

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición, Bromatología y  
Tecnología de los Alimentos**



**TESIS DOCTORAL**

**Obtención y caracterización de quitosanos modificados:  
ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y  
biológicas en la industria alimentaria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Ángeles López Mengíbar

Directoras

Ángeles María Heras Caballero  
M<sup>a</sup> Ángeles Beatriz Miralles Buraglia  
Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANOS  
MODIFICADOS. INGREDIENTES FUNCIONALES CON  
APLICACIONES TECNOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS EN  
LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

MEMORIA PRESENTADA POR:

**M<sup>a</sup> Angeles López Mengíbar**

**Para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

DIRECTORAS:

Ángeles María Heras Caballero

M<sup>a</sup>Ángeles Beatriz Miralles Buraglia

Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel

Madrid, 2011







Dra. Ángeles Heras Caballero, Profesora Titular ( Acreditada CU ) del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, miembro del Instituto de Estudios Biofuncionales y directora responsable del grupo 920071-UCM “Investigaciones en el sistema quitina/quitosano”.

Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Beatriz Miralles Buraglia, Titulada Superior Especializada del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM).

Dra. Inmaculada Mateos-Aparicio Cediél, investigadora contratada con cargo a Proyecto y miembro del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. M<sup>a</sup> Angeles López Mengíbar ha realizado la labor investigadora correspondiente a la Tesis Doctoral titulada “**Obtención y caracterización de quitosanos modificados. Ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria**” bajo su dirección en el Instituto de Estudios Biofuncionales y el Dpto. Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la UCM, reuniendo los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Concluído el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente nombrado a tal efecto.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente en

Madrid, 15 de Junio de 2011

Dra. Ángeles Heras Caballero

Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Beatriz Miralles  
Buraglia

Dra. Inmaculada Mateos-Aparicio  
Cediél





Don José González Jiménez, Director del Instituto de Estudios Biofuncionales y Profesor Titular del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación titulado “**Obtención y caracterización de quitosanos modificados. Ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria**” se ha realizado en este Instituto bajo la dirección de las doctoras Ángeles Heras Caballero, M<sup>a</sup>Ángeles Beatriz Miralles Buraglia e Inmaculada Mateos-Aparacicio Cediell y constituye la memoria que presenta M<sup>a</sup> Angeles López Mengíbar para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid, 15 de Junio de 2011

Dr. José González Jiménez



## **Agradecimientos**

En primer lugar, mis agradecimientos van dirigidos a mis directoras de Tesis, las Dras. Ángeles Heras Caballero, Beatriz Miralles Buraglia e Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel. Gracias Ángeles por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu grupo y por haberme apoyado, animado y haber defendido mi esfuerzo y trabajo en todo momento. Gracias Beatriz e Inmaculada, mis guías científicas que me han ayudado enormemente mano a mano en el laboratorio para formarme y poder llegar hasta aquí. A Beatriz, agradecerle que me hiciera formar parte de esta línea de investigación en la que empezó ella sola y en la que permanece ayudándome y animándome duramente día a día, aún estando en otro centro de investigación. A Inmaculada agradecerle la total dedicación y esfuerzo que me ha brindado para sacar aún más provecho de este trabajo de investigación.

En segundo lugar, agradezco a todas las instituciones que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis doctoral. Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de la beca FPU. Mi agradecimiento al Instituto de Estudios Biofuncionales y al Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia. A la Red Alfa II 0259 de la Unión Europea (Programa de intercambio entre universidades de la Unión Europea y Latinoamérica) por la concesión de una beca para el curso “Biopolymers in Materials and Life Sciences”. Gracias al National Science Council of Taiwan (NSC) por la concesión de una beca para realizar una estancia en la National Taiwan Ocean University. No olvido, el expresar mi agradecimiento a los grupos de investigación con los que se ha colaborado para el desarrollo de este trabajo de Tesis: al grupo del Prof. Alain Domard y posteriormente al Prof. Laurent David de la Universidad de Lyon, al grupo del prof. M.G. Peter de la Universidad de Postdam, al grupo del Prof. Stephen Harding de la Universidad de Nottingham, al grupo del Prof. Rong Huei Chen de la Universidad de Taipei y al grupo del Prof. R.A Rastall de la Universidad de Reading. Gracias también al Dr. Francisco Goycoolea y al Dr. Carlos Peniche cuyos sabios consejos han ayudado al desarrollo de este trabajo.

El desarrollo de esta Tesis en el Instituto de Estudios Biofuncionales me ha brindado además la oportunidad de conocer excelentes compañeros y muchos de ellos amigos, que me han ayudado día a día a que este trabajo diera lugar a su fruto y sobretodo y muy

importante a ser más feliz. Gracias a las que ya se fueron, Gemma , Inma, Inés y Niuris que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme en mis comienzos. Gracias a las que pasaron después, Eva y Elena. Gracias Ruthy, mi gran amiga y a la que siempre busco por sus consejos y admirable autocontrol. Gracias Carol, porque fuiste la primera y siempre hemos caminado juntas en ésto, con esos primeros viajes que nos unieron tanto. Gracias Ana, mi niña y mi compañera de escapadas, que siempre me haces ver todo lo positivo y me llenas de felicidad. Gracias Sofri, por compartir tanto conmigo y por todo lo que me has enseñado de la vida y de la ciencia, gracias a tí he conseguido acabar esto. Gracias Susi, “la supertécnico” que siempre puede con todo. Gracias Lauri, que siempre alegras los días de trabajo en el sotanillo. Gracias Albuchi, Rodri, Ander, “Lauras” y Patxy que ahora también contribuis a esa alegría. Gracias José Luis y Vivi por vuestros consejos, ser uno más de nosotros y por vuestra espiritualidad. También agradezco al resto de compañeros del Instituto y al CAI de RMN no sólo por su admirable trabajo y su ayuda en la resonancia. En especial gracias Marién con estos últimos experimentos con los que te he vuelto loca, también a David y Palmira por los buenos momentos que pasamos en el centro.

Y por último el agradecimiento más grande a mi familia, a mis padres y hermano que siempre están dándolo todo por mí, y a pesar de que dicen que a los amigos los eliges y la familia es la que te toca, a mí es la mejor que me podía haber tocado jamás. Gracias mamá y papá por dejaros la piel para que haya podido llegar hasta aquí, gracias mi Nano porque eres el más grande y por animarme siempre con todo y no olvidarme de “la niña Ascen” por supuesto. Gracias Enrique porque a pesar de todo siempre estás ahí y me aconsejas sabiamente. Gracias Parri por todo tu apoyo y esas risas y momentos que me han dado el empujón en los últimos tiempos. Y gracias a todos mis amigos que sin comprender muchos de ellos lo que estoy haciendo siempre me han apoyado y me han escuchado: Jero, Juli, Lina, Esteban, Raquel, Laura, Joaquin, Miguel, Ricky, Alfredo... y muchos más que han contribuido casi sin saberlo ayudándome a seguir mi camino. Gracias por todas esas risas y momentos felices que me aportais.

Sin todos vosotros ésto no hubiera sido posible. GRACIAS.

Esta memoria de **Tesis Doctoral** se ha llevado a cabo en el Instituto de Estudios Biofuncionales, en el grupo de investigación de la UCM 920071 “ Investigaciones en el sistema quitina/quitosano”. Ha estado financiada por una beca pre-doctoral de **Formación de Profesorado Universitario (FPU)** concedida por el **Ministerio de Educación y Ciencia en la convocatoria de 2007**.

**Este periodo queda reflejado en mi CV en lo siguiente:**

**Publicaciones:**

**M. Mengíbar**, B. Miralles, A. Santiago, I. Paños, A. Heras. Caracterización de conjugados formados entre quitosano y  $\beta$ -lactoglobulina mediante reacción de Maillard. *Alimentaria*, 372, 120-121 (2006).

B. Miralles, N. Acosta, **M.A López- Mengíbar**, A. Heras. Chitosan en complementos dietéticos: influencia de sus características químico-físicas en sus propiedades. *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria*, 26, 33-34 (2006).

B. Miralles, G. Galed, **M. Mengíbar**, A. Heras. Effect of dry heat on some physical and chemical properties of chitosan. *Advances in Chitin Science IX*, 70-77 (2007). Eds. A. Domard, E. Guibal, K. Varum. Montpellier, Francia.

**M. Mengíbar**, B. Miralles, A. Heras. Characterization of the products formed during the dry heating of chitosan. *Advances in Chitin Science X*, 44-48 (2007). Eds: S. Senel, K.M. Varum, M.M Summu, A.A. Hincal. Ankara, Turquía

David Castejón, Palmira Villa, Beatriz Miralles, **Marian Mengíbar**, Antonio Herrera. Aplicación de la resonancia magnética nuclear de alta resolución con ángulo mágico (HRMAS) en el estudio de la maduración del queso. *Alimentaria*, 395, 93-94 (2008).

Inmaculada Aranaz, **Marian Mengíbar**, Ruth Harris, Inés Paños, Beatriz Miralles, Niuris Acosta, Gemma Galed, Ángeles Heras. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203-230 (2009).

Beatriz Miralles, **Marian Mengíbar**, Ruth Harris, Angeles Heras. Suitability of a colorimetric method for the selective determination of chitosan in dietary supplements. *Food Chemistry*, 126, (4), 1836-1839 (2011).

**M. Mengíbar**, M. Ganan, B. Miralles, A.V. Carrascosa, A.J. Martínez-Rodríguez, M.G. Peter, A. Heras. Antimicrobial Activity of Chitosan Oligosaccharides (COS) against *Campylobacter Jejuni*. *Carbohydrate Polymers*, 84, (2), 844-848(2011).

R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, **M. Mengíbar**, A. Heras. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants and their application in cosmetics. *Carbohydrate Polymers*, 84, (2), 803-806 (2011).

L. Calderón, R. Harris, E. Lecumberri, N. Acosta, **M. Mengíbar**, A. Heras. Properties of chitosan as a Marine Cosmeceutical. Eds. Taylor and Francis Publisher. *Marine Cosmeceuticals: Latest Trends and Prospects*. Chapter 3.

#### **Contribuciones a congresos internacionales:**

B. Miralles, G. Galed, **M. Mengíbar**, A. Heras. Effect of dry heat on some physical and chemical properties of chitosan. 10<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. The European Chitin Society. Montpellier (Francia) (2006). Comunicación oral.

G. Galed, B. Miralles, **M. Mengíbar**, A. Heras. Characterization of chitosan heterooligosaccharides fractions obtained by enzymatic depolymerization. 10<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. The European Chitin Society. Montpellier (Francia) (2006). Póster.

I. Paños, I. Aranaz, **M. Mengíbar**, N. Acosta, A. Heras. Comparison of two kinds of chitosan microparticulate systems for controlled delivery of an antidepressant agent. XXVII Congreso Latinoamericano de Química y VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. Sociedad Cubana de Química. La Habana (Cuba) (2006). Póster.

**M. Mengíbar**, B. Miralles, A. Heras. Assessment of the quantitative determination of chitosan by a colorimetric method. IV Simposio Iberoamericano de Quitina. Sociedad Iberoamericana de Quitina. Natal (Brasil) (2007). Póster.

**M. Mengíbar**, A. Heras, B. Miralles. Characterization of the products formed during the dry heating of chitosan. 8th International Conference of The European Chitin Society. The European Chitin Society. Antalya (Turquía) (2007). Póster.

**M. Mengíbar**, B. Miralles, A. Heras. Influence of different chitosan on functional chitosan-protein conjugates. Euro Food Chem XV. Copenhagen (2009). Póster.

**M. Mengíbar**, M. Ganan, B. Miralles, A.V. Carrascosa, A.J. Martínez-Rodríguez, A. Heras. Antimicrobial activity of chitosan oligosaccharides (COS) against *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*). 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. Taipei (Taiwan) (2009). Póster.

R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, **M. Mengíbar**, A. Heras. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants and their application in cosmetics. 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. Taipei (Taiwan)(2009). Póster.

Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., **Mengíbar, M.**, Heras, A. Chitosan and co-passengers. Functional applications. Proceedings of 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. Taipei (Taiwan) (2009). Keynote Lecture.

B. Miralles, **M. Mengíbar**, A. Heras. Conjugados funcionales proteína-chitosano: Influencia de las características del quitosano. V Simposio Iberoamericano de Quitina. Sociedad Iberoamericana de Quitina. Santiago de Chile (Chile) (2010). Comunicación oral.

**M. Mengíbar**, I. Mateos-Aparicio, B. Miralles, S. Tejero, A. Costabile, S. Kolida, R. Rastall, A. Heras. Chito-oligosaccharides (COS) functionality: Antimicrobial activity and antioxidant capacity *in vitro*. 10<sup>th</sup> International Conference of The European Chitin Society. The European Chitin Society. San Petesburgo (Rusia) (2011). Póster.

Mateos-Aparicio, I, **Mengíbar, M**, Iglesias, S, Kolida, S, Rastall, R, Heras, A. Chitosan derivatives, prebiotics? Euro Food Chem XVI. Gdańsk, (Poland) (2011). Póster.

### **Contribuciones a congresos nacionales:**

**M. Mengíbar**, B. Miralles, A. Santiago, I. Paños, A. Heras. Caracterización de conjugados formados entre quitosano y  $\alpha$ -lactoglobulina mediante reacción de Maillard. Cytalia XI: Congreso anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Asociación Española de Licenciados y Doctores en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Alcyta: Madrid (España) (2006). Comunicación oral.

B. Miralles, **M. Mengíbar**, N. Acosta, A. Heras. Chitosan en complementos dietéticos: influencia de sus características químico-físicas en sus propiedades. II Simposio Internacional de “Alimentos Funcionales”. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. (Comunidad de Madrid). Las Rozas de Madrid (España) (2006). Póster.

David Castejón, Palmira Villa, Beatriz Miralles, **Marian Mengíbar**, Antonio Herrera. Aplicación de la resonancia magnética nuclear de alta resolución con ángulo mágico (HRMAS) en el estudio de la maduración del queso. Cytalia XIII: Congreso anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Asociación Española de Licenciados y Doctores en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Alcyta: Madrid (España) (2008). Comunicación oral.

### **Actividades de transferencia de tecnología:**

Participación en el contrato art. 83 con ADVANCELL S.L, “Determinación de peso molecular de diversas muestras de polímero”. Año 2008. Investigadores Responsables: Dra. Beatriz Miralles/ Dra. Angeles Heras.

Integrante del equipo promotor de la empresa de base tecnológica (E.B.T.) InFiQuS, S.L. Año 2009.

Premio Accesit a la **empresa de base tecnológica (E.B.T.) InFiQus S.L** en la modalidad de Plan de Empresa patrocinado por la UCM y el Parque Científico de Madrid. 2009

### **Participación en Proyectos de Investigación:**

Quitosanos específicos: obtención, caracterización y aplicaciones. MAT 2004-03982. Plan Nacional de I+D. Ministerio de Educación y Ciencia. 2004–2007. Investigadora principal: Begoña Elorza.

Desarrollo de aplicaciones industriales de quitosanos específicos. MAT 2007-63757. Plan Nacional de I+D. Ministerio de Educación y Ciencia. 2007–2010. Investigadora principal: Angeles Heras Caballero.

Aprovechamiento energético de la biomasa del cardo y valorización de subproductos. P2009/ENE-1660. Comunidad de Madrid. 2010-2013. Investigadora principal: Prof. Ángeles Heras Caballero.

Quitosano: biopolímero creador de sinergias y funcionalidad. MAT 2010-21621 C02-01 Plan Nacional de I+D. Ministerio de Educación y Ciencia. 2010–2014. Investigadora principal: Ángeles Heras Caballero.

### **Estancias en centros extranjeros:**

University Claude Bernard Lyon I . Laboratoy of Polymer Materials and Biomaterials. Characterization of chitosan-protein conjugates formed by Maillard reaction. Lyon (Francia). 2 meses 2007.2 semanas 2011.

National Centre for Macromolecular Hydrodynamics. School of Biosciences. Faculty of Science. Universidad de Nottingham. Reino Unido. “Caracterización de conjugados formados entre -lactoglobulina y quitosano”. 3 meses. 2008.

Department of Marine Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung.  
Characterization of chitosan-protein conjugates formed by Maillard reaction Taipei  
(Taiwan). 2 meses. 2009.

En la actualidad, se está trabajando en la elaboración de cuatro artículos con los resultados obtenidos de este trabajo de Tesis Doctoral, para su posterior publicación dentro de las áreas de constituyentes bioactivos de alimentos y funcionalidad de sistemas alimentarios.

## RESUMEN

El **quitosano** es un biopolímero natural que presenta importantes propiedades funcionales tanto desde el punto de vista tecnológico como biológico. El hecho de que la fuente de obtención más abundante sea un subproducto procedente de industrias pesqueras, y que se le hayan atribuido propiedades **emulgentes, gelificantes, antioxidantes y antimicrobianas**, entre otras, ha potenciado sus aplicaciones en los últimos años tanto en la industria alimentaria como en la biotecnológica. Por tanto, se han planteado como objetivos de este proyecto de tesis doctoral, la obtención y caracterización de quitosanos modificados para la elaboración de ingredientes funcionales con aplicación en la industria alimentaria y el estudio de las propiedades tecnológicas y biológicas de estos ingredientes. Para ello, por un lado se han obtenido distintas fracciones de oligosacáridos de quitosano mediante **despolimerización enzimática**, y por otro, se ha llevado a cabo la **reacción de Maillard en diferentes quitosanos con y sin la proteína -lactoglobulina procedente del suero lácteo**.

Una vez purificados y caracterizados estructuralmente y químico-físicamente, en los productos formados, se determinaron *in vitro* algunas propiedades funcionales, tecnológicas y biológicas. En los **quito-oligosacáridos (COS)** se analizaron la **actividad antioxidante, la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y su posible fermentación *in vitro* testada en microbiota humana**, determinando la influencia de las características químico-físicas de los oligosacáridos en estas propiedades funcionales. En los productos de Maillard (**MRPs**) se determinaron las propiedades tecnológicas: **actividad antioxidante, las propiedades emulgentes y las propiedades gelificantes**.

Se ha llevado a cabo la despolimerización de quitosanos de diferente grado de acetilación (DA) con lisozima y quitosanasa, obteniéndose fracciones de distinto peso molecular promedio ( $M_w$ ) mediante ultrafiltración. Los COS obtenidos con lisozima presentaron un mayor número de residuos acetilados que los obtenidas con quitosanasa, siendo más efectiva la quitosanasa en aquellos quitosanos que presentaban un bajo DA y la lisozima en aquellos que presentaban un DA mayor. Las propiedades funcionales medidas se determinaron en aquellos COS procedentes de la despolimerización con quitosanasa. El estudio de la actividad antioxidante demostró que los COS obtenidos

con quitosanasa de bajo  $M_w$  presentaban mayor actividad antioxidante independientemente del DA. En cuanto al efecto antimicrobiano, los COS obtenidos con quitosanasa de bajo DA, demostraron el mayor efecto antimicrobiano tanto frente a *Salmonella typhimurium* como *Clostridium difficile*, no influyendo de manera importante el  $M_w$  en las últimas y siendo los COS con un  $M_w$  comprendido entre 3 y  $12 \times 10^3$  g/mol los más activos frente a *Salmonella typhimurium*. Los estudios del empleo de los mismos COS como sustratos potencialmente fermentables por la microbiota humana mostraron que aquellos con bajo  $M_w$  y un alto DA y además con un patrón de distribución en el que predominan las secuencias que contienen de 6 a 11 residuos acetilados podrían ejercer efectos fisiológicos beneficiosos a nivel intestinal.

En cuanto al estudio de **modificación de quitosano** con y sin la  $\alpha$ -lactoglobulina mediante **reacción de Maillard** los resultados demuestran que esta reacción se produce en acetatos de quitosano. La  $\alpha$ -lactoglobulina y el acetato de quitosano a pH 6 dieron lugar a la formación de un complejo electrostático y a continuación tuvo lugar la formación de glicoconjugados solubles como consecuencia de la reacción. Los productos de glicosilación formados con los quitosanos de peso molecular intermedio presentaron mayor capacidad emulgente que la proteína y el quitosano. Los productos de reacción de Maillard (MRPs) obtenidos tras 4 y 7 días de reacción, mejoraron la actividad antioxidante de la proteína. Los MRPs formados a partir de un quitosano de bajo  $M_w$  ( $1.3 \times 10^3$  g/mol) presentaron la mayor actividad antioxidante, superior a la de la proteína y el quitosano inicial. En el caso de quitosanos con  $M_w$  intermedio se obtienen hidrogeles de acetato de quitosano por la reacción de Maillard, sin necesidad de agentes entrecruzantes. El gel producido a los 2 días de reacción es el que proporcionó la estructura más homogénea. Se obtuvieron hidrogeles de quitosano- $\alpha$ -lactoglobulina por la reacción de Maillard demostrándose que, en presencia de la proteína, las distribuciones continuas de tiempo de relajación spin-spin, T2, son mayores y por tanto el tamaño de poro de estos geles sería superior que el de los quitosanos obtenidos sin proteína.

## SUMMARY

Chitosan is a natural biopolymer with important functional properties in technological and biological applications. Its obtention source is a subproduct coming from the crustacean wastes of the fishing industry. Besides chitosan has been relationated with emulsifying, gelling, antioxidant and antimicrobial properties. These facts contribute to the potencial applications of this polymer in food industry and biotecnology. Because of this the main objective of this Thesis has been the obtencion and characterization of modified chitosan for the elaboration of functional ingredients with food industry application and the tecnological and biological properties study of these ingedients. The enzymatic depolymerization of chitosan and the Maillard reaction of chitosan with and without  $\beta$ -lactoglobulin have been proved as modifications of chitosan.

After purification and structural and chemical-physical characterizacion of the chito-oligosaccharides (**COS**) and of the Maillard reaction products (**MRPs**), some functional properties were determined. The **antioxidant activity**, the **antimicrobial activity** and the ***in vitro* fermentacion of COS by mixed cultures of human faecal bacteria** were analysed for the COS, studying the effect of the chemical-physical characteristics. In **MRPs** the analysed properties were **antioxidant activity, emulsifying and gelling properties.**

The depolymerization of chitosan with lisozyme and chitosanase allowed to separate and purificate different fractions of COS with different average molecular weight ( $M_w$ ) by ultrafiltration. The COS fractions had a higher number of acetylated residues in the composition, in the fractions obtained with lisozyme. The chitosanase depolymerization was more effective in chitosan with low acetylation degree (DA) and the lisozyme was more effective in depolymerization in the case of chitosan with higher DA. The low molecular weight COS independent of DA presentated the higher antioxidant activity. The antimicrobial activity was higher in the COS with low DA against *Salmonella typhimurium* and *Clostridium difficile*. The influence of  $M_w$  only had an effect on the activity against *Salmonella typhimurium* being COS with low  $M_w$  which presentated the higher activity. The study of utilization of COS as substrates by mixed cultures of human faecal bacteria showed that it was low  $M_w$  COS with a higher DA which could present positive physiological effects in the gut flora.

The modification of chitosan by Maillard reaction showed that the reaction is produced in chitosan acetates. The  $\alpha$ -lactoglobuline and the chitosan acetate at pH 6 formed an initial electrostatic complex and afterwards with the conditions of reaction, the formation of water soluble glycoconjugates happened. The glycosilation products formed between medium  $M_w$  chitosan and protein presented the higher emulsifying activity. The MRPs obtained at 4 and 7 reaction days improved the antioxidant activity of protein and it was the MRPs formed with low molecular weight chitosan which presented higher antioxidant activity compared to the chitosan and the protein. In the medium  $M_w$  chitosans acetates, besides a hydrogel was formed by Maillard reaction without crosslinking agent. The hydrogel produced at two days of reaction was the most homogeneous. Also the formation of a hydrogel occurred between chitosan and  $\alpha$ -lactoglobuline by Maillard reaction. When the protein is forming part of the structure the size is higher compared to the chitosan without protein.

## ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la varianza de una vía

Abs: Absorbancia

AGEs: Productos finales de las etapas avanzadas de la glicación

-Ig: -lactoglobulina

COS: Quito-oligosacáridos

DA: Grado de acetilación

DD: Grado de desacetilación

DP: Grado de polimerización

DPPH: 1,1-difenil-2-picril- hidracil

EAI: Índice de actividad emulgente

EFSA: Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

ELS: Evaporative Light Scattering

FAST Index: Fluorescence of Advanced Maillard products and Soluble Tryptophan

FDA: Food and Drug Administration

FISH: Microscopía de fluorescencia

FOS: Fructooligosacáridos

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojos de transformada de Fourier

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GlcN: N-glucosamina

GPC: Gel permeation chromatography

GRAS: Generally Recognised As Safe

Ip: Índice de polidispersidad

IRC: Inhibición crecimiento de la bacteria respecto al control

IRM: Imagen de Resonancia Magnética

MALDI-TOF-MS: Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matriz.

MALLS: Multi-Angle Laser Light Scattering

MHKS: Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada

MRPs: Productos de reacción de Maillard

$M_v$ : Peso molecular promedio viscoso

$M_w$ : Peso molecular promedio

PA: Patrón de la distribución intramolecular de los grupos acetilados RMN  
PES: Polietersulfona  
PG: Peptidoglicanos  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta  
SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico  
SE: Equilibrio de sedimentación  
SEC: Size exclusion chromatography  
SEM: Microscopía electrónica de barrido  
TA: Ácido lipoteicoico  
TE: Tiempo de eco  
TPTZ: 2,4,6-tripyridyl-s-triazine  
TR: tiempo de repetición  
Trp: Triptófano  
Qs: Quitosano  
UV: Ultravioleta  
UV/VIS: Ultravioleta visible

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS DEL QUITOSANO</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Grado de acetilación</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Peso molecular promedio</b>	<b>15</b>
1.2.1. Viscosimetría	17
1.2.2. Cromatografía de exclusión molecular	17
1.2.3. Ultracentrifugación analítica	18
<b>1.3. Solubilidad</b>	<b>19</b>
1.3.1. Conformación del quitosano en disolución	21
<b>2. MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO PARA USOS EN ALIMENTACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Despolimerización enzimática del quitosano para la obtención de quito-oligosacáridos (COS)</b>	<b>24</b>
2.1.1. Despolimerización con quitosanasas	25
2.1.1.1. Definición y clasificación	25
2.1.1.2. Reacción de transglicosilación	27
2.1.2. Despolimerización con lisozima	28
2.1.2.1. Definición y clasificación	28
2.1.2.2. Reacción de transglicosilación	29
<b>2.2. Quitosano modificado mediante reacción de Maillard</b>	<b>29</b>
2.2.1. Conjugados de polisacáridos con proteínas	29
2.2.2. Reacción de Maillard	31
2.2.2.1. Etapas de la reacción de Maillard	32
2.2.2.2. Variables que afectan a la reacción de Maillard	35
2.2.3. Proteínas del suero lácteo	37
<b>3. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS QUITOSANOS MODIFICADOS EN ALIMENTACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Propiedades funcionales de los quito-oligosacáridos (COS)</b>	<b>39</b>
3.1.1. Actividad antioxidante	39
3.1.2. Actividad antimicrobiana	42
3.1.2.1. Mecanismo del efecto antimicrobiano	43
3.1.2.2. Bacterias patógenas intestinales: <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Clostridium difficile</i>	47
3.1.3. Fermentación <i>in vitro</i> : efectos en la microbiota intestinal y producción de lactato y ácidos grasos de cadena corta	48
3.1.3.1. Microbiota intestinal humana	49

3.1.3.2.	Producción de lactato y ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)	50
<b>3.2.</b>	<b>Propiedades funcionales de los quitosanos modificados mediante reacción de Maillard</b>	<b>51</b>
3.2.1.	Propiedades emulgentes	51
3.2.2.	Actividad antioxidante	54
3.2.3.	Propiedades gelificantes	56
<b>II.</b>	<b><i>PLAN DE TRABAJO</i></b>	<b>59</b>
<b>III.</b>	<b><i>MATERIALES Y MÉTODOS</i></b>	<b>63</b>
<b>1.</b>	<b>MUESTRAS</b>	<b>65</b>
1.1.	Muestras empleadas en la modificación del quitosano mediante despolimerización enzimática	65
1.2.	Muestras empleadas en la modificación del quitosano mediante reacción de Maillard.	65
<b>2.</b>	<b>PURIFICACIÓN DEL QUITOSANO</b>	<b>66</b>
<b>3.</b>	<b>REACETILACIÓN DEL QUITOSANO</b>	<b>66</b>
<b>4.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FÍSICA DEL QUITOSANO</b>	<b>66</b>
4.1.	Determinación del grado de acetilación (DA). Espectroscopia ultravioleta-visible (método de la primera derivada)	67
4.2.	Determinación del peso molecular promedio	67
4.2.1.	Viscosimetría	67
4.2.2.	Cromatografía de exclusión molecular (GPC o SEC)	68
4.2.3.	Ultracentrifugación analítica: Experimento de equilibrio de sedimentación	68
<b>5.</b>	<b>MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO POR DESPOLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA</b>	<b>69</b>
5.1.	Condiciones de despolimerización	69
5.2.	Separación y purificación de los COS	70
5.3.	Caracterización químico-física de los quito-oligosacáridos (COS)	72
5.3.1.	Análisis estructural	72
5.3.2.	Determinación del peso molecular promedio	72
5.3.3.	Determinación del grado de acetilación	73
5.3.4.	Análisis del patrón de distribución intramolecular de grupos acetilados	73

<b>6. MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO MEDIANTE REACCIÓN DE MAILLARD</b>	<b>74</b>
<b>6.1. Formación y purificación de los productos de la reacción</b>	<b>74</b>
<b>6.2. Estudio de la interacción electrostática entre el quitosano y la lactoglobulina</b>	<b>74</b>
<b>6.3. Estudio del pardeamiento</b>	<b>75</b>
<b>6.4. Estudios de solubilidad de los productos resultantes</b>	<b>77</b>
<b>6.5. Cuantificación de grupos amino protonados libres</b>	<b>77</b>
<b>6.6. Estudio de formación y caracterización estructural de los glicoconjugados entre el quitosano y la lactoglobulina</b>	<b>77</b>
6.6.1. Perfiles electroforéticos de los glicoconjugados (SDS-PAGE)	77
6.6.2. Perfiles de velocidad de sedimentación	78
6.6.3. Perfiles cromatográficos de exclusión molecular (GPC)	79
6.6.4. Determinación de fluorescencia intrínseca	79
<b>6.7. Estudio del avance de la reacción de Maillard</b>	<b>80</b>
6.7.1. Determinación de furosina	80
6.7.2. Determinación de compuestos espectroscópicos que absorben en UV	80
6.7.3. Determinación de compuestos fluorescentes (AGEs)	81
<b>6.8. Caracterización de los productos insolubles procedentes de la reacción de Maillard</b>	<b>82</b>
6.8.1. Análisis estructural: Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)	82
6.8.2. Análisis microscópico : Microscopía electrónica de barrido (SEM)	82
<b>7. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS QUITOSANOS MODIFICADOS</b>	<b>84</b>
<b>7.1. Propiedades funcionales de los quito-oligosacáridos (COS)</b>	<b>84</b>
7.1.1. Actividad antioxidante	84
7.1.1.1. Método DPPH	84
7.1.1.2. Método FRAP	85
7.1.2. Actividad antimicrobiana frente <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Clostridium difficile</i>	85
7.1.3. Fermentación <i>in vitro</i> en cultivos mixtos	86
7.1.3.1. Ensayo cultivos fecales “in batch” a pH controlado	86
7.1.3.2. Cuantificación de poblaciones bacterianas por microscopía de fluorescencia (FISH)	87
7.1.3.3. Análisis de lactato y ácidos grasos de cadena corta	89

<b>7.2. Propiedades funcionales de los quitosanos modificados mediante reacción de Maillard</b>	<b>89</b>
7.2.1. Propiedades emulgentes	89
7.2.2. Actividad antioxidante	90
7.2.3. Propiedades gelificantes	90
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>91</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>93</b>
<b>1. ESTUDIO DE QUITOSANOS MODIFICADOS MEDIANTE DESPOLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA</b>	<b>95</b>
<b>1.1. Estudio de la despolimerización enzimática</b>	<b>97</b>
<b>1.2. Separación y purificación de los productos obtenidos mediante la despolimerización enzimática</b>	<b>102</b>
<b>1.3. Caracterización químico-física de los quito-oligosacáridos (COS)</b>	<b>103</b>
1.3.1. Análisis estructural de los productos obtenidos mediante la despolimerización enzimática	104
1.3.2. Determinación del peso molecular promedio	107
1.3.3. Determinación del grado de acetilación	111
1.3.4. Análisis del patrón de distribución intramolecular de grupos acetilados	113
<b>1.4. Propiedades funcionales de los quito-oligosacáridos (COS)</b>	<b>121</b>
1.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante de los COS	122
1.4.1.1. Capacidad para atrapar radicales libres DPPH	122
1.4.1.2. Poder reductor	124
1.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los COS	126
1.4.2.1. Actividad antimicrobiana frente a <i>Salmonella typhimurium</i>	127
1.4.2.2. Actividad antimicrobiana frente a <i>Clostridium difficile</i>	131
1.4.3. Determinación de la fermentación <i>in vitro</i> de COS en cultivos mixtos procedentes de muestras fecales humanas	134
1.4.3.1. Recuento de poblaciones bacterianas	135
1.4.3.2. Análisis de los SCFAs y lactato	140
1.4.3.3. Relación entre poblaciones bacterianas testadas, ácidos orgánicos producidos y características químico-físicas de los COS	145
<b>2. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS FORMADOS A PARTIR DE QUITOSANO MEDIANTE REACCIÓN DE MAILLARD</b>	<b>147</b>
<b>2.1. Estudio de la interacción entre el quitosano y la <math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	<b>148</b>
<b>2.2. Estudio del pardeamiento de los productos resultantes</b>	<b>150</b>

<b>2.3.</b>	<b>Estudio de la solubilidad de los productos resultantes</b>	<b>154</b>
<b>2.4.</b>	<b>Determinación de grupos amino protonados libres</b>	<b>158</b>
<b>2.5.</b>	<b>Estudio de formación y caracterización estructural de los glicoconjugados entre el quitosano y la <math>\alpha</math>-lactoglobulina</b>	<b>163</b>
2.5.1.	Perfiles electroforéticos SDS-PAGE	163
2.5.2.	Perfiles de velocidad de sedimentación	166
2.5.3.	Perfiles cromatográficos de exclusión molecular	168
2.5.4.	Determinación de la fluorescencia intrínseca	172
<b>2.6.</b>	<b>Estudio del avance de la reacción de Maillard</b>	<b>175</b>
2.6.1.	Determinación de furosina	175
2.6.2.	Determinación de compuestos espectroscópicos que absorben en UV	176
2.6.3.	Determinación de compuestos fluorescentes (AGEs)	179
<b>2.7.</b>	<b>Caracterización de los productos insolubles procedentes de la reacción de Maillard</b>	<b>183</b>
2.7.1.	Análisis estructural: Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)	183
2.7.2.	Análisis microscópico: Microscopía electrónica de barrido (SEM)	186
<b>2.8.</b>	<b>PROPIEDADES FUNCIONALES DEL QUITOSANO MODIFICADO MEDIANTE REACCION DE MAILLARD</b>	<b>187</b>
2.8.1.	Efecto de la glicosilación en las propiedades emulgentes	187
2.8.1.1.	Índice de actividad emulgente (EAI)	188
2.8.1.2.	Estabilidad de la emulsión	191
2.8.2.	Efecto del avance de la reacción de Maillard en la actividad antioxidante	193
2.8.2.1.	Capacidad para atrapar radicales DPPH	195
2.8.2.2.	Poder reductor	199
2.8.3.	Propiedades gelificantes	202
<b>V.</b>	<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	<b>209</b>
<b>VI.</b>	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>213</b>



## OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis doctoral ha estado enmarcado dentro de la línea de investigación del grupo 920071 de la UCM “Investigaciones en el sistema quitina/quitosano”, y dentro de él en **-Aplicación de quitosano en alimentación-**. La aportación de nuevas investigaciones de este biopolímero natural tanto en aplicaciones biológicas y tecnológicas en alimentación, contribuye a las consideraciones de su uso como ingrediente funcional.

El objetivo general ha sido el estudio de la modificación de quitosanos con distintas características químico-físicas mediante diferentes vías para la mejora de propiedades funcionales, y la posible aplicación de los productos obtenidos en la industria alimentaria. Dicho objetivo general se divide en los siguientes específicos:

- ✚ Obtención de quito-oligosacáridos mediante despolimerización enzimática.
- ✚ Modificación de quitosano mediante reacción de Maillard.
- ✚ Modificación de quitosano mediante reacción de Maillard con  $\beta$ -lactoglobulina.
- ✚ Caracterización funcional de los productos resultantes de la modificación del quitosano.



## I. *INTRODUCCIÓN*

---



Las razones que conducen en la actualidad a la sociedad a volver a utilizar los polímeros naturales que se venían usando desde hace cientos de años, son el creciente interés por compatibilizar la fabricación de productos manufacturados con la sostenibilidad del medioambiente y el alto coste de algunos materiales sintéticos. Además, el problema de una alta acumulación de residuos en los últimos tiempos ha promovido el uso de estos reciclándolos como materia prima.

El quitosano es un biopolímero natural con importantes propiedades funcionales y a este hecho se suma el valor añadido de obtenerse a partir de la quitina, que se extrae principalmente de las cáscaras de crustáceos y que constituye un subproducto importante procedente de la industria pesquera. El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859 y el estudio de este polímero a lo largo de todos estos años ha generado su empleo en múltiples aplicaciones. Entre las numerosas propiedades funcionales que se le han atribuido están: biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad filmogénica, actividad antimicrobiana, actividad antifúngica, actividad hipocolesterolémica, actividad antioxidante, mucoadhesión, hemostático y promotor de absorción. Estas propiedades funcionales han promovido su utilización a lo largo de los años en varios campos distintos como son la agricultura, la industria alimentaria y farmacéutica y la medicina (Rinaudo, 2006).



**Figura I.1.** Fuentes de obtención de quitina-quitosano.

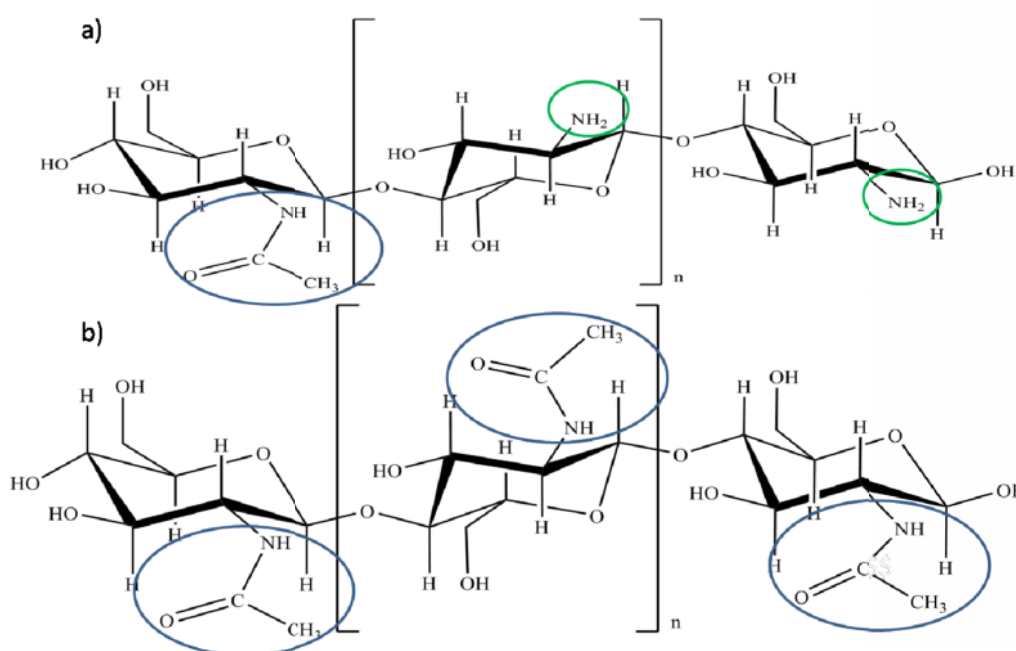
En cuanto a la industria alimentaria, el quitosano ofrece un amplio espectro de aplicaciones únicas. La mayoría se relacionan con su actividad antimicrobiana como por ejemplo son su uso como conservante en el empaquetamiento y en películas comestibles que recubren alimentos, y su empleo también como conservante en emulsiones. La capacidad de unirse a grasas permite su utilización como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos. Por otro lado, se han estudiado las propiedades tecnológicas como espesante, gelificante y emulgente. En su uso como agente emulgente es capaz de formar emulsiones y en la formación de emulsiones con proteínas del suero lácteo, se ha visto que mejora su estabilidad. Además se emplea como agente quelante y floculante para tratamiento de aguas residuales resultantes del procesado de alimentos y para clarificación de bebidas (vinos, zumos, etc.) (Aranaz y col., 2009).

A pesar de las importantes propiedades atribuibles a este polímero, en el ámbito de la industria alimentaria el quitosano aún en la actualidad tiene que hacer frente a alguna limitación. Por un lado es necesario el desarrollo de más investigaciones de su uso *in vivo*, y por otro, existen limitaciones legales que hacen que este polímero no se use todavía en la industria alimentaria en todo el ámbito internacional. El uso del quitosano como aditivo alimentario fue aprobado en Japón y Korea en 1983 y 1995, respectivamente (Weiner, 1992; KFDA, 1995). Su inclusión en el Codex Alimentarius fue considerada por su comisión en el 2003, pero actualmente no se recoge su uso en las listas generales estandarizadas de aditivos alimentarios ya que no ha sido aprobado ni por la FDA (Food and Drug Administration) ni por la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria). Aunque los estudios en humanos son escasos se sigue trabajando al respecto y en su reconocimiento como aditivo alimentario en el marco legal. Actualmente además de su uso como aditivo alimentario en países asiáticos existe un producto comercial (ChitoClear® Prymex ASA, Norway) que fue reconocido como producto GRAS (Generally Recognised As Safe) en Estados Unidos en el 2001 (Sagoo y col., 2002). El empleo de hidrocloreuro de glucosamina procedente de *Aspergillus niger* como aditivo alimentario en bebidas y de un producto comercial (“KiOnutrime-CG™”) compuesto de quitina-glucano, como suplemento dietético para aumentar la ingesta de fibra alimentaria, han sido evaluados como positivos por la EFSA (EFSA 2009; 2010). Los resultados de estas evaluaciones evidencian su inocuidad y contribuye al avance de los aspectos regulatorios al respecto.

Es imprescindible tener en cuenta la gran versatilidad de este polímero en cuanto a sus características químico-físicas que vendrá dada por la forma de obtenerlo. Desafortunadamente la mayoría de los quitosanos comerciales no se obtienen por los mismos procesos y suelen ser muestras heterogéneas (Nguyen y col., 2009) y en algunos casos contienen impurezas. Por ello, es importante en primer lugar la purificación de este producto y en segundo lugar la determinación cuidadosa de sus características químico-físicas para poder aplicar eficazmente el quitosano en cada uso particular según las propiedades funcionales buscadas.

## 1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS DEL QUITOSANO

El quitosano es un copolímero formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- -D-glucosa y 2-amino-2-desoxi- -D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1 4) (Figura I.2a). Se obtiene de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes de la naturaleza junto con la celulosa, que forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- -D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1 4) (Figura I.2.b) y la obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2.



**Figura I.2.** Estructura de a) quitosano y b) quitina.

La fuente y el método de obtención determinan la composición de las cadenas de quitosano y su tamaño. Por este motivo, el grado de acetilación (DA) y el peso molecular promedio ( $M_w$ ) son dos de los parámetros de obligado conocimiento para la caracterización de este polímero y para su empleo en distintas aplicaciones. Existen otras características químico-físicas como su solubilidad, cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas que también deben ser consideradas a la hora de emplear el polímero en una aplicación específica.

### 1.1. Grado de acetilación

El grado de acetilación se define como el contenido de residuos N-acetilglucosamina (GlcNAc) presentes en la cadena polimérica con respecto al contenido en residuos de N-glucosamina (GlcN) y se puede expresar en tanto por ciento (DA) según la siguiente ecuación:

$$DA = \frac{[GlcNAc]}{[GlcNAc+GlcN]} \times 100$$

El proceso de desacetilación nunca llega al 100% y en función del porcentaje alcanzado se habla de grado de acetilación (DA) del quitosano o desacetilación (DD) de la quitina. Algunos autores consideran que quitosano es el polímero con al menos 60 % de residuos desacetilados en su molécula (Aiba, 1991). En los quitosanos obtenidos a partir de quitina procedente de crustáceos, los residuos de GlcNAc y GlcN estarán distribuidos a lo largo de la cadena polimérica dependiendo del tipo de N-desacetilación aplicada a la quitina. Esta reacción de N-desacetilación implica una hidrólisis alcalina y puede ser heterogénea u homogénea.

**A) Desacetilación heterogénea:** Esta desacetilación no ocurre al azar y presenta secuencias de GlcNAc en bloques de más de tres residuos (Aiba, 1992; 1993). Según Kurita y col. (1977) la N-desacetilación de la quitina por reacción de hidrólisis heterogénea con álcali transcurre preferentemente en la región amorfa de la quitina. El

proceso se lleva a cabo con soluciones concentradas hidróxido de sodio o de potasio (40-50%), aplicando temperaturas que varían entre 60° y 130°C, de forma que se eliminan algunos de los grupos acetilo de la cadena de quitina. Como consecuencia de la presencia de álcali altamente concentrado y de los tiempos prolongados necesarios para conseguir una desacetilación las cadenas polisacarídicas pueden sufrir degradación en alguna medida (Tolaimate y col., 2000).

**B) Desacetilación homogénea:** Esta reacción ocurre de forma aleatoria (estadística de Bernouilli), con lo que la distribución de residuos de GlcNAc y GlcN es al azar (Vårum y col., 1996, Kurita, 1998). En este caso el proceso se lleva a cabo con álcali moderadamente concentrado ( 13% (p/p)) sobre quitina alcalina (Sannan y col., 1975; 1976) y se emplean temperaturas más bajas y tiempos de reacción mayores, por lo que no se forman precipitados en las soluciones ácidas al adicionar un exceso de álcali, contrariamente a lo que ocurre en la desacetilación heterogénea (Schatz y col., 2003; Tsaih y col., 2003). Como consecuencia, la modificación a lo largo de la cadena se produce de forma uniforme (Goycoolea y col., 2000). La N-desacetilación homogénea de la quitina da lugar a una distribución aleatoria de grupos acetilo y a la destrucción de la estructura secundaria de la quitina. Por estas razones, este tipo de desacetilación se emplea menos habitualmente si se pretende que el proceso sea más efectivo.

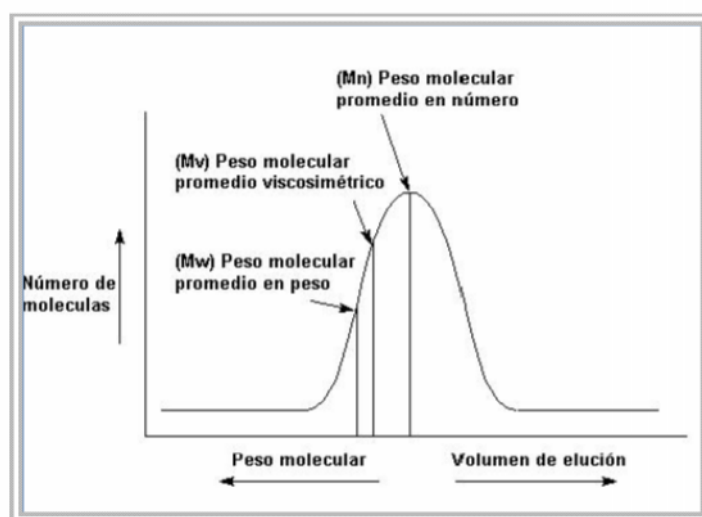
## 1.2. Peso molecular promedio

El peso molecular del quitosano se expresa como una media de los pesos de las moléculas presentes en la muestra. Las dos formas más comunes de expresar el peso molecular son:  $M_w$  que es el peso molecular promedio (normalmente más empleado) y  $M_n$  que es número molecular promedio (ASTM, 2007) y son definidos según las siguientes ecuaciones:

$$M_w = \frac{\sum_i W_i M_i}{\sum_i W_i} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

Donde  $N_i$  es el número de moléculas que tienen un peso molecular específico ( $M_i$ ) y  $W_i$  es el peso de las moléculas que tienen un peso molecular específico. Se define la polidispersidad como la relación entre el peso molecular promedio y el número molecular promedio:  $I_p = M_w / M_n$ .



