

Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón

Antibacterial activity of chitosan acid solutions obtained from shrimp exoskeleton

Alexander Pérez Cordero*, Johanna Rojas Sierra**, Johana Rodriguez Ruiz***

Irma Arrieta Álvarez****, Yenis Arrieta Álvarez****, Andrés Rodríguez Carrascal****

Resumen

El trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de soluciones ácidas de quitosano obtenido a partir del exoesqueleto de camarón, sobre siete bacterias patógenas, cinco de las cuales corresponden a patógenas de humanos (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* UDS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca* ATCC 43863 y *K. oxytoca* ATCC 43086) y las fitopatógenas (*Pectobacterium* sp UDS y *Burkholderia glumae* 320012-CIAT). Concentraciones de soluciones de quitosano de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 % (v/v) disueltas en ácido acético de 1.0, 1.5, 2.0 % (v/v) fueron preparadas; a partir de estas concentraciones, mediante la técnica de Kirby-Bauer se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro*. Los resultados de actividad antimicrobiana mostraron diferencias altamente significativas entre la especie de bacteria y los tratamientos de quitosano. Las bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. oxytoca* (ATCC 43086 y ATCC 43863) fueron las más susceptibles a los tratamientos, mientras que *E. faecalis*, *Pectobacterium* sp y *B. glumae* mostraron resistencia. Los tratamientos T₃, T₄, T₅, T₇, T₈, T₉ en donde las concentraciones de quitosano estuvieron por encima a las del ácido acético, se presentaron mayores valores medios de actividad de antimicrobiana en mm y aumentó este valor para los tratamientos T₉ (5.8095 mm), T₈ (6.00 mm) para y T₉ (5.8095 mm), donde las concentraciones de quitosano de 2.5 y 3.5%, disueltas en ácido acético fueron igual a 2%. Los resultados de este estudio en el Caribe Colombiano permitirán a futuro el reaprovechamiento del exoesqueleto de camarón como fuente de quitosano como un compuesto potencial frente al manejo al problema de salud pública ocasionada por las enfermedades bacterianas.

Palabras claves: camarón, quitosano, bacterias, patógenas.

Abstract

The work was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of chitosan obtained from exoskeleton of shrimp, on seven pathogenic bacteria, five of which corresponded to human pathogenic strain (ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* UDS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca*, *K. oxytoca* ATCC 43863 and ATCC 43086) and two phytopathogenic strain (*Pectobacterium* sp UDS and *Burkholderia glumae* 320012-CIAT). Solution of chitosan of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5% (v/v) dissolved in 1.0, 1.5, 2.0% (v / v) acetic acid was prepared and from these is by diffusion through the Kirby-Bauer technique was evaluated for antibacterial activity *in vitro*. The results of the antimicrobial activity showed significant differences between the species of bacteria and chitosan treatments evaluated. *P. aeruginosa*, *E. coli* and *K. oxytoca* (ATCC 43086 and ATCC 43863) were the most susceptible to the treatments, while *E. faecalis*, *B. glumae* and *Pectobacterium* sp were resistant. The treatments T₃, T₄, T₅, T₇, T₈, T₉, where chitosan concentrations were above the acetic acid, showed higher mean mm antimicrobial activity and this value increased to T₉ treatments (5.8095 mm), T₈ (6.00 mm) and T₉ (5.8095 mm), where chitosan concentrations 2.5 and 3.5% solution in acetic acid was equal to 2%. The results of this study in the Colombian Caribbean enable future reuse of the exoskeleton of shrimp as a source of chitosan as a potential compound against handling the public health problem caused by bacterial diseases.

Key words: shrimp, chitosan, bacteria, pathogens.

Recibido: junio 20 de 2013

Aprobado: mayo 5 de 2014

* Ingeniero Agrónomo, MSc y Ph.D en Microbiología, Universidad de Sucre, Grupo Bioprospección Agropecuaria. alexpcor@Unisucre.edu.co

** Biología, MSc en Microbiología, Universidad de Sucre, Grupo Bioprospección Agropecuaria. rojas_johanna@yahoo.com

*** Química Farmacéutica, MSc en Química, Universidad de Cartagena

**** Biólogos, Universidad de Sucre, grupo Bioprospección Agropecuarias. Universidad de Sucre Cra 28 #5-267, Teléfono: 282 1240 Sincelejo (Sucre), Colombia - Sur América.

