienen según el criterio de la primera derivada (dpH/dV), y la diferencia entre estos proporciona la razón de la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del QS.

$$\%DD = 100 - 16.1 \left(\frac{V_2 - V_1}{w} \right) M \quad ec. 1$$

En la ecuación 1, V_2 corresponde al punto de inflexión mayor, V_1 corresponde al punto de inflexión menor, expresados como volúmenes de NaOH; M es la

molaridad de la solución de NaOH (mol/L); w es el peso del QS empleado en (g) y 16,1 es un valor relacionado al peso del grupo amino (-NH₂) (Balanta *et al.*, 2010). Para determinar el DD del micelio de *Aspergillus Niger*, Balanta *et al.*, (2010) emplea 0,5 g de QS disueltos en 20 ml de HCl 0.3 M, NaOH 0.1 M como titulante y un potenciómetro *Schott Gerate* CG820 para registrar el pH, al adicionar cada ml de la base. Al analizar por duplicado el DD obtuvo un porcentaje de 77.46 y 80.68.

Escobar *et al.*, (2013) calculó el porcentaje de grupos amino ecuación 2 del hongo *Ganoderma lucidum* empleando 0.38 g de QS disueltos en una solución de HCl 0.3 M, NaOH 0.1 M como titulante y un potenciómetro *Hanna Instruments* para medir el cambio de pH por cada 2 ml de base añadida, manteniendo agitación continua, obteniéndose un porcentaje de grupo amino de 59.3.

$$\% NH_2 = \frac{16.1(y - x)}{w} \times f \quad ec. 2$$

Dónde:

y es el punto de inflexión mayor y x el menor (expresados como volúmenes)

f es la molaridad de la solución de NaOH

w es la masa en gramos de la muestra

□ Valoración potenciométrica lineal

Debido a la precipitación del QS en el intervalo de pH neutro, el segundo punto de inflexión no coincide con el punto real, causando que el precipitado cubra la superficie del electrodo y por lo tanto el electrodo pierda su precisión. Ante los inconvenientes mencionados se proponen nuevos métodos para calcular el DD como: Valoración potenciométrica lineal Tan (1998); donde el QS (0.20-0.25 g) se disuelve en 20 ml de una solución HCl 0.1 M, después se diluye en 10 ml de agua destilada, para no tener una solución tan viscosa, posteriormente el pH de la solución se ajusta a ~ 2 con 0.01 M de NaOH y se toma como punto de inicio de la titulación. Bajo agitación continua se añade 1 ml, se deja estabilizar y se registra el pH; esta secuencia se repite hasta que se alcance un valor de 3. Se

calcula la $f(x)$ de los correspondientes volúmenes de NaOH añadidos utilizando la ecuación 3.

$$f(x) = \left(\frac{V_0 + V}{N_B} \right) \times ([H^+] - [OH^-]) \quad ec.3$$

Donde V_0 es el volumen de solución de QS (ml); V el volumen de NaOH añadido (ml); N_B concentración de NaOH (M); $[H^+]$ concentración de H^+ (M); $[OH^-]$ concentración de OH^- (M).

La curva de titulación lineal se obtiene graficando $f(x)$ vs el correspondiente volumen de NaOH añadido. El volumen en el punto final de la titulación V_e se estima por extrapolación de la curva lineal de titulación para el eje x. Para calcular DD se calcula usando la ecuación 4 y 5 respectivamente.

$$DD(\%) = \frac{\phi}{\left[\frac{(W - 161\phi)}{204} + \phi \right]} \times 100 \quad ec.4$$

$$\phi = (N_A V_A - N_B V_e) / 1000 \quad ec.5$$

Donde N_A es la concentración de HCl (M); V_A volumen de HCl (ml); N_B concentración de NaOH (M); V_e volumen de NaOH en el punto final (ml); W masa de la muestra (g) para la ecuación 5, una vez obtenido el valor de ϕ Se sustituye en la ecuación 4 y esta manera conocemos el DD.

Métodos Espectroscópicos

Los métodos espectroscópicos para el análisis estructural y caracterización fisicoquímica del QS: son Espectroscopia Infrarroja (IR), Espectroscopia de Rayos X, Espectroscopia UV-Vis y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

□ Espectroscopia infrarroja (IR)

Es una de las técnicas analíticas más importantes y ampliamente utilizada por los científicos que trabajan con el QS. Se basa en las vibraciones de los átomos de una molécula. El espectro infrarrojo comúnmente se obtiene al pasar la radiación electromagnética infrarroja a través de una muestra que posee un momento dipolar permanente o inducida y determinar qué fracción de la radiación incidente

es absorbida en una energía particular La energía de cada pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula, permitiendo así la identificación cualitativa de ciertos grupos funcionales en la muestra. Un espectrómetro de infrarrojos por lo general registra la energía de la radiación electromagnética que se transmite a través de una muestra como una función del número de onda o frecuencia. Hoy en día, el espectro total se analiza mediante un proceso de interferencia, a la que se le aplica la operación matemática de transformada de Fourier para obtener el espectro. La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) ha mejorado dramáticamente la calidad de los espectros de infrarrojos y minimiza el tiempo requerido para obtener datos .Los espectros de FTIR del QS se registran por lo general en el infrarrojo medio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}) (Kumirska *et al.*, 2010).

El grado de N-acetilación (DA) del QS puede determinarse según Kasaai, (2008) mediante técnicas de IR de las siguientes maneras:

- La determinación de la relación A_M/A_R , donde A_M es la intensidad de una banda característica, que es una medida de N-acetil o el contenido de amina; y A_R es la intensidad de una banda de referencia, que tiene una intensidad que no cambia con el DA. El DA de muestras desconocidas se puede estimar al comparar los valores de A_M/A_R con relaciones similares de algunas muestras de referencia que tienen un DA conocido.
- La creación de una curva de calibración trazando la relación de absorción de muestras de QN/QS de DA conocida frente a su DA, donde la DA de las muestras se determina por IR o un método de referencia tal como espectroscopia de ^1H RMN. El DA de la muestra desconocida se calcularon a partir de la curva de calibración.
- Evaluación estadística de varias relaciones de banda de absorción.

De manera general los métodos de espectroscopia incluyen elegir una banda característica adecuada (que es la intensidad de una banda medida de N-acetilo o el contenido de amina), elegir una apropiada banda de referencia (que tiene una intensidad que no cambia con el DA) y dibujar una buena línea base, debido a

que tiene un efecto considerable en la estimación de los valores del grado de acetilación (DA). También se necesita una calibración frente a una técnica absoluta. La validez de la calibración depende de la técnica utilizada para medir la DA, Espectroscopia ^1H RMN ha sido elegido como método estándar por el Método de Prueba Estándar Estadounidense, organización para determinar el grado DA del QS.

Elegir un procedimiento adecuado para calcular el DA entre varios autores es una tarea difícil para los investigadores debido a que proponen diferentes líneas bases figura 3, bandas características y de referencia, así como la técnica absoluta para medir el grado de acetilación (DA) y los rangos de DA. No hay ninguna banda de referencia única que se puede utilizar como una banda de referencia para toda la gama de DA, debido a que el espectro de la QN/QS cambia como una función del DA; la banda de referencia adecuada depende de la DA (Kasaai, 2008).

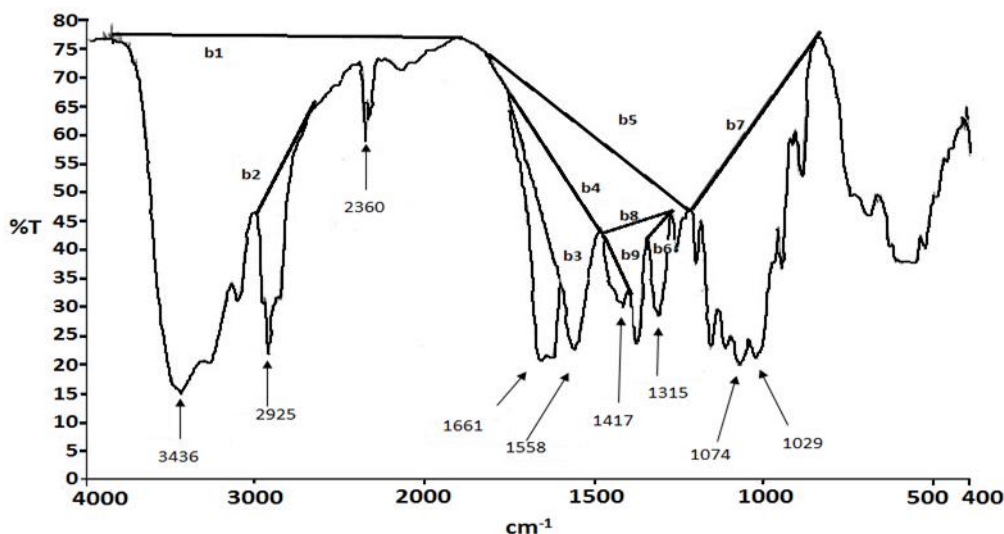


Figura 8. IR espectro de QN. Representación de las diferentes líneas base mencionados en la literatura (Brugnerotto *et al.*, 2001)

Brugnerotto *et al* (2001) abarca un rango de valores de DA que va de 0.5-97.9 así como una amplia variedad de fuentes de materiales (camarones, cangrejos, langosta) y utiliza resonancia magnética nuclear (RMN) como técnica absoluta para determinar los DA de muestras de QN y QS, donde la DA de las muestras se determina por ^{13}C RMN de estado sólido para muestras con DA mayor que 50%,

mientras que para aquellos con menor DA, soluble en medio acuoso, líquido ^1H RMN. Para la identificación de una banda característica y una de referencia propone comparar los espectros IR de las dos moléculas que representan las unidades de repetición de la QN (N-acetilglucosamina) y el QS (glucosamina).

Al comparar ambos espectros, se podría apreciar que una banda característica aparece en 1320 cm^{-1} para N-acetilglucosamina, como banda de referencia propone evaluar dos posibles bandas a 3450 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} . Al elaborar las curvas de calibración, trazando las relaciones de adsorción (banda característica/banda de referencia) de muestras de QN y QS, frente a su DA obtuvo las siguientes correlaciones entre los valores experimentales de DA y las relaciones de absorbancia A_{1320} / A_{3450} y A_{1320} / A_{1420} , expresa por la ecuación 6 y 7.

$$A_{1320}/A_{3450} = 0.03146 + 0.00226 \times DA \quad r = 0.97036 \quad \text{ec. 6}$$

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \times DA \quad r = 0.99042 \quad \text{ec. 7}$$

La relación entre las variables (Relación de bandas de absorción frente DA) se basó en el supuesto de que la dependencia es lineal. Por consiguiente uno tiene que calcular los coeficientes de regresión; A ; y B de la ecuación 8 para predecir la DA.

$$y = B + A \times DA \quad \text{ec. 8}$$

Un coeficiente de correlación, r , proporciona una manera cuantitativa para expresar el grado de asociación existente entre las dos variables. El propósito para determinar el coeficiente de correlación es evaluar la fiabilidad de los instrumentos IR que miden la absorción de bandas características y de referencia. Un alto coeficiente de correlación significa gran fiabilidad y bajo coeficiente de correlación baja confiabilidad.