**Figura I.3.** Cromatograma de exclusión molecular donde se representan las diferentes formas de expresar el peso molecular.

Existen varias técnicas que pueden ser empleadas en la determinación de peso molecular promedio de quitosanos como son la viscosimetría (Wang y col., 1991), la cromatografía de exclusión molecular (Ottøy y col., 1996) o la ultracentrifugación analítica (Errington y col., 1993). Dependiendo de la técnica empleada se obtienen valores diferentes de peso molecular promedio que pueden variar en uno o más órdenes de magnitud. En el caso de la viscosimetría las diferencias son debidas a que lo que se determina es el peso molecular promedio viscoso ( $M_v$ ) y dependerá de forma importante del solvente en el que se encuentre disuelto el quitosano y de la temperatura. En la cromatografía de exclusión molecular y la ultracentrifugación analítica se determina peso molecular promedio ( $M_w$ ) que determinan diferente comportamiento en solución, y aquí las diferencias suelen relacionarse también con la naturaleza del polímero.

polímero y su diferente comportamiento en las columnas de exclusión molecular (Fee y col., 2003).

### 1.2.1. Viscosimetría

La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  es una medida del volumen hidrodinámico que ocupan las macromoléculas en solución y por tanto un reflejo de su tamaño. La concentración influye notablemente en este parámetro (Desbrieres, 2002). Experimentalmente  $[\eta]$  se obtiene a partir de medidas de viscosidades relativas de soluciones con diferentes concentraciones de polímero. Las medidas se realizan en un viscosímetro capilar, a una temperatura determinada, basándose en la ley de Poiseuille y asumiendo un comportamiento newtoniano para bajas concentraciones y bajas fuerzas de cizalla. A partir de las medidas que se realizan en el viscosímetro se obtiene la viscosidad intrínseca mediante las aproximaciones de Huggins y Kraemer (Huggins, 1942; Wang y col., 1991).

La viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ) está relacionada con el peso molecular a través de la ecuación de Mark- Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS):

$$[\eta] = k_m M_v^a$$

Donde  $M_v$  es el peso molecular promedio viscoso y  $K_m$  y  $a$  son constantes independientes del peso molecular para un rango amplio de valores. Según el solvente empleado en la medición de la viscosidad intrínseca y la temperatura, estas constantes adquieren valores determinados, habiendo sido las más empleadas las propuestas por Rinaudo y Roberts (Rinaudo y col., 1993; Roberts y Domszy., 1982).

### 1.2.2. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular conocida como GPC (Gel Permeation Chromatography) o SEC (Size Exclusion Chromatography) se emplea mediante sistemas de detección de Multi-Angle Laser-Light Scattering (MALLS) para la

determinación del peso molecular promedio absoluto del quitosano sin necesidad de calibración. Mediante esta técnica se determina lo que se denomina peso molecular promedio aparente  $M_{w,app}$  y el radio de giro  $\langle Rg \rangle$  de las moléculas empleando el formalismo de Debye-Zimm (Wyatt, 1992). A partir del peso molecular promedio aparente se calcula el  $M_w$  ya que debido a la baja concentración de la muestra después de la dilución en la columna cromatográfica, la contribución de  $2BM_w c$  (siendo  $c$  la concentración y  $B$  el segundo coeficiente de virial termodinámico) se puede considerar cero y existe una buena aproximación entre  $M_w \sim M_{w,app}$ .

$$\frac{1}{M_{w,app}} = \left( \frac{1}{M_w} \right) (1 + 2BM_w c)$$

### 1.2.3. Ultracentrifugación analítica

Esta técnica permite calcular el peso molecular promedio de quitosano mediante experimentos de equilibrio de sedimentación (SE). Los datos se ajustan según la ecuación de Lamm (Clewlow y col., 1997):

$$d \ln \left( \frac{1}{r} \frac{dn}{dr} \right) d(r^2) = M_{z,app} (1 - \bar{v} \rho) \omega^2 / 2RT$$

Donde  $\bar{v}$  es el volumen específico parcial (mL/g) determinado por densimetría de precisión para cada quitosano,  $\rho$  es la densidad del solvente (mL/g),  $R$  es la constante de los gases y  $T$  la temperatura (K). La representación de  $\ln (1 dn/ r dr)$  frente a  $r^2$  permite calcular el  $M_{z,app}$  donde  $r$  es la distancia con respecto al centro de rotación en cm. Para transformar el valor de  $M_{z,app}$  en  $M_{w,app}$  se puede emplear el algoritmo de MSTARI (Cölfen y Harding., 1997). Para tener en cuenta el comportamiento de no idealidad del quitosano y otros polímeros, el peso molecular promedio aparente determinado para un rango de concentraciones se extrapola a cero (Harding, 1995). Una vez obtenido el peso molecular aparente, el segundo coeficiente de virial termodinámico y el peso molecular

absoluto ( $M_w$ ) se puede estimar de la representación de  $1/M_{w,app}$  frente a la concentración según la ecuación que se ha descrito en el apartado anterior.

Tanto el grado de acetilación como el peso molecular del quitosano se pueden determinar por diferentes técnicas. Para poder establecer comparaciones más exactas entre las características químico-físicas del polímero y poder relacionarlas con sus propiedades, es imprescindible unificar las técnicas empleadas en la caracterización de un polímero tan versátil como este. Por ello, actualmente se está trabajando en la estandarización de las técnicas empleadas en la determinación de estos parámetros según un estudio Interlaboratorio propuesto en la 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan, pero por ahora resulta fundamental especificar el tipo de técnica empleada en cada caso y el empleo de más de una de las técnicas para cada parámetro permite establecer más comparaciones con otros trabajos de investigación.

### 1.3. Solubilidad

Los polisacáridos en solución presentan una dinámica sensible a los tamaños de las cadenas, sus formas y número de cargas, las cuales dependen de la concentración del polímero. El quitosano es altamente reactivo debido a la amina primaria (alifática), y los hidroxilos primario y secundario que se encuentran en cada uno de sus monómeros (Acosta y col., 1993). Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, se forma la amina primaria ( $\text{NH}_2$ ) en los monómeros desacetilados y ésta es hidrogenada y adquiere carga positiva ( $\text{NH}_3^+$ ) en solución. Por ello, aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas formando sales, ya que el pKa del grupo amino en el quitosano es 6.5 (Tommeraas y col., 2001). Su carácter catiónico lo hace único entre los polisacáridos de la naturaleza por su comportamiento como una molécula anfifílica en la que la proporción de residuos acetilados y desacetilados es responsable del balance entre las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas a las que da lugar en disolución (Schatz y col., 2003). Por tanto, en su comportamiento en solución influirán variables tales como el pH, la naturaleza de las sales que se añadan, la fuerza iónica y de forma importante su  $M_w$  y su DA (Aranaz y col., 2009). Algunos autores han descrito lo que se denomina “ley general del comportamiento del quitosano en soluciones acuosas” (Brugnerotto y col., 2001b; Sorlier y col., 2002). De acuerdo con el

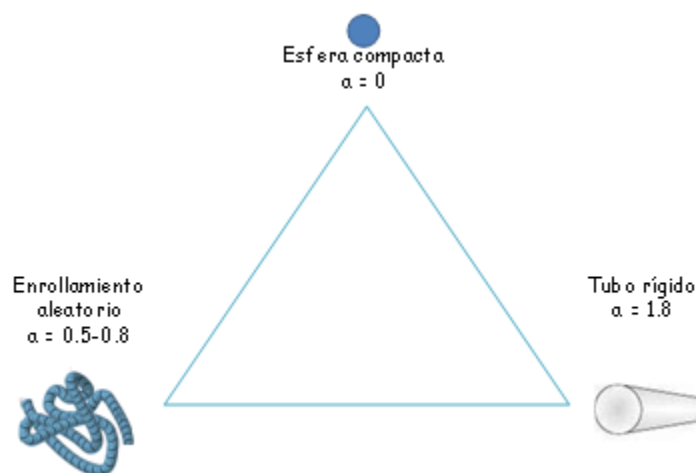
grado de acetilación (DA) del polímero esta ley se puede resumir en un triple comportamiento:

- DA inferior a 20 %. El quitosano presenta una alta densidad de carga en su estructura con un distancia promedio de 5-6 Å entre sus grupos ionizables distribuidos a lo largo de la cadena (por debajo de la longitud de Bjerrum  $\lambda_B = 7,1 \text{ \AA}$ ). En esta región el quitosano presenta un comportamiento polielectrolítico relativo a alta repulsión electrostática y la larga distancia existente en las interacciones electrostáticas intra- e intermoleculares, estableciéndose principalmente puentes de hidrógeno. Estas interacciones son responsables de la expansión de la cadena del polímero, de la alta solubilidad y de la condensación iónica.
- DA entre 20-50 %. En este caso existe un equilibrio entre las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Los parámetros químico-físicos como la viscosidad intrínseca, el radio de giro o el incremento del índice de refracción de estas moléculas en disolución permanece más o menos constante.
- DA superior a 50 %. En este caso, debido a la menor densidad de carga en la estructura del polímero, la distancia entre sus grupos ionizables es menor a la longitud Bjerrum y las interacciones electrostáticas que se producen son a larga distancia. Por ello, predominan las interacciones hidrofóbicas debido al mayor contenido de grupos acetilo.

En cuanto a la relación del tipo de interacciones que se establecen en la cadena del polímero con la viscosidad intrínseca de la solución, parece ser que cuanto mayor es el número de interacciones intermoleculares, mayor es el aumento que se produce de la viscosidad intrínseca. Por otro lado, cuando además se producen interacciones intramoleculares, se producen fenómenos de autoagregación dándose lugar a soluciones muchos menos viscosas incluso a altas concentraciones (Hu y col., 2007).

### 1.3.1. Conformación del quitosano en disolución

Se puede estimar la flexibilidad de una macromolécula y su conformación en solución haciendo uso del triángulo de Haug (Harding y col., 1991; Brugnerotto y col., 2001b). Este triángulo describe los tres niveles de conformaciones macromoleculares: esfera compacta, tubo rígido y enrollamiento al azar, representados en cada uno de los vértices (Figura I.4).



**Figura I.4.** Triángulo de Haug.

En general, en la mayoría de los polímeros la conformación suele presentar un comportamiento semiflexible intermedio entre un tubo rígido y un enrollamiento al azar. La conformación en solución de muchos polisacáridos también se puede describir en términos de varios parámetros estadísticos, tales como la longitud de persistencia ( $lp$ ), el radio de giro  $\langle Rg \rangle$  y la longitud estadística de Kuhn ( $b$ ) (Harding y col., 1991; Cölfen y Harding., 1997). En estos casos una medida de la flexibilidad de la molécula puede conseguirse en términos de la relación del contorno de longitud frente a la longitud de persistencia. El valor  $a$  es uno de los parámetros empíricos válidos sólo para un conjunto establecido de solvente-polímero y a una temperatura específica de la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) que se ha descrito en el apartado anterior. Este valor es análogo a los exponentes de las expresiones usadas para el cálculo del radio de giro o del coeficiente de difusión, medidos por dispersión de luz o ultracentrifugación (Hokputsa y col., 2003). Cuanto mayor número de cargas tiene el polisacárido su conformación es más cercana a un tubo rígido, mientras que los

polisacáridos con menor número de cargas se comportan más como enrollamientos al azar (Smidsrød y col., 1971). Por ello, en el caso de quitosanos con un bajo DA aumenta la rigidez de la cadena y el  $\langle R_g \rangle$  debido al mayor número de repulsiones electrostáticas en las cadenas (Hu y col., 2007).

La ultracentrifugación analítica mediante los experimentos de velocidad de sedimentación permite calcular el coeficiente de sedimentación [S]. El rango de velocidad al cual un polisacárido sedimenta bajo elevados campos centrífugos es función del peso molecular promedio y de la conformación (Harding y col., 1991). Por lo que ésta es una técnica muy útil que permite ver afinidad entre complejos macromoleculares y estimar la forma aproximada de las macromoléculas en disolución. Estudios previos basados en la velocidad de sedimentación determinada mediante ultracentrifugación han planteado métodos cualitativos o semicuantitativos (Tombs y Harding., 1998; Harding, 2005) de estimación de la conformación basados en la relación existente según la ley Mark–Houwink–Kuhn–Sakurada entre el coeficiente de sedimentación y el peso molecular promedio  $s \sim M_w^b$  y la viscosidad intrínseca y el peso molecular promedio  $[\eta] \sim M_w^a$  tomando a y b valores para enrollamientos aleatorios (0.5-0.8 y 0.4-0.5, respectivamente), esferas (0 y 0.67) y tubo rígido (1.8 y 0.15). En el caso del quitosano, que ha sido descrito como un polímero semiflexible (Brugnerotto y col., 2001b; Schatz y col., 2003; Lamarque y col., 2005), el coeficiente de sedimentación no se ve prácticamente afectado por su  $M_w$  ya que el parámetro b tiene valores muy bajos. Algunos autores han establecido que el valor de b es aproximadamente 0.15 (Harding, 1995; Tombs y Harding., 1998; Harding, 2005) y este hecho hace que aunque se produzca un aumento del  $M_w$  del polímero no se incremente de forma importante el valor del coeficiente de sedimentación (Morris y col., 2009). Aunque no haya mucha variabilidad en [S] para un quitosano, sí que se ha descrito que se pueden observar diferencias en la anchura de pico de las distribuciones del coeficiente de sedimentación debidas a fenómenos de difusión en las soluciones y debido a la polidispersidad. La formación de complejos del quitosano con otras moléculas como, por ejemplo, las proteínas provocaría cambios conformacionales afectando al parámetro b, por lo que la técnica de determinación de la velocidad de sedimentación permitiría ver si la formación de complejos con el polímero tiene lugar y estimar de forma aproximada la forma de las macromoléculas en disolución (Cölfen y col., 1996).

## 2. MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO PARA USOS EN ALIMENTACIÓN

Son conocidas las diferentes y potentes propiedades funcionales y biológicas que presenta el quitosano como ya se describía al comienzo de esta memoria. Sin embargo, uno de los factores limitantes del empleo de este polímero en algunas de estas aplicaciones, es su elevada viscosidad en medios ácidos dada por un peso molecular elevado y su baja solubilidad a pH superiores a 5 (Xia y col., 2008). Precisamente su elevada viscosidad es lo que genera una baja absorción en el organismo incluso a bajas concentraciones, provocando que el conocimiento de los efectos *in vivo* sea todavía escaso (Shon, 2001). Entre las estrategias planteadas para la mejora de solubilidad del quitosano existen varios métodos.

Por un lado, se plantea el control del proceso de la desacetilación homogénea, pero en estos casos no se consiguen altos rendimientos (Kurita y col., 1991). Otra de las estrategias para superar las limitaciones de solubilidad y que exista una utilización eficiente *in vivo* del polímero es su despolimerización que produce heterooligosacáridos y quitosanos de bajo peso molecular (Vishu Kumar y col., 2004a; Mengíbar y col., 2011). Puede ser llevada a cabo por métodos físicos, hidrólisis ácida o métodos enzimáticos. El empleo de métodos físicos como la irradiación y los ultrasonidos provoca una rápida degradación aleatoria del quitosano produciendo productos de gran variabilidad e inestables en cuanto a su solubilidad (Chung y col., 2005). La hidrólisis ácida da lugar a gran cantidad de N-glucosamina libre y una menor cantidad de heterooligosacáridos debido a la baja especificidad de la reacción (Kittur y col., 2003a; Galed y col., 2005a). Otra desventaja de este tipo de hidrólisis es el manejo de elevados volúmenes de ácidos fuertes y las altas temperaturas con la que hay que trabajar, así como la toxicidad de algunos de los productos secundarios. En el proceso de despolimerización enzimática el transcurso de la reacción así como la distribución de los productos obtenidos es más fácil de controlar debido a la mayor especificidad de la reacción. Además, en la hidrólisis enzimática los productos conservan sus propiedades biológicas iniciales ya que no se produce desacetilación y las condiciones son más suaves (Kittur y col., 2005).

La introducción de grupos funcionales hidrofílicos, llamada modificación química del quitosano también sería una modificación que podría aumentar y mejorar las

características y propiedades del quitosano (Holme y Perlin., 1997). Estas reacciones de modificación química implican procesos difíciles de controlar. La reacción de Maillard, sin embargo, es un proceso que tiene lugar de forma espontánea sin necesidad del empleo de reactivos químicos y es fácil de llevar a cabo. Se ha descrito su empleo para la introducción de algunos monosacáridos en la cadena de quitosano, con el fin de mejorar la solubilidad del polímero (Chung y col., 2005). Esta reacción también ha sido planteada entre el quitosano y diferentes proteínas (Hattori y col., 2000; Kato, 2002; Song y col., 2002; Usui y col., 2004; Miralles y col., 2007) con el fin de mejorar algunas propiedades funcionales. Se obtiene así un producto con mejor solubilidad, con valor añadido respecto a la funcionalidad de la proteína y de aplicabilidad en la industria alimentaria.

### **2.1. Despolimerización enzimática del quitosano para la obtención de quito-oligosacáridos (COS)**

Los oligosacáridos de quitosano también llamados quito-oligosacáridos (COS) se definen como co-oligómeros lineales formados por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosas (GlcNAc) y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas (GlcN) unidas mediante enlace  $\beta$ -(1 4). Estos productos son solubles en agua, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables, lo que facilita su uso en un amplio espectro de aplicaciones dentro de distintos campos: industria alimentaria, medicina, agricultura, cosmética y aplicaciones farmacéuticas. En el campo de la industria alimentaria y la medicina existe un especial interés en el posible uso de pentámeros y hexámeros de quitosano puesto que numerosos estudios desde hace tiempo están demostrando que presentan actividad antimicrobiana, antitumoral y efectos inmunológicos (Suzuki y col., 1986; Uchida y col., 1989; Tsukada y col., 1990; Jeon y col., 2000; Jeon y col., 2001; Kim y Rajapakse., 2005; Caiqin y col., 2008; Tang y col., 2010; Kim y col., 2011). Hay que tener en cuenta que la bioactividad de los COS con frecuencia ha sido determinada mediante la utilización de mezclas de oligosacáridos heterogéneas y/o pobremente caracterizadas. Esto genera discrepancias en cuanto a los resultados obtenidos en diferentes estudios debido a la estrecha relación existente entre las características químico-físicas de estos productos y sus propiedades funcionales. Por ello, existe un especial interés en producir COS bien definidos en lo que se refiere a sus parámetros

estructurales: fracción molar de unidades de GlcNAc en la cadena del polímero (DA), grado de polimerización (DP) y patrón de la distribución intramolecular de los grupos acetilados a lo largo de la cadena oligomérica (PA) (Barroca-Aubry y col., 2010).

El quitosano es susceptible al efecto hidrolítico de un amplio espectro de enzimas. Las más empleadas son las quitosanasas y quitinasas como enzimas específicas con actividad quitosanolítica (Hsiao y col., 2008; Kuroiwa y col., 2008; Denhart y col., 2008; Lin y col., 2009b). La especificidad de estas enzimas permite hidrolizar quitosanos parcialmente acetilados produciendo principalmente dímeros, trímeros y tetrámeros de N-acetil-D-glucosamina (Xie y col., 2009). Sin embargo, estas enzimas presentan como desventaja a la hora de aplicarlas a gran escala que no están disponibles en grandes cantidades y que tienen un elevado coste. Alternativamente se ha estudiado el uso de otras enzimas no específicas que incluyen hemicelulasas (Cabrera y col., 2005), lipasas (Muzzarelli y col., 1995), pectinasas (Kittur y col., 2005; Abd-Elmohdy y col., 2010), papaínas (Vishu Kumar y col., 2004a), celulasas (Roncal y col., 2007), proteasas (Vishu Kumar y col., 2007), lisozimas (Yoon, 2005; Lin y col., 2009a; Verheul y col., 2009) y  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucanasas (Roncal y col., 2007). Estas enzimas no presentan un coste tan elevado y están fácilmente disponibles, por lo que su uso abre nuevas perspectivas más económicas para la industria. En este caso, la no especificidad en la acción quitosanolítica hace que preferentemente se produzcan quitosanos de bajo peso molecular en altas cantidades frente a oligosacáridos (Lin y col., 2009a).

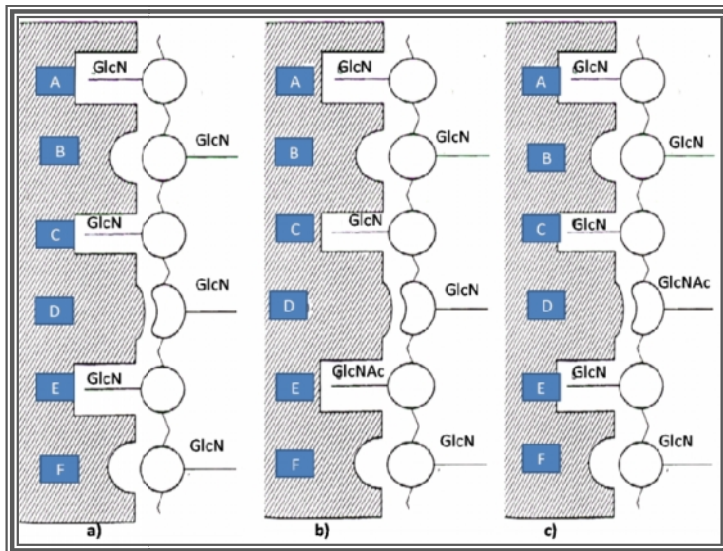
### **2.1.1. Despolimerización con quitosanasas**

#### **2.1.1.1. Definición y clasificación**

Las quitosanasas son glicosil hidrolasas que catalizan la degradación del quitosano parcialmente acetilado de forma endo-hidrolítica. Se producen en la naturaleza por varias bacterias y hongos y se emplean en la lisis de la pared celular de algunos hongos pertenecientes a la familia *Mucorales* (Izume y col., 1992). Se clasifican en familias de glicosil hidrolasas en base a la similitud de su secuencia. Existe una gran multiplicidad en la especificidad de sustrato de dichas enzimas y no se ha encontrado ninguna relación

con la estructura de las quitosanasas, pero sí está claro que depende del microorganismo de procedencia (Chiang y col., 2003).

Teniendo en cuenta que el quitosano puede presentar cuatro tipos de enlaces: GlcN-GlcN (D-D), GlcNAc-GlcN (A-D), GlcN-GlcNAc (D-A) y GlcNAc-GlcNAc (A-A), las quitosanasas pueden dividirse en tres clases según su especificidad de hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glicosídicos en los quitosanos parcialmente acetilados: las de clase I hidrolizan enlaces tipo A-D y D-D, las de clase II solo enlaces D-D y las de clase III enlaces D-A y D-D. Ninguna quitosanasa hidroliza enlaces del tipo A-A, ya que se requiere al menos un residuo GlcN en uno de los lados del enlace a hidrolizar. La rotura de los enlaces tipo A-D y D-A da lugar a un residuo GlcNAc en el extremo reductor o no reductor de los productos, respectivamente. El dominio de unión a sustrato de la quitosanasa puede alojar al menos 6 residuos de GlcN y la hidrólisis ocurre en el punto medio de este dominio entre los sitios D y E (Figura I.5) (Vårum y col., 1996; Fukamizo y col., 1995). La especificidad de sustrato es mayor para esta enzima y presenta un pH óptimo de actuación entre 4 y 6.8 (Yalpani y Halls., 1984).



**Figura I.5.** Esquema del centro activo de quitosanasa. La rotura del enlace glucosídico se da entre los sitios D y E. a) hidrólisis de enlaces D-D (GlcN-GlcN); b) hidrólisis de enlaces D-A (GlcN-GlcNAc); hidrólisis de enlaces A-D (GlcNAc-GlcN).