Introducción

A nivel mundial, diversas enfermedades afectan a poblaciones humanas, animales y vegetales; su control durante muchos años se ha dado mediante el uso de productos químicos, los cuales debido a su intensa utilización han generado problemas de contaminación en el medio ambiente, resistencia de patógenos, extinción de comunidades de microorganismo benéficos y problemas de salud en los humanos. Sustentado lo anterior, se hace necesario desarrollar alternativas biológicas de control, para mejorar así la calidad de vida de toda la población (Lárez *et al.*, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que “El uso abusivo de los antibióticos es una de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana y uno de los mayores problemas de salud pública” (Queipo *et al.*, 2000). La prescripción no adecuada y abusiva de los antibióticos, la prolongación de los planes más allá de lo necesario, la aplicación de dosis no óptimas, la irregularidad en la toma de las drogas, son los principales factores que han llevado a una alta tasa de resistencia microbiana (Álvarez, 2007).

De otra parte, los residuos industriales de productos acuícolas, se han convertido en un problema ambiental y de salud pública, por la producción de grandes cantidades de residuos orgánicos como son los exoesqueletos de camarones. Estos desechos contaminan al ambiente y además pueden afectar la salud de las comunidades aledañas en donde se vierten. El quitosano es biopolímero natural no tóxico derivado por desacetilación de la quitina, el principal componente del exoesqueleto de crustáceos e insectos. En los últimos años ha recibido considerable atención por la aplicación en los campos de la biomédica, alimento, ingeniería química, farmacéutica con excelentes propiedades antibacteriana (Fernandes *et al.*, 2009) antifúngica y antiviral; nutrición y en la protección del ambiente y la agricultura (Li *et al.*, 2008).

En la Región Caribe Colombiana existen alrededor de cuatro empresas camaroneras reconocidas, como son: Acuipisca y Colombiana de acuicultura en el área de Cartagena, seguida de Cartagena de Acuicultura, ubicada en el municipio de San Onofre (Sucre) y Agrosolidad, localizada en el estuario de la bahía de Cispata (San antero - Córdoba). Estas son una fuente de materia prima para la obtención de quitosano, sin embargo no ha sido aprovechada, así mismo en nuestra región no existen evidencias del efecto del quitosano sobre bacterias patógenas, convirtiéndose este subproducto en un material innovador y una nueva alternativa biológica para el control de enfermedades (Lárez *et al.*, 2008).

En el presente estudio se realizó evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano sobre bacterias patógenas en humanos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y las fitopatógenas

Burkholderia glumae y *Pectobacterium sp.* Este estudio representa una alternativa frente a los bactericidas y fármacos sintéticos de uso común, además la obtención de productos a partir de biomasa marina residual, proporcionando valor agregado de aplicación en la industria biomédica y farmacéutica y contribuyendo con la disminución de la contaminación ambiental producida por los desechos de crustáceos (Lemus *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009).

Materiales y métodos

Recolección del camarón

Diez muestras de 10 kg de residuos de exoesqueletos de camarones fueron colectadas en el municipio de Coveñas (Sucre), Colombia a 9°24'19.41"N y 75°40'38.83"O. Los exoesqueletos fueron depositados en recipientes estériles y transportados en refrigeración a los laboratorios de Fitoquímica y de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre, para su procesamiento y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro*.

