

## Uso de biopolímeros naturales para la formación de geles por complejos polielectrolíticos

Adriana Marisol Rangel Rodríguez MC<sup>1,2</sup>, Dra. Liliana Licea Jiménez<sup>1</sup>, Dr. Sergio Gabriel Flores Gallardo<sup>1</sup>, Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel<sup>2</sup>.

**Resumen**— Esta investigación presenta la formación de geles por complejos polielectrolíticos (CPE) utilizando biopolímeros mediante tecnología enzimática. Actualmente el uso de biopolímeros en el área médica ha aumentado debido a sus características de biodegradabilidad y biocompatibilidad, además de que presentan baja toxicidad. Para el desarrollo de la investigación se utilizaron quitosán soluble en agua, pectina y pectin metil esterasa (PME). La formación del gel fue evaluado mediante parámetros reológicos, mientras que la caracterización del CPE se realizó mediante infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). Los resultados mostraron que al utilizar una pectina de bajo metoxilo se formó un precipitado, mientras que al utilizar la de alto metoxilo permitió la formación de gel. De acuerdo a los parámetros reológicos el tiempo de gelificación aproximado del sistema se presentó a los 6.1 min. Mientras que en el FTIR nos permitió mediante las señales evidenciar la interacción de estos materiales. Por lo que de acuerdo a lo anterior se concluye que la dependencia en la formación del gel se debe al grado de esterificación de la pectina.

**Palabras clave**—pectin esterasa, quitosano, gel.

### Introducción

En la ciencia de los materiales se buscan sistemas que cumplan con las necesidades de aplicación en el área médica. Dentro del vasto mundo de materiales se emplean algunos polisacáridos como biopolímeros. El quitosán es un polisacárido químicamente lineal compuesto por unidades de D-glucosamina unidos por enlace  $\beta(1\rightarrow4)$ . Este material es obtenido por la desacetilación de la quitina y es soluble en soluciones ácidas. El quitosán tiene grupos amino libres con alta densidad de carga que le confieren una naturaleza catiónica. El quitosán soluble en agua (QSA) es obtenido por la despolimerización del quitosán, es biodegradable, mucoadhesivo, antimicrobiano, antitumoral y antioxidante (Kim y Rjapakse 2005). Este material ha sido utilizado en la formación de CPE con carboximetilcelulosa (Ichikawa et al. 2005), alginato (Barkowiak y Hunkeler, 1999 y 2000), pectina (Rangel Rodríguez 2008) y heparina (William et al. 2006).

La pectina es un biopolímero aniónico localizado en la laminilla media de la pared celular de tejidos vegetales. Químicamente la unidad estructural es el ácido galacturónico, además de contener inserciones de azúcares neutros (ramnosa, xilosa, piosa, fucosa y otros). Las pectinas pueden ser de alto o bajo metoxilo (mayor o menor al 50 %, respectivamente) (Nordby et al. 2003). Debido a los grupos carboxilo libres que presente, puede formar complejos polielectrolíticos con compuestos catiónicos. La pectina tiene aplicaciones en el área de alimentos (confitería y lácteos) y farmacéutica. Una de las enzimas que actúan sobre la molécula de pectina es la PME, hidrolasa que actúa desesterificando la molécula de la pectina generando así pectinas de bajo metoxilo (Levertu et al 2006). La formación de estos CPE depende de la naturaleza del polímero, peso molecular, densidad de carga y temperatura (Mortimer 1991 y Butlerr et al 2006).

Los complejos polielectrolíticos entre pectina y quitosán han sido evaluados para la formación de geles (Marudova 2004), micropartículas y laminillas. En estas investigaciones se ha utilizado quitosán de alto peso molecular, sin embargo debido a sus características de solubilidad disminuye su campo de aplicación. El alcance de esta investigación radica en el desarrollo de un sistema mediante tecnología enzimática utilizando quitosán soluble en agua y pectina, para su posterior evaluación como una opción en el área médica y agrícola.