Entre los microorganismos capaces de secretar quitosanasas se encuentra *Streptomyces griseus*, que es un organismo con fuerte actividad quitosanólítica cuando crece en un medio que contiene quitosano como única fuente de carbono. Las quitosanasas que produce son dos la I y la II, que presentan actividades quitosanasas y  $\alpha$ -1,4-glucanasa, respectivamente. La quitosanasasa I parece ser un derivado de la quitosanasasa II. Estas son enzimas estructurales o de soporte (retaining) y producen específicamente la forma anomérica de los oligómeros, es decir, presentan retención anomérica (Fukamizo y col., 1995). La especificidad anomérica depende de la estructura del sitio catalítico. Tienen un peso molecular conjunto de  $34 \times 10^3$  g/mol estimado por SDS-PAGE y un punto isoelectrico a pH= 9.7. Su pH óptimo es de 5.7 y la temperatura óptima de 60°C (Tanabe y col., 2003). Según la clasificación de especificidad de hidrólisis en función de los tipos de enlace que escinden, pertenecen a la clase III de quitosanasas pudiendo hidrolizar tanto enlaces D-A como D-D en quitosanos parcialmente acetilados y produciendo heterooligosacáridos con residuos GlcN en el extremo reductor. Requieren como mínimo de tetrámeros en el caso de emplear como sustrato los oligómeros D y actúan según mecanismo de endo-splitting. Son específicas de enlaces N-acetil-  $\beta$ -D-glucosamínicos en los quitosanos parcialmente N-acetilados y no actúan sobre quitina (Ohtakara, 1988). Existen dos aminoácidos esenciales en su estructura para que tenga lugar a acción catalítica: Glu-22 y Asp-40 (que actúan como donador y aceptor de protones). La reacción quitosanólítica tiene lugar a través de la donación de un protón del grupo carboxílico de Glu-22 y la activación de una molécula de agua, produciéndose así el ataque del C1 del sustrato a través de un grupo carboxilo de Asp-40 (Dennhart y col., 2008).

#### **2.1.1.2. Reacción de transglicosilación**

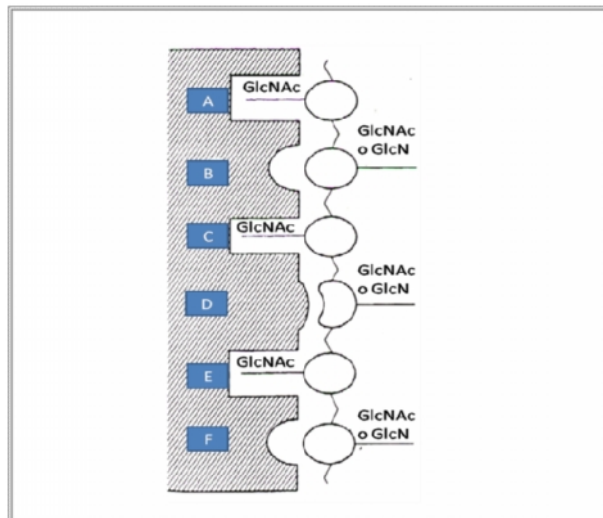
La quitosanasasa de *Streptomyces griseus* cataliza, además, una reacción de transferencia glicosídica en la hidrólisis de los quitoo-oligosacáridos del tipo (GlcN)<sub>5</sub>, transfiriendo grupos (GlcN)<sub>2</sub> y (GlcN)<sub>3</sub> a (GlcNAc)<sub>3</sub> que da lugar como productos finales a (GlcN)<sub>2</sub> y GlcN-(GlcNAc)<sub>3</sub> (Fukamizo y col., 1995; Tanabe y col., 2003). Esto se sabe porque al emplear sustratos (GlcN)<sub>5</sub> totalmente desacetilados nunca se liberan residuos de GlcN de la hidrólisis. Se relaciona este tipo de reacciones con las altas concentraciones de sustrato. Cuando tiene lugar la acción catalítica de la enzima, el fragmento de sustrato sobre el que se actúa se elimina del centro activo después de la escisión del enlace

glicosídico y es reemplazado por una molécula de agua, nucleofílica. Una alta concentración de sustrato puede hacer que ese fragmento de oligosacáridos ocupe el lugar de la molécula de agua y tenga lugar la transglicosilación (Dennhart y col., 2008; Hsiao y col., 2008).

## 2.1.2. Despolimerización con lisozima

### 2.1.2.1. Definición y clasificación

La lisozima es una endo-carbohidrasa, que hidroliza los enlaces  $-(1 \rightarrow 4)$  glicosídicos de algunos peptidoglicanos de la pared celular de ciertas bacterias y de la quitina (Nordtveit y col., 1994). Uno de los sustratos naturales de la lisozima es la quitina aunque también puede hidrolizar quitosanos parcialmente acetilados. El sitio activo de la lisozima consiste en seis subsitios A, B, C, D, E y F que se unen a seis residuos de glucopiranososa (Figura I.6).



**Figura I.6.** Esquema del centro activo de lisozima. La rotura del enlace glicosídico se da entre los sitios D y E. Siendo D normalmente GlcNAc.

Los sitios alternados A, C y E interaccionan con cadenas acetamida laterales de residuos GlcNAc y la hidrólisis tiene lugar entre los residuos unidos a los subsitios D y E

(futuros extremos reductor y no reductor, respectivamente). Como resultado de la hidrólisis se pueden producir oligosacáridos con GlcN en el extremo reductor, lo que nos dice que D puede unirse a residuos de ambos tipos aunque mayoritariamente lo hace a GlcNAc. El subsitio F tampoco es muy específico y pueden estar unidos residuos del tipo GlcN (Vårum y col., 1996). Tanto la lisozima como el quitosano están cargados positivamente a pH=4.5, con lo que la formación del complejo enzima-sustrato lleva implícita el contacto directo entre los dos policationes. La lisozima tiene un pH óptimo cercano a 5, causado por los valores de pKa tan distintos del Asp-52 y del Glu-35 (que actúan como aceptor y donador de protones, respectivamente) y que se encuentran en el sitio activo de la lisozima (Shigemasa y col., 1994; Nordtveit y col., 1994).

#### **2.1.2.2. Reacción de transglicosilación**

Esta enzima puede dar lugar a transglicosilaciones si el pH, temperatura y concentraciones de enzima-sustrato son los adecuados. Se produce una reacción de transferencia de un residuo N-acetilglucosamina (GlcNAc) a un grupo (GlcNAc)<sub>2</sub> para formar (GlcNAc)<sub>3</sub>. Este es el paso limitante de la reacción puesto que, una vez que este trisacárido se ha formado, la cadena se puede elongar hasta formar hexámeros o heptámeros. Algunos autores opinan que mediante esta reacción de síntesis se mejoran los rendimientos en la obtención de los COS comparativamente con la hidrólisis ácida de quitosano (Usui y col., 1990).

### **2.2. Quitosano modificado mediante reacción de Maillard**

#### **2.2.1. Conjugados de polisacáridos con proteínas**

La glicosilación de proteínas con carbohidratos mediante reacción de Maillard está atrayendo especial interés como método efectivo para obtener proteínas con mejores propiedades tecnológicas. Debido a que esta reacción se produce de forma natural y espontánea, sin necesidad del empleo de reactivos químicos, se propone como método alternativo y seguro para mejorar propiedades funcionales de la proteína frente a reacciones químicas como la acetilación, desamidación y succinilación, que implica el uso de reactivos químicos que pueden resultar tóxicos. Por tanto, ésta parece ser una de

las alternativas más prometedoras para la industria alimentaria. Sin embargo, es necesario el desarrollo de métodos industrialmente viables para explotar el potencial de esta reacción y crear nuevos ingredientes funcionales con valor añadido (Oliver y col., 2006). La contribución al desarrollo de estos nuevos ingredientes a base de proteínas está creciendo cada vez más y se está dirigiendo a conseguir un conjunto de buenas características tecnofuncionales, nutricionales y sensoriales (Hiller y col., 2010), como consecuencia de la suma de los requerimientos exigidos por tecnólogos de alimentos, nutricionistas y consumidores. Las proteínas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria debido a su capacidad para proporcionar propiedades únicas como emulsionantes, espumantes, gelificantes y alta capacidad de solubilización (Phillips y col., 1994). En concreto, la utilización eficaz de las proteínas lácteas puede encontrarse limitada por la disminución de su funcionalidad durante los procesos de obtención de las mismas, o durante el procesado de los alimentos a los que se adicionan, como consecuencia de las condiciones del medio (alta temperatura, pH ácido o elevada fuerza iónica). Por ello, son de gran interés aquellos métodos que aumenten la aplicación de estas proteínas como ingredientes alimentarios, y que además permiten revalorizar los subproductos de los que proceden.

La funcionalidad de glicoconjugados formados entre proteínas y polisacáridos a partir de reacción de Maillard ha sido descrita en numerosas investigaciones. La glicosilación de proteínas durante las primeras etapas de la reacción, ha sido relacionada con un aumento de las propiedades emulgentes (Dickinson y Galzka., 1991; Kato y col., 1992; Darewicz y Dziuba., 2001; Diftis y Kiosseoglou., 2004), de las propiedades espumantes (Dickinson y Stefanich., 1996), de la solubilidad (Saeki y Tirrell., 1997; Sato y col., 2000; Katayama y col., 2002), de la actividad antimicrobiana (Nakamura y col., 1991; Song y col., 2002) y de la estabilidad térmica de la proteína (Aoki y col., 1999; Hattori y col., 1997; Chevalier y col., 2001b). Otros efectos positivos de la reacción como son la formación de compuestos antioxidantes han sido relacionados con etapas avanzadas de la reacción entre proteínas y polisacáridos (Barry J. McGookina y Augustin., 1991; Chevalier y col., 2001a). La reacción de Maillard en quitosano con diferentes proteínas como la lisozima o la caseína (Kato y col., 1992; Kato, 2002; Song y col., 2002), proteínas de la soja (Usui y col., 2004) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) (Hattori y col., 2000), ha demostrado mejorar las propiedades emulgentes y antimicrobianas de estas proteínas. Por otro lado, la formación de nuevos productos como consecuencia de la reacción de

Maillard, contribuye paralelamente al desarrollo de esas propiedades, pudiéndose obtener ingredientes funcionales con potenciales aplicaciones en la industria alimentaria.

### **2.2.2. Reacción de Maillard**

Es una reacción que se produce de forma natural y espontánea durante el procesado y almacenamiento de algunos alimentos pudiendo provocar efectos beneficiosos o perjudiciales en función del tipo de compuestos que se originen, tanto a nivel organoléptico como nutricional. Mediante la reacción se pueden modificar las propiedades funcionales de las proteínas producido por cambios en su carga, solvatación y/o en su estructura (Morgan y col., 1999a; Darewicz y Dziuba., 2001)

La reacción da lugar a una variedad muy amplia de productos intermedios y productos finales o melanoidinas que contribuyen marcadamente al aroma, color y sabor, como también al potencial poder antioxidante de los alimentos almacenados (Silvan y col., 2006). Sin embargo, entre los efectos perjudiciales como consecuencia de la reacción se puede promover la formación de compuestos tóxicos, (Brands y col., 2000), la pérdida de valor nutricional (Somoza, 2005) y además el desarrollo de sabores y aromas desagradables. En cuanto a la pérdida del valor nutricional, se ha descrito que puede disminuir la digestibilidad de las lisina (Lys) (Damodaran, 1996).

La racemización de residuos L-aminoácidos a residuos D-aminoácidos tiene lugar a pH alcalino y altas temperaturas. Los D-aminoácidos por lo general son menos hidrolizados por las proteasas, y además, a este hecho se suma que el carboanión formado bajo condiciones alcalinas puede dar lugar a reacciones de -eliminación produciendo dehidroalanina, la cual perjudica a la digestibilidad de la proteína y a la biodisponibilidad de lisina (Damodaran, 1996). Además otros aminoácidos esenciales, como el triptófano, la metionina, la arginina y la histidina, pueden ser bloqueados por los grupos carbonilo de azúcares reductores o lípidos oxidados, impidiéndose su absorción (Hurrell, 1984; Somoza, 2005). Por tanto, es importante a la hora de desarrollar ingredientes funcionales mediante este proceso llevar a cabo un calentamiento controlado y minimizar estas reacciones no deseables bajo condiciones alcalinas, ya que el objetivo es que estos ingredientes, además de presentar propiedades

funcionales, presentan en su composición productos de reacción de Maillard (MRPs) con alta actividad antioxidante y menos efectos negativos (Lertittikul y col., 2007).

### 2.2.2.1. Etapas de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard fue descrita por primera vez por Louis-Camille Maillard en 1912 a partir del estudio del calentamiento de una solución de glucosa y glicina (Maillard, 1912). Posteriormente Hodge en 1953 (Hodge, 1953) planteó un esquema simplificado de la reacción que es considerado como una de las descripciones de pardeamiento no enzimático más adecuadas hasta el momento (Figura I.7). El mecanismo de dicha reacción engloba una serie de reacciones complejas interrelacionadas, que pueden ocurrir simultáneamente, y se divide en tres etapas en las que se producen las reacciones que se describen a continuación:

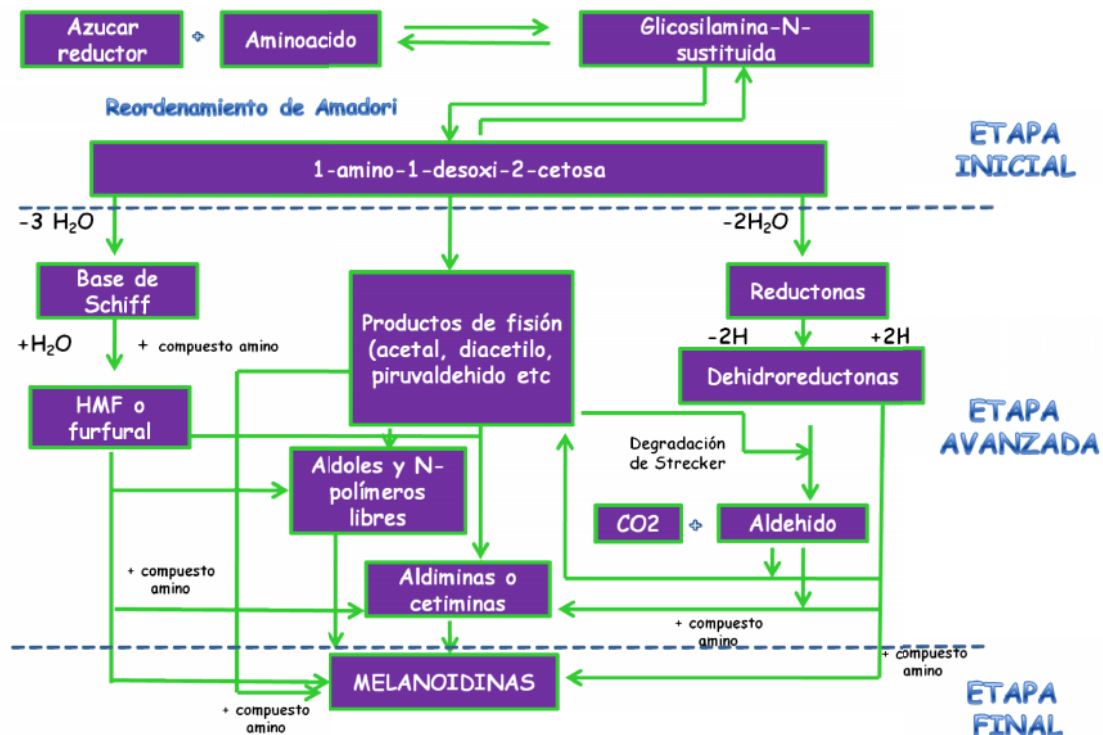


Figura I.7. Esquema de reacción de Maillard basado en el esquema propuesto por Hodge en 1953.

**Etapa inicial. Glicosilación no enzimática o glicación:** Esta etapa es la más conocida y caracterizada. En esta etapa se suceden reacciones de condensación y de reordenamiento (Dills, 1993) y no se producen alteraciones estructurales importantes en la estructura de proteína ni tampoco tiene lugar desarrollo de color. Se produce la unión covalente entre un grupo amino libre, no protonado, de un aminoácido, normalmente el de la lisina (Lys) y el grupo carbonilo de un azúcar reductor. Esta reacción está catalizada por las bases que eliminan un protón del grupo amino, que se comporta como nucleófilo. El producto de condensación formado pierde una molécula de agua y se forma una “base de Schiff”, que, por ciclación, se transforma en la correspondiente glicosilamina N-sustituida. Estos compuestos son muy inestables, a excepción de los procedentes de aminoácidos aromáticos, y sufren un reordenamiento irreversible, denominado reordenamiento de Amadori en el caso de que el azúcar sea una aldosa (Amadori, 1929) o de Heyns si el azúcar es una cetosa (Heyns y Meinecke., 1953), para dar lugar al correspondiente compuesto de Amadori (1-amino-1-desoxi-2-cetosa) o de Heyns (2-amino-2-desoxi-aldosa), los cuales son los primeros productos estables de la reacción (Ames, 1992).

**Etapa avanzada:** Durante esta etapa se produce la fragmentación de azúcares y la degradación de aminoácidos (degradación de Strecker) dando lugar a compuestos coloreados y fluorescentes 1,2-dicarbonilos. El compuesto de Amadori/Heyns, a pesar de ser bastante estable cuando la actividad de agua es baja, puede experimentar varias reacciones irreversibles de degradación, que conducen a la formación de una gran variedad de compuestos volátiles, los cuales aún no se encuentran muy bien caracterizados, y que son responsables de aroma y sabor típicos (Ledl y col., 1990; Friedman, 1996). En función del pH, se pueden distinguir dos vías principales de degradación:

- ❖ A pH ácido, se ve favorecida la enolización de los carbonos C1 y C2 y la eliminación del grupo amino en posición 1 y del grupo carboxilo en posición 3, dando lugar a compuestos 1,2-dicarbonilo (vía 1,2-E), como el metilglioxal, el glioxal, la 1-desoxiglucosulosa y la 3-desoxiglucosulosa (Thornalley, 1996), que dan lugar mediante deshidrataciones posteriores a furfurales, como el 5-hidroximetilfurfural, y derivados responsables del aroma (Henle, 2005).

- ❖ A pH básico, la enolización de los carbonos C2 y C3 y la eliminación del grupo amino en posición 1 da lugar a la formación de compuestos 2,3-dicarbonilo (vía 2,3-E), cuya fragmentación posterior origina compuestos de bajo peso molecular como son los cetoaldehídos, las reductonas, compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos, etc.

Además, es posible que tenga lugar la formación de estos compuestos a partir de carbohidratos sin que exista participación de grupos aminos, vía caramelización a altas temperaturas. Por otra parte, los compuestos 1,2-dicarbonilos, debido a su alta reactividad pueden reaccionar con los residuos de lisina y arginina de las proteínas o con intermediarios de los compuestos de Amadori dando lugar a la formación de derivados aminoácidos denominados productos finales de glicación avanzada (AGEs: “advanced glycation end products”) (Henle, 2005) caracterizados por presentar fluorescencia.

**Etapa final:** Las etapas finales de la reacción de Maillard engloban una serie de reacciones de ciclación, deshidratación, retroaldolización, reordenamiento, isomerización y condensación de los productos iniciales de la reacción, que dan lugar a oligómeros y polímeros nitrogenados de alto peso molecular, altamente coloreados e insolubles en agua, llamados melanoidinas (Friedman, 1996). Debido a su difícil aislamiento y elevada complejidad, la estructura de las melanoidinas todavía es objeto de estudio. Se han propuesto tres vías de formación (Martins y col., 2003):

- Hofmann en 1998 (Hofmann, 1998) detectó compuestos coloreados de bajo peso molecular que eran capaces de entrecruzarse vía grupos amino de lisina o arginina para producir compuestos de alto peso molecular.
- Tressl en 1998 (Tressl y col., 1998) lo definieron como un polímero que consiste en unidades repetidas de furanos y/o pirroles formados durante los estadios avanzados de la reacción y unidos mediante reacciones de policondensación.

- Otros autores plantean un esqueleto de melanoidinas principalmente formado a partir de la degradación de los productos formados en las etapas iniciales de la reacción de Maillard, y polimerizado mediante condensación aldólica y uniéndose a compuestos amino (Cämmerer y Krosh., 1995; Yaylayan y col., 1998).

#### 2.2.2.2. Variabes que afectan a la reacción de Maillard

Las condiciones de reacción pueden determinar el tipo de productos que son formados durante la reacción de Maillard y por tanto las vías seguidas en la formación de melanoidinas (Tressl y col., 1995). La reactividad de los carbohidratos que participan en la reacción de Maillard depende en gran medida del medio en el que se encuentre, dependiendo de las condiciones de pH, actividad del agua, temperatura y medio de reacción empleado (sólido o solución) (Baynes y col., 1989; Chawla y col., 2007).

##### ➤ **Temperatura y tiempo de reacción**

Las variables temperatura y tiempo, influyen en la velocidad de la reacción y en la composición de los productos finales. Un aumento de la temperatura disminuye el tiempo total de reacción e incrementa la velocidad de reacción. La duración del tratamiento influye también en el número y diversidad de los productos finales de la reacción.

##### ➤ **Actividad del agua ( $a_w$ )**

El intervalo de  $a_w$  en el cual la reacción se produce de forma más favorecida se encuentra entre 0.5 y 0.8 (Labuza y Baisier., 1992 y Van Boekel, 2001). Cuando la  $a_w$  es alta, la velocidad de reacción es baja, debido a que los reaccionantes se encuentran diluidos en el agua del medio (Labuza, 1970).

##### ➤ **pH del medio**

El pH del medio influye en gran medida en la proporción de grupos amino no protonados que existan para que tenga lugar el paso inicial de condensación y sea

favorecida así la formación de reductonas sobre la producción de furfurales del compuesto de Amadori, permitiéndose el desarrollo de color (Bates y col., 1998). La formación de compuestos coloreados en sistemas modelos entre la glucosa y la lisina en un intervalo de pH entre 3 y 9 se ha relacionado principalmente con las condiciones ligeramente alcalinas (Ajandouz y Puigserver., 1999). El intervalo de pH comprendido entre 6 y 8 parece ser el más apropiado para que la reacción tenga lugar de forma favorable. Otros autores demuestran la necesidad de un pH ligeramente alto para que tenga lugar la reacción de Maillard (Petriella y col., 1985).

### ➤ **Composición del medio**

La velocidad de la reacción va a depender de las características de los diferentes azúcares y aminoácidos que lo forman, así como de la proporción entre ellos. Parece ser que existe una mayor reactividad en las moléculas de carbohidratos pequeños frente a la baja reactividad de los polisacáridos, lo que unido a los efectos de impedimento estérico provocados por el polisacárido, limita la extensión de la reacción de Maillard, evitándose el desarrollo de color excesivo y la polimerización de la proteína. Este hecho se plantea como una ventaja puesto que esto permitiría llevar un control de reacción para las distintas propiedades sin la pérdida de funcionalidad y efectos indeseables en los productos resultantes (Kato, 2002).

En cuanto al tipo de aminoácido se ha descrito que la Lys es el aminoácido más fácilmente degradado debido a la presencia de dos grupos amino reactivos en su estructura (Ajandouz y Puigserver., 1999). El grupo imidazol de la histidina, el grupo indol del triptófano o el grupo guanidino de los residuos de arginina también podrían reaccionar, pero de una manera menos extensa (Ames, 1992). También se ha demostrado la pérdida de otros residuos aminoácidos como Arg (Yen y col., 1992), S-Cys (Billaud y col., 2004) y Pro (Davidek y col., 2003) por otros autores. La disminución del contenido de S-Cys también reduce la posibilidad de que la proteína se agregue a través de enlaces S-S, lo que aumentaría la solubilidad de los MRPs en agua (Li y col., 2009).

La reacción puede tener lugar tanto en estado sólido como en solución. En general, cuando se realiza la reacción en sólido se consigue una  $a_w$  óptima siendo requeridos

menores tiempos de reacción (O'Regan y Mulvinill., 2010) aunque normalmente en el caso de las proteínas globulares, según se ha comprobado en numerosos estudios, es preciso aplicar tiempos de reacción más prolongados (Babiker y col., 1998; Nakamura y Lato., 2000; Song y col., 2002). Este hecho no resulta muy práctico desde el punto de vista industrial, como tampoco lo son, las necesidades de liofilización para llevar a cabo la reacción en estado sólido (Oliver y col., 2006). Sí es deseable, desde el punto de vista de la industria, un menor espacio y el menor tiempo. Además, los productos resultantes resultarían más estables a largo plazo y por tanto más fáciles de manipular y almacenar.