Esta curva de calibración se emplea para convertir una relación de absorción a un valor DA. También se utiliza para verificar y validar los resultados experimentales. Si los puntos experimentales se encuentran cerca de la línea de calibración, esto indica que los resultados experimentales están en concordancia con los datos de referencia y la técnica es por lo tanto validada (Kasaai, 2008).

Baxter (1992), propone las relaciones de bandas A_{1655}/A_{3450} , y toma como línea base la comprendida entre los 4000 cm^{-1} para la banda A_{3450} correspondiente al grupo OH del QS y entre 1800 cm^{-1} y los 1600 cm^{-1} para la banda de absorción en los 1655 cm^{-1} correspondiente a la amida I. El grado de acetilación se obtiene a través de la ecuación 9.

$$DA(\%) = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115 \quad \text{ec. 9}$$

Esta ecuación se utiliza para muestras con grado de acetilación entre 0 y 55%. Sin embargo; cuando se trabaja con muestras que presentan un alto grado de acetilación pierde precisión, debido a la absorción en 1655 cm^{-1} es una mezcla de dos componentes: una centrada en 1655 cm^{-1} con una línea base entre 1800 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} y para la banda de absorción a 1630 cm^{-1} una línea base entre 1650 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} . En este caso el DA se calcula mediante la ecuación.10 (Hernández, 2010)

$$DA(\%) = [(A_{1655}/A_{3450}) + (A_{1630}/A_{3450}) - 0.13] \times 85.5 \quad \text{ec. 10}$$

Los resultados mediante esta ecuación presentan una buena correlación con los obtenidos mediante RMN-H para un grado de acetilación entre 0 y 100 % (Hernández, 2004).

Dong (2001) proponen evaluar cuatro bandas características 1655 , 1560 , 1380 y 1329 cm^{-1} , ocho bandas de referencia 3430 , 2920 , 2880 , 1425 , 1155 , 1070 , 1030 y 895 cm^{-1} , también utiliza el métodos de línea base, donde se utilizaron las bandas características de 1655 y 1560 cm^{-1} y como bandas de referencia las antes mencionas.

En la tabla 2 se muestra los coeficientes de correlación de las relaciones de banda característica/banda de prueba (A_M/A_R).

Tabla 2 Coeficientes correlación de la relación A_M/A_R vs DD

Bandas cm^{-1}	Características								
		3430	2920	2880	1425	1155	1070	1030	895
Referencia	1655	0.9721	0.9749	0.9710	0.9348	0.8237	0.6963	0.6285	0.8418
	1560	0.9728	0.9837	0.9818	0.9543	0.8954	0.8521	0.8249	0.8895
	1380	0.8430	0.9343	0.9206	0.8908	0.4851	0.1010	0.3312	0.7989
	1320	0.8997	0.9585	0.9535	0.9542	0.7330	0.3583	0.2406	0.8902

El QS es extremadamente higroscópico, por lo tanto, es muy difícil eliminar completamente el efecto de la humedad. Por esta razón es mejor utilizar 1560 cm^{-1} como banda característica perteneciente a la amida secundaria, que es menos afectada por el agua. La intensidad de 1560 cm^{-1} disminuye con la desacetilación, llegando a ser muy débil para muestras muy desacetiladas debido al aumento de intensidad de la banda $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$.

La relación A_M/A_R tiende a convertirse en un pequeño valor positivo pero no cero cuando DD= 100%. Esta situación ocurre en otras curvas, debido al efecto de bandas adyacentes. Por ejemplo mientras que el DD aumenta, la banda 1560 cm^{-1} se debilita y la banda 1600 cm^{-1} se fortalece, de ahí que la banda 1560 cm^{-1} se solapa con el fondo de la banda 1600 cm^{-1} . Incluso si la banda 1560 cm^{-1} desaparece por completo, el lugar de la banda 1560 cm^{-1} aún tiene contribución en el fondo de la banda 1600 cm^{-1} , y la absorbancia no puede bajar a cero.

Si se utilizando el método de línea base los valores extrapolados de las curvas en el 100% de desacetilación están más cerca de cero. Los valores de coeficientes de correlación de todas las combinaciones utilizando el segundo método se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Coeficientes de correlación de la relación A_M/A_R vs. DD (método de línea base)

Bandas cm^{-1}	características								
		3430	2920	2880	1425	1155	1070	1030	895
Referencia	1655	0.9880	0.9811	0.9764	0.9440	0.8605	0.7800	0.7457	0.8682
	1560	0.9816	0.9866	0.9860	0.9605	0.9208	0.9044	0.8935	0.9219

Se puede observar que las curvas obtenidas utilizando el método de línea de base tienen mejor linealidad, las ecuaciones se muestran de la siguiente forma.

$$A_{1560}/A_{3430} = -0.0057 DD + 0.7375 (R = 0.9816) \quad ec. 11$$

$$A_{1655}/A_{2920} = -0.0144 DD + 1.9239 (R = 0.9811) \quad ec. 12$$

$$A_{1655}/A_{2880} = -0.0139 DD + 1.8833 (R = 0.9764) \quad ec. 13$$

Shigemasa (1996) al evaluar la relación A_{1655}/A_{3450} contra su DD no tenía una relación lineal en la región de bajos DD.

Las relaciones de A_{1655}/A_{1070} y A_{1655}/A_{1030} contra DD no mostraron una relación lineal, debido a la separación de la banda de amida I.

Las bandas de amida I en 1655 cm^{-1} (a veces junto con la banda de amida I en 1630 cm^{-1}) o la banda de amida II en 1560 cm^{-1} se utilizan como bandas características de N-acetilación. Entre las bandas de referencia propuestas son el estiramiento de la banda OH a 3450 cm^{-1} , el estiramiento C-H a $2870\text{-}2880 \text{ cm}^{-1}$, la flexión centrada $-\text{CH}_2$ a 1420 cm^{-1} , la banda de la amida III en $1315\text{-}1320 \text{ cm}^{-1}$, la anti-simétrica del estiramiento del puente C-O-C alrededor de 1160 cm^{-1} . Las diferentes líneas bases sugeridas en la literatura se presentan en la figura 8 (Kumirska *et al.*, 2010).

□ Espectroscopia de rayos X

Es indiscutiblemente el medio más versátil y ampliamente utilizado para caracterizar materiales de todas las formas. Hay dos tipos generales de información estructural que se pueden estudiar por espectroscopia de rayos X: estructura electrónica (centro de valencia y electrones del núcleo, que controlan las propiedades químicas y físicas, entre otros) y la estructura geométrica (que proporciona información acerca de las ubicaciones de todos o un conjunto de átomos en una molécula con una resolución atómica). Este método abarca varias técnicas espectroscópicas para la determinación de las estructuras electrónicas y geométricas de materiales utilizando excitación de rayos X: espectroscopia de absorción de rayos-X (XAS), espectroscopia de emisión de rayos-X (XES), espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X (XPS) se utiliza generalmente para

determinar las energías de unión de C, O y átomos de N en la superficie de QS (Kumirska *et al.*, 2010).

□ **Espectroscopia UV-Vis**

Espectroscopia ultravioleta/visible (UV-Vis) es útil como una técnica analítica por dos razones. En primer lugar, se puede utilizar para identificar ciertos grupos funcionales en las moléculas, y en segundo lugar, que puede ser utilizado para ensayar. A diferencia de la espectroscopia IR, espectroscopia UV-Vis implica la absorción de radiación electromagnética para el rango de 200-800 nm y la posterior excitación de electrones a una energía más alta de estado. La absorción de ultravioleta/luz visible por moléculas orgánicas se limita a ciertos grupos funcionales (cromóforos) que contienen electrones de valencia de baja energía de excitación. El espectro UV-Vis es complejo y aparece como una banda de absorción continua debido a la superposición de rotación y transiciones vibratorias en las transiciones electrónicas dando una combinación de líneas superpuestas. Hoy en día, la detección individual de las transferencias de electrones sin superposición por las vecinas bandas vibracionales también se pueden grabar. Con la espectroscopia UV-Vis es posible investigar transferencias de electrones entre orbitales o bandas de átomos, iones y moléculas existentes en fase gaseosa, líquida y sólida. Análisis de soluciones y cristales por lo general se lleva a cabo en la transmisión, mientras que muestras de polvo a menudo se miden en el modo de reflexión difusa (espectroscopia de reflectancia difusa-DRS) (Kumirska *et al.*, 2010).

Para calcular el grado de acetilación de las muestras de quitina y quitosano por el método de la primera derivada se utiliza la ecuación 14

$$DA\% = \frac{\frac{m1}{203.21} \times 100}{\frac{m1}{203.21} + \frac{m2}{161.17}} \quad ec. 14$$

Dónde:

$m1$ es la masa de acetyl-glucosamina en 1 ml de quitina / quitosano solución, calculado a partir de la curva de calibración a H_{203} , $m2$ es la masa de glucosamina

en 1 ml quitina/quitosano solución, calculado por $m_2 = M - m_1$, M es la masa de quitina/quitosano en un ml de solución. M se calcula como $M = (M_1 \times M_3) / (M_1 + M_2)$

M_1 es la masa de sólida muestra de quitina / quitosano tomada para el análisis, M_2 es la masa de 20 ml de ácido fosfórico al 85 % y M_3 es la masa de 1 ml quitina / quitosano de solución en ácido fosfórico concentrado.

La curva de calibración se hizo por el trazado de los valores de UV a 203 nm (H_{203}) como una función de la concentración N-acetilglucosamina y glucosamina.

□ **Espectroscopia de RMN**

Espectroscopia de RMN es una de las técnicas más poderosas para el estudio de los compuestos orgánicos, tanto pequeñas moléculas y polímeros. Es una técnica importante para el estudio de la QN y el QS. Sin embargo, la solubilidad de estos compuestos presenta un problema grave.