---

<sup>1</sup> Adriana Marisol Rangel Rodríguez es estudiante del programa de Doctorado en Materiales del Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Apodaca, Nuevo León. [adriana.rangel@cimav.edu.mx](mailto:adriana.rangel@cimav.edu.mx)

<sup>1</sup> La Dra. Liliana Licea Jimenez es Doctor Investigador del Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Apodaca, Nuevo León. [liliana.licea@cimav.edu.mx](mailto:liliana.licea@cimav.edu.mx)

<sup>1</sup> El Dr. Sergio Gabriel Flores Gallardo es Doctor Investigador del Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Chihuahua, Chihuahua. [sergio.flores@cimav.edu.mx](mailto:sergio.flores@cimav.edu.mx)

<sup>2</sup> El Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel es Doctor Investigador, CEO, de Coyotefoods Biopolymer and Biotechnology, SRL de MI. Saltillo, Coahuila. [covotefoods@hotmail.com](mailto:covotefoods@hotmail.com)

## Descripción del Método

### *Formación de CPE*

El quitosán soluble en agua de 20 kDa (2% p/v) fue preparado en agua destilada. La pectina fue preparada (2 % p/v) en buffer de ácido acético acetato de sodio 10 mM (pH 5.0). El quitosán y la pectina fueron mezclados (1:1) mediante agitación manual, posteriormente se adicionó la pectin metil esterasa (6  $\mu$ L). Las soluciones fueron homogenizadas e incubadas por 2 h a 37°C.

### *Análisis reológico*

Para el análisis reológico fue considerada la pectina de alto metoxilo, la cual formó un gel con el QSA y la PME. La evaluación reológica fue llevada a cabo en un reómetro de esfuerzos controlados (Rheology Instruments, AR2000, New Castle, Delaware, USA). La geometría utilizada fue plato-plato (60 mm diámetro, 1 mm gap). Los parámetros a evaluar fueron: el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ) y la relación  $G''/G'$  conocida como  $\tan \delta$ . Los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ) fueron analizados durante 1 h a 37°C, con una frecuencia de oscilación a 1 rad/s, controlando la torca 10  $\mu$ N/m. Posteriormente fue llevado a cabo el barrido de frecuencia 0.1-100 rad/s a 37°C controlando manualmente la torca aplicada. La región viscoelástica lineal fue evaluada mediante barrido de esfuerzos a frecuencia constante de 6.284 rad/s y con una torca de 10-1000  $\mu$ N/m. Las muestras fueron llevadas a liofilización y posteriormente fueron analizadas mediante infrarrojo por transformadas de Fourier.

### *Infrarrojo por transformadas de Fourier*

Las muestras en polvo (previamente liofilizadas) fueron analizadas mediante infrarrojo por transformadas de Fourier (Thermo Electron Corporation, Nicolet 6700, Newcastle, Delaware, USA) utilizando un reflector goldengate atenuado mediante accesorio de reflectancia total (ATR). Los espectros fueron obtenidos a una resolución de 4.0  $\text{cm}^{-1}$  con 40 barridos. Las lecturas espectroscópicas fueron realizadas a una resolución de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros fueron corregidos a línea base y normalizados a absorbancia de 1.