Obtención de quitina

El exoesqueleto de camarón colectado, fue lavado con agua de grifo, para eliminar las impurezas y residuos. Se procedió a separarlo en tres partes: cefalotórax, pleópodo y telson, para su procesamiento, debido a que el telson y cefalotórax tienen mayor pigmentación y requieren de más tiempo para su tratamiento. Un kg de cada parte, se pesó para posteriormente medir el rendimiento de obtención de quitina. Una vez pesadas se trataron con una solución de HCl 2M por 8 horas a temperatura ambiente con agitación constante para su descalcificación. Posteriormente se utilizó papel de filtro (125 mm de diámetro) y se desechó el ácido, el material obtenido se lavó con agua hasta alcanzar pH neutro y dos veces con agua destilada, para purificar. Después se secó al sol por 8 horas y posteriormente se sumergió en un volumen de solución de NaOH 1N a 80°C por 8 horas con agitación constante, para eliminar las proteínas del caparazón. Nuevamente se filtró en papel y se descartó el álcali, y el material obtenido se lavó hasta alcanzar un pH neutro y finalmente se secó al sol por 8 horas (Lemus *et al.*, 2007).

Obtención del quitosano

Para la obtención del quitosano, se tomó la quitina obtenida en la etapa anterior se sumergió en volumen de solución de NaOH 50% a 115°C a reflujo con agitación constante por 24 horas, para eliminar las unidades acetilo. Posteriormente se filtró a través de papel y se desechó el álcali. El material obtenido se lavó con agua hasta alcanzar pH neutro; se secó al sol por 8 horas y por último se molió y se pesó (Lemus *et al.*, 2007).

Caracterización del quitosano

El grado de desacetilación del quitosano, fue medido empleando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y se determinó su peso molecular a partir de la viscosidad intrínseca (Kasaai y Mohammad, 2009).

Para la determinación del grado de desacetilación del quitosano se empleó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)-84005 marca SHIMADZU en la región 4000-400 cm^{-1} de propiedad de la Universidad de Cartagena. En un mortero se mezcló 1 mg de muestra de quitosano con aproximadamente 100 mg de NaCl desecado y se pulverizó con un pistilo. Posteriormente se presionó la mezcla en un troquel entre 700 y 1000 Kg/cm^2 hasta obtener un disco transparente, que se ubica en la trayectoria del haz del instrumento para su examen espectroscópico (Skood *et al.*, 2001). El grado de desacetilación del quitosano (DD) se calculó por la siguiente ecuación: $\text{DD} = 100 - [(A_{1645}/A_{3500}) \times 115]$, donde A_{1645} y A_{3500} son las absorbancias del pico correspondiente a la amina I y de la banda tomada como referencia, respectivamente.

La determinación del peso molecular del quitosano se realizó en un viscosímetro de Hoppler, a una temperatura constante de 25°C. Se prepararon muestras de quitosano disuelto en ácido acético a una concentración inicial de 1 g/dl. Una vez establecida las condiciones de trabajo se procedió a determinar el tiempo que tarda la esfera en recorrer una distancia de 5 cm, estando sumergida ésta en la solución polimérica. Luego la disolución preparada se diluyó hasta obtener concentraciones finales de 0.73, 0.6 y 0.45 g/dl y se determinó nuevamente el tiempo de caída de la esfera bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió 3 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados y se calculó la velocidad reducida con la Ecuación de Huggins:

$$n_{red} = \frac{(t - t_0)}{t_0} \times \frac{1}{c}$$

donde t y t_0 corresponden al tiempo de caída de la esfera en la solución y en el disolvente. Posteriormente se graficaron las 4 concentraciones con sus respectiva viscosidad reducida, para poder hacer una buena regresión lineal y así obtener la viscosidad intrínseca. El peso molecular promedio viscosimétrico se calculó mediante la ecuación de Mark-Houwink $[\eta] = K^*(Mv)^a$ (Ecuación 2), en que $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y Mv es el peso molecular promedio. Los parámetros K y a son las llamadas constantes de Mark-Houwink y dependen del polímero, del disolvente y de la temperatura. Las constantes para a y k fueron 0.85 y 13.8×10^{-5} dl/g (Gartner y López, 2010).

Preparación de soluciones de quitosano

Se prepararon concentraciones de quitosano disuelto en diferentes concentraciones de ácido acético de 1.0,

1.5, 2.0 y 2.5 % (v/v), siguiendo el diseño experimental indicado en la tabla 1. El pH de la solución de quitosano se ajustó a 4.5, mediante la adición de gotas de ácido acético y se esterilizó en autoclave marca ALL AMERICAN modelo 25X-I, a 15 lb/ 15 min.

