

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE DISOLUCIONES DE SALES DE QUITOSANA

Mario A. García^{1}, Nilia de la Paz², Mirna Fernández¹ y Jarol A. Valdés¹*

1Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, CP 13600. La Habana, Cuba. E-mail: marioifal@gmail.com

2Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ave. 26 No. 1605 e/Boyeros y Puentes Grandes. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se evaluó la actividad antioxidante de disoluciones de acetato y lactato de quitosana obtenida a partir de quitina de langosta común (*Panulirus argus*) a escala industrial. Para la obtención de las sales de quitosana se prepararon dos disoluciones de quitosana al 4 % (m/v), una en ácido acético y otra en ácido láctico, ambos al 10 % (v/v). El secado por aspersión de estas disoluciones se realizó a temperaturas de entrada/salida de 160/100 °C. Se emplearon los ensayos ABTS¹ y DPPH para determinar la actividad antioxidante de las disoluciones de quitosana y sus sales. Los valores del potencial de secuestro de radicales libres de las disoluciones fueron superiores al 30 % sin manifestar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con el incremento de la concentración y tiempo de reacción, aunque las disoluciones de las sales mostraron mayor capacidad antioxidante ($p \leq 0,05$) que la quitosana.

Palabras clave: Quitosana, acetato de quitosana, lactato de quitosana, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Evaluation of antioxidant activity of chitosan salts solutions

Antioxidant activity of chitosan acetate and lactate obtained from chitin of common lobster (*Panulirus argus*) at industrial scale was evaluated. It was prepared two chitosan solutions at 4 % (w/v), one of them in acetic acid and the other in lactic acid, both at 10 % (v/v). These solutions were spray dried at input/output temperatures of 160/100 °C. ABTS¹ and DPPH assays were used to determine the antioxidant activity of chitosan solutions and its salts. The values of free radicals scavenging ability of solutions were higher to 30 % without show significant differences ($p \leq 0.05$) with the increase of concentration and reaction time, although salts solutions showed higher antioxidant capacity ($p \leq 0.05$) than chitosan.

Keywords: Chitosan, chitosan acetate, chitosan lactate, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son sustancias que previenen o retrasan el daño oxidativo de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos por especies reactivas del oxígeno (EROs) como los radicales libres (1). Además de jugar un papel importante en los sistemas fisiológicos, los antioxidantes se han utilizado como aditivos en la industria alimentaria para prolongar la vida útil de los alimentos, especialmente de aquellos ricos en grasas polinsaturadas, las que son fácilmente oxidadas por EROs y constituyen una causa importante en el dete-

**Mario A. García Pérez: Licenciado en Ciencias Alimentarias (2006). Máster en Ciencia y Tecnología de Alimentos (2009). Se desempeña como profesor de Principios de Ingeniería de Alimentos, Conservación de Alimentos y Ciencia y Tecnología de Frutas y Hortalizas en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. Su área de investigación está relacionada con el empleo de productos naturales en la industria alimentaria.*

rioro de la calidad, pérdidas nutricionales, desarrollo de mal sabor y coloración no característica (2). Debido a la controversia con respecto al empleo de antioxidantes sintéticos en relación con la salud de los consumidores, se ha incrementado el estudio de los antioxidantes naturales, entre los cuales se encuentra la quitosana (3).

La industria procesadora de mariscos es altamente generadora de desechos sólidos que contaminan el medio ambiente y se convierten en una carga económica para la industria, porque su eliminación es problemática y costosa. En la actualidad existen alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de estos desechos y su conversión en productos de utilidad como la quitina y sus derivados (4,5).

La quitosana, obtenida por desacetilación de la quitina, es un polímero con estructura de hélice con grupos amino reactivos, lo que ofrece muchas posibilidades de modificación e interacciones iónicas (6,7).

En los últimos años la quitosana ha recibido mucha atención por parte de los investigadores debido a sus propiedades y a su fácil obtención. Al ser uno de los pocos polisacáridos catiónicos, esto le confiere propiedades únicas con respecto al resto de los polisacáridos, que generalmente son neutros o negativamente cargados (7).

Las aplicaciones de las películas y disoluciones de quitosana como antioxidante incluyen su empleo en la conservación de fresas (8), jugos de naranja (9) y manzana (10), cacahuets, papas fritas (11), hamburguesas de res (12), embutidos secos fermentados (13) y mayonesa (14).