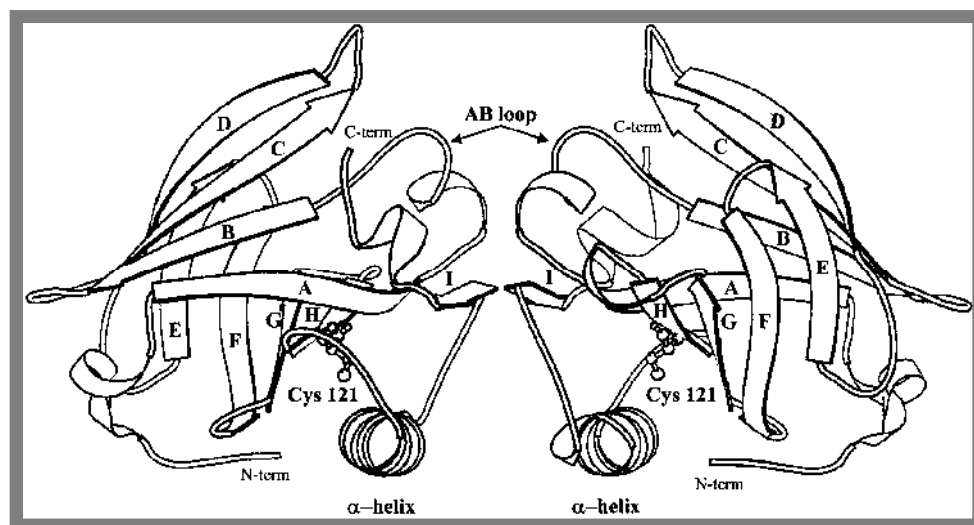
### 2.2.3. Proteínas del suero lácteo

Las proteínas de suero lácteo son ampliamente usadas como ingredientes funcionales en una amplia variedad de alimentos, destacan por su alto valor nutricional y sus propiedades químico-físicas únicas. La funcionalidad tecnológica y biológica de las proteínas está determinada en gran medida por sus características estructurales, incluyendo el tamaño molecular, la conformación, la composición y secuencia de aminoácidos, la carga neta, la distribución de carga, la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria y la flexibilidad molecular (Fox, 2003). También dependerán de factores extrínsecos como son la temperatura, fuerza iónica y el pH (Damodaran, 1996). Aproximadamente un 20 % del suero lácteo está formado por las proteínas de la leche, en un intervalo de concentración de 4 a 7 g/L, siendo la proteína mayoritaria la  $\beta$ -lactoglobulina, que se encuentra en una concentración de 3.7 g/L (Kinsella y col., 1984).

**$\beta$ -lactoglobulina bovina:** La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) es el principal componente del suero lácteo. Es una proteína globular relativamente pequeña formada por un monómero molecular de  $18,4 \times 10^3$  g/mol (Caessens y col., 1997). El apilamiento de sus nueve cadenas y los dos puentes disulfuro le confieren una estructura compacta resistente a las proteasas digestivas (Reddy y col., 1988) (Figura I.8).

La desnaturalización parcial de la proteína, da lugar a su exposición aumentando su reactividad para formar puentes disulfuro y contribuir a la oligomerización de la proteína (Hoffmann y col., 1997).

La conformación de la  $\beta$ -lg es sensible a cambios de pH y temperatura. Aún así, la  $\beta$ -Lg nativa es soluble en un amplio intervalo de pH debido a su gran estabilidad estructural y al elevado número de grupos hidrofílicos cargados y no cargados en su superficie, cuya hidratación crea fuerzas de repulsión lo suficientemente grandes como para contrarrestar la agregación vía interacciones hidrofóbicas, promovidas en el rango de pH próximo a su punto isoelectrico ( $pK_a$  5.2) (Damodaran, 1997).



**Figura I. 8** Estructura de la  $\beta$ -lactoglobulina basada en los datos de rayos X de Brownlow y col. (1997).

A pH ácido ( $<3.5$ ) la proteína se encuentra en su forma monomérica. Entre pH 4-5 se forman tetrámeros/octámeros reversibles que no dan lugar a cambios notables en la estructura secundaria. A pH 5.2-7.5 aparece como dímero, presentando por encima de 5.2, dominios electronegativos hidrofílicos y por debajo de este pH presenta un exceso de cargas positivas (Mounsey y col., 2008). Por encima de pH 7.5 se producen cambios conformacionales, se expone y ioniza un grupo carboxilo por monómero y se produce una gran exposición de residuos de tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) acompañado de una expansión molecular general, de la disociación del dímero en monómeros, del despliegue de los monómeros, de la agregación de moléculas y de un incremento de la reactividad del grupo tiol libre seguido de su transición (Kinsella y col., 1984; Bouhallab y col., 1999). En cuanto al efecto de la temperatura sobre esta proteína, entre 30-55°C la forma dimérica se disocia dando lugar a monómeros. Es termolábil entre los

50-90°C, pero la desnaturalización es reversible, siempre que no se superen los 65-70°C. Cuando se superan los 70°C, se producen cambios estructurales irreversibles que pueden dar lugar a la agregación de las moléculas, exponiéndose grupos nucleofílicos (SH y -NH<sub>2</sub>) hacia áreas hidrofóbicas (Kinsella y col., 1984; Bertrand-Harb y col., 2002).

### **3. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS QUITOSANOS MODIFICADOS EN ALIMENTACIÓN**

#### **3.1. Propiedades funcionales de los quito-oligosacáridos (COS)**

El quitosano se emplea en numerosas aplicaciones útiles en la industria alimentaria, siendo una de las más atractivas su uso en la conservación de alimentos. Estas aplicaciones pueden presentar dificultades por la baja solubilidad que presenta el quitosano. Por ello los COS desempeñan un papel fundamental en las propiedades biológicas que se le atribuyen al polímero. Debido a su baja viscosidad y al aumento de su solubilidad, estos pueden emplearse de forma eficiente por la actividad antimicrobiana que presentan frente a un amplio espectro de microorganismos (Lin y col., 2009a). Por tanto, es de destacar su potencial uso como agente antimicrobiano, además de cómo antioxidante o aditivo para mejorar el valor nutricional en alimentos (Shahidi y col., 1999).

##### **3.1.1. Actividad antioxidante**

La acumulación de radicales libres en el organismo afecta adversamente a la función y estabilidad de componentes celulares como son los lípidos, las proteínas y el ADN (Huang y col., 2006). Existen sistemas de defensa endógenos en el organismo como son las vitaminas y los sistemas de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa, que neutralizan a las especies reactivas y reparan los daños causados por ellas (Schaller, 2005). Sin embargo, debido al envejecimiento celular, a algunos desequilibrios fisiológicos, y al origen y desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales de carácter crónico, como la artritis reumatoide, aterosclerosis, cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Ferrari y Torres., 2003), estos sistemas de antioxidantes naturales llegan a ser cada vez

menos efectivos (Rafique\* y col., 2004; Huang y col., 2006). Por tanto, el uso de antioxidantes externos puede ser de gran importancia desde el punto de vista terapéutico para mantener un ambiente redox interno apropiado.

En este sentido, un antioxidante se define como aquel compuesto natural o sintético que, a bajas concentraciones respecto a una sustancia potencialmente oxidable, previene o retrasa la oxidación de la misma (Halliwell y Gutteridge.,1988). Teniendo en cuenta su mecanismo de acción los antioxidantes pueden clasificarse en:

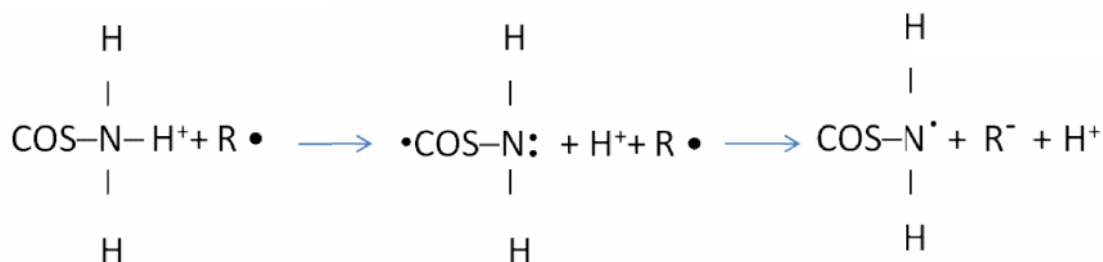
- antioxidantes de prevención: impiden la formación de radicales libres
- antioxidantes eliminadores (*scavengers*): neutralizan radicales libres al inhibir el inicio de la cadena o romper su propagación
- sistemas enzimáticos de reparación de síntesis de novo: reparan los daños producidos y reconstituyen la membrana celular.

Actualmente existen numerosas investigaciones que se centran en la extracción de antioxidantes de alimentos ricos en estos, como son las frutas, verduras y de plantas de uso medicinal. La búsqueda de antioxidantes naturales, tiene que ver con los efectos adversos que se han encontrado en algunos antioxidante sintéticos (Halliwell y col., 1995; Suh y col., 2003). Sin embargo, una de las limitaciones de la extracción de antioxidantes naturales en las fuentes que se comentaban, es que estos no se encuentran en cantidades substanciales.

Diversos compuestos biológicos, incluyendo carbohidratos, péptidos y algunos compuestos fenólicos han sido identificados como potentes secuestrantes de radicales libres. Dentro de los carbohidratos, el estudio de la actividad antioxidante de quitosano y derivados de este, está siendo objeto de estudio en numerosos trabajos de investigación en los últimos años (Chiang y col., 2000). La administración de quitosano soluble en agua como posible tratamiento en la resistencia al estrés oxidativo en un estudio *in vivo* ha sido sugerida por Anraku y col. (2009).

El mecanismo mediante el cual el quitosano y los COS presentan capacidad antioxidante no es aún muy claro, pero parece ser que se atribuye a los grupos amino y a los grupos hidroxilos unidos a carbono en las posiciones C-2, C-3 y C-6 del anillo de

piranosa (Park y col., 2003b; Kim y Rajapakse col., 2005; Xing y col., 2005). Xie y col. (2001) plantearon que podrían producirse tres mecanismos distintos en el atrapamiento de radicales libres: la reacción de los grupos hidroxilos del propio polisacárido con los radicales  $\bullet\text{OH}$ , la reacción de los grupos  $-\text{NH}_2$  con los radicales  $\bullet\text{OH}$  para formar radicales macromoleculares estables y la reacción de los grupos amino protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) con los  $\bullet\text{OH}$  a través de reacciones de adición. Chen y col. (2009), sin embargo, plantean el atrapamiento de radicales libres a través de los electrones de transferencia de los grupos amino y en concreto, relacionan la capacidad de atrapar DPPH por parte de los oligosacáridos de quitosano, como la capacidad de los COS para donar un electrón al radical DPPH con un electrón desapareado para unirse al DPPH. Dicho atrapamiento depende de los efectos de los diferentes tamaños de la densidad de la nube electrónica y por tanto la diferente accesibilidad entre el DPPH y los COS. Una alta densidad de la nube electrónica, aumentaría la capacidad para donar electrones, y a su vez esto aumentaría la capacidad de atrapar radicales y el poder reductor (Sun y col., 2008).



**Figura I.9.** Posible mecanismo de transferencia de electrones de grupos amino de los COS propuesto por Chen y col. 2009

Por otro lado, es conocida la importante acción del quitosano como agente quelante. Peng y col. (1998) mostraron que el quitosano retarda la oxidación lipídica mediante la quelación de iones  $\text{Fe}^{2+}$  presentes en el sistema a través de sus grupos amino o hidroxilos, eliminando así la actividad prooxidante de este metal o su conversión en iones ferricos  $\text{Fe}^{3+}$ . Como resultado se forma un complejo metal-polímero, mediante la donación de un par de electrones no enlazantes del nitrógeno de los grupos amino o del oxígeno de los grupos hidroxilos del quitosano a los iones del metal pesado (Kim y col., 2007).

Existen numerosas investigaciones relativas a la actividad antioxidante del quitosano y sus derivados en las que se tiende a establecer la relación de esta actividad con el  $M_w$  y el DA del quitosano. Parece ser que a menor  $M_w$  la actividad antioxidante del quitosano es mayor (Park y col., 2003a). Xing y col. (2005) mostraron como la actividad antioxidante del quitosano aumentaba a medida que se disminuía su  $M_w$  (760 a  $9 \times 10^3$  g/mol) y Je y col. (2004) encontraron una mayor actividad antioxidante en COS de  $M_w$   $1-5 \times 10^3$  g/mol frente a los de un  $M_w$  de  $5-10 \times 10^3$  g/mol y los de  $M_w$  por debajo de  $1 \times 10^3$  g/mol. En cuanto al efecto del DA los mismos autores han descrito que a menor DA mayor actividad antioxidante. Sin embargo, este efecto no parece estar tan claro. Un exceso de grupos amino cargados podría dar lugar a fuerzas electrostáticas de repulsión haciendo que aumentara el volumen hidrodinámico, con el consiguiente cambio de conformación por la extensión de la cadena del polímero (Kamil y col., 2002). Como consecuencia de este fenómeno existiría una menor actividad antioxidante por parte de estos grupos amino y una menor quelación debido a un mayor peso molecular del quitosano. Kim y Thomas (2007) y Zhu y col. (2004) atribuyeron la no actividad antioxidante de quitosano a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares debido al alto número de cargas en la molécula.

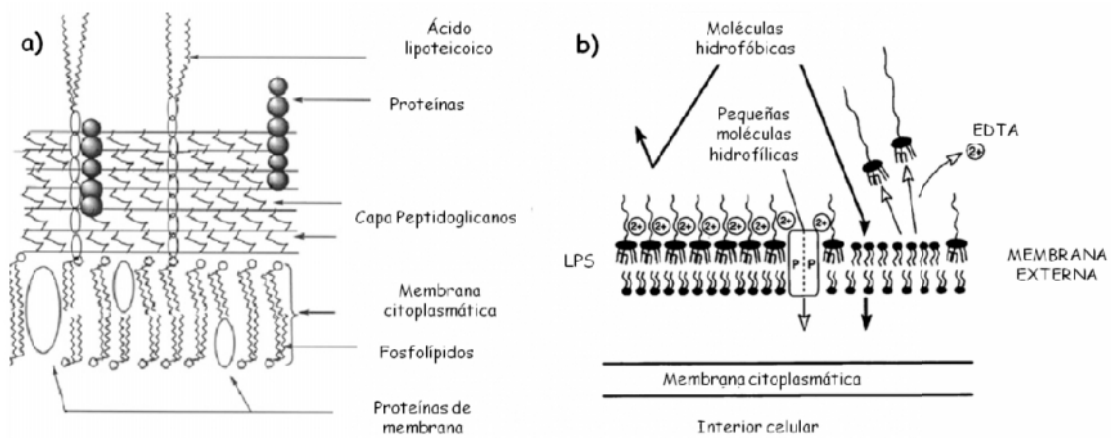
### **3.1.2. Actividad antimicrobiana**

El estudio del uso de quitosano como aditivo alimentario, conservante o componente de materiales de envasado viene utilizándose desde hace tiempo, ya que no sólo retarda el crecimiento de microorganismos patógenos, sino que además puede mejorar la calidad y la vida útil del alimento (Kim y Rajapakse., 2005). Es conocido el amplio espectro bactericida del quitosano desde que Allan y Hardwiger lo propusieron en 1979, y desde entonces, debido a su potencial uso desde el punto de vista comercial, ha atraído la atención de diversas investigaciones. Por ello, el efecto antimicrobiano de este polímero está bien documentado frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se han documentado intervalos de concentración mínima inhibitoria entre  $100-10.000 \text{ mgL}^{-1}$  para bacterias Gram-negativas (Helander y col., 2001) y de  $100-1250 \text{ mgL}^{-1}$  frente a bacterias Gram-positivas (No y col., 2002; Vishu Kumar y col., 2004b).

### 3.1.2.1. Mecanismo del efecto antimicrobiano

Se propone como mecanismo principal de la actividad antimicrobiana del quitosano y los COS la interacción electrostática entre la estructura de polication del quitosano y los componentes predominantemente aniónicos de la superficie del microorganismo (Kong y col., 2010). El posible efecto antimicrobiano que presenta el quitosano se va a ver afectado por factores químicos, físicos y biológicos, que incluyen la concentración de quitosano, el peso molecular promedio ( $M_w$ ), grado de acetilación (DA), pH, temperatura, salinidad, la presencia de cationes divalentes, el solvente en el que se encuentre disuelto el quitosano, el medio de suspensión, y la fase de crecimiento del microorganismo (No y col., 2002; Zheng y col., 2003; Lim y col., 2004). Debido a la diferente morfología de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, el mecanismo de actuación antimicrobiana presentado por el polímero va a ser diferente (Figura I.10).

- **Bacterias Gram-negativas:** Presentan pared celular y dos membranas lipídicas, una de ellas externa. La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS), proporcionándole a la bacteria carácter hidrofílico. Los lípidos y el núcleo interior de los LPS contienen grupos aniónicos (fosfatos y carboxilos), lo que contribuye a la estabilidad de la membrana mediante interacciones con cationes divalentes (Helander y col., 2001). La eliminación de esos cationes divalentes mediante agentes quelantes supondría la desestabilización de la membrana externa y la liberación de LPS. Esta membrana sirve como barrera de penetración contra macromoléculas y compuestos hidrofóbicos, haciendo a estas bacterias resistentes frente a antibióticos y compuestos tóxicos. Por tanto, vencer esa barrera es un requisito indispensable para cualquier material que quiera ejercer un efecto antimicrobiano (Kong y col., 2008).
- **Bacterias Gram-positivas:** Presentan una envoltura celular con una pared celular y una membrana citoplasmática. La pared celular se encuentra formada por una gruesa capa de peptidoglicanos (PG) y se une a la membrana citoplasmática mediante ácido lipoteicoico (TA). Los grupos aniónicos de glicerol fosfato del TA hacen a este ácido responsable de mantener la estabilidad estructural de la pared celular. La presencia de este ácido es también necesaria para mantener la acción de determinadas enzimas unidas a la membrana (Kong y col., 2010).



**Figura I.10.** Esquema de las envolturas celulares de a) bacterias Gram-positivas y b) bacterias Gram-negativas basado en esquemas propuestos por Kong y col. (2010).

La actividad antimicrobiana del quitosano y los COS va a depender de la morfología de la superficie bacteriana. Estas superficies son estructuralmente complejas y químicamente heterogéneas, por lo que no se pueden considerar como simples superficies esféricas. Algunas bacterias presentan apéndices de movilidad como los pilis, fimbrias o flagelos, e incluso aquellas bacterias que no tienen estos apéndices, pueden proyectar distintos tipos de polímeros desde su superficie como: LPS, ácidos micólicos, ácidos lipoteicos, polisacáridos capsulares y proteínas (Hancock, 1991). Estos polímeros están involucrados en interacciones con distintas superficies y pueden causar interacciones débiles de diferente naturaleza incluso desde largas distancias, como, por ejemplo, puentes de hidrogeno. La hidrofobicidad de la superficie es otro factor que juega un papel importante en las distintas interacciones que se producen, dando lugar a fenómenos de adhesión o floculación (Stranda y col., 2002). Son los grupos aniónicos presentes en la superficie bacteriana los responsables de establecer interacciones con el quitosano, o sus derivados. Algunas investigaciones han demostrado que, en el caso de bacterias Gram-positivas, existe una mayor carga electronegativa en la bacteria y una mayor absorción de quitosano, permitiendo un mayor efecto inhibitorio de este (Chung y col., 2004). A pesar de las diferencias estructurales entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, el efecto antimicrobiano producido por cualquier agente comienza con las interacciones con la superficie bacteriana, ya sea la pared celular o la membrana lipídica externa. En las bacterias

Gram-positivas las interacciones tienen lugar a través de los grupos aniónicos presentes en TA que interactúan con los grupos catiónicos del quitosano bloqueando así las funciones de la membrana lipídica (Raafat y col., 2008). En el caso de las bacterias Gram-negativas, los grupos catiónicos del quitosano compiten con los metales divalentes por el establecimiento de interacciones con los grupos aniónicos de los LPS y las proteínas de la membrana externa. Si el pH está por encima del pKa del quitosano o sus derivados, entonces se produce un efecto de quelación por parte del polímero. Como consecuencia del reemplazo de iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  se perturba la integridad de la pared celular o se interfiere en la actividad de las enzimas de degradación. Helander y col. (2001) demostraron la unión de quitosano a la membrana externa de bacterias Gram-negativas formando una estructura vesicular y causando la perturbación de la membrana externa y originando la pérdida de la propiedad de barrera.

Como consecuencia de estos fenómenos de desestabilización de interacciones en la envoltura celular, ya sean bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, se produce un cambio de permeabilidad de la membrana citoplasmática. Las proteínas de la membrana se pueden desnaturalizar y se puede producir la penetración del quitosano dentro de la bicapa fosfolipídica, con la consiguiente salida de sustancias intracelulares y la pérdida de estabilidad de esta membrana, provocándose así la muerte de la bacteria (Kong y col., 2008). Ikeda y col. describieron en 1984, la contribución de quitosano en cada uno de los procesos elementales de la secuencia de procesos que siguen los compuestos bactericidas: 1. Absorción en la pared celular 2. Difusión a través de la pared celular 3. Absorción en la membrana citoplasmática 4. Perturbación de la membrana citoplasmática 5. Salida de constituyentes de la membrana citoplasmática 6. Muerte celular. Cuando el quitosano o los COS entran en contacto con la membrana citoplasmática, probablemente interactúan con los fosfolípidos y las proteínas presentes en ésta (Chen y Cooper., 2002).

Las interacciones que se establecen entre los grupos catiónicos y los lípidos cargados negativamente pueden ocurrir de varias formas (Ostro, 1983 y Seki y Tirrell., 1984):

- Unión simple superficial producida por la atracción electrostática de cargas opuestas. Este tipo de interacciones se puede desestabilizar por el aumento de la fuerza iónica. Además, provoca un bajo impacto en la temperatura de transición de fase de los lípidos y la alteración de la permeabilidad de la membrana.
- Interacciones electrostáticas entre cargas opuestas y penetración del polímero en la bicapa fosfolipídica, causando expansión, disminución de la temperatura de transición de fase de los lípidos y alteración de la permeabilidad de la membrana.
- Penetración del polímero en la bicapa fosfolipídica y perturbación de la membrana citoplasmática, eliminando la capacidad de transición de fase de los lípidos. Se pueden producir micelas o agregados entre el polímero y los lípidos.

Chen y Cooper. (2002) plantean como probable, el último mecanismo antimicrobiano. Además, dentro de los efectos que producen la perturbación de la membrana otros trabajos de investigación, han demostrado la unión de quitosano o de sus derivados al ADN inhibiendo su transcripción (Shahidi y col., 1999; Tharanathan y col., 2003; Harish Prashanth y col., 2007) el bloqueo en el transporte de nutrientes (Tokura y col., 1997; Shon, 2001) y demostrándose la consiguiente muerte celular. (Papineau y col., 1991).

La actividad antimicrobiana de quitosano y sus derivados, se ha relacionado en algunos trabajos de investigación con el DA, mostrando que a menor DA esta actividad tiende a aumentar (Chen y col., 1998; Tsai y col., 2002; Takahashia y col., 2008). Vishu Kumar y col. (2007) relacionan la alta inhibición bacteriana de los COS con el bajo valor de DA (~14–19%), y por consiguiente con la protonación de los grupos amino del C2. Esto causa la unión con los grupos negativamente cargados de la pared celular dando lugar a la permeabilización de la membrana citoplasmática y su consiguiente perturbación. En cuanto a la influencia del  $M_w$  en la respuesta antibacteriana, se suelen proponer como rangos de  $M_w$  óptimos para desarrollar esta respuesta, los pesos moleculares intermedios comprendidos entre 5 y  $27 \times 10^3$  g/mol (Kittur y col., 2003b; Gerasimenko y col., 2004) dependiendo esto de forma considerable de la bacteria estudiada.