Bacterias evaluadas

Para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana del quitosano con sus diferentes tratamientos (tabla 1), se utilizaron siete bacterias, cinco de las cuales correspondieron a especies patógenas de humanos (*E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* UDS, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. oxytoca* ATCC 43863 y *K. oxytoca* ATCC 43086) y dos fitopatógenas *Pectobacterium* sp UDS y *B. glumae* 320012-CIAT.

Tabla 1. Diseño experimental de tratamientos utilizados para la actividad inhibitoria de las bacterias patógenas.

Tratamientos	Concentración de a. acético %(v/v)	Concentración de quitosano %(v/v)
T1	1	1
T2	1.5	1.5
T3		2.0
T4		2.5
T5		3.0
T6	2.0	3.5
T7		2.5
T8		3.0
T9		3.5

Evaluación de la actividad inhibitoria del quitosano

La evaluación de actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en disco sobre agar, realizando siembra de las bacterias purificadas en medio sólido por medio de la técnica de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton. La concentración de todas las bacterias fue del orden de 10^8 UFC/mL. Los discos estériles de papel filtro fueron sumergidos por un tiempo de 24 horas en los diferentes tratamientos (tabla 1), transcurrido este tiempo, en condiciones asépticas se depositaron sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C (Cuéllar y Hussein, 2009).

Para cada bacteria, se utilizó como testigo absoluto el ácido acético, control positivo con gentamicina 120 mg/mL y control negativo con agua destilada estéril. Los ensayos se realizaron por triplicado y la evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los discos (mm). Para determinar la actividad antibacteriana del quitosano, a éste resultado se le restó el obtenido del ácido acético. La eficiencia de la actividad antibacteriana del quitosano fue comparada con el control positivo.

Análisis estadístico

Para establecer relación de la actividad antibacteriana de los tratamientos en función de las bacterias, se realizó un ANOVA multifactorial. Se realizaron pruebas para determinar los factores que tuvieron un efecto estadístico significativo sobre la inhibición. Se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores, las cuales fueron evidenciadas de acuerdo a los resultados de las pruebas- F obtenida mediante ANOVA. Los análisis fueron realizados mediante el programa estadístico R (R Development Core Team, R, 2009).

Resultados

Caracterización del quitosano

En la figura 1 se muestran los espectros FTIR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier) de la quitina y quitosano. En el caso de la quitina se presenta el espectro de absorción de la muestra desproteínizada y desmineralizada y quitosano corresponde a la muestra desacetilada.

La determinación del grado de desacetilación del quitosano se obtuvo mediante el uso de espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)-84005 marca SHIMADZU en la región 4000-400 cm^{-1} . El grado de desacetilación del quitosano (DD) se calculó a través de la ecuación: $DD = 100 - [(A_{1645}/A_{3500}) \times 115]$, donde A_{1645} y A_{3500} son las absorbancias del pico correspondiente a la amina I y de la banda tomada como referencia, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 1, se observaron bien definidos picos de absorción como: enlace C=O (1730 y 1680), grupo amida NH (3860 y 3740) y un pico de absorción débil correspondiente a las vibraciones de su estructura piranósica (1065), lo cual indica que en esta etapa efectivamente se tiene la quitina. No obstante, aparece un pico de absorción a 2350 cm^{-1} , que no corresponde a ningún grupo funcional presente en la estructura de la quitina; posiblemente producto de componentes traza de eta-

pas anteriores. Así mismo se observaron bandas que permitieron evidenciar los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano: grupos OH a 3500 cm^{-1} , N-H a 3220 cm^{-1} , C-H a 2877 cm^{-1} , C-O-C a 1153 cm^{-1} , grupo piranósico a 1065 cm^{-1} y grupo amina a 1645 y 1430 cm^{-1} . Además se evidencia que en las dos estructuras se mantienen presentes las señales correspondientes a C-H alifático y al anillo piranósico, mientras que las bandas correspondientes al grupo NH (1430 y 1645 cm^{-1}) de la amina, se definen mejor después que la muestra se sometió al proceso de desacetilación, es decir en la obtención de quitosano.