Como se dijo anteriormente, la QN con una DA superior es prácticamente insoluble en todos los disolventes y mezclas diferentes, mientras que el QS es soluble en solución ácida acuosa. Su solubilidad depende del grado de N-acetilación, el grado de polimerización, el grado de cristalinidad, la distribución de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y la glucosamina (GlcN) a lo largo de la cadena del polímero, la fuerza iónica del disolvente, pH y concentración de QS en la solución. Diferentes técnicas de RMN se han utilizado para estudiar la QN, QS y sus derivados, incluyendo ^{13}C y ^{15}N de estado sólido RMN, y ^1H , ^{31}P , y ^{13}C de estado líquido RMN. Sin embargo, sólo ^{13}C y ^{15}N estado sólido de RMN puede ser usado para estudiar la QN con una alta DA, ya que esta técnica no requiere la solubilización del polímero (Kumirska *et al.*, 2010).

□ **Espectroscopia de ^1H RMN**

El factor más importante es encontrar un disolvente adecuado, que tenga buenas propiedades de solubilidad hacia el material. Cuando la muestra es parcialmente soluble, el análisis cuantitativo no es exacto y reproducible. Por otra parte, la señal residual del disolvente no debe superponerse a las señales de la muestra.

Los disolventes más comunes para la espectroscopia de RMN en estado líquido son D₂O / DCl, D₂O / CD₃COOD, D₂O / DCOOD.

Los espectros ¹H RMN son generalmente registrados en solución ácida acuosa (pD ~ 5) a una temperatura de 30-80 °C; 8-128 exploraciones se realizan, dependiendo de la concentración de las muestras (Kumirska *et al.*, 2010).

□ Espectroscopia de ¹³C RMN

Hay dos tipos de espectroscopia ¹³C RMN: en estado líquido y estado sólido. El primero tiene las mismas limitaciones que la espectroscopia ¹H RMN, la solubilidad insuficiente de la mayoría de los materiales. Por otra parte, espectroscopia de ¹³C RMN es mucho menos sensible que espectroscopia ¹H RMN debido a las propiedades del núcleo de carbono y el único 1% de abundancia del isótopo ¹³C en la naturaleza.

En estado líquido espectros de ¹³C RMN suelen registrar a partir de los mismos tipos de soluciones que se usan para producir los espectros ¹H RMN pero el número de exploraciones tiene que ser mucho mayor. La QN se puede analizar sin la solubilización especial del polímero.

Para espectros ¹H y ¹³C RMN, el DA se puede calcular comparando la integral del carbono de metilo/protones del grupo acetilo o las integrales de otros carbonos/protones de las principales cadenas. Muchas ecuaciones para el cálculo de DA se han presentado para diferentes tipos de espectroscopia de RMN. El DA del QS se puede calcular sobre la base de protones integrales para ¹H RMN utilizando las ecuaciones 14, 15 y 16 (Kumirska *et al.*, 2010).

$$\%DA = \frac{1/3 * I_{CH_3(A)}}{1/6 * I_{H_2-H_6(A+D)}} * 100 \quad ec. 15$$

$$\%DA = \frac{I_{CH_3(A)}}{3 * I_{H_1(A+D)}} * 100 \quad ec. 16$$

$$\%DA = \frac{1/3 * I_{CH_3(A)}}{I_{H_2(D)}} * 100 \quad ec. 17$$

Aplicaciones del quitosano

El QS no se presenta como una molécula única, sus moléculas pueden variar en los valores de masa molecular y grados de desacetilación promedio o grupos amino libres, lo cual determina el uso de este biopolímero (De la Paz *et al.*, 2012).

□ Actividad antimicrobial.

Mohamed (2015) utilizó tres cepas de hongos para la extracción de QS, *Mucor rouxii*, *Cunninghamella elegans* y *Rhizopus sp.* Bajo las siguientes condiciones de extracción desproteinización al 2% peso/volumen de solución de hidróxido de sodio (30:1 volumen /peso a 121 °C, 15 min). Después de la filtración, el material insoluble en álcali (MIA) fue lavado con agua destilada hasta pH neutro y posteriormente secado. Se añadió un gramo de MAI seco a 40 ml de ácido acético al 20% a 80 °C durante 6 h. La mezcla fue centrifugada, de esta manera se recogió el sobrenadante. El pH del sobrenadante fue ajustado a pH 9,0 con 2N de solución NaOH, nuevamente fue centrifugada la mezcla para separar el precipitado y de esta forma obtener QS.

Los DD obtenidos para el QS eran de 80.3, 80.3 y 81.50 respectivamente. El QS se utilizó para evaluar la actividad antimicrobial de microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum* mediante agar, los diámetros de inhibición se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Diámetros de inhibición

Microorganismos patógenos	Zona de inhibición (mm)		
	QS <i>Mucor rouxii</i> .	QS <i>Rhizopus sp.</i>	QS <i>Cunninghamella elegans</i> .
<i>Escherichia coli</i>	17.0	19.0	21.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	29.0	30.0	29.0
<i>Candida albicans</i>	7.3	5.8	6.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	5.0	6.0	5.3

El QS de *Mucor rouxii*, *Rhizopus sp.* y *Cunninghamella elegans* era más eficaz contra microorganismos patógenos de *Staphylococcus aureus*, el DD de 81.5 %,

correspondiente al QS *Rhizopus* tiene una notable importancia en la zona de inhibición dando así un mayor valor.

□ **Regeneración de tejido.**

Nwe (2009) extrajo QS del micelio de hongo *Gongronella butleri* cepa USDB 0201, con peso molecular 5×10^4 Da y 13% DA, para su aplicación en la preparación de andamios en la regeneración de tejido, y los comparo con los andamios de crustáceos (camarón, conchas de cangrejos y placas óseas de calamar) con peso molecular de 2×10^6 , 1×10^5 , $2 \times 10^5 - 10^6$ Da y DA 12, 20, 15% respectivamente, Las propiedades físico-químicas del QS extraído de hongos y crustáceos tuvieron un efecto sobre la formación de los poros en los andamios, y por consiguiente influyó en las propiedades mecánicas y biológicas de los andamios. Los andamios de QS obtenido de hongos mostraron una excelente propiedad mecánica, absorción de agua y propiedades de degradación lisozima, mientras que los andamios de QS de camarón con peso molecular 2×10^6 Da y DA 12% exhibieron baja absorción de agua y baja velocidad de degradación lisozima.

Por otro lado el mismo autor (New) trabajó en la proliferación de células de fibroblastos de embrión de ratón en andamio de QS de bajo peso molecular para la regeneración de tejido fue mayor que en andamio QS con alto peso molecular; cabe señalar que el QS con un menor DA estimula la proliferación celular más rápido que el QS con un mayor DA. Para la preparación de un andamio que se utiliza como una plantilla para la regeneración de los tejidos, el período de degradación del andamio de QS implantado no debe ser demasiado largo, es decir, la velocidad de degradación de un andamio debe ser óptima para mantener una estructura estable y el tiempo suficiente para obtener las diferentes capas de células en el andamio.

□ **Actividad antitumoral.**

Rao, Ming y Jeng (2016) evaluaron la actividad antitumoral de QS del estipe de *Shiitake* por diferentes tratamientos de *N*-desacetilación (85.5, 90.3, 86.3 y 90.2 %) con QS comercial de conchas de cangrejo (88.4, 93.3, 87.8 y 85.2 %) sus

resultados muestran que fue más eficaz el de *Shiitake*, debido a su bajo peso molecular 382,73 kDa, y alto grado de *N*-desacetilación (90.2 %) mejorando mayormente la inhibición sobre las células de cáncer.

Aranaz (2009) reporta las aplicaciones del QS dependiendo de su DD y peso molecular (Mw) en diversos campos como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5.Recomendaciones generales para la aplicación del QS (Aranaz *et al.*, 2009)

Aplicaciones	Recomendaciones Generales
Cicatrización de heridas	<input type="checkbox"/> QS con alto DD. <input type="checkbox"/> Muestras de bajo Mw (oligómeros).
Sistemas de administración de fármacos	<input type="checkbox"/> Alto DD. <input type="checkbox"/> Alto Mw.
Andamios (ingeniería de tejidos)	<input type="checkbox"/> DD alrededor de 85 (buena proliferación y estructura). <input type="checkbox"/> Alto Mw (biodegradación prolongada).
Inmovilización celular	<input type="checkbox"/> QS con alto DD.
Inmovilización de enzimas	<input type="checkbox"/> Dependerá de la enzima, el método de inmovilización y medios de reacción <input type="checkbox"/> Bajo contenido en cenizas <input type="checkbox"/> Alto DD para la adsorción, covalente y encapsulación.
Conservación de alimentos	<input type="checkbox"/> Alto DD. <input type="checkbox"/> Medio-bajo Mw (5-80 kDa).
Tratamiento de aguas residuales	<input type="checkbox"/> Dependerá de las condiciones de los contaminantes y agua (pH, fuerza iónica). <input type="checkbox"/> En general, se utiliza QS con alto DD. <input type="checkbox"/> Baja cristalinidad

□ **Industria de películas comestibles.**

El uso de películas comestibles y recubrimientos para extender la vida y mejorar la calidad de los alimentos ha sido examinado en los últimos años.

Hay muchos mecanismos implicados en la ampliación de la vida útil de los alimentos por recubrimiento de películas. Estos incluyen la transferencia de humedad controlada entre el alimento y el medio ambiente circundante, controla la liberación de agentes químicos como sustancias antimicrobianas, antioxidantes, reducción de la presión parcial de oxígeno en el paquete que resulta en una disminución de la tasa de metabolismo, velocidad controlada de la respiración, la alta impermeabilidad a ciertas sustancias como grasas y aceites (Shahidi *et al.*, 1999).

□ **Inmovilización de enzimas.**

La inmovilización de la enzima es un método para mantener moléculas de enzima confinados en una fase distinta separada de la fase en masa al tiempo que permite el intercambio entre estas dos fases. Diferentes métodos tales como unión covalente, unión electrostática, copolimerización, el atrapamiento de polímero, de interacción hidrófoba, atrapamiento liposomal y la encapsulación a menudo se utilizan para la inmovilización de enzimas. El método más común es la unión covalente a un polímero insoluble, tal como celulosa y QS. Las enzimas inmovilizadas son reutilizadas, estables y adecuadas como catalizadores industriales específicos (Shahidi *et al.*, 1999).