### 3.1.2.2. Bacterias patógenas intestinales: *Salmonella typhimurium* y *Clostridium difficile*

***Salmonella typhimurium***: Se trata de una bacteria Gram-negativa, móvil mediante flagelos peritricos, anaerobia facultativa y no esporulada. Se desarrolla entre 8-45° C y a un pH de 4 a 8; y no sobrevive a más de 70°C (Walker y col., 2000). Esta bacteria es capaz de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés durante largos periodos de tiempo, es capaz de resistir la deshidratación y vivir en condiciones de salmuera. *Salmonella* es uno de los géneros bacterianos que está asociado a brotes de enfermedades de origen hídrico, además de estar asociada a ciertos alimentos (Palacios y col., 1999). Provoca enfermedad diarreica bacteriana, como resultado de ingerir alimentos contaminados.

***Clostridium difficile***: Se trata de un bacilo Gram-positivo formador de esporas y anaerobio estricto. Forma parte de la flora intestinal normal de algunos individuos sanos y de pacientes hospitalizados. *C. difficile* es la causa más importante de diarrea nosocomial que desencadena en colitis pseudomembranosa, una infección del colon, que se produce como consecuencia de la erradicación de la flora saprófita por el uso extenso de antibióticos. Es considerada como una de las primeras causas de diarrea nosocomial en los países desarrollados (González-García y col., 2005).

Teniendo en cuenta la actividad antimicrobiana que se le atribuye al quitosano y a los COS frente a determinadas bacterias y a que cada vez más, se está estudiando la incorporación de quitosano o derivados de este en materiales de envasado de alimentos con el fin de retardar o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, resulta interesante estudiar su efecto frente a *S. typhimurium* como bacteria Gram negativa, sobre el crecimiento de la cual ya se ha probado el efecto de quitosano y sus COS (No y col., 2002; Kim y col., 2011). La actividad de estos mismos sobre una bacteria Gram positiva puede permitir ver si existen diferencias con respecto a su efecto sobre bacterias Gram negativas. Por otro lado, *C. difficile* puede formar parte de la microbiota intestinal de algunos individuos pudiendo provocar efectos negativos. En esta memoria también se han llevado a cabo estudios sobre el efecto del quitosano y los COS sobre algunas de las poblaciones de bacterias presentes en la microbiota intestinal.

### **3.1.3. Fermentación *in vitro*: efectos en la microbiota intestinal y producción de lactato y ácidos grasos de cadena corta**

Los polisacáridos no digeribles son frecuentemente fermentados por las bacterias del colon y pueden ser considerados como fibra alimentaria. La fibra alimentaria presenta todas las características requeridas para ser considerada un importante ingrediente en la formulación de alimentos funcionales debido a sus muchos efectos beneficiosos, entre otros, la posible estimulación de la proliferación de la microbiota intestinal y su potencial efecto prebiótico (Rodríguez y col., 2006). El término prebiótico fue establecido por Gibson y Roberfroid, que lo definieron por primera vez en 1995 (Gibson y col., 1995) como “ingredientes alimentarios no digeribles de los alimentos que van a ejercer un efecto beneficioso en el huésped porque estimulan de manera selectiva, el crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, lo que mejora la salud del huésped”. Todos los prebióticos actualmente conocidos son oligosacáridos no digeribles, a excepción de la inulina, polisacárido formado por moléculas de fructosa (Sanz y col., 2006). En concreto, los prebióticos de mayor importancia conocidos hasta ahora son los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina. Los oligosacáridos no digeribles, pueden encontrarse de forma natural en muchos alimentos principalmente en frutas, hortalizas, cereales y legumbres (Kuo y col., 1988). Sin embargo, estos alimentos no siempre se ingieren en cantidades suficientes para que los oligosacáridos que se encuentran en ellos ejerzan su posible efecto prebiótico. Por ello, los oligosacáridos que se emplean como prebióticos o se obtienen por extracción de fuentes naturales, o se sintetizan química o enzimáticamente desde los mono- o disacáridos, o bien se obtienen por hidrólisis enzimática de los polisacáridos (Crittenden, 1999). Entre los oligosacáridos más estudiados por su posible efecto prebiótico se encuentran: los galacto-oligosacáridos, la lactulosa, la lactosucrosa, los xilo-oligosacáridos, los malto-oligosacáridos, los isomalto-oligosacáridos y los oligosacáridos de la soja, entre otros (Rupérez, 1998; Rabiú y col., 2001; Sanz y col., 2006; Espinosa-Martos y Rúperez., 2006; Tenorio y col., 2010). Por otro lado, el aprovechamiento de subproductos proporciona una fuente muy rica en compuestos que pueden ser usados por sus aplicaciones tecnológicas y funcionales beneficiosas (Schieber y col., 2001), entre otras para la búsqueda de potenciales prebióticos.

En el caso de los oligosacáridos obtenidos a partir de quitosano, además de la importante actividad antimicrobiana que presentan (Tsai y col., 2002; Kittur y col., 2003a; Gerasimenko y col., 2004; Kim y Rajapakse., 2005; Kong y col., 2010). Lee y col. (2002) mostraron el posible efecto estimulante de los quito-oligosacáridos en el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus spp.* en cultivos puros. Sin embargo, Vernazza y col. (2005), en un estudio sobre la fermentación de quitosanos de distinto  $M_w$  y de una fracción de COS en cultivos mixtos de poblaciones bacterianas procedentes de material fecal humano, no observaron crecimiento de las poblaciones de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, e incluso el grupo *Clostridia*, considerado potencialmente negativo, se vio aumentado. Por otro lado, observaron un incremento en la producción de butirato, uno de los ácidos grasos de cadena corta que se producen como consecuencia de la fermentación y que tienen efectos fisiológicos beneficiosos sobre el organismo. Por ello, el efecto sobre la microbiota intestinal humana debería estudiarse en profundidad, ya que sólo existen estas publicaciones a este respecto.

### **3.1.3.1. Microbiota intestinal humana**

La actividad bioquímica de la microbiota intestinal interviene en la mejora de la biodisponibilidad de nutrientes y la degradación de compuestos de la dieta no digeribles; el aporte de nuevos nutrientes, y la eliminación de compuestos perjudiciales y antinutrientes. Estas funciones metabólicas van a depender de la composición de la flora intestinal y a su vez de sus complejas interacciones con la dieta y el organismo. Las bacterias que componen el tracto gastrointestinal humano presentan una gran variabilidad dependiendo del tramo del intestino, tanto en número como en composición de las especies que lo constituyen. Entre todas las especies bacterianas, algunas son patógenas y otras tienen efectos beneficiosos, por lo que el efecto sobre la salud puede ser positivo o negativo. De ahí la necesidad de mantener un equilibrio adecuado a favor de las bacterias positivas. Entre las bacterias negativas se encuentran *Clostridium* y *Veillonella* que originan sustancias potencialmente perjudiciales, tales como productos putrefactos, toxinas o carcinógenos. Entre las bacterias beneficiosas se encuentran las del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que desempeñan un papel básico en las funciones nutricionales y en la prevención de enfermedades (Gibson y col., 1995). Por ello, estas bacterias beneficiosas juegan un papel decisivo en la ecofisiología de la microbiota a nivel de colon, ya que se ha descrito que aumentan la resistencia a

infecciones y diarreas, estimulan la actividad del sistema inmune y actúan en la prevención del cáncer de colon (Macfarlane y col., 2008). Se ha demostrado que algunas bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* manifiestan una fuerte actividad antimutagénica y antitumoral en modelos animales, teniendo efecto profiláctico y terapéutico (Hosono y col., 1997), lo que se relaciona con el efecto sobre el sistema inmune como resultado de la composición química y estructural de los componentes de sus paredes celulares.

En el colon se lleva a cabo la fermentación anaeróbica de aquellos sustratos que no han sido digeridos en el intestino delgado. Entre esos sustratos se encuentra la fibra alimentaria, que es resistente a la acción de las amilasas pancreáticas y se degrada a oligómeros más pequeños y monosacáridos por enzimas bacterianas como las glicosidas, proteasas y amino peptidasas (Gibson y col., 1995). La fermentación de los carbohidratos mediante las bacterias sacarolíticas tiene lugar en el colon proximal produciéndose ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (MacFarlane y col., 2003).

### **3.1.3.2. Producción de lactato y ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)**

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) inhiben la síntesis de ADN y el crecimiento celular, ejercen modificaciones en el ADN como la acetilación, metilación y fosforilación entre otras, alteran la expresión génica, inducen la diferenciación celular y modifican la morfología y estructura celular. Aunque no son esenciales a nivel nutricional, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud y participan en la prevención de enfermedades (Marcil y col., 2002). Los SCFAs se absorben y metabolizan principalmente por los colonocitos. Su producción va a depender del número y tipo de microorganismos presentes en el colon, de la fuente de sustrato y del tiempo intestinal (Roberfroid, 2007). Los carbohidratos son los principales precursores de SCFAs y diferentes tipos de enzimas hidrolíticas que son sintetizadas por la microbiota intestinal para digerir estas sustancias y que se absorban (Macfarlane y col., 2008). Los principales SCFAs producidos por la fermentación de los carbohidratos son acetato, propionato y butirato (Cummings, 1995). El ácido láctico es un producto intermedio de la fermentación de los carbohidratos y se acumula solamente cuando se inhibe la producción de SCFAs en un medio ácido inferior a pH 5,5 (Soergel, 1994). El acetato es

el mayor SCFA producido y es el principal ácido graso de cadena corta que se encuentra en sangre y participa en la síntesis de colesterol. Se puede también utilizar en el tracto gastrointestinal por los tejidos periféricos y por bacterias para producir butirato en el colon (Duncan y col., 2002). El propionato pasa al torrente sanguíneo y es metabolizado en el hígado como precursor de la gluconeogénesis. Además, el aumento de su producción a través de la fermentación se asocia con una disminución de lípidos en sangre y con la inhibición de la síntesis de colesterol en el hígado. La relación propionato/acetato parece determinante en la acción de dichos SCFAs sobre los lípidos séricos puesto que dicha relación es la responsable de la mayor o menor producción de colesterol (Cheng y Lai., 2000; Wolever y col., 1996). En cuanto al butirato, este ácido graso es la principal fuente de energía para las células epiteliales del colon. El butirato está implicado en el control de todos los mecanismos que controlan la apoptosis, división y proliferación celular a nivel de colon (Cummings, 1981; Cummings, 1995) y participa en el mantenimiento de la barrera intestinal (Marcil y col., 2002), y junto con el propionato se relaciona con la prevención del cáncer de colon (Cummings, 1981; Bornet y col., 2002).

### **3.2. Propiedades funcionales de los quitosanos modificados mediante reacción de Maillard**

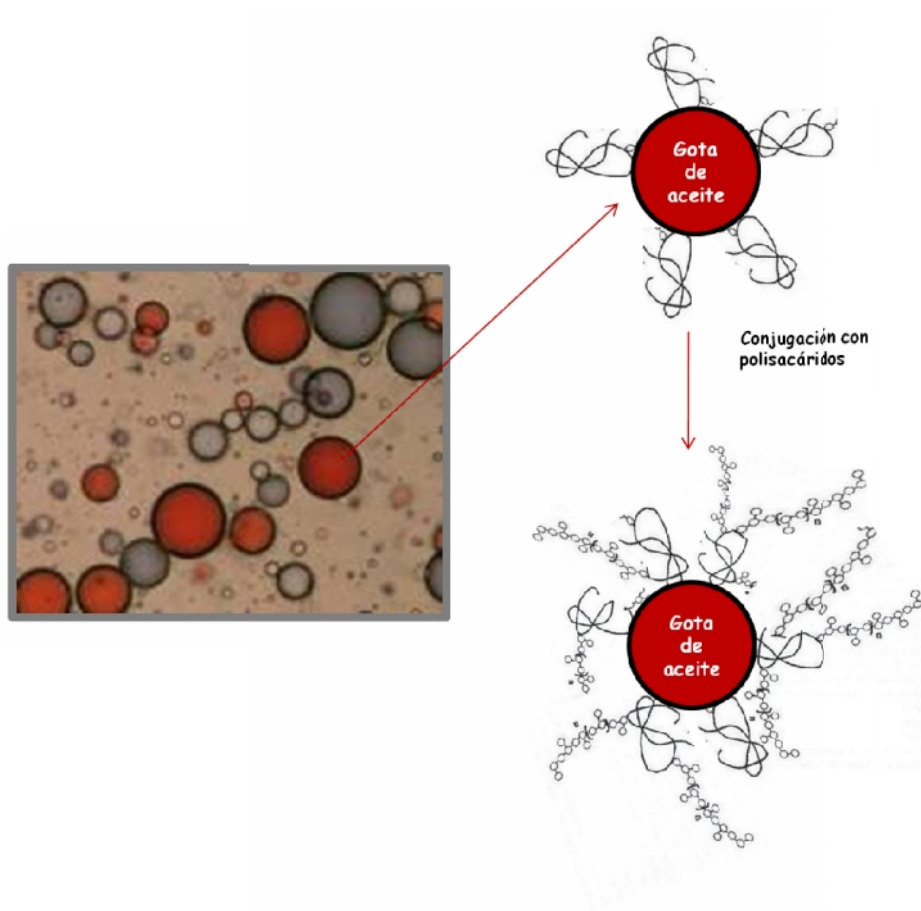
#### **3.2.1. Propiedades emulgentes**

El quitosano presenta propiedades emulgentes mediante la formación de emulsiones estables múltiples del tipo agua/aceite/agua (Schulz y col., 1998). Su carácter de polielectrolito anfifílico, debido a la presencia de moléculas con diferente grado de acetilación, le confiere dicha propiedad ya que combina mecanismos de estabilidad electrostáticos y de viscosidad que hacen que pueda emplearse como un emulgente sin la necesidad del uso de surfactantes (Rodríguez y col., 2000).

Una de las características que más notablemente se puede mejorar en proteínas por conjugación mediante reacción de Maillard son las propiedades emulgentes (Kato, 2002; Neiryneck y col., 2004 ; O'Regan y Mulvinill., 2010). En las emulsiones, la proteína forma una película interfacial y estabiliza al sistema frente la floculación y la

coalescencia. Las moléculas de proteína difunden y se absorben en la interfase aceite/agua y se despliegan e interaccionan para formar una película continua alrededor de las gotas de aceite. Los residuos hidrofóbicos de la proteína se orientan hacia la fase apolar del aceite mientras que los segmentos polares de esta se extienden en la fase acuosa, estando la mayoría de las moléculas ocupando la interfase y proporcionando solidez y viscosidad a la película (Kinsella y col., 1984). Las propiedades emulgentes de proteínas lácteas están de manifiesto en gran variedad de ingredientes alimentarios. Sin embargo, estas proteínas presentan algunas limitaciones. Así, la limitada hidrólisis enzimática de las proteínas del suero lácteo genera péptidos más anfifílicos, con menor estructura secundaria y más flexibles (Chobert y col., 1988; Segall y col., 1999). Estos hidrolizados difunden rápidamente y se absorben en la interfase aceite/agua, cubriendo un área más grande de la interfase que la proteína sola; y reducen el tamaño de las gotas en la formación de la emulsión. Sin embargo, estos hidrolizados son menos eficientes y estabilizadores a causa de su limitada capacidad para formar películas superficiales estables y así formar emulsiones que son más propensas a la floculación y coalescencia. Una alternativa para mejorar la formación de emulsiones es el empleo de agentes emulgentes que se absorben más rápidamente en la interfase aceite/agua, mientras que las proteínas son demasiado rígidas para absorberse, o estas son desplazadas parcialmente en la absorción. Como consecuencia de la adición de estos agentes se forma una película densamente empaquetada, pero menos rígida en la interfase, reduciendo la superficie, las tensiones superficiales y el tamaño de la gota de emulsión y mejorando la estabilidad de la emulsión. Desde el punto de vista industrial, el uso de agentes emulgentes en alimentos supone un coste adicional. Sin embargo, por otro lado el alto consumo y la alta demanda en el mercado de ingredientes funcionales a base de proteínas lácteas, está creando la necesidad de trabajar en el campo de las proteínas del suero lácteo para obtener ingredientes con propiedades funcionales, tales como la capacidad emulgente mejorada, para su utilización en algunos alimentos específicos en la industria alimentaria. Entre las modificaciones que están ganando aceptación como potencial modificación válida está la obtención de ingredientes mediante conjugación de polisacáridos a proteínas vía reacción de Maillard (Akhtar y Dickinson., 2003; Oliver y col., 2006).

Parece ser que, en el mecanismo de mejora de la capacidad emulgente en los conjugados formados entre la proteína y los carbohidratos, juega un papel importante el equilibrio entre el carácter hidrofóbico e hidrofílico de los conjugados, favoreciendo la difusión y adsorción de las proteínas en las interfases aceite/agua. Durante el proceso de formación de la emulsión los residuos hidrofóbicos de la proteína se anclan en las gotas de aceite mientras el carbohidrato del glicoconjugado atrae moléculas de agua alrededor de las gotas de aceite. De esta manera se consigue acelerar la formación de una película gruesa que estabiliza estéricamente la emulsión (Figura I.11), inhibiendo la coalescencia de las gotas de aceite (Sattar Khan y col.,1999).



**Figura I.11.** Efecto de la conjugación de proteínas con polisacáridos sobre las gotas de aceite de una emulsión.

Existen numerosos estudios de investigación de glicosilación de proteínas con carbohidratos que mejoran la capacidad emulsionante, en concreto la  $\beta$ -lactoglobulina se ha conjugado mediante reacción de Maillard con monosacáridos y disacáridos como la glucosa, la glucosa-6-fosfato, la galactosa, la manosa, la ribosa, la arabinosa, el gliceraldehído y la lactosa (Aoki y col., 1997; Nacka y col., 1998; Bouhallab y col.,

1999; Morgan y col., 1999a; Morgan y col., 1999b; Chevalier y col., 2001b; Fenaille y col., 2003). Por otro lado, se han mejorado también estas propiedades con el uso de polisacáridos como el quitosano, el dextrano, pectinas y otros polisacáridos (Dickinson y Galazka., 1991; Nagasawa y col., 1996; Dunlap y Côte., 2005; Miralles y col., 2007; Jiménez-Castaño y col., 2007; Matemu y col., 2009).

Se suele asociar la mejora de la actividad emulgente de los MRPs con los estados iniciales de la conjugación, y parece que luego decrece gradualmente en estados más avanzados donde se produce la degradación de los productos iniciales de la reacción dando lugar a una mezcla de productos de menor peso molecular o una variedad de distintos pesos (Li y col., 2009). Algunas investigaciones relacionan la mejora de la actividad emulsionante con la baja tensión superficial que presentan los conjugados de alto peso molecular entre la -Ig y la goma acacia (Schmitt y col., 2005), o entre la -Ig y el dextrano (Dunlap y Côte., 2005). Se supone que se produciría una mejora de la estabilidad interfacial, debida al incremento de hidrofiliidad aportado por los MRPs a la fracción de proteína que se orienta a la fase lipídica y cubre la superficie de las gotas de aceite (Diftis y Kiosseoglou., 2006). Sin embargo, otros trabajos de investigación han propuesto que la absorción retardada de MRPs de alto peso molecular en la interfase (Ganzevles y col., 2006) o el lento despliegue de la proteína en la interfase líquida (Thomas y col., 2004) podrían ser las causas de los bajos valores de actividad emulgente. Un producto con excesivo peso molecular podría cubrir una área insuficiente de la interfase (Dunlap y Côte., 2005; Wooster y col., 2006). Además los MRPs con alto peso molecular podrían participar en la lámina superficial de diferentes gotas de aceite, facilitando así su coalescencia (Diftis y col., 2005).

### **3.2.2. Actividad antioxidante**

El empleo de ingredientes funcionales con efectos antioxidantes beneficiosos es interesante además de por su efecto sobre el organismo como se ha descrito en el apartado 3.1.1, por el efecto que estos compuestos provocan en la conservación de los alimentos. La oxidación lipídica puede tener lugar durante la conservación o el procesado de los alimentos. Mediante la reacción de Maillard se puede mejorar la actividad antioxidante de las proteínas, dando lugar a la formación de productos que se podrían emplear como aditivos alimentarios o que, incluso se podrían formar durante el

procesado de los alimentos, manteniendo así la estabilidad frente a la oxidación (Bressa y col., 1996; Chevalier y col., 2001a). Entre las proteínas que presentan actividad antioxidante, la  $\gamma$ -lg es una ellas (Stadtman, 1993; Chevalier y col., 2001a; Hernández-Ledesma y col., 2008). Parece ser que el mecanismo antioxidante de las proteínas engloba el poder de atrapamiento de radicales libres y la capacidad de quelación de metales de transición prooxidativos (Liu y col., 2007). Se ha demostrado la reactividad de distintos aminoácidos frente al atrapamiento de radicales libres, mostrando ser la Cys la de mayor reactividad. Los grupos sulfhidrilos libres de Cys <sup>121</sup>, que son capaces de donar un hidrógeno, son los responsables de esta actividad antioxidante (Sharp y col. 2004).

Las propiedades antioxidantes *in vitro* de los MRPs producidos por el calentamiento de sistemas modelos de aminoácidos y azúcares han sido previamente estudiadas, demostrando esta actividad (Jayathilakan y Sharma., 2006; Maillard y col., 2007). Por otro lado, otros trabajos de investigación entre proteínas y carbohidratos de distinta naturaleza han demostrado mejorar la actividad antioxidante de la proteína (Nakamura y col., 1992; Chevalier y col., 2001a). Se relaciona la actividad antioxidante de los MRPs con las melanoidinas formadas en las últimas etapas de reacción, las cuales muestran una alta capacidad antioxidante a través de su capacidad para atrapar especies reactivas de oxígeno o capacidad para quelar metales (Yoshimura y col., 1997; Morales y col., 2001; Benjakul y col., 2005; Silvan y col., 2006). Delgado-Andrade y col. (2005) encontraron la mayor actividad antioxidante en melanoidinas de alto peso molecular formadas en estados avanzados de la reacción preparadas a partir de xilosa y glicina. Se asocia la actividad antioxidante de las melanoidinas con su capacidad para donar protones (Yen y col., 1995; Murakami y col., 2002; Morales y col., 2001; Calligaris y col., 2004; Benjakul y col., 2005; Sun y col., 2006). La capacidad reductora de estos productos también ha sido demostrada en numerosos trabajos de investigación entre xilosa-lisina (Yen y col., 1995), glucosa-glicina (Yoshimura y col., 1997), sacarosa-lisina (Wijewickreme y col., 1999) y proteína de plasma de cerdo-sacarosa (Benjakul y col., 2005). Se ha descrito que los grupos hidroxilo de los MRPs desempeñan un papel primordial en la actividad reductora (Yoshimura y col., 1997). Sin embargo, algunos autores relacionan la actividad reductora con productos formados en las etapas intermedias. Hwang y col. (2001) proponen que los productos que se forman a partir de la termólisis del compuesto de Amadori son los responsables de la capacidad reductora.

Además, se ha demostrado que las reductonas, y otros compuestos intermedios de bajo peso molecular de la reacción, pueden romper la cadena de radicales libres por donación de un átomo de hidrogeno (Eichner, 1981).

### **3.2.3. Propiedades gelificantes**

Las proteínas y polisacáridos desempeñan un papel fundamental en la estructura, textura y estabilidad de los alimentos. Es común el empleo de diferentes complejos formados por estos biopolímeros como espesantes, gelificantes y sistemas de protección y liberación de ingredientes bioactivos (Pérez y col., 2006).

Según la definición dada por Peppas en 1986 los hidrogeles son estructuras tridimensionales que tienden a hincharse en presencia de agua o fluidos biológicos. Los hidrogeles se forman mediante el entrecruzamiento de al menos un polímero de carácter iónico o hidrofílico para formar una estructura tridimensional. Se ha descrito la capacidad del quitosano para formar hidrogeles. El mecanismo de entrecruzamiento de un hidrogel de quitosano se puede mantener mediante enlaces covalentes (Roberts, 1989; Brugnerotto y col., 2001a; Berger y col., 2004), interacciones iónicas (Calvo y col., 1997), puentes de hidrogeno (Vachoud y col., 2001) o interacciones hidrofóbicas (Desbrieres, 2002). En el caso de que se produzcan interacciones físicas, el proceso de gelificación en polímeros se alcanza cuando existe un equilibrio entre las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas que dependerá de varios parámetros externos. El mecanismo de gelificación en el quitosano se ha atribuido a uniones físicas debidas a interacciones hidrofóbicas por parte de los grupos acetilados de las unidades de GlcNAc y a la formación de puentes de hidrogeno. Por ello, el parámetro responsable de que se produzca el fenómeno de la gelificación es la densidad de carga aparente. El grado de acetilación también tendría un papel importante en este proceso en los que a organización molecular y movilidad se refiere (Montembault y col., 2005). Se ha descrito que en quitosanos con un bajo DA por debajo del 25%, la densidad de carga inicial del polímero es alta y, el contenido de interacciones hidrofóbicas es bajo, puesto que la alta repulsión electrostática no favorece la formación de estas interacciones físicas. Por tanto, los puentes de hidrogeno jugarían un papel más importante en el mecanismo de gelificación (Montembault y col., 2005).