Determinación del peso molecular del quitosano

La ecuación encontrada para la determinación el peso molecular del quitosano a partir de la viscosidad intrínseca fue $Y = 0.2174X + 1.4489$, con $R^2 = 0.9894$. Se observa, que la viscosidad reducida se incrementó a medida que la concentración del quitosano aumenta. El coeficiente de correlación (r) fue igual a 0.9894; lo que indica que la regresión es una función lineal, dado que su valor es mayor de 0.95, es decir que sus variables son directamente proporcionales.

El intercepto con el eje de las (y) proporciona el resultado de la viscosidad intrínseca, la cual es igual a 1.4489 dl/g; este dato reemplazado en la expresión:

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{13.8 \times 10^{-5}} \right)^{\frac{1}{0.85}}$$

(Ecuación 2) (Parada et al., 2004), permitió obtener el peso molecular del quitosano el cual correspondió a 53800 g/mol.

Actividad antibacteriana del quitosano

En la tabla 2 se muestra los resultados de medias de actividad antibacteriana (mm) en relación a tipo de bacteria y tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%.

Los resultados de la actividad antibacteriana del quitosano sobre diferentes grupos de bacterias patógenas

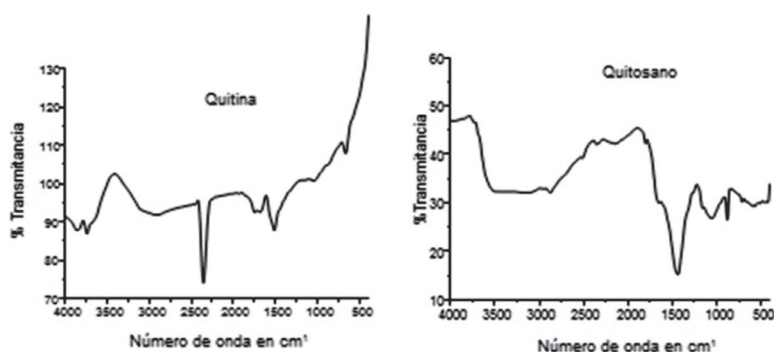


Figura 1. Espectros FTIR de muestra de quitina y quitosano.

(tabla 2), se observan que las bacterias *B. glumae*, *Pectobacterium* sp y *E. faecalis*, mostraron valores menores medios de inhibición en mm de 0.0, 0.0 y 0.3704, respectivamente al quitosano; mientras que *P. aeruginosa* (2.1852), *E. coli* (4.8889) *K. oxytoca* ATCC 43086 (9.2963) y *K. oxytoca* ATCC 43863 (9.3333), presentaron mayores valores medios de inhibición al quitosano. Se observa además, que el efecto inhibitorio fue mayor en las bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. Coli*, *K. oxytoca* ATCC 43086 y *K. oxytoca* ATCC 43863), que en Gram-positiva (*E. faecalis*). Sin embargo, no todas las bacterias Gram-negativas fueron inhibidas.

Al comparar la eficiencia de inhibición del quitosano con relación al control químico con gentamicina 120 mg/ml, se observó mayor formación de halo de inhibición para *K. oxytoca* ATCC 43863, *K. oxytoca* 43086 y *E. coli* en los pozos 1 de cada bacteria como se muestran en la figura 2, indicando que la eficiencia de la actividad antibacteriana del quitosano es similar al efecto que produjo la gentamicina (pozo 4). De otra parte se observó además, que la actividad inhibitoria de es atribuida directamente al quitosano, y no al ácido acético (pozo 2), en el cual no se mostró ningún efecto inhibitorio sobre las especies de bacterias evaluadas. En la misma figura se observa que en *Burkholderia glumae* no se hubo ninguna actividad inhibitoria por parte de las soluciones ácidas de quitosano ni para el control químico.

La actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones de quitosano disuelto en ácido acético, señalan que el tratamiento correspondiente a concentraciones de 1.0% de quitosano disuelto en 1.0% ácido acético (T₁) no fue efectivo, dado que no hubo inhibición para ninguna de las bacterias; en orden de efectividad le siguieron los tratamientos T₂ y T₆ con un mínimo efecto inhibitorio, destacándose el hecho de que en estos 3 tratamientos se hizo una relación 1:1 de quitosano y ácido acético (tabla 2). En los demás tratamientos T₃, T₄, T₅, T₇, T₈, T₉ en donde las concentraciones de quitosano están por encima de las del ácido acético, la actividad de inhibición fue aumentando; destacándose T₇ y T₉, es decir a concentraciones 2.5 y 3.5% de quitosano, disuelto a una misma concentración de ácido acético igual al 2%.

Además, se observan que los tratamientos T₄ y T₇ aunque tienen concentraciones iguales de quitosano (2%), disuelto en distintas concentraciones de ácido acético (1.5 y 2.0% respectivamente), se observa que el tratamiento T₇ presentó mayor inhibición. Resultado similar mostró el tratamiento T₈, el cual presentó mayor efecto inhibitorio que el tratamiento T₅, encontrándose estos a concentraciones iguales de quitosano (3%), disuelto en distintas concentraciones de ácido acético (2.0 y 1.5%. respectivamente).

Discusión

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de las soluciones ácidas de quitosano se convierten en un potencial biológico para la inhibición de bacterias pa-

tógenas. El peso molecular del quitosano obtenido mediante la ecuación lineal de viscosidad intrínseca fue de 53800 g/mol, este valor encontrado es similar al obtenido en el trabajo realizado por Gartner y López, (2010) y se encuentra en el rango de 10⁵ a 5 x 10³ g/mol determinado por Pacheco, (2010). Trabajo realizado por Pacheco, (2013) sobre la determinaciones *in vitro* del efecto de quitosanos con diferentes pesos moleculares y grados de acetilación, mostraron que el quitosano de peso molecular medio (400 g/mol) inhibió al hongo *P. digitatum* durante la etapa de germinación de esporas, y que en combinación con un agente de biocontrol como la levadura (*Pichia guilliermondii*) la inhibición se observa durante la etapa de crecimiento radial. Estos resultados obtenidos sobre el valor del peso de quitosano encontrados en el presente estudio demuestran que quitosano evaluado presentó un peso molecular de acuerdo a la comparación con el estudio citado anteriormente.

Los resultados de actividad antimicrobiana del quitosano sobre diferentes grupos de bacterias analizadas en este estudio, confirman la eficiencia de este producto como lo demuestran estudios llevados a cabo por Hong et al., (2002), quienes al evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de seis muestras de quitosano y seis de oligómeros de quitosano con diferentes pesos moleculares sobre cuatro bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *L. bulgaricus*) y cuatro Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, y *Vibrio parahaemolyticus*), demostraron que el quitosano inhibió el crecimiento de la mayoría de las bacterias probadas, además, los efectos inhibitorios de este variaron con respecto al peso molecular, concentración y especie de bacteria estudiada.

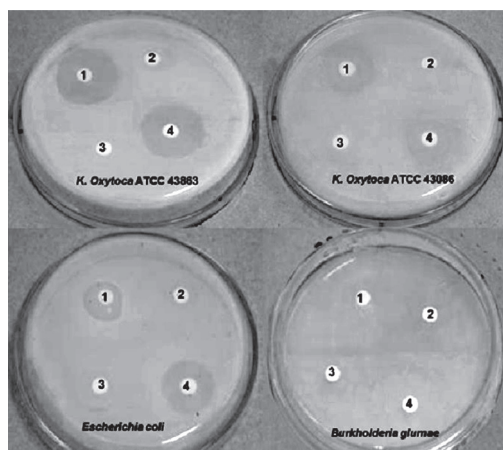


Figura 2. Resultados de actividad antibacteriana del quitosano sobre bacterias patógenas. 1: quitosano, 2: Ácido acético, 3: testigo absoluto, 4: control positivo (gentamicina 4 mg/mL). Fuente Pérez 2012.