En la mayoría de los procesos industriales las enzimas operan en sistemas de una sola fase, es decir, se encuentran disueltas con el sustrato el cual a su vez es transformado en producto. Por lo anterior, resulta difícil separar a las enzimas del resto de los componentes de la mezcla de reacción y por ende, en un proceso continuo, la enzima soluble puede ser arrastrada junto con el producto obtenido. Este tipo de proceso no es conveniente desde el punto de vista económico ya que por lo general el precio de las enzimas es elevado (Salazar *et al.*, 2014).

La inmovilización de enzimas en soportes sólidos se ha posicionado como una metodología capaz de aumentar la eficiencia de un bioproceso, ya que al

compararse con el uso de enzimas libres (sin inmovilizar) esta metodología ofrece diversas ventajas. La inmovilización, en la mayoría de los casos, estabiliza la estructura de las enzimas y por consecuencia su capacidad catalítica aumenta en condiciones extremas de pH y temperatura. Además, la fácil separación de la enzima inmovilizada facilita su reutilización permitiendo la implementación de procesos continuos de catálisis en reactores (Salazar *et al.*, 2014).

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas son regidas por las características del sistema enzimático y del material utilizado como soporte.

De la gran variedad de materiales que han sido estudiados y utilizados para inmovilizar enzimas destacan el QS, debido a su estructura química de este compuesto posee una gran disponibilidad de grupos funcionales que pueden reaccionar con las enzimas o que son susceptibles a ser modificados químicamente para aumentar su reactividad (Salazar *et al.*, 2014).

□ **Tratamiento de aguas crudas**

Las aguas naturales contienen sólidos de diversos tamaños de origen mineral (arena, arcillas, entre otros) u orgánico (producto de la descomposición de plantas y animales); además de estos compuestos, en las aguas naturales también se pueden encontrar bacterias, plancton, algas y virus. Los sólidos suspendidos son los responsables de la turbidez y el color del agua y causan problemas durante su potabilización.

Las planta de tratamiento de agua potable usa coagulantes inorgánicos como sulfato y policloruro de aluminio, para remover turbiedad, solidos suspendidos totales y color. Investigaciones evidencian que estos agentes coagulantes son usados convencionalmente en la potabilización de las aguas crudas para el consumo humano. El sulfato de aluminio o alumbre es el agente coagulante más ampliamente usado en las plantas de tratamiento debido a su probada efectividad y bajo costo. Sin embargo, algunos estudios han reportado que el aluminio podría inducir enfermedades neurológicas, tales como el mal de Alzheimer, síndromes de demencia y disminución de la capacidad motora y mental.

Considerando las desventajas de las sales de aluminio, se han estudiado coagulantes naturales más efectivos, menos perjudiciales y amigable con el ambiente que puedan sustituirlo como el QS. En este aspecto, los coagulantes naturales es una alternativa viable ya que son usualmente más seguros para la salud (Ricaurte *et al.*, 2014).

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

Comparación del proceso de obtención de crustáceos y micelios de hongo.

La principal fuente de obtención de QS es a partir del exoesqueleto de crustáceos (langostas, cangrejos, camarones, etc.), sin embargo la extracción del polímero se ve limitada, debido a la escasez del material de los residuos en ciertas temporadas del año o tiempos de veda, por esta razón, se utilizan fuentes alternas convencionales como los hongos, en la figura 9 se muestran de manera general ambos procesos químicos para obtención de este compuesto.

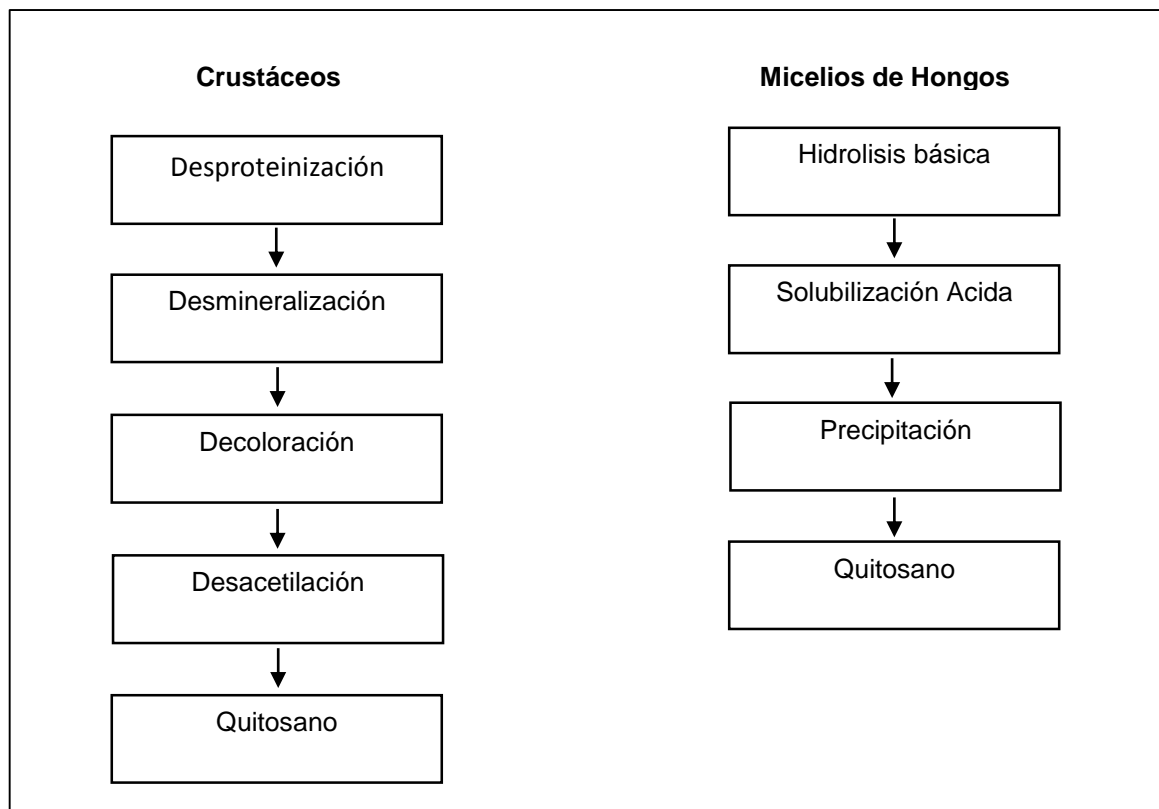


Figura 9. Proceso de obtención de QS en crustáceos y micelios de hongos.

Como se puede observar durante el proceso de obtención de crustáceos se involucran dos etapas más en comparación con la de los hongos (figura 5), dando así ventajas sobre la cantidad de reactivos requeridos (HCl, NaOH, xileno, etc.) y tiempos no utilizados para la extracción de QS en hongos.

Obtención de quitosano por el método de Nwe et al., (2010)

Los estudios reportados por los diferentes autores mencionados anteriormente sobre la obtención de QS utilizan para su estudio diferentes tipos de hongos, empleando el mismo método de extracción; la variación entre los diferentes autores es que utilizan distintas concentraciones de los reactivos, medios de cultivo del hongo, temperaturas y tiempos. Para nuestro estudio se utilizó la metodología propuesta por Nwe *et al.*, (2010) variando temperatura, tiempos, concentración de hidróxido de sodio y ácido acético figura 10.

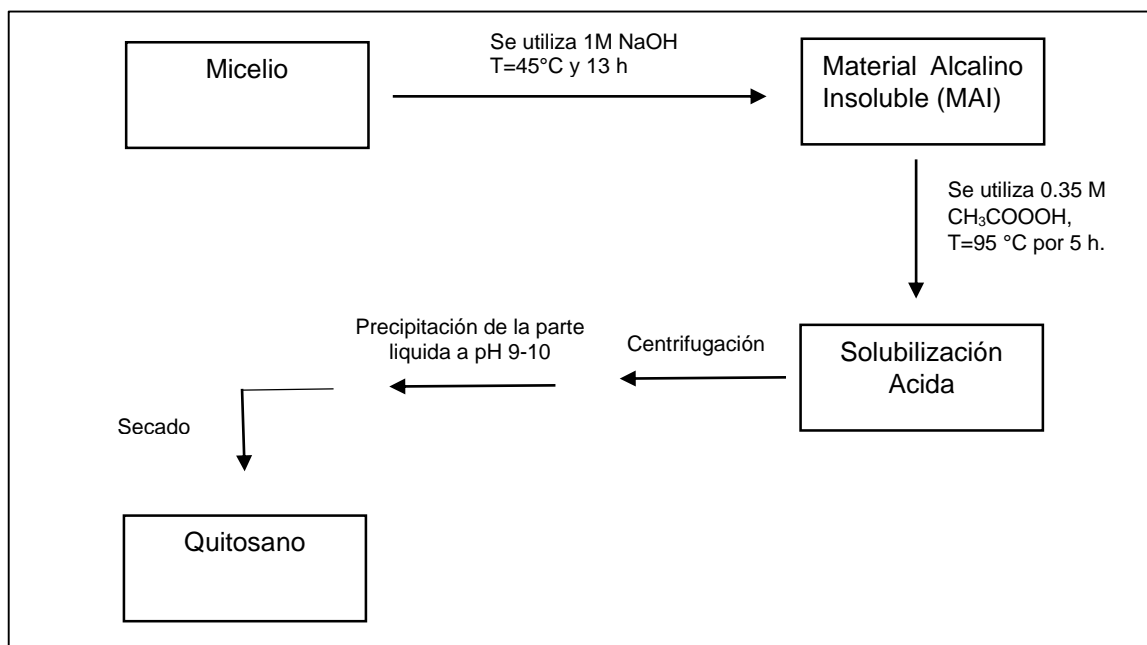


Figura 10. Metodología para la extracción de QS de micelios (Nwe *et al.*, 2010).

Identificación del polímero

Una vez extraído el biopolímero se realizó la identificación por medio de la presencia de las bandas de tensión, vibración de los grupos funcionales característicos del QS (grupos hidroxilo OH, C-H, CH₂, CH₃ -NH₂, -NH-, C-O-C,) trabajado en un rango de frecuencia entre 450 y 4000 cm⁻¹. Para lo cual se utilizó Espectroscopia de Infrarrojo empleando un espectrofotómetro *FTIR* Marca PerkinElmer Modelo Spectrmone Serie 74070.

Determinación del grado de desacetilación

Cuando el DD de la QN alcanza aproximadamente el 50% (dependiendo del origen del polímero), se hace soluble en soluciones acidas diluidas y se le denomina QS según Rinaudo (2006). La solubilización se produce por la protonación de grupo $-NH_2$ en la posición C-2 de la unidad monomérica de repetición de D-glucosamina, mediante el cual el polisacárido se convierte en una polielectrolito en medios ácidos (Rinaudo *et al.*, 2006).