Sin embargo, las aplicaciones prácticas de la quitosana se ven limitadas por su insolubilidad en agua a pH superior a 6. Varios derivados de la quitosana han sido diseñados para superar este obstáculo. La quitosana forma sales solubles en agua con ácidos inorgánicos y orgánicos como ácidos clorhídrico, fórmico, glutámico, láctico, cítrico, acético y ascórbico. Los grupos aminos reactivos presentes en la quitosana pueden ser protonados (NH_3^+ OCOR-) por estos ácidos y el polisacárido soluble en agua resultante está cargado positivamente (7).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante de disoluciones de sales de quitosana obtenida a partir de quitina de langosta común (*Panulirus argus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para preparar las disoluciones se emplearon quitosana de masa molecular 275 kDa y grado de desacetilación de 75 %, obtenida en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, por N-desacetilación de la quitina de langosta común (*P. argus*), disolución de ácido láctico 90 % (Merck, Alemania), ácido acético glacial (Merck, Alemania) y agua destilada.

Además, se utilizaron acetato de quitosana y lactato de quitosana con una composición de un 30 % (m/m) de quitosana, obtenidas mediante el secado por aspersión de dos disoluciones de quitosana al 4 % (m/m), una en ácido acético y otra en ácido láctico, ambos al 10 % (v/v), a temperaturas de entrada/salida de 160/100 °C en un secador por aspersión a escala de laboratorio (Mini Spray Dryer Büchi B-191, Suiza).

Para la evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS' (15) se prepararon disoluciones de quitosana en ácido láctico al 1 % (v/v) y disoluciones de acetato de quitosana y lactato de quitosana, ambas al 1 % (m/v) en agua destilada. Se utilizó como tiempo final de reacción 10 min.

El ensayo se realizó de la forma siguiente: se adicionó 1 mL de la disolución de radicales ABTS' diluida en un tampón de fosfato a pH 7,4 con absorbancia de $1,00 \pm 0,02$ UA a un tubo de ensayo con 100 μL del extracto convenientemente diluido y a otro con 100 μL de ácido láctico al 1 % (v/v) como referencia. Después de 10 min de reacción a temperatura ambiente se midió la absorbancia de ambos a 734 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2401PC UV-VIS, Japón). La diferencia de absorbancia es proporcional a la concentración de sustancias antioxidantes. Como sustancia patrón para la curva de calibración se empleó el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E, pero soluble en agua en concentraciones entre 0 y 7 μM . Los resultados de la capacidad antioxidante por el ensayo ABTS' se expresaron como Trolox en mmol/100 mL de disolución.

La capacidad de secuestro de radicales libres se determinó mediante la reducción del radical estable 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) (Sigma) a 517 nm contra el blanco. La absorbancia característica de este radical en disolución etanólica posee una coloración violeta intensa, la cual disminuye en presencia de una sustancia que sea capaz de capturar electrones libres (16). A la disolución de DPPH se añadió disolución de quitosana y de sus sales a diferentes concentraciones (12,5; 25 y 50 µg/mL), en una proporción DPPH: disolución de quitosana de 3:1. El porcentaje de decoloración de esta disolución fue medido a 517 nm a los 5; 15 y 30 min de reacción.

Se realizó un análisis de varianza mediante Statistics (versión 7, 2004, StatSoft. Inc., Tulsa, EE.UU.) y la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las diferencias entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra que no existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la capacidad antioxidante de las disoluciones; estos valores coincidieron, de forma general, con los reportados en otros trabajos (17-19), aunque para quitosanas obtenidas de fuentes diferentes a la langosta.

Varios trabajos han informado la capacidad secuestradora de radical hidroxilo (17) y de metales (18) de disoluciones acuosas de quitosana. La capacidad antioxidante de la quitosana puede explicarse por varios mecanismos. Uno de ellos es la capacidad de secuestro de radicales libres, en el cual el polímero elimina varios de estos radicales por acción del nitrógeno en el C-2. Se ha reportado (17) que la capacidad de secuestro está relacionada con el hecho de que los radicales libres pueden reaccionar con los iones H^+ provenientes de los iones amonio (NH_3^+) de las moléculas estables.

Tabla 1. Capacidad antioxidante de disoluciones de quitosana y sus sales al 1 % (m/v)

Disolución	Capacidad antioxidante (mmol/100 mL)
Quitosana	0,026 (0,006)
Acetato de quitosana	0,030 (0,003)
Lactato de quitosana	0,032 (0,004)

Media (desviación estándar); n = 3.