Tabla 2. Medias de actividad antibacteriana (mm) en relación a tipo de bacteria y tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

Nivel	Casos	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Media global	189	3.72487			
Bacterias					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	27	2.1852	0.5955	1.00988	3.3605
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 29212	27	0.3704	0.5955	-0.804937	1.5457
<i>Burkholderia glumae</i>	27	0.0	0.5955	-1.17531	1.1753
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43086	27	9.2963	0.5955	8.12099	10.4716
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43863	27	9.3333	0.5955	8.15803	10.5086
<i>Escherichia coli</i>	27	4.8889	0.5955	3.71358	6.0642
<i>Pectobacterium</i> sp.	27	0.0	0.5955	-1.17531	1.1753
Tratamientos					
T ₁ : 1%(v/v) ácido acético + 1%(v/v) de quitosano	21	0.0	0.67522	-1.33267	1.3327
T ₂ : 1%(v/v) ácido acético + 1.5%(v/v) de quitosano	21	1.7619	0.67522	0.429232	3.0946
T ₃ : 1.5%(v/v) ácido acético + 2.0%(v/v) de quitosano	21	3.1904	0.67522	1.8578	4.5232
T ₄ : 1.5%(v/v) ácido acético + 2.5%(v/v) de quitosano	21	3.2381	0.67522	1.90542	4.5708
T ₅ : 1.5%(v/v) ácido acético + 3.0%(v/v) de quitosano	21	4.3333	0.67522	3.00066	5.6660
T ₆ : 1.5%(v/v) ácido acético + 3.5%(v/v) de quitosano	21	2.3809	0.67522	1.04828	3.7136
T ₇ : 2.0%(v/v) ácido acético + 2.5%(v/v) de quitosano	21	6.8095	0.67522	5.47685	8.1422
T ₈ : 2.0%(v/v) ácido acético + 3.0%(v/v) de quitosano	21	6.0	0.67522	4.66733	7.3327
T ₉ : 2.0%(v/v) ácido acético + 3.5%(v/v) de quitosano	21	5.8095	0.67522	4.47685	7.1422

Trabajos realizados por Helander, (2001), sobre la acción antimicrobiana del quitosano de alto peso molecular, sobre bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*); corroboro que el quitosano al tener un ion positivo con una base amino (NH₂), se une a los aniones presentes en la membrana externa de las bacterias e inhibe la absorción y transporte de nutrientes al interior de la célula. De las bacterias evaluadas en este ensayo, las especies de *K. oxytoca*, provenientes de diferentes fuentes, mostraron mayor susceptibilidad a los tratamientos con quitosano y diferencias en el grado de susceptibilidad entre ellas, *K. oxytoca* ATCC 43086, mostró valores medios de inhibición mayores con respecto a *K. oxytoca* ATCC 43863, esto confirma, que el efecto inhibitorio

del quitosano varía entre especies y entre miembros de una misma especie (intraespecífica).

Los datos obtenidos, indican que el efecto del quitosano depende no solo de la especie de bacteria y la fuente de procedencia; sino además, del tipo de hospedero, sustentado esto, por los resultados de resistencia obtenidos sobre las bacteria fitopatógenas evaluadas, como el caso de *Pectobacterium spp.* y *B. glumae*, las cuales se han convertido en uno de los fitopatógenos de mayor importancia agrícola, por su impacto económico y por la resistencia de manejo en campo (Pérez y Saavedra, 2011).

Los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones evaluadas de quitosano, sugieren, que aquellos que tienen concentraciones de quitosano iguales a las

concentraciones de ácido acético, no son tan efectivos, como aquellos, en los cuales las concentraciones de quitosano están por encima de las del ácido acético. De igual manera se muestra que a una misma concentración de ácido acético y concentraciones mayores del quitosano se encontró la mayor actividad antibacteriana de este compuesto, para la mayoría de las bacterias evaluadas; coincidiendo estos resultados con los realizados por Ming *et al.*, (2008), quienes evaluaron el mecanismo antibacteriano de microesferas de quitosano sobre *E. coli*; concluyendo que la actividad antibacteriana fue directamente proporcional a la concentración de las microesferas del polímero.