El DD del QS es una de las características químicas más importantes que puede influir en muchas de sus aplicaciones (ingeniería de tejido, conservación de alimentos, tratamiento de aguas residuales, inmovilización de enzimas, etc.), por tal motivo es esencial determinar el DD para proponer sus posibles aplicaciones.

Existen diversos métodos para determinar el DD del QS: Valoración potenciométrica Espectroscopia Infrarroja (IR), Resonancia magnética nuclear, UV primera derivada, difracción de rayos X, entre otros.

El DD se determinó por valoración potenciométrica, valoración potenciométrica lineal y Espectroscopia Infrarroja (IR).

□ Valoración potenciométrica

La valoración potenciométrica, consistió en disolver el QS en ácido clorhídrico diluido para que ocurriera la protonación del grupo amino libre y luego se realizó una valoración con hidróxido de sodio hasta que el pH de la solución se estabilizó, lo cual permitió obtener una curva de titulación del QS, que presento dos puntos de inflexión, cuyos valores se obtuvieron según el criterio de la primera derivada (dpH/dV), y la diferencia entre estos puntos proporciona la razón de la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del QS de esta manera se obtuvo el DD mediante la ecuación 1.

$$\%DD = 100 - 16.1 \left(\frac{V_2 - V_1}{w} \right) M \quad ec. 1$$

En la ecuación 1, V_2 es el punto de inflexión mayor, V_1 corresponde al punto de inflexión menor, expresados como volúmenes de NaOH; M es la molaridad de la

solución de NaOH (mol/L); w es el peso del QS empleado (g) y 16,1 es un valor relacionado al peso del grupo amino ($-NH_2$) (Balanta *et al.*, 2010).

Debido a la precipitación del QS en el intervalo de pH neutro, el segundo punto de inflexión no coincide con el punto real, causando que el precipitado cubra la superficie del electrodo y por lo tanto el electrodo pierda su precisión. Ante los inconvenientes mencionados se propuso otro método para calcular el DD valoración potenciométrica lineal de Tan *et al.*, (1998).

□ Valoración potenciométrica lineal

El QS (0.20-0.25 g) se disuelve en 20 ml de una solución HCl 0.1 M, después se diluye en 10 ml de agua destilada, para no tener una solución tan viscosa, posteriormente el pH de la solución se ajusta a ~ 2 con 0.01 M de NaOH y se toma como punto de inicio de la titulación. Bajo agitación continua se añade 1 ml de NaOH 0.1 M, se deja estabilizar y se registra el pH; esta secuencia se repite hasta que se alcance un valor de 3. Se calcula la $f(x)$ de los correspondientes volúmenes de NaOH añadidos utilizando la ecuación 3.

$$f(x) = \left(\frac{V_0 + V}{N_B} \right) \times ([H^+] - [OH^-]) \quad ec. 3$$

Donde V_0 es el volumen de solución de QS (ml); V el volumen de NaOH añadido (ml); N_B concentración de NaOH (M); $[H^+]$ concentración de H^+ (M); $[OH^-]$ concentración de OH^- (M).

La curva de titulación lineal se obtiene graficando $f(x)$ vs el correspondiente volumen de NaOH añadido. El volumen en el punto final de la titulación V_e se estima por extrapolación de la curva lineal de titulación para el eje x. Para calcular DD se calcula usando la ecuación 4 y 5 respectivamente.

$$DD(\%) = \frac{\phi}{\left[\frac{(W - 161\phi)}{204} + \phi \right]} \times 100 \quad ec. 4$$

$$\phi = (N_A V_A - N_B V_e) / 1000 \quad ec. 5$$

Donde N_A es la concentración de HCl (M); V_A volumen de HCl (ml); N_B concentración de NaOH (M); V_e volumen de NaOH en el punto final (ml); W masa

de la muestra (g) para la ecuación 5, una vez obtenido el valor de ϕ Se sustituye en la ecuación 4 y esta manera conocemos el DD.

Para corroborar los datos obtenidos en la valoración potenciométrica lineal se utilizó una técnica más.

□ **Espectroscopia Infrarroja (IR)**

Del trabajo de Brugnerotto (2001) se toma el rango de DA así como una amplia variedad de fuentes de obtención de materiales, y utiliza resonancia magnética nuclear como técnica absoluta para determinar los DA de muestras de QN y QS. Como banda característica se tomó la absorbancia de 1320 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-N y como banda de referencia 1420 cm^{-1} a -CH₂ ecuación 7.

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \times DA \quad r = 0.99042 \quad \text{ec. 7}$$

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para nuestro estudio las setas *Pleurotus ostreatus* se adquirieron el 16 de febrero de 2015 en "Setas del bosque, S del R.L." de la ciudad de Puebla. Se almacenaron en refrigeración a 5°C durante 2 días, posteriormente se separaron las partes del hongo, en píleo y estipe para ser secados a 60 °C en un horno marca *Lumistell* modelo HTP-72 durante 7 horas, mientras para la semilla el tiempo requerido de secado fue de 8 horas.

En estudios preliminares se estudió la influencia del tamaño de partícula del hongo en el rendimiento del QS y se observó que al tener un tamaño de partícula de malla 20 los rendimientos de QS eran menores. Por tal situación solo utilizaremos malla 40 para obtener mejores rendimientos.

Obtención de QS de *Pleurotus ostreatus*.

Se retoma la metodología de Nitar Nwe, Tetsuya Furuike and Hiroshi Tamura 2010, con modificaciones para la extracción de QS figura 11.

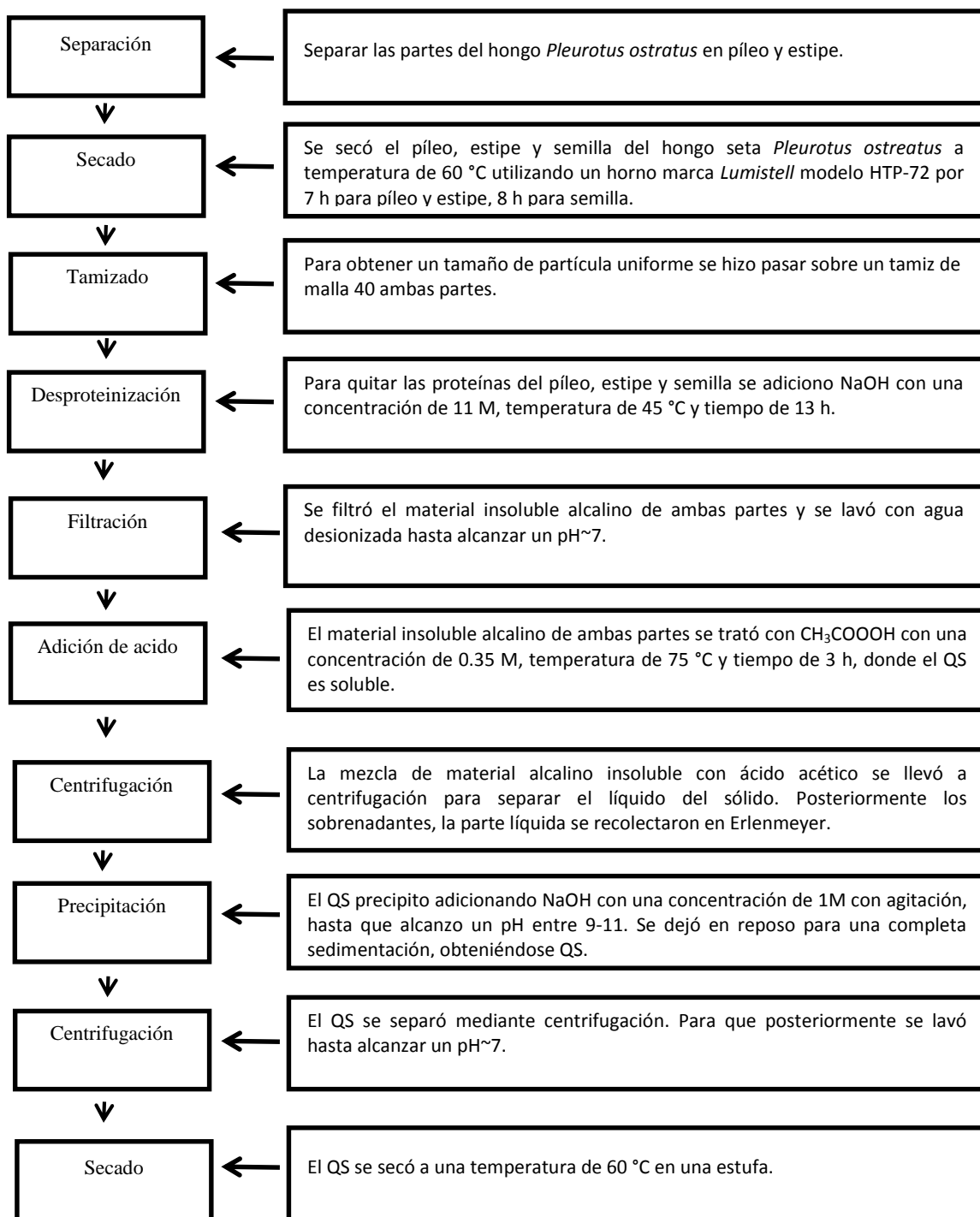


Figura 11. Diagrama de bloques para la obtención de QS de *Pleurotus ostreatus*.

Etapas del proceso de obtención de quitosano

Operaciones unitarias

1. Separación de las partes del hongo

Se cortó el píleo y el estipe y se almacenaron por separado.

2. Secado

El píleo, el estipe y la semilla se secaron en un horno marca *Lumistell* modelo HTP-72 a 60°C para que su consistencia tuviera la apariencia de polvo fino y no de masa. Una vez secos se llevan a peso constante. El tiempo requerido para secar el píleo y el estipe fue de 7 h y para la semilla de 8 h.

3. Tamizado

Para el tamizado, cada uno de los componentes del hongo así como la semilla se molieron en una licuadora convencional con la finalidad de disminuir el tamaño, de tal manera que se formara un polvo. Una vez obtenido dicho polvo, este se hizo pasar por un tamiz de malla 20 y 40 para tener un tamaño de partícula uniforme.