## Comentarios Finales

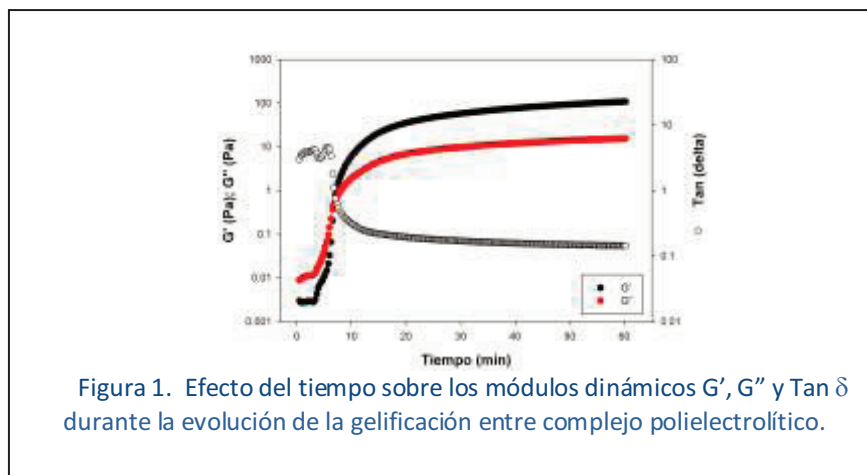
### *Resumen de resultados*

La formación de geles por CPE se evaluó utilizando pectina (alto y bajo metoxilo) y QSA mediante tecnología enzimática. Los resultados mostraron que al utilizar la pectina de bajo metoxilo y QSA se presenta la formación de un precipitado, esto sin la adición de la PME. Lo anterior se manifiesta, dado que la cantidad de los grupos carboxilo libres presentes en la pectina de bajo metoxilo es alta, la cual fue necesaria para llevar a cabo la formación de un CPE en donde los polianiones se encuentran disponibles en solución para interactuar entre ellos. Por tal razón, la pectina de bajo metoxilo se descartó para la formación del gel por tecnología enzimática. Al utilizar la pectina de alto metoxilo se observó ausencia de la formación de CPE. La adición de la PME a la solución generó grupos carboxilo libres de manera aleatoria en la pectina conforme incrementaba el tiempo de reacción. Lo anterior permite la interacción de los grupos carboxilo libres con los amino protonados del QSA, permitiendo la formación de un CPE ordenado que conlleva a la formación del gel.

El análisis de reología nos permitió evaluar el comportamiento de la formación del gel. El tiempo de gelificación fue determinado a lo reportado por Kumar et al. (2000), en donde se consideró  $G'=G''$  o  $\tan \delta=1$ . En la Figura 1 muestra que el módulo de  $G''$  presenta un valor mayor, indicando el estado líquido del sistema. Mientras conforme incrementa el tiempo existe un cruce entre el módulo viscoso ( $G''$ ) y el módulo de almacenamiento ( $G'$ ). El tiempo aproximado de inicio de la gelificación del material fue a los 6.1 min después de la adición de la enzima. Sin embargo cabe mencionar que posteriormente se realizaran más estudios para determinar el punto de gelación a evaluando diversas frecuencias. Los módulos de  $G'$  y  $G''$  incrementan exponencialmente acercándose al estado estacionario a los 60 min, mientras que la  $\tan \delta$  disminuye conforme incrementa el tiempo de oscilación ( $\tan \delta \sim 0.15$ ). En literatura, se reporta la formación de gel con quitosán de alto peso molecular con gelatina utilizando la transglutaminasa, los tiempos de gelificación reportados va de los 20 min a 1.5 h (Chen et al. 2008). En el presente trabajo de investigación los tiempos de gelificación son menores. Muradova et al. (2004) han reportado la formación

de gel entre pectina y quitosán, en dichos sistemas se considera la adición de NaCl. La adición de sales impide la interacción entre los grupos ionizados de los biopolímeros.

Hasta donde sabemos, en la literatura actualmente no existen reportes relacionados con la formación de geles por CPE utilizando quitosán soluble en agua mediante tecnología enzimática. El desarrollo de este sistema nos permitió obtener estructuras ordenadas utilizando tecnología enzimática y biopolímeros. Las ventajas de este sistema es que no se utilizan sales para llevar a cabo la formación de un sistema gelificado con la pectina y el quitosán soluble en agua, además de la disminución de los tiempos de gelificación.



La evidencia de la formación de CPE para la formación del gel se evaluó mediante infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). En la Figura 2 se muestran los espectros FTIR de los polisacáridos utilizados y la formación del CPE. La región de  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  es la zona característica de los carbohidratos, las cuales se encuentran presentes en la pectina y el quitosán soluble en agua. La pectina (Figura 2-A) muestra la región de los grupos carboxilo libres ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) y carboxilo metoxilados ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ). Mientras que la Figura 2-B muestra al quitosán soluble en agua, observando la región de los grupos amida I ( $1610\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1315\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$ ) y los grupos amino protonados ( $1520\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ ). En la formación gel por CPE en la región de ( $1500\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ ) se observa un ensanchamiento por interacción polielectrolítica entre los biopolímeros debido a interacción entre los grupos  $\text{NH}_3^+$  del quitosán y los grupos  $\text{COO}^-$  de la pectina cítrica. La ausencia del pico a  $1730\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos carboxilo metoxilados que fueron modificados por la acción de la PME. En la región de  $1637\text{ cm}^{-1}$  se presentó una disminución atribuido a la interacción entre los grupos amino con el biopolímero catiónico (Bigucci et al. 2008).