Por otro lado, es conocida la capacidad de las proteínas para gelificar, lo que se relaciona con su capacidad para adsorber humedad. La mejora de las propiedades gelificantes de proteínas globulares mediante calentamiento puede verse incrementada con la introducción de azúcares, y reduciendo la necesidad de una alta concentración de proteína (Hill y col., 1992). La gelificación en estas mezclas parece ser promovida por la reacción de Maillard, ya que un aumento en el entrecruzamiento covalente reduciría la solubilidad de la proteína (Kato y col., 1986). La formación de este entrecruzamiento e incluso la agregación proteica podrían mejorar la viscosidad y las propiedades gelificantes de las proteínas. Estas propiedades podrían alcanzarse llevando a cabo un control del avance de la reacción de Maillard, controlando el grado de polimerización y el entrecruzamiento. Así podrían obtenerse glicoconjugados que dieran lugar a soluciones viscosas, o incluso, que pudieran dar lugar a una estructura gelificada cuando se reconstituyeran las muestras (Oliver y col., 2006). Existen numerosas investigaciones de mejora de propiedades gelificantes en proteínas globulares entre las que se encuentran la  $\alpha$ -lg, la lisozima y proteínas de la clara de huevo (Cabodevila y col., 1994; Mishray col., 2001; Matsudomi y col., 2002; Li y col., 2005). Una mayor capacidad de retención de agua podría reflejar un aumento de la carga neta de la red tridimensional. Parece ser que un aumento en el grado de covalencia da lugar a geles más elásticos (Cabodevila y col., 1994). Sin embargo, según describen Knaul y col. (1999), si en la reacción de Maillard está teniendo lugar la formación de la base de Schiff, habría pocos grupos aminos disponibles y pocos hidrógenos, y por tanto no se podrían unir al agua, lo que reduciría su adsorción. La formación de grandes complejos insolubles de naturaleza covalente está relacionada con los estados avanzados de la reacción de Maillard (Chevalier y col., 2001a; Aoki y col., 2001).



## ***II. PLAN DE TRABAJO***

---



El objetivo que se plantea en esta memoria de tesis se llevó a cabo mediante el siguiente esquema de trabajo general, y que se resume en la Figura II.1:

1. Modificación de quitosano:
  - A) Despolimerización enzimática.
  - B) Reacción de Maillard con y sin  $\beta$ -lactoglobulina.
2. Caracterización químico-física de los quito-oligosacáridos (COS): Estudio de despolimerización enzimática, análisis estructural, determinación de peso molecular promedio ( $M_w$ ), análisis de grado de acetilación (DA) y distribución de residuos acetilados.
3. Estudio de interacción electrostática quitosano:  $\beta$ -lactoglobulina, estudio del pardeamiento y la solubilidad, y caracterización espectroscópica, electroforética y estructural de los compuestos típicos de la reacción de Maillard (MRPs).
4. Estudio de las propiedades funcionales de los productos obtenidos mediante las modificaciones propuestas.

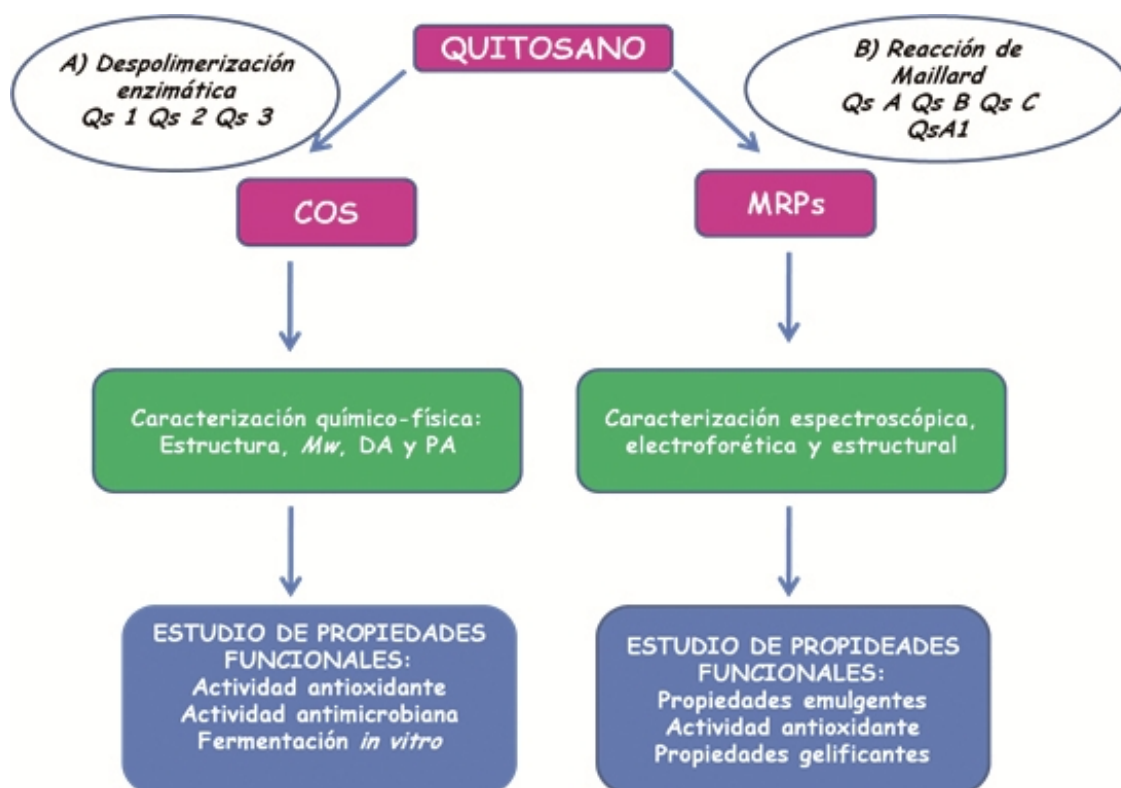


Figura II.1. Esquema general de plan de trabajo.



### **III. *MATERIALES Y MÉTODOS***

---



## 1. MUESTRAS

### 1.1. Muestras empleadas en la modificación del quitosano mediante despolimerización enzimática

La modificación mediante despolimerización enzimática se llevó a cabo en tres quitosanos de partida: **Qs 1**, **Qs 2** y **Qs 3** que se diferenciaban principalmente en su grado de acetilación. El Qs 1 fue suministrado por Novamatrix (Noruega). El Qs 2 fue obtenido previamente a este estudio en nuestro laboratorio mediante desacetilación heterogénea de quitina de centolla (*Lithodes antarcticus*). El Qs 3 se obtuvo mediante reacetilación a partir del Qs 1.

### 1.2. Muestras empleadas en la modificación del quitosano mediante reacción de Maillard.

La modificación mediante reacción de Maillard se realizó en quitosanos de grados de acetilación similares con diferente peso molecular promedio. Se partió de tres quitosanos distintos de origen comercial: **Qs A** (Laboratorios Beslan S.L), **Qs B** (Productos Químicos Gonmisol S.L) y **Qs C** (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Además se empleó el **Qs A1** obtenido por despolimerización enzimática con quitosanas a partir de Qs A y ultrafiltrado mediante membranas de corte de 5 y 10 x 10<sup>3</sup>g/mol. La **-lactoglobulina** (mezcla de variantes A y B) fue suministrada por Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Todos los quitosanos, previamente a su utilización, fueron purificados y caracterizados como se describe en los métodos que se presentan a continuación. Los resultados de sus características químico-físicas se expresan en el apartado correspondiente de Resultados y Discusión.

## 2. PURIFICACIÓN DEL QUITOSANO

La purificación de las muestras de quitosano empleadas se llevó a cabo mediante disolución de estas en ácido acético 0.5M al 0.5 % (p/p). A continuación se filtraron las soluciones secuencialmente a través de filtros Álamo de vidrio con membranas de tres tamaños de poro diferentes: 250-160  $\mu\text{m}$ , 100-40  $\mu\text{m}$  y 16-10  $\mu\text{m}$ . Una vez filtradas las soluciones, se precipitaron con NaOH al 10% (p/p) hasta alcanzar un pH 8. Se centrifugaron las muestras para la eliminación del sobrenadante y el quitosano precipitado se lavó con mezclas sucesivas de EtOH: H<sub>2</sub>O en proporción 70:30, 80:20 y 90:10 hasta alcanzar la neutralización. Por último el quitosano se dejó secar en estufa a 50 ° C y se pulverizó mediante el empleo de un molinillo eléctrico para su posterior uso en las diferentes aplicaciones.

## 3. REACETILACIÓN DEL QUITOSANO

La reacetilación fue llevada a cabo en el Qs 1 disuelto al 1 % (p/v) en ácido acético 0.5M. Esta disolución se llevó a una concentración final de 0.5% mediante la adición de 1,2-propanodiol. A continuación, teniendo en cuenta el DA del quitosano de partida, se añadió una cantidad estequiométrica de anhídrido acético disuelto en una pequeña cantidad de 1,2-propanodiol hasta alcanzar el DA deseado. Después de agitar durante una hora y media para que tuviera lugar la reacción se precipitó el quitosano con NH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O al 30% (p/v). El quitosano precipitado se centrifugó para la eliminación del sobrenadante y se lavó con mezclas sucesivas de EtOH:H<sub>2</sub>O en proporción 70:30, 80:20 y 90:10 hasta alcanzar la neutralización. El quitosano se dejó secar en estufa a 50°C y se pulverizó a continuación.

## 4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FÍSICA DEL QUITOSANO

Las características químico-físicas del quitosano son las que proporcionan sus propiedades funcionales, y por lo tanto van a influir en las posibles aplicaciones que se le pueda dar a este polímero. Es por ello que deben ser determinadas con precisión para aplicar eficazmente el quitosano en cada uso particular.

#### 4.1. Determinación del grado de acetilación (DA). Espectroscopia ultravioleta-visible (método de la primera derivada)

La determinación del grado de acetilación (DA) de las muestras de quitosano y quitooligosacáridos empleadas se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico UV-visible de la primera derivada propuesto por Muzzarelli y col. (1997). El método se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro marca Specord 205 Analytikjena (Jena, Germany). La curva de calibrado se realizó con cuatro disoluciones de N-acetilglucosamina de 10, 20, 30 y 40 ppm en ácido acético 0.01M. Simultáneamente se prepararon tres disoluciones de ácido acético de 0.01M, 0.02M y 0.03M. El barrido de absorbancia de todas estas disoluciones se llevó a cabo entre las longitudes de onda de 190 y 240 nm. Una vez obtenida la curva de calibrado se disolvieron las muestras en ácido acético 0.01M en concentración 0.1 % (p/v). Las medidas de grado de acetilación se realizaron por triplicado. El grado de acetilación (DA) se calcula con esta concentración según la ecuación:

$$DA = \frac{[GlcNAc]}{[Quitosano]} * 100$$

#### 4.2. Determinación del peso molecular promedio

La determinación de peso molecular promedio de los quitosanos se realizó mediante el empleo de distintas técnicas: viscosimetría cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación analítica.

##### 4.2.1. Viscosimetría

La viscosidad intrínseca se midió en los quitosanos a partir de una solución al 0.1% (p/v) en solvente Roberts 0.1M AcH/0.2M NaCl (Roberts y col., 1982) empleando un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde acoplado a un aparato de medición ViscoClock (Schott-Geräte, Germany) en un baño de agua termostatzado a temperatura constante de 25°C. Se utilizó un capilar modelo N°.525.20/II de 1.03 mm de diámetro. Se procedió midiendo la viscosidad cinemática y calculando la viscosidad intrínseca según Wang y

col. (1991) y Argüelles y col. (2004). El peso molecular promedio viscoso  $M_v$ , se calculó con la ecuación de Mark-Houwink-Kunh-Sakurada. Los valores de las constantes para las soluciones de quitosano en el solvente 0.1M AcH/0.2M NaCl en esta ecuación son  $a=0.93$  y  $K_m=1.81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$  (Roberts y col., 1982).

$$[\eta] = K_m \times M_v^a$$

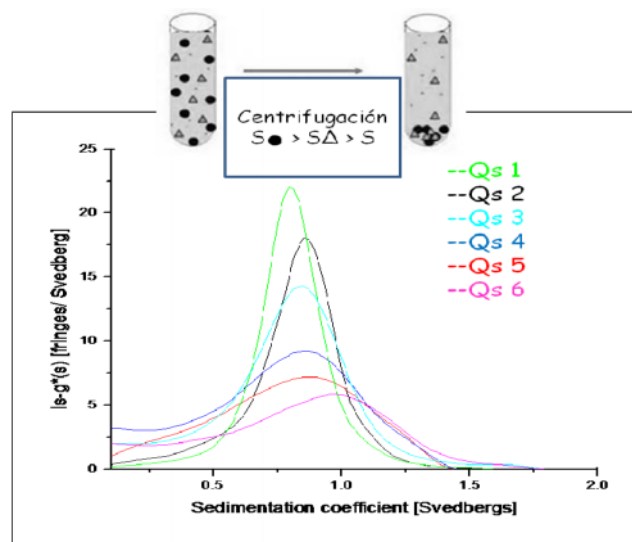
#### **4.2.2. Cromatografía de exclusión molecular (GPC o SEC)**

La cromatografía de exclusión molecular GPC (Gel Permeation Chromatography) o SEC (Size Exclusion Chromatography), permitió la determinación de la distribución de peso molecular promedio de los distintos quitosanos empleados. El sistema cromatográfico que se empleó estaba constituido por una bomba IsoChrom LC (Spectra Physics, Irvine CA, USA) conectada con dos columnas acopladas en serie: Protein Pack glass 200 SW y TSK gel 6000 PW. Los detectores empleados conectados en línea fueron: un detector de índice de refracción R 410 (Waters, Massachusetts USA) y un detector MALLS (Multi-Angle Laser-Light Scattering) (Wyatt Dawn DSP, Santa Barbara USA). Como eluyente se utilizó tampón 0.15M acetato de amonio/ 0.2M ácido acético pH 4.5 filtrado previamente mediante filtros de membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0.2 $\mu\text{m}$  (Millipore, MA USA). Las muestras de quitosano se prepararon en concentración 0.05 % (p/v) y fueron filtradas mediante filtros de jeringa de acetato de celulosa de tamaño de poro 0.45 $\mu\text{m}$  (Millipore) antes de inyectarse 120  $\mu\text{L}$ . El flujo se mantuvo constante a 0.5 mL/min.

#### **4.2.3. Ultracentrifugación analítica: Experimento de equilibrio de sedimentación**

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo mediante la utilización de una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I (Beckman Instruments, Palo Alto, USA). Se prepararon disoluciones de las muestras en un intervalo de concentraciones de 0.04-0.1% en tampón acético/acetato de sodio pH 4.3. A continuación 95  $\mu\text{L}$  de la muestra y 100  $\mu\text{L}$  del mismo tampón en el que fueron

disueltas, se inyectaron en los canales de doble sector de 12 mm de longitud de paso óptico de la muestra y de referencia respectivamente. La centrifugación se llevo a cabo a 8000 rpm a una temperatura de 20°C (Harding, 1995). Los perfiles de concentración en función del movimiento de la línea divisoria de sedimentación en la célula de ultracentrifugación analítica fueron registrados usando un sistema óptico de interferencia Rayleigh basado en medidas de índice de refracción y de detección en el UV a 280 nm. Los datos se analizaron usando el algoritmo de MSTARI (Cölfen y col., 1997) para obtener el peso molecular promedio.



**Figura. III.1** Ejemplos de perfiles de coeficientes sedimentación de diferentes quitosanos determinados mediante experimentos de equilibrio de sedimentación.

## 5. MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO POR DESPOLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA

### 5.1. Condiciones de despolimerización

Las enzimas utilizadas en las reacciones de despolimerización fueron; lisozima de clara de huevo de gallina (EC 3.2.1.17), y quitosanas (EC 3.2.1.132) de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las condiciones de reacción empleadas fueron seleccionadas en función de estudios previos de nuestro laboratorio (Galed,

2005b). Para ello se disolvieron los quitosanos purificados en concentración 0.5% (p/v) en tampón acético-acetato de sodio 0.2M con diferente pH en función de la enzima empleada. Una vez que el quitosano fue preincubado según condiciones de temperatura y agitación mecánica, se añadió la concentración de enzima correspondiente a la relación de enzima: sustrato. Se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 1, 24, 48, 72 y 96 horas para quitosanasa y 0, 2, 72, 72 y 144 horas para lisozima) y se determinó la viscosidad reducida. Posteriormente se detuvo la actuación enzimática mediante el calentamiento a 100°C durante 10 minutos. En el caso de lisozima se repuso la misma cantidad de enzima a los tres días de reacción (Tabla III.1).

**Tabla III.1.** Condiciones seleccionadas de depolimerización enzimática a partir de quitosano empleando como enzimas quitosanasa y lisozima.

	Quitosanasa	Lisozima
Concentración enzima (mg/mL)	$3.48 \times 10^{-3}$	$62.7 \times 10^{-2}$
Relación E:S	1:10	1:100
Tiempo de incubación (días)	4	7
pH tampón AcH/AcONa	5.7	4.5
Condiciones de incubación	37°C 100rpm	37°C 100rpm

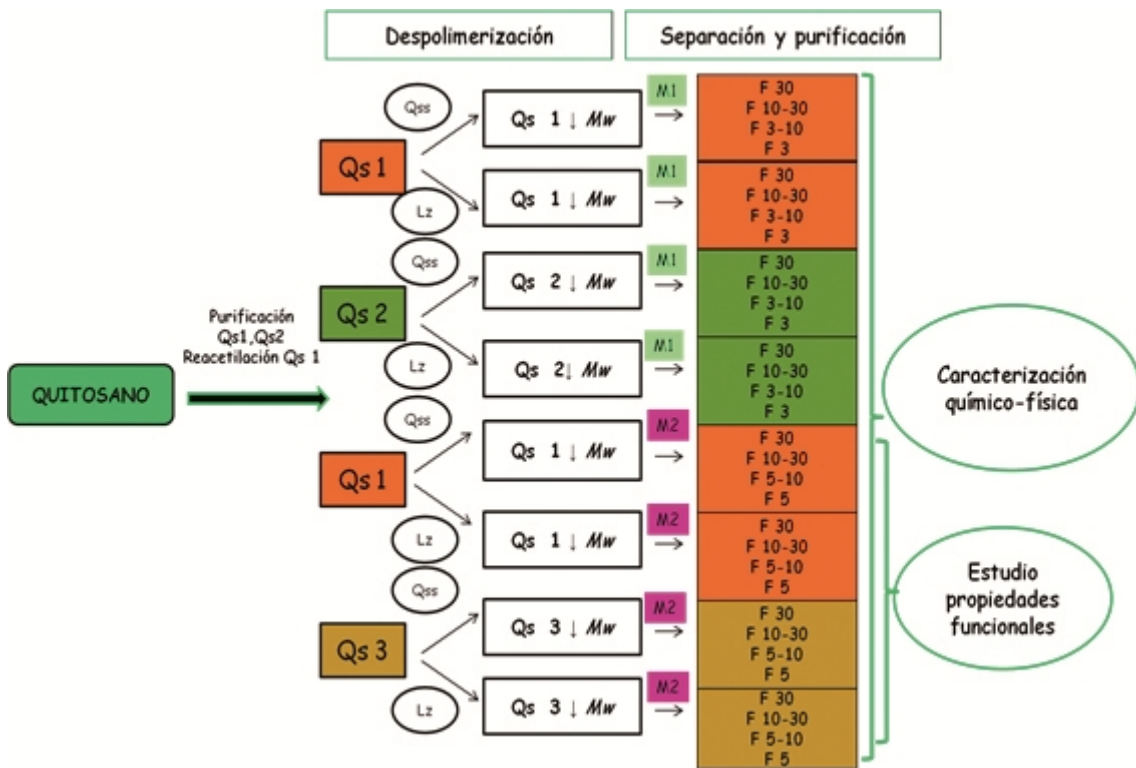
Se realizó el seguimiento de la despolimerización enzimática mediante viscosimetría. Para ello se empleó el mismo viscosímetro descrito en el apartado 4.2.1 y se midió la viscosidad reducida de cada una de las alícuotas tomadas en concentración 0.5% (p/v).

## 5.2. Separación y purificación de los COS

Una vez se detuvo la despolimerización enzimática mediante el calentamiento a 100 ° C de las soluciones de Qs 1 y Qs 2, se procedió a separar los COS obtenidos a partir de estos quitosanos en fracciones con distinto rango de peso molecular promedio según el **método 1**. Para ello, se empleó una célula agitadora de ultrafiltración Amicon (Modelo

8050 Millipore) en la que se acoplaron membranas de acetato de celulosa de cortes de tamaño molecular de 30, 10 y 3 x 10<sup>3</sup> g/mol (Millipore Corporation, Beverly, MA, USA). Los volúmenes de las fracciones retenidas se lavaron dos veces con cuatro volúmenes más de agua Milli-Q®. Posteriormente las soluciones se atomizaron empleando un atomizador Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Switzerland). Se utilizaron las siguientes condiciones de atomización: flujo de aire 473 NL h<sup>-1</sup>, flujo de pulverización 32m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> y temperatura de entrada (inlet) 160°C.

A continuación se muestra el esquema de trabajo para la obtención y la caracterización de las distintas fracciones de oligosacáridos de quitosano (Figura III.2).



**Figura III.2.** Esquema de trabajo de la obtención de quito-oligosacáridos por despolimerización con Qs (quitosanasa) y Lz (lisozima) mediante M1(método 1) y M2 (método 2).

La separación y purificación de los COS obtenidos a partir de una nueva despolimerización se llevó a cabo según el **método 2**. La separación en este caso fue a través de un sistema de ultrafiltración tangencial basado en un concentrador (Sistema Vivaflow 200), al que se le acoplaron membranas de Polietersulfona (PES) de baja

adsorción inespecífica de tamaños de corte molecular de 30, 10 y  $5 \times 10^3$  g/mol. Las fracciones de oligosacáridos retenidas se lavaron con cuatro volúmenes más del tampón correspondiente en el cual se encontraban disueltas y posteriormente fueron dializadas mediante membranas de diálisis (Medicell International Ltd) de tamaño de poro de 12-14, 7 y  $3.5 \times 10^3$  g/mol dependiendo de la fracción obtenida. Para F 30 se utilizó la de 12-14  $\times 10^3$  g/mol, para F 10-30 la de  $7 \times 10^3$  g/mol y para la F 5-10 y F 5 se usó la de  $3.5 \times 10^3$  g/mol. Las diálisis se llevaron a cabo a  $4^\circ\text{C}$  frente a agua destilada y se cambió el agua cada 8 horas hasta completa eliminación de las sales. Una vez dializadas las soluciones se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  y fueron liofilizadas.

### **5.3. Caracterización químico-física de los quito-oligosacáridos (COS)**

La caracterización consistió en un análisis estructural, la determinación del peso molecular promedio, del grado de acetilación y el análisis del patrón de distribución intramolecular de grupos acetilados.

#### **5.3.1. Análisis estructural**

Se llevaron a cabo experimentos de  $^1\text{H-NMR}$  y  $^{13}\text{C-NMR}$ . Para ello las muestras se disolvieron en una mezcla de  $\text{DCI} / \text{D}_2\text{O}$  al 1% (p/v) y se dispusieron en tubos de RMN de 5mm. Se utilizó TSP (sodio 3-(trimetilsilil)-propionato- $\text{d}_4$ ) como patrón interno. Las medidas para los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro AMX 500 (Bruker Ettingen, Alemania) . Las condiciones de adquisición fueron un tiempo de adquisición de 2 s y número de scans 128 para los experimentos de  $^1\text{H-NMR}$  y una frecuencia de 125,77 MHz; tiempo de adquisición 3 s y número de scans 17000 para los experimentos de  $^{13}\text{C-NMR}$ .

