

INTERACCIÓN DE QUITOSANO CON ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Noelia L. Vanden Braber^{1†}, Nadia Z. Comba^{2§}, Virginia Gonzalez Estevez^{2‡}

Tutoras: María L. Boiero², Mariana A. Montenegro^{1,2}

E-mail: noeliavanden@gmail.com

¹ Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, UNVM, Campus Universitario Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba, Argentina. ² Departamento de Química. Universidad Tecnológica Nacional- Facultad Regional Villa María, Av. Universidad 450. Villa María. Córdoba. Argentina.

[†] Ingeniera en Tecnología de los Alimentos. [§] Alumna de Ingeniería Química. [‡] Alumna de Maestría en Tecnología de los Alimentos.

RESUMEN

El quitosano (Ch) es un polisacárido formado por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-D-glucosa. Constituye un derivado de la quitina, obtenido por deacetilación alcalina de la misma. Este polímero presenta funciones biológicas destacadas como actividad antimutagénica, antimicrobiana, antioxidante y acción inmuno estimulante. (Aranza y col., 2009).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad antioxidante de Ch frente a dos de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROS): el radical hidroxilo (\cdot OH) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estas especies radicalarias son fuente de numerosos perjuicios para el hombre, puesto que su inestabilidad y su rápida capacidad de reacción le otorgan un papel fisiológico importante en enfermedades como el cáncer, y en el detrimento de alimentos por la incesante degradación de sus nutrientes (Valko y col., 2007).

El estudio consistió en analizar la capacidad antioxidante de Ch con dos grados de deacetilación (GDA) diferentes (70% y 90%) frente a trolox (Tr), antioxidante de referencia. Los resultados obtenidos, expresados como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC), mostraron una importante actividad antioxidante del Ch frente a las EROS en estudio. A su vez, se pudo observar que el grado de deacetilación afecta dicha capacidad.

1. INTRODUCCIÓN

La formación de radicales libres de oxígeno es una consecuencia inevitable en organismos aeróbicos, con ellos se desencadenan una serie de reacciones difíciles de controlar que pueden derivar en enfermedades cardiovasculares, diabetes, entre otras.

La aplicación del Ch en la industria de los alimentos y la medicina ha demostrado numerosos beneficios, mejorando los efectos protectores contra infecciones asociadas a patógenos, presentando actividad antifúngica y antimicrobiana, jugando un rol importante en enfermedades como la artritis, el Alzheimer, el cáncer y las úlceras gástricas (Je y col., 2004).

El uso de este polisacárido como antioxidante está en creciente investigación, ya que es el segundo más abundante en la tierra después de la celulosa y no presenta toxicidad alguna.

1.1. Estructura Química del Quitosano

Como se ha mencionado anteriormente, el Ch constituye un derivado de la quitina, obtenido por deacetilación alcalina de la misma. Las estructuras químicas de ambos compuestos se muestran en la Figura 1.

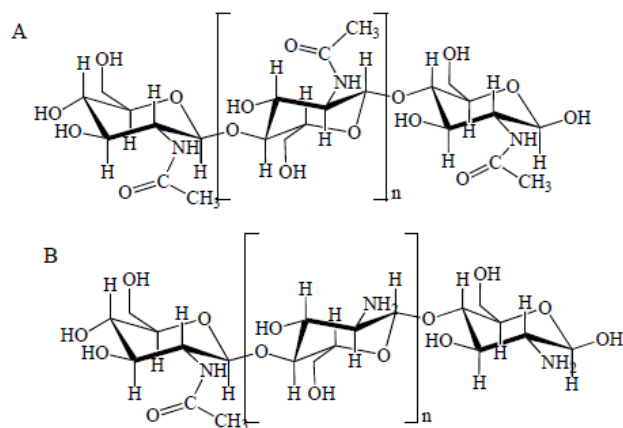


Figura 1. Quitina 100% acetilada (A). Quitosano (B).

La solubilidad de la quitina y sus derivados guarda una relación directa con la cantidad y la organización de los grupos acetamido ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$), ya que los hidrógenos de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) establecen puentes con el oxígeno de su grupo carbonilo, otorgando a la molécula una estructura semi-cristalina. La ubicación de estos grupos en la cadena da lugar a distintas variedades polimórficas (α , β y γ), la forma β presenta las cadenas alineadas en paralelo, estableciendo un mayor orden molecular y facilitando su manipulación (Pillai y col., 2009).