4. Extracción y desacetilación de la quitina

Se pesaron 40 g de píleo, 30 g de estipe y 50 g de semilla, para ser transferidos por separado en vasos de precipitados de 1 L provisto de una barra magnética para agitación. Posteriormente se adiciono NaOH con una concentración de 11 M en una relación de 5 ml de solución por cada gramo de píleo, estipe y semilla. La reacción se mantuvo por 12 h a temperatura de 45 °C y agitación de 5 strir de manera intermitente. Primero se mantuvo a 45°C durante 8 horas con un posterior reposo de 16 horas. Finalmente se concluyó la reacción con un calentamiento adicional de 4 horas.



Figura 12. Desacetilación de píceo



Figura 13. Desacetilación de estipe

Al término de la reacción con las condiciones mencionadas se obtuvo una sustancia líquida de color café oscuro, figura 12 y 13, la parte líquida correspondiente a la proteína, y las partículas sólidas a la QN desacetilada, ambos con un pH de 13.



Figura 14. Desacetilación de semilla

Por el contrario la semilla tenía una consistencia espesa (por alto contenido de proteína), con un pH de 13. Bajo estas condiciones no se realizó la desacetilación completa de la QN (figura 14).

5. Centrifugación y Filtración

Para disminuir el exceso de NaOH y alcanzar un pH cercano a la neutralidad, en píceo y estipe se realizaron una serie de lavados, aplicando 1 L de agua desionizada por cada lavado a temperatura (35°C) figura 15.

Con la finalidad de obtener QN en la semilla una parte de la pasta de color crema se diluyó en 3 L de agua desionizada (35°C), de esta forma se eliminó la consistencia espesa y por consiguiente disminuir el exceso NaOH.

La recuperación de pastas (píleo, estipe y semilla) se realizó por centrifugación durante 15 min (3500 rpm y temperatura 25 °C) figura 16.



Figura 15. Lavados con agua desionizada

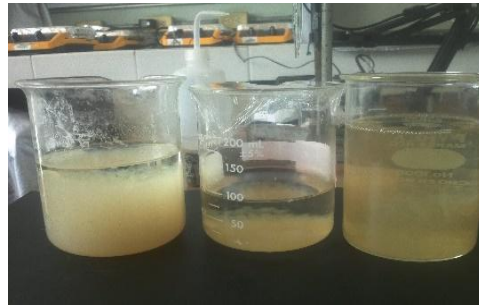


Figura 16. Pastas después de una serie de lavados

Después de la recuperación de las pastas se hizo una lectura del pH, debido a que el pH de las pastas resultantes no disminuía se utilizó la filtración con agua desionizada a temperatura ambiente figura 17, bajo estas condiciones el pH se redujo rápidamente, los datos registrados se muestran en la tabla 6.



Figura 17. Filtración de pasta

Tabla 6. Características de las pastas después de la desacetilación.

Parte del Hongo	pH registrado	Apariencia
Píleo	7.8	Coloración crema
Estipe	7.8	Coloración Café claro
Semilla	7.8	Color Crema Claro

6. Solubilización del QS

Una vez neutralizadas las pastas se pesaron, el píleo (30.6 g), estipe (26.8 g) y semilla (6.2 g), ambas pastas se transfirieron por separado en vasos de precipitados de 1 L provisto de una barra magnética para agitación. Las pastas se mezclaron por separado con CH_3COOH 0.35 M en una relación 5 ml de solución por cada gramo de pasta. Posteriormente se sometieron a agitación de 5 stir durante 3 h con una temperatura de 75°C. Dichas mezclas se dejaron en reposo durante un tiempo aproximado de 17 horas. Al término de este reposo se midió el pH de las mezclas. El pH del píleo 2.89, estipe 3.04 y semilla 2,69.

7. Centrifugación

Para recuperar la parte líquida del píleo estipe y semilla se procedió a añadir las mezclas resultante en tubos de centrifuga fondo cónico (Corning) de 50 ml, y ser centrifugados durante 10 min, a una velocidad de 4500 rpm, los sobrenadantes (parte líquida) de cada frasco se reunieron en vasos de precipitados de 1 L, figura 18.



Figura 18. Sobrenadantes

8. Precipitación del QS

En la tabla 7 se muestra la cantidad requerida de solución de NaOH 1 M para precipitar el QS así como el pH en ambas partes, para una completa sedimentación el sistema se dejó en reposo durante 58 h (figura.19).

Tabla 7. Cantidad de NaOH para la precipitación del QS.

Partes	NaOH (ml)	pH
Píleo	35	10.47
Estipe	25	10.34
Semilla	16	11

9. Centrifugación y filtración

Después del reposo se observa un precipitado (QS) en píleo y estipe, mientras que en la semilla no se obtuvo nada, el QS se recuperó por centrifugación durante 10 min (4500 rpm a temperatura de 25 °C), posteriormente se lavó con agua desionizada mediante filtración hasta que alcanzaron un pH de 7.8 píleo, estipe 7.4.



Figura 19. Precipitación del QS

10. Secado del QS

Finalmente el QS del píleo y estipe se secaron en una estufa a temperatura de 60 °C durante 4 h y 47 min.

En la primera etapa del proceso de extracción se liberan las glicoproteínas y glucanos que se encuentran presentes en la pared celular, para ello se utiliza un medio fuertemente alcalino (NaOH) que ocasiona la solubilización de la membrana por saponificación de los lípidos presentes en ella. Asimismo, el enlace glucosídico del complejo sufre una hidrólisis básica, separando la quitina del complejo.

Desacetilación de la Quitina

Al tratar a la QN con un álcali fuerte se obtiene QS, al liberar los grupos acetamido dejando libres a los grupos amino.

Solubilización y precipitación de Quitosano

Una vez terminada la reacción de desacetilación, el QS se encuentra mezclado con algunos residuos de proteínas que no fueron eliminados por completo en medio alcalino, por tal razón estas pastas se adicionan en un medio ácido donde el QS es soluble y el grupo amino libre perteneciente al polímero se encuentra protonado, a esta solución se le adiciona NaOH 1 M para que ocurra la precipitación del biopolímero y de esta manera sea posible separarlo mediante procesos físicos (filtración o centrifugación) de los residuos insolubles.

En la tabla 8 se muestran los rendimientos de QS obtenido.

Tabla 8. Rendimiento de QS.

Partes	Peso de hongo fresco (g)	Peso de hongo seco (g)	Quitosano (g)	Rendimiento
Píleo	829.4	40	0.3451	0.862 %
Estipe	541.3	30	0.0073	0.024 %
Semilla	1000	100	0	0 %

Identificación del polímero en píleo y estipe

Teniendo en cuenta que cada molécula o grupo funcional tiene una absorción característica, a una longitud de onda determinada, a partir del espectro de la molécula del QS podremos identificar los grupos funcionales característicos obtenidos en el píleo y estipe y a su vez compararlo con el QS comercial, figura

20 y figura 21. En el espectro de infrarrojo del QS (píleo) se observa una banda con dos picos de poca frecuencia en 3353 cm^{-1} que es atribuida al grupo hidroxilo (-OH) y la segunda al grupo -NH_2 en 3291 cm^{-1} en el espectro también se observa otra banda en 2878 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los enlaces carbono-hidrogeno (C-H), el grupo amida primario aparece en 1642 cm^{-1} , deformación del enlace N-H en 1583 cm^{-1} , también se observan la banda del grupo $\text{-CH}_2\text{-}$ a 1422 cm^{-1} , vibraciones de estiramientos C-N a 1325 cm^{-1} .

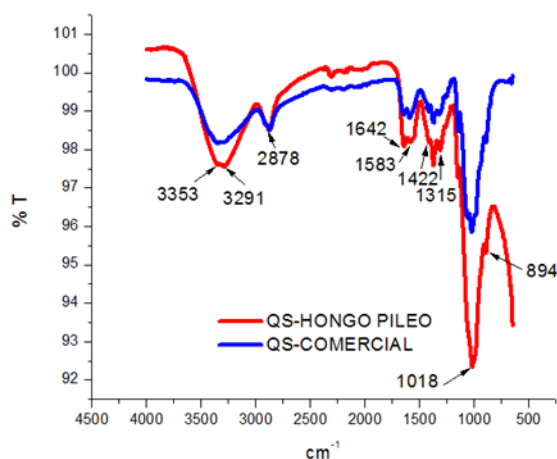


Figura 20. Espectro de IR del QS píleo obtenido del hongo seta *Pleurotus ostreatus*.

Para el caso del estipe se observa una banda con dos picos de poca frecuencia en 3359 cm^{-1} que es atribuida al grupo hidroxilo (-OH) y la segunda al grupo -NH_2 en 3286 cm^{-1} en el espectro también se observa otra banda en 2873 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los enlaces carbono-hidrogeno (C-H), el grupo amida primario aparece en 1643 cm^{-1} , deformación del enlace N-H en 1585 cm^{-1} , también se observan la banda del grupo $\text{-CH}_2\text{-}$ a 1422 cm^{-1} , vibraciones de estiramientos C-N a 1325 cm^{-1} .

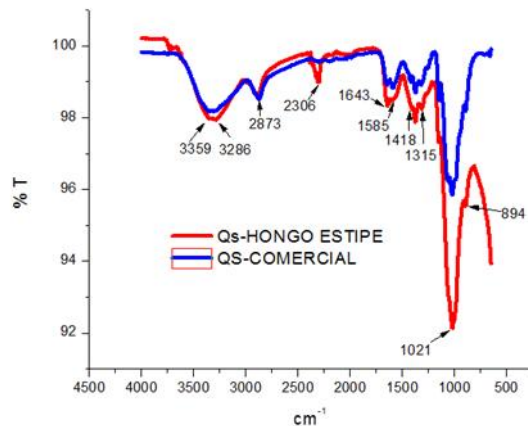


Figura 21. Espectro de IR del QS estipe obtenido del hongo seta *Pleurotus ostreatus*.

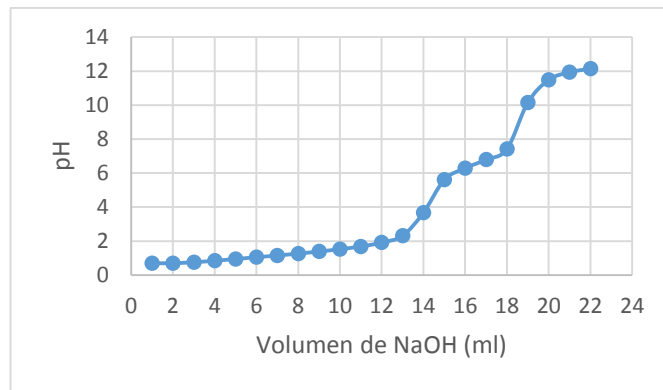
Caracterización del QS

Para determinar el grado de desacetilación DD se realizaron tres métodos: valoración potenciométrica, valoración potenciométrica lineal y espectroscopia infrarroja.