La actividad antioxidante de la quitosana está relacionada con su masa molecular y concentración en la disolución, razón por la cual debe considerarse que aunque todas las disoluciones fueron preparadas a la misma concentración, la masa de quitosana fue menor en las disoluciones de las sales de quitosana (30 % m/m de quitosana), y sin embargo, mostraron igual capacidad antioxidante que la quitosana base, lo que apunta al hecho de que las disoluciones de las sales de quitosana posean mayor capacidad antioxidante que las preparadas a partir de quitosana base, lo cual pudiera estar relacionado con la mayor solubilidad de las sales en medio acuoso.

En otro trabajo (19) se evaluó la capacidad antioxidante de quitosanas clasificadas por su masa molecular en alta, media y baja, y se reportó una mayor actividad antioxidante para la de 12 kDa (baja) con valores de 2,15 µmol de Trolox equivalente y 1,46 y 0,89 µmol de Trolox equivalente para la quitosana de media (95 kDa) y alta masa molecular (318 kDa), respectivamente.

Los valores del potencial de secuestro de radicales libres de las disoluciones se comportaron en todos los casos superiores al 30 % sin manifestar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con el incremento de la concentración y tiempo de reacción (Tabla 2). Este resultado se relaciona con los del ensayo ABTS' en cuanto a la capacidad antioxidante de la quitosana frente a especies reactivas.

Sin embargo, los resultados indicaron que existió diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre la capacidad de secuestro del radical DPPH por las disoluciones de quitosana y sus sales (Tabla 3). Se observa que las sales de quitosana mostraron una mayor ($p \leq 0,05$) capacidad antioxidante que la quitosana base.

Esta técnica ha sido ampliamente informada en otros trabajos (20) para evaluar la actividad antioxidante de disoluciones al 1 % (m/v) de quitosana y que, en concordancia con esta investigación, reportan actividad antioxidante para este polímero.

Se ha reportado (21) la capacidad antioxidante de quitosanas de 30, 90 y 120 kDa a través del ensayo DPPH, con mayor actividad para la quitosana de menor masa molecular, con un rango de secuestro de radicales entre 40 y 100 %, incrementándose en la medi-

Tabla 2. Capacidad de secuestro del radical DPPH de las disoluciones de quitosana y sus sales

Disolución	Concentración (mg/mL)	Capacidad de secuestro (%)		
		5 min	15 min	30 min
Quitosa	12,5	0,36 (0,0)	0,35 (0,0)	0,32 (0,007)
	25	0,37 (0,01)	0,38 (0,01)	0,35 (0,01)
	50	0,35 (0,0)	0,35 (0,0)	0,34 (0,01)
Acetato de quitosa	12,5	0,45 (0,0)	0,42 (0,06)	0,3 (0,1)
	25	0,43 (0,01)	0,42 (0,008)	0,40 (0,03)
	50	0,44 (0,004)	0,41 (0,03)	0,36 (0,09)
Lactato de quitosa	12,5	0,44 (0,005)	0,42 (0,007)	0,39 (0,002)
	25	0,44 (0,01)	0,43 (0,01)	0,40 (0,02)
	50	0,43 (0,01)	0,43 (0,01)	0,42 (0,009)

Media (desviación estándar); n = 3.

da en que se aumentó la concentración desde 0,2 hasta 1 % (m/v). Las quitosanas de 90 y 120 kDa mostraron un efecto menor, con un porcentaje de secuestro entre 9 y 37 % para cada una frente a las concentraciones antes mencionadas. En consecuencia, se plantea que la capacidad de secuestro de radicales libres por la quitosana depende de las concentraciones y masa molecular del polímero.

También se utilizó este método en otro trabajo (19) en el que la capacidad antioxidante de la quitosana se incrementó con el aumento de la concentración y disminución de la masa molecular.

En este mismo estudio se utilizaron disoluciones de quitosana de 318; 95 y 12 kDa a concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 % (m/v), respectivamente. El porcentaje de secuestro en la quitosana de 12 kDa se incrementó desde 25 hasta 53 %, este último valor al 1

% (m/v). La quitosana de menor masa molecular exhibió una excelente actividad antioxidante, atribuible a su fuerte capacidad de donar iones H⁺.

Contrario a esto, se sugiere que la quitosana tiene pobre actividad antioxidante al obtener valores de secuestro muy bajos con el ensayo DPPH (20).

Es importante señalar que en estos análisis se debe tener en cuenta diferentes factores que pueden influir en la actividad antioxidante como las concentraciones del polímero, proporciones reactivo/muestra, así como las masas moleculares de las quitosanas que, según se ha descrito, influye también en sus propiedades.