La solubilidad del Ch en medios acuosos es uno de los factores limitantes para su utilización, el GDA y el peso molecular son características muy importantes para mejorar dicho factor; se precisan condiciones ácidas para protonar los grupos ($-\text{NH}_2$) y otorgarle la posibilidad de formar puentes hidrógeno con el agua, logrando que se encuentre en solución; por esta razón, en determinadas circunstancias, se requiere de aplicar una hidrólisis enzimática o ácida como tratamiento previo a su agregado, ya que no todas las matrices son capaces de albergarlo en condiciones apropiadas de pH.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

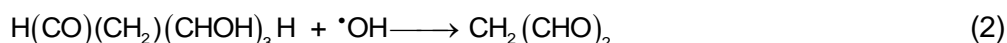
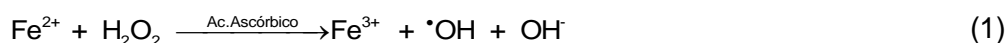
2.1. Reactivos

Los Ch de GDA 70% y 90%, Tr, clorhidrato de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 2-Desoxi-D-ribosa fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (MO). Mientras que FeCl_3 , H_2O_2 , KH_2PO_4 , ácido ascórbico, ácido tricloroacético (TCA) y clorhidrato de hidroxilamina, todos ellos de grado analítico, se obtuvieron de Biopack (Buenos Aires, Argentina). Los ácidos tiobarbitúrico (TBA) y etilendiaminotetraacético (EDTA), fueron provistos por Merck.

Las soluciones acuosas se prepararon con agua bidestilada.

2.2. Desactivación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$): Método de la Desoxirribosa

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se generó por la reacción de Fenton (Ec. 1) dando lugar a la formación de malonaldehído (MAD) por oxidación de la 2-Desoxi-D-ribosa (Ec. 2). El MAD en presencia de TBA forma un aducto ($\lambda_{\text{máx}}$: 532 nm) cuya inhibición se tradujo a comportamiento antioxidante de Ch (Ec. 3-4).



Procedimiento

En tubos de vidrio se colocó el volumen pertinente de cada reactivo en el orden establecido en la Tabla 1, expuesta a continuación. Una vez realizado el ensayo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 532 nm.

Tabla 1. Procedimiento radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

| Reactivo | Concentración (mM) | Volumen (μL) |
|--|--------------------|---------------------------|
| Buffer Fosfato pH 7,4 | 50 | 400 |
| 2-Desoxi-D-ribosa | 10 | 560 |
| H_2O_2 | 100 | 50 |
| FeCl_3 | 1 | 50 |
| EDTA | 5 | 40 |
| Agua Bidestilada/ Solución AOX. | - | 860 |
| Ácido Ascórbico | 5 | 40 |
| 1 hora a 37 °C 20 minutos en baño de agua hirviente | | |
| Ácido TBA | 1 % | 1000 |
| Ácido TCA | 2,8 % | 1000 |

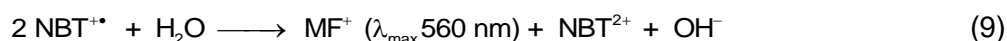
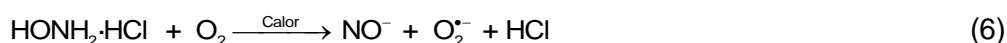
El % de desactivación (%D) del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) fue calculado de acuerdo a la Ec. 5,

$$\%D = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

Donde A_0 es el valor de absorbancia a la longitud de onda de cada experimento obtenida para la solución control sin Ch o el compuesto de referencia Tr, y A_x es el valor de absorbancia en presencia de estos compuestos.

2.3. Desactivación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) fue generado por la autooxidación del clorhidrato de hidroxilamina (Ec. 6), el estudio se basó en la inhibición de la formación de monoformazan (MF^+) ($\lambda_{\text{máx.}}$ 560 nm) por reducción del azul de nitrotetrazolium (NBT^{2+}) (Ec. 7-9).



Procedimiento

En tubos de vidrio se colocó el volumen pertinente de cada reactivo en el orden establecido en la Tabla 2, expuesta a continuación. Una vez realizado el ensayo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm.

Tabla 2. Procedimiento anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

| Reactivo | Concentración (mM) | Volumen (μ L) |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| Buffer Fosfato pH 8 | 50 | 500 |
| NBT | 1 | 360 |
| EDTA | 1 | 300 |
| Agua Bidestilada/ Solución AOX. | - | 400 |
| Clorhidrato de Hidroxilamina | 6 | 500 |

1 hora a 37 °C

El % de desactivación (%D) del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) fue calculado de acuerdo a la Ec. 5.

3. RESULTADOS

3.1. Radical Hidroxilo (\cdot OH)

La Figura 2 muestra el % D del radical \cdot OH por los Ch con GDA 70% y 90% y por Tr. En la misma se observa que Ch con GDA 90% presenta una mayor eficiencia de desactivación en todo el rango de concentraciones analizado.

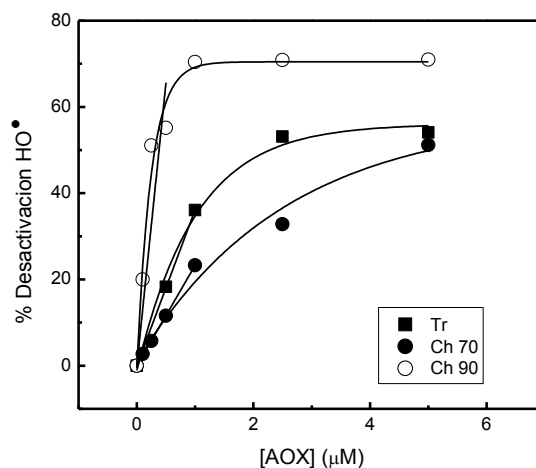


Figura 2. % Desactivación del radical hidroxilo (\cdot OH).