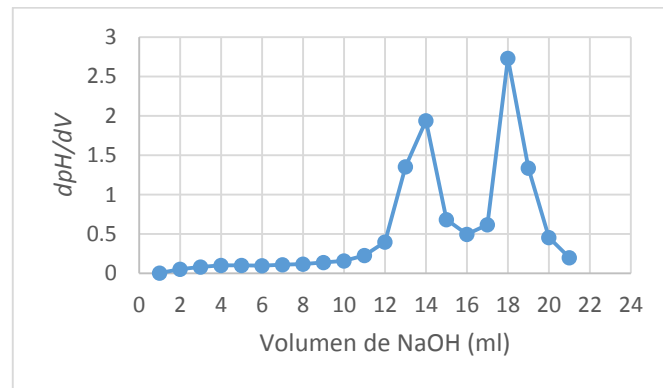
□ Grado de desacetilación por valoración potenciométrica del píleo

Se emplearon 0.15 g de QS disueltos en 6 ml de HCl 0.3 M. Esta solución se tituló con NaOH 0.1 M. Las mediciones de pH se realizaron gradualmente tras la adición de cada mililitro de NaOH en un potenciómetro marca Orion, la valoración termino cuando el pH llega a 12 (Balanta *et al.*, 2010).

En la gráfica 1 se muestran los resultados de la valoración potenciométrica para la muestra de QS extraído de *Pleurotus ostreatus*, donde se genera una curva de titulación con dos puntos de inflexión el primer punto corresponde al HCl en exceso y el segundo al QS protonado, La diferencia entre los dos puntos de inflexión a lo largo del eje de abscisas corresponde a la cantidad de ácido requerida para protonar los grupos amino de QS cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada; dichos puntos corresponden a los máximos grafica 2.



Grafica 1. Curva de titulación del quitosano extraído de *Pleurotus ostreatus*



Grafica 2. Criterio de la primera derivada

Con base en lo anterior, la ecuación 1 permite conocer el grado de desacetilación.

$$\%DD = 100 - 16.1 \left(\frac{18 - 14}{0.15} \right) 0.1 = 57.0666\%$$

La determinación del DD por valoración potenciométrica puede presentar un cierto margen de error debido a la cantidad de lecturas, la adherencia del QS al electrodo del potenciómetro a la hora de hacer la valoración; ocasionando lecturas imprecisas, esto a su vez provoca que el resultado del DD para este caso sea tan bajo (tabla 9). Algunos autores mencionan que con un porcentaje mayor a 50% de DD se considera que es QS Rinaudo (2006) y para nuestro caso el porcentaje obtenido fue de 57.06 lo que nos indica la presencia de QS.

Tabla 9. Valoración potenciométrica del QS píleo.

NaOH (M)	V ₂ (ml)	V ₁ (ml)	V ₂ -V ₁	%DD
0.1	18	14	4	57.06 ±5.3014

Grado de desacetilación del QS (obtenido de píceo) por valoración potenciométrica lineal

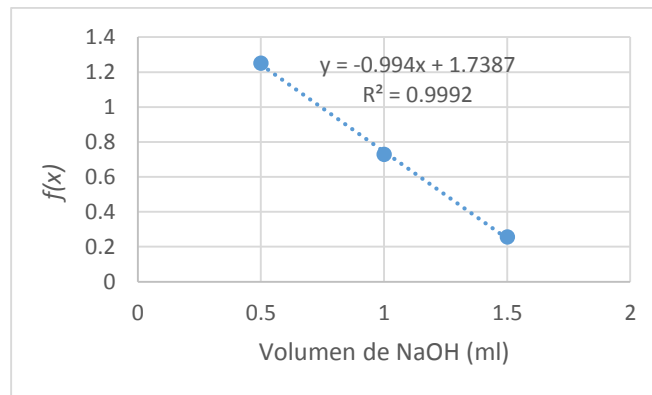
Debido a que el QS empieza a precipitar a un pH cercano al neutro, éste se va adhiriendo a las paredes del electrodo del potenciómetro; provocando que el segundo punto de inflexión no coincida con el punto real. Por las razones expuestas, se optó por utilizar otra técnica de valoración potenciométrica que no presente tantos márgenes de error. Para esto empleamos valoración potenciométrica lineal propuesta por Tan (1998) en donde se reduce las lecturas de pH a un rango de 2 a 3, mientras que en la valoración potenciométrica las lecturas involucran valores de 0 a 12.

QS 0.0841 g se disolvió en 6.7 ml de HCl 0.1 M y se diluyó con 10 ml de agua destilada (pH=1.787), posteriormente el pH de la solución se ajustó a ~ 2 con 0.1 M de NaOH y se toma como punto de inicio de la titulación. Bajo agitación continua de 5 stir, 0.5 ml de NaOH 0.1 M se añadió, se dejó equilibrar y el pH se registró. Esta secuencia se repitió hasta que el pH alcanzó un valor de 3. Los valores de $f(x)$ de los correspondientes volúmenes de NaOH añadido se calcularon utilizando la siguiente ecuación 3.

$$f(x) = \left(\frac{V_0 + V}{N_B} \right) \times ([H^+] - [OH^-]) \quad ec. 3$$

Donde V_0 es el volumen de solución de QS 16.7 ml; V el volumen de NaOH añadido en ml; N_B concentración de NaOH 0.1 M; $[H^+]$ concentración de H^+ (M); $[OH^-]$ concentración de OH^- (M).

La curva de valoración lineal por el trazado de $f(x)$ vs volumen correspondiente de NaOH se muestra en la gráfica 3.



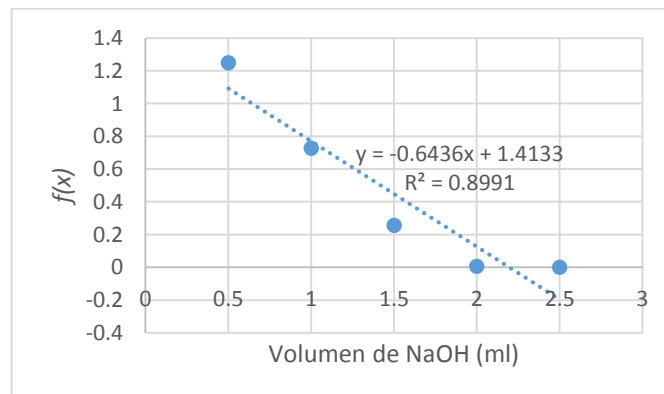
Gráfica 3. Curva de valoración lineal píleo

La dependencia de $f(x)$ con el hidróxido de sodio es lineal, donde el volumen de NaOH en el punto final de la titulación, V_e , se estimó mediante la extrapolación de la curva de valoración lineal para el eje x. El DD de la muestra de QS se calculó utilizando la ecuación 5 y 4.

$$\emptyset = \frac{0.1 \times 6.7 - 0.1 \times 1.7491}{1000} = 4.9 \times 10^{-4}$$

$$DD(\%) = \frac{4.9 \times 10^{-4}}{\left[\frac{(0.0841 - 161 \times 4.9 \times 10^{-4})}{204} + 4.9 \times 10^{-4} \right]} \times 100 = 95.8325\%$$

Sin embargo otros autores como Jiang (2003) utilizan el intervalo de pH ~ 2 hasta donde el QS no precipita pH<6, al graficar este intervalo se obtuvo la curva de valoración de la gráfica 4.



Gráfica 4. Curva de valoración lineal de pH ~2 a pH<6 píleo

Nuevamente se calculó V_e , y ϕ , sustituyendo los valores obtenidos en la ecuación 5 y 4 respectivamente se obtiene el DD del píleo reportados en la tabla 10.

Tabla 10. Valoración potenciométrica lineal del QS píleo.

Método	pH	%DD
Tan <i>et al.</i> ,(1998)	pH=3	95.8325
Jiang <i>et al.</i> ,(2003)	pH ~ 2 a pH < 6	88.8037

Se puede observar que al diluir los solución del QS y terminar la titulación a pH de 3 y 6 donde el QS no precipita se reducen considerablemente los errores del potenciómetro, dando así datos precisos del DD. Para corroborar los datos obtenidos en valoración potenciométrica lineal se realizó una técnica más para calcular el DD.

Grado de desacetilación del QS píleo y estipe por espectroscopia IR

Se retoma el trabajo de Brugnerotto (2001) debido a que cubre todo el rango de valores de DA así como una amplia variedad de fuentes de obtención de materiales, y utiliza resonancia magnética nuclear como técnica absoluta para determinar los DA de muestras de QN y QS. Como banda característica se toma la absorbancia de 1320 cm^{-1} y como banda de referencia 1420 cm^{-1} ecuación 7.

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \times DA \quad r = 0.99042 \quad \text{ec. 7}$$

Una vez que se identificó el polímero en píleo y estipe del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*) se calculó el DA del QS mediante la correlación de Brugnerotto, ecuación 3 evaluando la absorción de las bandas característica de la amida III localizada a 1315 cm^{-1} para el píleo y estipe, como referencia las bandas de los grupos metilos a 1422 cm^{-1} para píleo y 1418 cm^{-1} para el estipe. Mientras que para conocer el DD se utilizó la ecuación 18.

$$\text{Grado de desacetilacion} = 100 - DA \quad \text{ec. 18}$$

Sustituyendo los valores de absorción correspondiente se obtiene los DA reportados en la tabla 11.

Tabla 11 DD del píleo y estipe por IR.

Parte	DA	%DD
Píleo	22.6677	77.3322 ±0.2687
Estipe	19.2927	80.7072±0.4618

Dada su capacidad antimicrobiana en microorganismos patógenos Gran positivo (Mohamed, 2015; Rao, 2016) se propone como aplicación industrial para el QS obtenido de estipe con las condiciones descritas anteriormente y su DD de 80.7 su uso como agente antimicrobiano industrial en presentación de polvo.

La aplicación de QS obtenido de píleo está en función del valor de DD:

Para el QS Con un DD de 95 se propone su uso como medicamento anti inhibidor de células cancerosas como lo reporta Rao (2016). Sin embargo para un rango de DD de 77 y 88 la propuesta consiste en su uso como material para favorecer la regeneración de tejido. Aranaz (2009), menciona que los andamios con bajo DD (75-85%) muestran una mayor estructura regular y los poros son suficientemente uniformes y paralelos, con una sección transversal poligonal. Se sabe que la microestructura tales como tamaño de poro, forma y distribución tiene una influencia destacada en la intrusión celular, proliferación y función en la ingeniería de tejido y su uso en la industria farmacéutica.