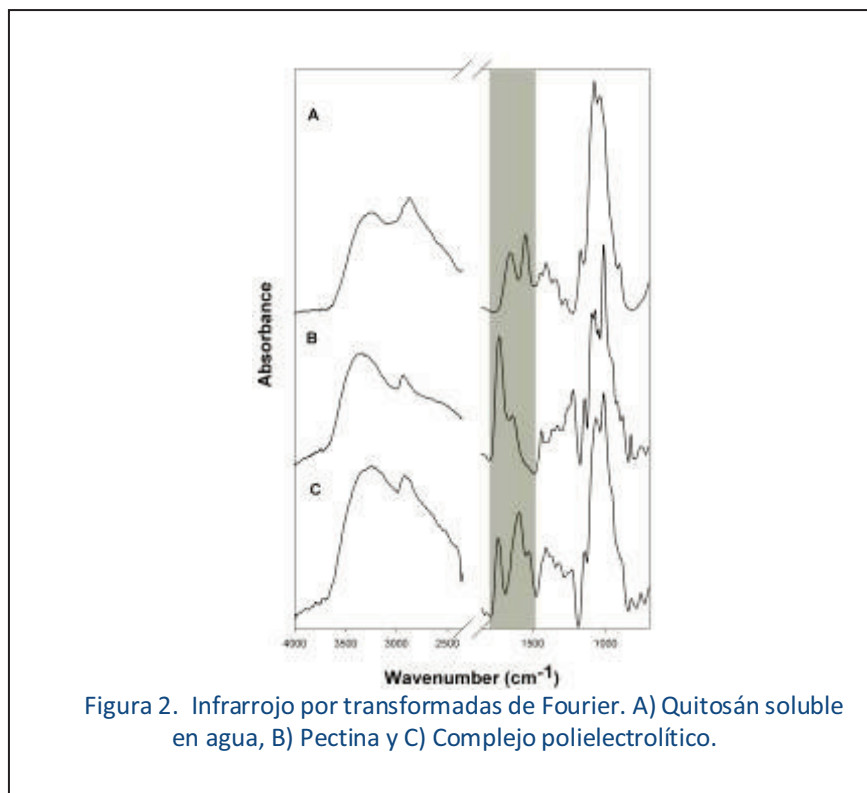


Figura 2. Infrarrojo por transformadas de Fourier. A) Quitosán soluble en agua, B) Pectina y C) Complejo polielectrolítico.

### Conclusiones

En este trabajo de investigación se evaluó la formación del gel por CPE mediante tecnología enzimática. Los resultados mostraron que al utilizar una pectina de bajo metoxilo sin la adición de la PME dio lugar a la formación de CPE como precipitado. Por lo que la pectina es un factor determinante para la formación del gel por tecnología enzimática. El tiempo de gelificación obtenidos disminuyen hasta en un 70-90% comparados con los reportados en literatura. El uso del quitosán soluble en agua incrementa el campo de aplicación. El gel obtenido formado con biopolímeros tiene potencial para ser utilizado como soporte de crecimiento celular, nutriente vegetal y aplicarlo en el área médica y agrícola.

### Recomendaciones

Esta investigación permitió la formación de CPE en forma ordenada, por lo que se recomienda evaluar este sistema en el área médica. Lo anterior para ser utilizado en el área médica y agrícola, dadas las características de estos materiales: biodegradabilidad y biocompatibilidad.

### Referencias

- Barkowiak, A. y Hunkeler D. "Alginate-oligochitosan Microcapsules: a mechanistic study relating membrane and capsule properties to reaction conditions," *Chemical Materials*, Vol. 11, No. 9, 1999.
- Bigucci, F., Luppi, B., Sorrenti, M., Bettinetti, G., Rodríguez, L. y Zecchi, V. "Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 35, No. 5, 2008.
- Barkowiak, A. y Hunkeler, D. "Alginate-oligochitosan microcapsules II control and permeability of the membrane", *Chemical Materials*, Vol. 12, No. 1, 2000.
- Butler, M.F., Clark, A.H. y Adams, S. "Swelling and mechanical properties of biopolymer hydrogels containing chitosan and bovine serum albumin", *Biomacromolecules*, Vol. 7, No. 11, 2006.
- Ichikawa, S., Iwamoto, S. y Watanabe, J. "Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose", *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*, Vol. 69, No. 9, 2005.