La actividad antioxidante de cada compuesto se expresa como la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) a partir de las pendientes iniciales del gráfico de % de desactivación (Figura 2), la misma fue calculada según la Ec. 10,

$$\text{TEAC} = \frac{m_x}{m_0} \quad (10)$$

Donde m_x corresponde la pendiente inicial de la curva de Ch y m_0 a la pendiente inicial de la curva de Tr.

Los valores de TEAC se presentan en la Tabla 3. Observándose que Ch con GDA 90% presenta una capacidad antioxidante cuatro veces mayor que la del antioxidante de referencia Tr. Mientras que Ch con GDA 70% presentó una actividad antioxidante frente a $\cdot\text{OH}$ equivalente al 60% de la presentada por Tr.

Tabla 3. TEAC para Ch con GDA 70% y 90%

| Ch | TEAC | |
|---------|------------------|-----------------------|
| | $\cdot\text{OH}$ | $\text{O}_2^{\cdot-}$ |
| 70% GDA | 0,65 | 0,50 |
| 90%GDA | 3,63 | 0,44 |

3.2. Anión Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

El % D del anión ($\text{O}_2^{\cdot-}$) por los Ch con GDA 70% y 90% y por Tr se presenta en la Figura 3. En la misma se observa que la reactividad frente a $\text{O}_2^{\cdot-}$ es fuertemente dependiente de la concentración de Ch siendo mayor a concentraciones superiores.

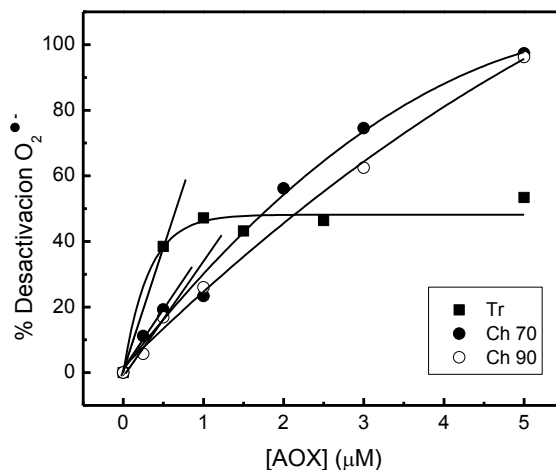


Figura 3. % Desactivación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

Como en el caso del $\cdot\text{OH}$ la capacidad antioxidante de los compuestos estudiados fue expresada por el valor de TEAC (Tabla 3), calculados a partir de las pendientes iniciales de las curvas mostradas en la Figura 3 de acuerdo a la Ec. 10.

Se observa que por debajo de 1,5 μM , la actividad antioxidante de ambos Ch es inferior a la del Tr. Mientras que por encima de esta concentración, el %D de ambos Ch supera al del Tr, siendo mayor el del Ch con un 70% de deacetilación.

4. Conclusiones

Según Kim y Thomas (2007) la presencia de los grupos -NH_2 está intrínsecamente ligada a la actividad antioxidante del Ch, la disponibilidad de un par de electrones libres en este grupo funcional da lugar a la captación de protones H^+ desde el medio, los mismos posteriormente serán cedidos a los radicales libres que forman parte de la cadena de reacciones que constituyen la degradación oxidativa, formando moléculas más estables y evitando la concreción de dicho fenómeno. En el Ch de elevado peso molecular, la actividad antioxidante se relaciona, de manera más representativa, a un efecto quelante de metales pro-oxidantes. De este modo, puede considerarse que el Ch puede actuar como antioxidante tipo I y tipo II, respectivamente.

Se puede concluir que para la desactivación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) el grado de deacetilación de la molécula de Ch juega un rol protagonista, desactivando en mayor proporción aquél que se encuentra con una mayor disponibilidad de grupos -NH_2 (Ch con un 90% de deacetilación).

En el caso del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), los resultados presentan una mayor complejidad. Según los valores de TEAC a los que se arribó, la capacidad antioxidante de cada Ch, por debajo de una concentración de $1,5 \mu\text{M}$, no presenta diferencia notable y muestran, ambos, una capacidad antioxidante inferior a la del Tr. Por encima de dicha concentración, ambos Ch desactivan más que el antioxidante de referencia, pero el Ch con un 70% de deacetilación presenta un %D mayor para todas las restantes concentraciones. Se concluye para este caso, que aquello que marca una exclusiva importancia en la desactivación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) es la concentración en la que se encuentre el antioxidante en estudio.

5. REFERENCIAS

- 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: 203-230.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Cronin, M.T.D.; Mazura, M.; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.
- Je, J. Y.; Park, P. J.; Kim, S. K. (2004). Free radical scavenging properties of heterochitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 381-387.
- 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.
- Kim, K. W.; Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101: 308-313.