CONCLUSIONES

La discrepancia en el porcentaje del DD obtenido en el píleo (57, 95, 77) por los diferentes métodos se pueden deber a:

Para el caso de valoración potenciométrica al registrarse las lecturas de pH en el potenciómetro cuando el QS empieza a precipitar (en el intervalo de 5-7) se cubre la superficie del electrodo y la lectura no se estabiliza impidiendo un reconocimiento preciso para nuestro segundo punto de inflexión y en consecuencia un incremento en el margen de error. Con base a lo anterior se propusieron las otras dos técnicas (Valoración potenciométrica lineal y Espectroscopia Infrarroja)

Para el caso de valoración potenciométrica lineal para evitar que el QS se adhiriera al electrodo del potenciómetro; el analito es diluido con agua destilada y ajustado a pH 2 en este punto se inicia la titulación hasta alcanzar un pH de 3, reduciendo de esta manera los errores que se pudieran dar por la adherencia de QS a las paredes del electrodo del potenciómetro dando así datos más precisos del DD.

La espectroscopia Infrarroja podemos decir que es una técnica más precisa ya que no depende tanto de preparación de reactivos o de lecturas que implican errores humanos; Sin embargo depende de la elección adecuada de una banda característica y una de referencia, se han reportado varias correlaciones en el capítulo 1 de cómo poder calcular el DD así como el coeficiente de correlación que nos indica que tan confiables son los instrumentos IR que miden la absorción. Al utilizar la correlación de Brugnerotto (2001) que tiene un alto coeficiente los datos reportados son confiables, con base a lo anterior podemos decir que el QS obtenido del píleo de hongo seta (*Pleurotus ostreatus*) se encuentra entre 77 y 95 DD.

Como se mencionó anteriormente el DD es afectado por las condiciones del proceso de obtención, lo cual nos indica que el DD reportado por IR es mayor en el estipe porque las cadenas de quitina/quitosano-glucano se rompieron más fácilmente con las condiciones empleadas en el método de obtención, y de esta manera permiten una mayor desacetilación de los grupos acetilo.

La obtención de QS en la semilla no se llevó a cabo debido a que la QN se encuentra presente en la pared celular de los hongos y no en la semilla. Comúnmente las proteínas se disuelven en solución de NaOH, al ser tratada la semilla con esta solución se pudo observar que tiene demasiada proteína ya que presenta una apariencia dura y espesa.

Las aplicaciones para un DD de 87 %, según Nwe (2009) y Aranaz (2009) en la regeneración de tejido, con un DD de 81.5 según Mohamed (2015) y Rao (2016), en la inhibición de microorganismos patógenos y con un DD de 90 según Rao (2016) en la inhibición de células cancerígenas. Debido a que el DD del QS obtenido del hongo seta está comprendido en estos intervalos sería aplicado de la forma que se mostró anteriormente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, E., S., Nagy, K., S., A., Elsabee, M., Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99, 1359-1367.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta N., Galed, G., Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A. (2013). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. *Food Technol. Biotechnol*, 51 (1) 12-25.
- Arcidiacono, S., & Kaplan, D.L. (1992). Molecular Weight Distribution of Chitosan Isolated from *Mucor rouxii* under Different Culture and Processing Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 39, 281-28.
- Balanta D., Grande. C. D., Zuluaga, F. (2010). Extracción, Identificación y Caracterización de Quitosano del Micelio De *Aspergillus Niger* y sus Aplicaciones como Material Bioadsorbente en el Tratamiento de Aguas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 11(5), 297-316.
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. A. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*. 14, 166-169.
- Becerra-Jimenez, J.M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar C.N, Martínez-Hernández, J.L., Contreras-Esquivel J.C., & Cuellar Lozano C.A. (2011). Quitosano Fúngico: Fuentes y Propiedades. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3(5), 24-32.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbières, J., Rinauro, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580,
- Colina, M., Ayala, A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., Vargas, J., & Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de

quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(1), 21-43.

Crestini, C., Kovac, B., Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Production and Isolation of Chitosan by Submerged and Solid-state Fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology and Bioengineering*. 50, 207-210.

De la Paz, N., Fernández, M., Darío, L.O., Nogueira, A., Garcia, M.C., Pérez, D., Tobella, L.J., Montes, de Oca. Y., Díaz, D. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 13(3), 103-116.

Dong, Y., Xu, C., Wang, J., Wang, M., Wu, Y., & Ruan, Y. (2001). Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China*, 216-224.

Escobar, S.D.M., Castro, R.A.M., Vergara, C.N.A. (2014). Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. *Revista de ciencias*, 73-88.

Escobar, S.D.M., Ossa, O.C.P., Quintana, M.A., Ospina, W.A. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*.18, 260-266.

Embuscado, E.M., & Huber, C.K. (2009). Edible Films and Coatings for Food Applications. doi 10.1007/978-0-387-92824-1.

Gaitán, H., Salmones, D., Pérez, M.R., Mata, M. (2006). Manual Práctico del cultivo de setas.

García, Z. T., Roca, O., & Johana, M. (2008). Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 11(2), 24-32.

Hang, Y.D. (1990). Chitosan production from *Rhizopus Oryzae* mycelia. *Biotechnology Letters*, 12(12), 911-922.

Hernández, I. (2004). La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 97-110.

Jaworska, M.M., Konieczna, E. (2001). The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 220-224.

Jiang, X., Chen, L., Wei Zhong, W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 457–463.

Kasaai, M., R. (2008). A review of several report procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71, 497-508.

Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 3–11.

Kozo Ogawa & Toshifumi Yui. (1993). Crystallinity of Partially N-Acetylated Chitosans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(9), 1466-1469.

Kucukgulmez, A M., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D, Polat, H., Kadak, A.E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126, 1144–1148.

Kumar, P.D., Dutta, J., & Tripathi, V.S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20-31.

Kumar B., Varadaraj M., Tharanathan R. (2007). Low Molecular Weight Chitosans Preparation with the Aid of Pepsin, Characterization, and Its Bactericidal Activity. *Biomacromolecules*, 8, 566-572.

Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming J., and Stepnowski, P. (2010). Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan, *Marine Drugs*, 8(5), 1567-1636.

Kumirska, J., Weinhold, M.X., Thöming, J., Stepnowski, P. (2011). Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*, 3 1875-1901.

Libardo, R.P.E. (2011). Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cafealexina. Tesis de licenciatura.

Lárez V.C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 4(2) ,91-109

Maksym, V. P., & Vitalii, Z. S. (2015). Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State, *European Journal of Medicine*. 2, 24-33.

Martínez-Carrera, D., Curvetto, M., Sobal, P.M., Mora V.M. (2010) *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción- Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales- COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.

Maza, M.I., & Hernandez C.J. (2007). Caracterización Físicoquímica de Quitosano para su aplicación como Biosorbente de Metales, *Revista de la facultad de ciencias de la UNI*, 11(1), 1-5.

Mohamed, M.G., Sabha, M.E., Marwa, A.S., Osama, M.D. (2015). Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 123-130.

Mora, V. & Martínez-Carrera, D. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. Disponible en <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/Mexico/UAEM/P.pdf>

Montero-Álvarez., J. A., Paredes-Bautista M. J., Rivera-Morales. M. C. (2010). Utilización de quitosana para la remoción de arsénico (As) del agua. *Superficies y Vacío*, 136-139.

Muzzarelli, A.A.R., Ilari, P., Tarsi, R., Dubini, B., & Xia, W. (1994). Chitosan from *Absidia coerulea*. *Carbohydrate Polymers*, 25, 45-50.

New, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*, 374-398.

- New, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2010). Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering: 11 Years of Our Progress, Present Situation and Future Prospects. *Biopolymers*, 135-162.
- Oyola, M.R. (2014). Titulación Potenciométrica. Universidad de Puerto Rico-Humacao, 1-4.
- Perentena, L., González, C., Celis, B., Valbuena A., & Colina, M. (2015). Síntesis de bases de schiff derivadas del quitosano por reacción con *p*-Dimetilaminobenzaldehído y 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehído. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 16(1), 1-27.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, 641–678.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 25: 78-82.
- Rao-Chi, C., Ming-Tsung, Y., & Jeng-Leun M. (2016). Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitak estipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 138, 259–264.
- Rane, K.D., Hoover, D.G. (1993). Production of chitosan by fungi. *Food Biotechnology*, 7(1), 11-33.
- Ricaurte, V. L., Morales, G. M.L., Rodríguez, D. Y.J. (2014). Tratamiento de aguas crudas usando quitosano como coagulante orgánico. Memorias del II Seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe & VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental, 194-199.
- Rodríguez, P, A. T., Ramírez, A, M. A., Rivero, G, D., Bosquez, M, E., Barrera, N, L. L., & Bautista, B, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307-317.
- Rane, K. D., & Hoover, D.G. (1993). Production of Chitosan by fungi. *Food Biotechnology*, 7(1), 11-33.

- Rico, R. F. (2013). Estudio de la aplicación de recubrimientos comestibles de quitosano y su combinación con aceites esenciales sobre la vida útil del mango (*Mangifera indica L.*) mínimamente procesado. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D. E. Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L.L & Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades Químico-Estructurales y Actividad Biológica de la Quitosana en Microorganismos Fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 15(3), 307-317.
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades Químico-Estructurales y Actividad Biológica de la Quitosana en Microorganismos Fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307-317.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Salazar-Leyva, J.A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J.C., García-Sánchez, G., Ezquerro-Brauer, J.M., Valenzuela-Soto, E.M., Carvallo-Ruiz, M.G., Lugo-Sánchez, M.E., Pacheco-Aguilar, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 129-150.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., & Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Shigemasa, Y., Matsuura, H., Sashiwa, H., Saimoto, H. (1996). Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 237-242.
- Signini, R., & Campana, F.S.P. (2001). Características e Propriedades de Quitosanas Purificadas nas Formas Neutra, Acetato e Cloridrato. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, 58-64.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. Octava edición. Thomson.

Tan, S.C., Khor, E., Tan, T.K., Wong, S.M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 713–719.

Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.M., & Khorb, E. (1996). The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*, 239-242.

Tao, W., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., and Sams, C. E. (2005). Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3888-3894.

Wessels, J. G. H., Mol. P. C., Sietsma, J. H. & Vermeulen, C. A. (1990). Wall structure, wall growth, and fungal cell morphogenesis. *Biochemistry of cell walls and Membranes in fungi*, Kuhn, P. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W. & Copping, L. G. 81-95, Springer-Verlag, Berlin.