- Kim, S.K. y Rajapakse, N. "Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A Review", *Carbohydrate polymers*, Vol. 62, No. 4, 2005.
- Kumar, G., Bristow, J.F., Smith, P.J., Payne, G.F. "Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan", *Polymer*, Vol. 41, No. 6, 2000.
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N. y Buschmann, M.D. "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree deacetylation", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 27, 2006.
- Marudova, M., MacDougall, A. y Ring, S.G. "Pectin-chitosan interactions and gel formation", *Carbohydrate Research*, Vol.339, No. X, 2004.
- Mortimer, D. "Synthetic polyelectrolyte- A Review", *Polymer*, p-29, 1991.
- Nordby, M.H., Kjoniksen, A.L., Nystrom, B. y Roots, J. "Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan", *Rheology, biomacromolecules*, Vol. 4, No. 2, 2003.
- Rangel-Rodríguez, A.M. (Dic 2008) "Water soluble chitosan applications and anionic polymers on the formation complex polyelectrolyte, gels and microspheres (in Spanish), M.Sc. Thesis", Laboratory of Applied Glycobiology, Food Research Department. School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo City, Coahuila State, Mexico.
- William, G.T., Knox, J.P. y Delgaard Mikkelsen, J.D. "Pectin: new insights into an old polymer and starting to gel", *Trends in Foods Science & Technology*, Vol. 17, No. 3, 2006.

### Notas Biográficas

La **MC Adriana Marisol Rangel Rodríguez** es actualmente estudiante de Doctorado de Ciencia de los Materiales en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Unidad Monterrey. Es Químico Farmacobiólogo obtuvo el grado en el 2006 y en el 2008 obtuvo recibió el título de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. Además, participa como investigador asociado en la empresa Coyotefoods Biopolymer and Biotechnology. Ha participado en el asesoramiento a estudiantes de licenciatura, ponencias en congresos nacionales e internacionales.

La **Dra. Liliana Licea** es Directora e Investigadora del Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Unidad Monterrey. Recibió su grado de Maestría en el 2003 en Ciencias de los Materiales otorgada por el centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Querétaro. En el 2007, obtuvo el grado de Doctor lo obtuvo por el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería de la Universidad de Chalmers en Gotemburgo, Suecia. Su investigación se enfoca al área de nanocompuestos de base polimérica, nanomateriales funcionales y nanoestructuras, entre otras. La Dra. Licea ha sido autor y coautor de más de 15 artículos en revistas internacionales, más de 45 ponencias en congresos nacionales e internacionales, ha supervisado estudiantes de Licenciatura, Maestría y Doctorado. Dentro de su participación en vinculación con el sector industrial ha sido líder y ha participado en más de 15 proyectos dentro su área de experiencia sobre temas de innovación en materiales nanocompuestos

El **Dr. Sergio G. Flores Gallardo** es profesor Investigador titular A en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados. En 2002 obtuvo su grado de Doctorado en Polímeros por el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), en Saltillo Coahuila. Su investigación está enfocada al área de reología y procesamiento de polímeros y materiales compuestos y ha publicado 15 artículos en revistas internacionales, 8 patentes nacionales e internacionales, más de 50 ponencias en congresos nacionales e internacionales, ha graduado un total de 13 estudiantes de Licenciatura, Maestría y Doctorado. Perteneció al sistema nacional de investigadores Nivel I y participa constantemente siendo líder en proyectos de investigación básica y aplicada con el sector industrial.

El **Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel** es profesor Investigador de tiempo completo del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila y Gerente-Fundador de la empresa biotecnológica Coyotefoods Biopolymer and Biotechnology. En 1995 obtuvo su grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Chihuahua. El grado de Doctor lo obtuvo en el 2003 en la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Es miembro nacional de investigadores Nivel I y participa en la formación de estudiantes de Licenciatura, Maestría y Doctorado. Participa en líder de proyectos de investigación, vinculación con el sector industrial y en ponencias en congresos nacionales e internacionales.