Diversos factores influyen en la efectividad de los antioxidantes en sistemas heterogéneos y complejos como los alimentos y sistemas biológicos (22). Esto incluye las propiedades de la fracción lípido/fase acu-

Tabla 3. Comparación de la capacidad de secuestro del radical DPPH de las disoluciones de quitosana y sus sales

Disolución	Capacidad de secuestro (%)
Quitosa	0,35 (0,01) b
Acetato de quitosa	0,41 (0,05) a
Lactato de quitosa	0,42 (0,01) a

Media (desviación estándar); n = 18.

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$) por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

sa del antioxidante, condiciones de oxidación y estado físico del sustrato oxidable. La influencia de todos estos parámetros no puede ser evaluada mediante un solo método de ensayo. En consecuencia, debe destacarse que en todas las investigaciones citadas, se determinó la capacidad antioxidante de la quitosana por diferentes métodos para comparar el comportamiento de las muestras y los resultados en función de cada técnica, demostraron en todos los casos, el efecto protector de la quitosana frente a reacciones de oxidación.

CONCLUSIONES

Los valores de la capacidad de secuestro de radicales libres de las disoluciones de quitosana y sus sales fueron superiores al 30 % sin manifestar diferencias signi-

ficativas ($p \leq 0,05$) con el incremento de la concentración y tiempo de reacción, aunque las sales de quitosana mostraron mayor capacidad antioxidante ($p \leq 0,05$) que la quitosana base.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. C. José Luis Rodríguez del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (Cuba) y Dr. C. Liván Delgado del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana por su colaboración en las determinaciones de la actividad antioxidante.

REFERENCIAS

1. Wang, L.; Wu, H.; Qin, G. y Meng, M. *Food Control* 41: 56-62, 2014.
2. López, C.; López, M.; López, J. M. y González M. V. *Food Res. Inter.* 53: 522-528, 2013.
3. Fan, L.; Wu, H.; Cao, M.; Zhou, X.; Peng, M.; Xie, W. y Liu, S. *React. Funct. Polym.* 76: 26-31, 2014.
4. Mármol, Z.; Páez, G.; Rincón, M.; Araujo, K.; Aiello, C.; Chandler, C. y Gutiérrez, E. *Rev. Tecnocientífica* 1: 53-58, 2011.
5. Wang, S. y Hao, H. *LWT* 52: 71-79, 2013.
6. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O. y Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 35-52, 2004.
7. Fernández, M.; Heinämäk, J.; de la Paz, N.; Lopéz, O.; Maunu, S. L.; Virtanen, T.; Hatanpää, T.; Antikainen, O.; Nogueira, A.; Fundora, J. y Jyliruusi, J. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12(2): 637-649, 2011.
8. Wang, S. y Hao, H. *LWT* 52: 71-79, 2013.
9. Martín-Diana, A. B.; Rico, D.; Barat, J. M. y Barry-Ryan, C. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10: 590-600, 2009.
10. Chien, P. J.; Sheu, F.; Huang, W. T. y Su, M. S. *Food Chem.* 102: 1192-1198, 2007.
11. Schreiber, S. Chitosan-gallic acid films as multifunctional food packaging (tesis de maestría, Universidad de Tennessee), 2012, 123 p.
12. Georgantelis, D.; Blekas, G.; Katikou, P.; Ambrosiadis, I. y Fletouris, D. *J. Meat Sci.* 75: 256-264, 2007.
13. Krkic, N.; Sojic, B.; Lazi, V.; Petrovic, L.; Mandic, A.; Sedej, I.; Tomovic, V. y Dzinic, N. *Food Control* 32: 19-723, 2013.
14. García, M.; Silva, Y. y Casariego, A. *Emir. J. Food Agric.* 26(10), doi: 10.9755/ejfa.v26i10.xxx, 2014.
15. Re, R.; Pellegrini, N.; Progentte, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Riceevans, C. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237, 1999.
16. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. y Berset, C. *LWT* 28: 25-30, 1995.
17. Xie, W.; Xu, P. y Liu, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 1699-701, 2001.
18. Xue, C.; Yu, G. T.; Hirata, J.; Terao, J. y Lin, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 206-209, 1998.
19. Chien, P. J.; Sheu, F.; Huang, W. T. y Su, M. S. *Food Chem.* 102: 1192-1198, 2007.
20. Sweetie, R. K.; Ramesh, C. y Sharma, A. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 39: 997-1003, 2004.
21. Kim, K. W. y Thomas, R. L. Antioxidative activity of chitosan with varying molecular weights. Department of Packaging Science, Clemson University [en línea]. Consultado abril 2014 en www.Aseafood.info/Articles/11017328.pdf.
22. Frankel, E. N. y Meyer, A. S. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1925-1941, 2000.