Aunque el ácido acético no es el que ocasiona la inhibición, si juega un rol muy importante dado que a mayor concentración de ácido acético mayor es la solubilidad del polímero y la protonación de los grupos-NH₂. Estos resultados coinciden con los encontrados por Ying *et al.*, (2003), quienes evaluaron el efecto de factores abióticos como el pH y la fuerza iónica, en la actividad antimicrobiana del polímero sobre las bacterias *E. coli* y *Staphylococcus aureus*; concluyendo que la actividad antibacteriana del quitosano depende significativamente de sus cargas y solubilidad.

La actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenidas a partir del exoesqueleto de camarón se convierte en una posible alternativa biológica para el Caribe Colombiano, dado que los otros estudios realizados se han direccionado hacia la actividad antibacteriana del quitosano obtenida sintéticamente. Estudios posteriores serán realizados utilizando quitosano de diferentes pesos moleculares (bajo, medio y alto), sobre otros patógenos de importancia clínica y agrícola para el departamento de Sucre y la región Caribe Colombiana.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos, a los laboratorios de Fitoquímica y de Investigaciones Microbiológica de la Universidad de Sucre y a la Universidad de Cartagena.

Bibliografía

Álvarez L., 2007. Infecciones de vías urinarias en el hospital universitario del Norte. *Salud Uninorte*. 23: 9-18.

Bin L., Xiao W., Ruoxia Ch., Weiguang H., Guanlin X. 2008. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*, 72:287-292.

Cuéllar A., Hussein R. 2009. Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in mbarara district (Uganda). *Revista Colombiana de Ciencias Animal-Recia*. 1(2): 240-249.

Fernandes J., Eaton P., Gomes A., Pintado M., Malcata F. 2009. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy*, 109: 854-860.

Gartner C., López B. 2010. Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Revista facultad de ingeniería universidad de Antioquia*. 53: 20-29.

Helander I. 2001. Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 71:235-244.

Hong N., Young N., Shin L. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 65-72.

Kasaai J., Mohammad R. 2009. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1667-1676.

Lárez C.m Sánchez J., Millán Y. 2008. Viscosimetric Studies of Chitosan Mitrato and Chitosan Chlorhydrate in Acid free NaCl Aqueous Solution. *Polymers*. 14:25-28.

Lemus J., Martínez L., Navarro M., Posadas A. 2007. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón. *Boletín electrónico* N° 7. 7:1-9.

Ming K., Xi G., Chen C., Chen G., Xiang H., Le J. 2008. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids Surf Biointerfaces*. 65:197-202.

Pacheco N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: Caracterización y aplicación. [Trabajo de tesis doctoral]. UAM-Iztapalapa, México, Ingeniería des Matériaux Polymères, UCB- Lyon 1 France. http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/80/79/45/PDF/TH2010_Pacheco_-_Lopez_-_Neith_-_Aracely.pdf.

Parada L., Acosta C., Canjura O., Katime I. 2004. Estudio de miscibilidad en mezclas de diferentes poli (mono-itaconatos de N-alquilo) con poli(vinilpiridinas). *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5:153-165.

Pérez C., Saavedra E. 2011. Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano, *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 3(1): 111-124.

Pillai C., Paul W., Sharma Ch. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34:641-678.

Queipo J., Budía A., Máscaros E., Gómez-Ferrer A., Gobernado M., Jiménez J. 2000. Evolución de la resistencia microbiana a fluorquinolonas en un hospital terciario. *Actas Urológica Española*. 24:381-387.

R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, 2009, Vienna, Austria. ISBN 3-900051. Disponible en URL: * <http://spatial-analyst.net/book/biblio/author/650>.

Rodríguez A., Ramírez MA., Rivero GD., Bosquez ME., Barrera N., Bautista B. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosano en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo serie horticultura*. 15(3):307-317.

Skood D., Holler F., Nieman T. 2001. Principio de Análisis Instrumental. España, Mc Graw- Hill / interamericana, p. 1038.

Soro L. 2007. Estudio de la obtención de Quitosano a partir de Camarón de Camarón (*Penaeus vannamei*) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión aceite en agua. [Trabajo de grado]. Ecuador, Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. DOI:handle/123456789/1258.

Ying Ch., Huey L., Yen M., Song L. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*. 88:179-184.