#### **5.3.2. Determinación del peso molecular promedio**

En cuanto al peso molecular promedio y las distribuciones de peso molecular para los COS se determinaron por cromatografía de exclusión molecular (GPC), mediante sistemas cromatográficos distintos. El peso molecular promedio de los COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 2 mediante el método 1, se analizó según el método descrito en el

apartado 4.2.2. Para el análisis de los COS obtenidos de la despolimerización de Qs 1 y Qs 3 separados según el método 2 se describe a continuación el procedimiento empleado.

El sistema cromatográfico utilizado en este caso estaba constituido por una bomba Waters 625 LC System conectada con una columna Ultrahydrogel (Waters, i.d.=7.8mm, l=300 mm) termostaticada en un horno a 35°C. Los detectores empleados fueron un índice de refracción (Waters 2414) acoplado en línea con un Evaporative Light Scattering (ELS Waters 2424). Como eluyente se utilizó tampón 0.15M acetato de amonio/0.2M ácido acético pH 4.5, filtrado previamente mediante filtros de membrana de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0.2µm (Millipore) y desgasificado con helio. Las muestras de los COS se prepararon en concentración 0.05% (p/v) y fueron filtradas mediante filtros de jeringa de acetato de celulosa de tamaño de poro 0.45µm (Millipore) antes de inyectarse 20 µL de la misma. El flujo se mantuvo constante a 0.6 mL/min. Se utilizaron estándares de quitosano con un promedio de peso molecular conocido para el cálculo de peso molecular promedio de los oligosacáridos de quitosano.

### **5.3.3. Determinación del grado de acetilación**

El grado de acetilación de todos los COS se determinó por espectroscopía UV/VIS mediante el método de la primera derivada descrito en el apartado 4.1.

### **5.3.4. Análisis del patrón de distribución intramolecular de grupos acetilados**

Este análisis se llevó a cabo mediante espectrometría de masas de ionización láser asistida por matriz MALDI-TOF-MS. El análisis de los COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 2 según el método 1. Se realizaron en un equipo Bruker Reflex II (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) equipado con láser pulsado de nitrógeno ( $\lambda = 337\text{nm}$ , 3 ns de anchura de pulso y 3 Hz de frecuencia). Para ello, se depositó la muestra en una placa de acero junto con la matriz (ácido dihidroxibenzoico disuelto en metanol) en proporción 1:1 dejándose co-cristalizar a temperatura ambiente. Los espectros de masas fueron adquiridos en modo positivo lineal. Para el análisis de los COS obtenidos según el método 2 a partir de Qs 1 y Qs 3 se utilizó un espectrómetro de masas de Tiempo de Vuelo MALDI-TOF/TOF Bruker modelo Ultraflex. La muestra se preparó de la misma

manera. Las masas obtenidas para las distintas subunidades acetiladas y desacetiladas se compararon con las calculadas teóricamente.

## **6. MODIFICACIÓN DEL QUITOSANO MEDIANTE REACCIÓN DE MAILLARD**

### **6.1. Formación y purificación de los productos de la reacción**

Los quitosanos se disolvieron en ácido acético 0.1 M y la -lg en agua destilada. Se ajustó el pH a 6 con NaOH al 10% (v/v) y se repartió la disolución en viales para su congelación a -80°C para su posterior liofilización. En el caso de utilizar -lg, las disoluciones se mezclaron en proporción Qs: -lg 2:1. Una vez liofilizadas las muestras se dispusieron en los viales en un desecador en el interior de una estufa a 40°C y con una humedad relativa del 79% mediante KBr saturado. Los quitosanos sin proteína se sometieron a las mismas condiciones. Se tomaron muestras a tiempo 0, 2, 4 y 7 días y la reacción se detuvo introduciendo las muestras en el congelador a -20°C. Para la purificación de los productos formados se procedió a su redisolución al 0.1% en agua. Puesto que tuvo lugar la formación de material insoluble, éste fue retirado mediante la centrifugación de las muestras a 18000g y 20°C durante 1 hora. El sobrenadante se decantó y fue filtrado por filtros de membrana de nitrato de celulosa de 11µm. A continuación con el fin de separar el quitosano y la proteína no unido, las muestras fueron ultrafiltradas mediante una célula agitadora Amicon (Centricon, Amicon Inc., Beverly, MA, USA) utilizando una membrana de acetato de celulosa de corte de 30 x 10<sup>3</sup> g/mol. El material retenido fue llevado hasta un volumen de 10 mL y se lavo con agua Milli-Q® dos veces. Posteriormente este material soluble se liofilizó.

### **6.2. Estudio de la interacción electrostática entre el quitosano y la lactoglobulina**

La determinación de potencial zeta se llevó a cabo mediante espectroscopía de correlación fotónica empleando un Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania). Las muestras se disolvieron en agua en concentración 0.25% (p/v) y se

filtraron por filtros de jeringa de acetato de celulosa de tamaño de poro 0.45 $\mu$ m. La medida del potencial zeta se realizó utilizando cubetas desechables DTS 1060 (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania), con un voltaje efectivo de 150V y a 25°C. El equipo proporcionó datos de movilidad electroforética ( $U_E$ ) que fueron traducidos automáticamente a valores de potencial zeta usando la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa \cdot a)}{3\eta}$$

Donde  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica,  $\zeta$  el potencial zeta,  $\eta$  la viscosidad y  $f(\kappa \cdot a)$  la función de Henry. La unidad de  $\kappa$ , distancia de Debye, es la recíproca de la distancia, y generalmente se toma  $\kappa^{-1}$  como el grosor de la doble capa eléctrica. El parámetro  $a$  es el radio de la partícula y por tanto  $\kappa \cdot a$  es la relación del radio de la partícula con la doble capa eléctrica. El valor de potencial zeta fue comparado con respecto a proteína y cada uno de los quitosanos control.

### 6.3. Estudio del pardeamiento

Se llevó a cabo la determinación de color de los productos obtenidos tras la reacción empleando un colorímetro Chromameter CR 300 (Minolta, Japon) aplicando la escala CIE Lab. Este es un sistema internacional estandarizado para medir el color teniendo en cuenta al observador y la fuente de luz. Mide la emisión reflejada de colores independiente de la luz que los rodea y calcula los parámetros del color en tres ejes del espacio  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Donde  $L^*$  se refiere a la luminosidad en un intervalo desde 0 (negro) hasta 100 (blanco),  $a^*$  para el color y la saturación en el eje rojo-verde y  $b^*$  para el color y la saturación en el eje azul-amarillo (Hunter, 1942) (Figura III.3).



**Figura III.3.** Escala CIE Lab aplicado a los productos de reacción de Maillard mediante el software del colorímetro Chromameter CR 300 (Minolta, Japon).

A partir de estos parámetros se determinó el índice E según la ecuación:

$$E = (L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$$

También se determinó el parámetro c, que indica el grado de saturación, pureza o intensidad del color visual y es definido como la distancia desde el color gris al tono cromático puro, según la ecuación:

$$c = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

Por otro lado, se llevo a cabo la determinación visual de coloración realizando fotografías de los productos de reacción sobre fondo blanco y se compararon.

#### **6.4. Estudios de solubilidad de los productos resultantes**

Una vez separado por centrifugación el material insoluble, este se lavó con agua destilada con una nueva centrifugación a 18000g y 20 °C durante 30 minutos. El material insoluble se liofilizó y se determinó el material soluble por diferencia de pesada. La solubilidad se expresó como porcentaje de material soluble.

#### **6.5. Cuantificación de grupos amino protonados libres**

La determinación de grupos amino libres protonados en los productos solubles de reacción se llevó a cabo mediante el método descrito por Muzzarelli (1998) y modificado por Miralles y col. (2011). Para ello se preparó una solución tamponante pH 3.2, pesando 1.87 g de glicina y 1.46 g de NaCl, y enrasando hasta un volumen final de 250 mL. A esta solución se le añadió HCl 0.1M hasta ajustar el pH a 3.2. Por otro lado se preparó una solución de colorante (Cibacron Brilliant Red 3B-A), en concentración 0.15% (p/v). De la solución madre de colorante se preparó una dilución 1/20 (v/v), para tener una concentración de  $7.5 \times 10^{-3}$  % (p/v). Se preparó una solución de quitosano en concentración 0.5% (p/v) en ácido acético 0.1M, se filtró por 0.45  $\mu$ m y se diluyó 1/10 hasta alcanzar una concentración de 0.05 % (p/v). La solución resultante se utilizó para preparar una curva patrón a partir de sucesivas diluciones de la misma, entre 2.3  $\mu$ g/mL y 37.9  $\mu$ g/mL. La muestra problema se analizó empleando una concentración teórica del 15.15  $\mu$ g/mL. Se filtró por 0.45  $\mu$ m, y se tomaron 100  $\mu$ L de esta solución, a la cual se le añadió solución tamponante pH 3.2 hasta un volumen de 300  $\mu$ L. Después se le añadieron 3 mL de solución colorante, y se midió su absorbancia a 575 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **6.6. Estudio de formación y caracterización estructural de los glicoconjugados entre el quitosano y la $\alpha$ -lactoglobulina**

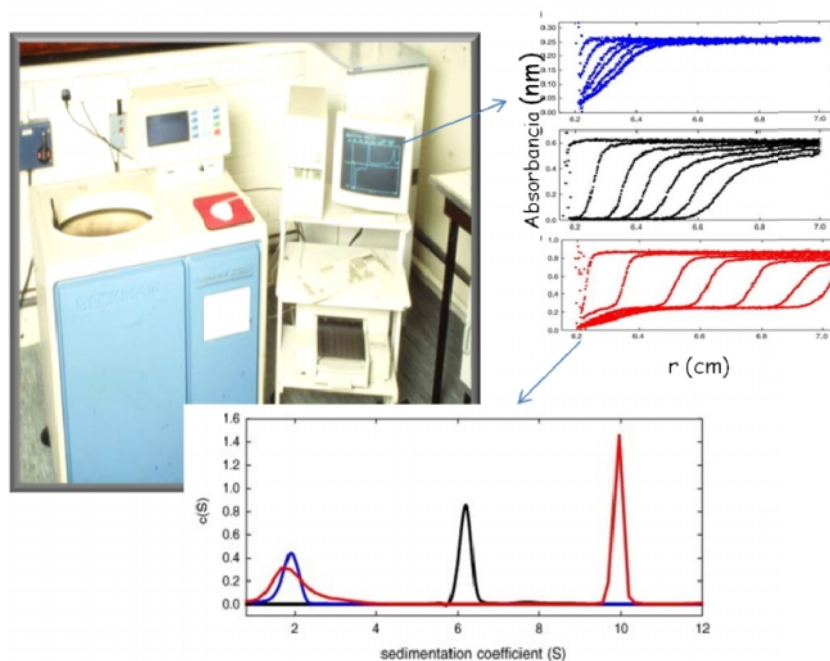
##### **6.6.1. Perfiles electroforéticos de los glicoconjugados (SDS-PAGE)**

En la electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS-PAGE se prepararon geles separadores al 15% de acrilamida y geles concentradores al 5% de acrilamida, según el

método propuesto por Laemmli (1970). Las muestras se disolvieron en agua destilada en concentración 0.25% (p/v). De esta solución se tomó una alícuota a la cual se añadió en una relación 4:1 el tampón de carga de la muestra (Tris HCL 0.5M p H 6.8, SDS 0.4% y glicerol). La carrera se realizó a 180 V manteniendo el voltaje constante durante aproximadamente 1 hora. Los geles de electroforesis SDS-PAGE se introdujeron en una solución fijadora de glutaraldehído al 2.5 % durante 45 min en agitación, se lavaron con agua destilada y se introdujeron en una solución de azul de Coomassie durante 1 hora. Posteriormente se introdujeron en una solución decolorante de ácido acético:etanol:agua en proporción 1:4.5:4.5 hasta aclarar el fondo.

### 6.6.2. Perfiles de velocidad de sedimentación

Los experimentos de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo mediante utilización de una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I (Beckman Instruments, Palo Alto, USA) (Figura III.4).



**Figura III.4.** Ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I (Beckman Instruments, Palo Alto, USA) y ejemplo gráfico de los datos obtenidos mediante esta técnica.

Se prepararon disoluciones de las muestras en concentración 0.2% (p/v) en tampón acético/acetato de sodio 0.2M pH 4.3. A continuación 390  $\mu\text{L}$  de la muestra y 400  $\mu\text{L}$  del mismo tampón en el que fueron disueltas, se inyectaron en los canales de doble sector de 12mm de longitud de paso óptico de la muestra y de referencia respectivamente. La centrifugación se llevo a cabo a 45.000 rpm a una temperatura de 20°C. Los perfiles de concentración en función del movimiento de la línea divisoria de sedimentación en la célula de ultracentrifugación analítica fueron registrados usando un sistema óptico de interferencia Rayleigh basado en medidas de índice de refracción y de detección en el UV a 280 nm, de tal forma que los datos se convierten en concentración (en unidades de desplazamiento relativo al menisco de la célula,  $j$  (fringes)) frente a la posición radial  $r$  (Harding, 2005). Los datos fueron analizados usando el modelo continuo incorporado en el programa SEDFIT (Versión 9.4b). El software genera una distribución aparente de coeficiente de sedimentación en forma de  $c$  (s) frente a coeficiente de sedimentación,  $s$ .

#### **6.6.3. Perfiles cromatográficos de exclusión molecular (GPC)**

Para llevar a cabo cromatografía de exclusión molecular (GPC) los productos de reacción se disolvieron en el mismo tampón que fue empleado como fase móvil (tampón 0.15M acetato de amonio/ 0.2M ácido acético pH 4.5) en concentración 0.05% (p/v). Las muestras se filtraron por 0.45 $\mu\text{m}$  y la cantidad de muestra inyectada fue de 20  $\mu\text{L}$ . El flujo se mantuvo a 0.6mL/min y el sistema cromatográfico empleado fue el mismo que se ha descrito en el apartado 5.3.2 para la caracterización de oligosacáridos.

#### **6.6.4. Determinación de fluorescencia intrínseca**

Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia intrínseca, debida al triptófano, las muestras se diluyeron en agua a una concentración de 0.05 % (p/v). Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro AMINCO Bowman Series 2 Luminiscence Spectrometer y los espectros se registraron entre 300 nm y 400 nm, previa excitación de la muestra a 280 nm.

## 6.7. Estudio del avance de la reacción de Maillard

### 6.7.1. Determinación de furosina

Para la determinación de la furosina fue empleada la cromatografía de líquidos en fase inversa (RP-HPLC), para lo cual se utilizó una columna C<sub>8</sub> específica de furosina (Alltech, Lokeren, Bélgica) (250nm x 4.6mm d.i) según el método propuesto por Pellegrino y col. (1995). El equipo usado consta de una bomba binaria modelo 250 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, INC; Waltham, Massachussets, USA), un inyector manual Rheodyne (modelo 9125), un horno (Kariba Instrumentsm Cardiff, USA) para termostatar la columna, un detector UV (LCD Analytical, SM 4000, Riviera Beach, FL, USA) y una interfase modelo 406 (Beckman). En cuanto a las condiciones cromatográficas se trabajó con una temperatura en la columna de 35°C, el flujo se mantuvo a 1.2mL/min y se inyectaron 50 µL de muestra. La fase móvil se preparó mediante dos eluyentes; eluyente A: 0.4% ácido acético grado HPLC en agua milli-Q (v/v), eluyente B: 0.3% cloruro potásico en el eluyente A (p/v). Se realizó la elución en gradiente lineal y la detección fue mediante medida de absorbancia a 280nm. Las muestras se prepararon pesando aproximadamente 10mg que se mezclaron con un pequeño volumen de HCl 8N. A continuación se pasó una corriente de helio durante 1min para crear una atmósfera inerte y, posteriormente, se realizó la hidrólisis de las muestras a 110°C durante 23 horas. Posteriormente se añadieron 2mL de HCl 8N y se filtraron a través de cartuchos C<sub>18</sub> (Sep-Pak Plus, Waters Corporation, Milford, Massachussets, USA). El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón externo utilizando disoluciones de furosina (Neosystem Laboratories, Strasbourg, Francia) de concentraciones entre 0.02 y 0.08 % (p/v). Los datos se expresaron como mg de furosina/100g de muestra. Los análisis se realizaron por duplicado.

### 6.7.2. Determinación de compuestos espectroscópicos que absorben en UV

Se prepararon soluciones acuosas de los productos de reacción (0.1% p/v) para seguir la formación de productos intermedios de reacción de Maillard que absorben a una longitud de onda de 294 nm según el método propuesto por Lericí y col. (1990). Para ello se realizaron barridos de absorbancia que fueron llevados a cabo entre las longitudes de onda de 190 y 500nm, a una velocidad de scan de 5nm/s mediante un

espectrofotómetro marca Specord 205 Analytikjena (Jena, Alemania). Los análisis se realizaron por triplicado.

### 6.7.3. Determinación de compuestos fluorescentes (AGEs)

La presencia de los compuestos fluorescentes de la reacción de Maillard se demostró por un lado mediante la adquisición de espectros de fluorescencia empleando en este caso como longitudes de onda  $E_x=337$  y  $E_m=350-550\text{nm}$  según Wang y col. (2009), y por otro lado, mediante la determinación del índice de productos avanzados de Maillard fluorescentes y triptófano soluble (FAST Index “Fluorescence of Advanced Maillard products and Soluble Tryptophan”) según Birlouez-Aragon y col. (2001). En ambos casos se utilizó un fluorímetro AMINCO Bowman Series 2 Luminiscence Spectrometer. Para la determinación del FAST Index se tomaron las muestras disueltas en agua en concentración 0.05% (p/v) y se dispusieron en cubetas para fluorimetría de 1cm de paso de luz (Hellma). Las longitudes de onda empleadas fueron:  $E_x=338/ E_m=410$  para los productos avanzados de Maillard fluorescentes (AMP) y  $E_x=290/ E_m=340$  para el triptófano (Trp). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. El FAST Index se determinó siguiendo la ecuación:

$$FAST\ index = 100 \times \frac{AMP\ IF}{Trp\ IF}$$

Donde *AMP IF* es la intensidad relativa de fluorescencia para los productos avanzados fluorescentes de la reacción de Maillard y *Trp IF* es la intensidad relativa de fluorescencia para el Triptofano. Las medidas se realizaron por triplicado.

## **6.8. Caracterización de los productos insolubles procedentes de la reacción de Maillard**

### **6.8.1. Análisis estructural: Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)**

Los espectros de infrarrojo de los productos insolubles liofilizados se obtuvieron con un Magna-IR 750 (Nicolet) por el método de transmisión. Las muestras se midieron con un beamsplitter de KBr y un detector DTGS de KBr entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  de longitud de onda. El espectro tenía una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y el número de barridos fue de 128. Los espectros obtenidos se analizaron con el programa Winfirst™ (Microsoft® Windows FT-IR software, USA).

### **6.8.2. Análisis microscópico: Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para obtener las imágenes de microscopía electrónica de barrido, los productos insolubles liofilizados se adhirieron con una cinta de doble haz adhesivo sobre portamuestras cilíndricos. Las muestras se metalizaron con Au/Pd utilizando un evaporador a vacío (Balzers SDC 004 Sputter coater, Oerlikon Corporate Pfäffikon, Switzerland) a una presión de vacío de 0.1mbar y a 25mA, durante 3 minutos. Se empleó un microscopio JEOL JSM-6330 F (JEOL, Tokyo, Japan), el cual trabajó a un voltaje de aceleración de electrones de 5kV.

En la siguiente página se muestra la tabla resumen de los análisis llevados a cabo en las muestras resultantes de la modificación de quitosano mediante reacción de Maillard (Tabla III.2).

**Tabla. III.2.** Análisis llevados a cabo en las muestras obtenidas por modificación de quitosano mediante reacción de Maillard.

		Qs A:β-Ig	Qs B:β-Ig	Qs A1:β-Ig	Qs A	Qs B	Qs C
Estudio de producto de reacción	Interacción Qs:β-Ig	✓	✓				
	Desarrollo de color	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Solubilidad	✓	✓		✓	✓	✓
	% Grupos NH <sub>2</sub>	✓	✓	✓	✓	✓	
	SDS-PAGE	✓	✓	✓			
Estudio de glicoconjugados	Velocidad de sedimentación		✓				
	GPC	✓	✓	✓			
	Fluorescencia Intrínseca β-Ig	✓	✓				
Estudio del avance de la reacción de Maillard	Furosina	✓	✓				
	Abs 294nm	✓	✓		✓	✓	
	AGEs	✓	✓				
Caracterización productos insolubles de Maillard	FT-IR	✓	✓				
	SEM	✓	✓				

## 7. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS QUITOSANOS MODIFICADOS

### 7.1. Propiedades funcionales de los quito-oligosacáridos (COS)

#### 7.1.1. Actividad antioxidante

La determinación de actividad antioxidante de los COS se llevó a cabo mediante dos métodos basados en mecanismos distintos. En primer lugar se empleó un método basado en la captura de radicales libres de 1,1-difenil-2-picril- hidracil (DPPH), según la metodología propuesta por Chen y col. (2009) y aplicando ligeras modificaciones. Por otro lado se empleó el método FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) según la metodología descrita por Benzie y col. (1996) y modificada por Pulido y col. (2000) basada en el poder de reducción sobre soluciones de  $\text{Fe}^{3+}$  medido por espectrofotometría y expresado como equivalentes de ácido 6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic (Trolox) que es un derivado sintético de la vitamina E que se emplea como patrón de actividad.

##### 7.1.1.1. Método DPPH

Se prepararon soluciones de los COS y los quitosanos controles en agua en concentración 1% (p/v). A 250 $\mu\text{L}$  de la muestra, se le añadió 1mL de solución metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en concentración 100 $\mu\text{M}$ . La mezcla se agitó en vortex y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron medidas de absorbancia a 30 min y 60 min a 517nm mediante un espectrofotómetro Specord 205 Analytikjena (Jena, Germany). Se utilizó agua destilada como blanco y la capacidad antioxidante fue calculada como:

$$\text{Capacidad de atrapar radicales DPPH(\%)} = \frac{1 - \text{Absmuestra}}{\text{Abscontrol}} \times 100$$

Donde *Abs muestra* es la absorbancia correspondiente a la muestra y *Abs control* la absorbancia del blanco. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.1.1.2. Método FRAP

Se prepararon soluciones de los COS y los quitosanos controles en agua en concentración 1% (p/v). A continuación se preparó el reactivo FRAP que está formado por: tampón acetato 0.3M pH 3.6 (3.1g acetato de sodio trihidratado, Merck KGaA, Germany y 16 mL ácido acético glacial, Panreac Quimica PAU); TPTZ 10mM (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ) en HCl 40mM ; y FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se mezclaron 25mL del tampón acetato con 2.5mL de solución de TPTZ y 2.5mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. Este reactivo se mantuvo a 37°C hasta su uso. Como patrón se utilizó Trolox (Sigma Aldrich) en agua destilada en un rango de concentraciones de 0-0.6mM. Para llevar a cabo la reacción a 30 µL de muestra se le añadieron 90 µL de agua y 900 µL del reactivo FRAP. La mezcla fue agitada en vortex y calentada a 37° C durante 30 minutos. El agua destilada fue empleada como control y la absorbancia fue medida a 595nm mediante un espectrofotómetro Specord 205 Analytikjena (Jena Germany). Los resultados fueron expresados como micromolequivalentes de Trolox y los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.1.2. Actividad antimicrobiana frente *Salmonella typhimurium* y *Clostridium difficile*

Como medio de crecimiento se utilizó Luria-Bertani Broth (LB) (Oxoid, Cambridge UK) para *S. typhimurium* y Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Oxoid) para *C. difficile*. *S. typhimurium* se dejó crecer en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 16 horas. *C. difficile* fue incubada a la misma temperatura y tiempo pero en una campana con condiciones anaérobicas. Se preparó suficiente medio correspondiente a cada bacteria para usar 50 mL por triplicado por cada muestra y para los controles positivos. De manera que se añadió 50 ml de medio en tubos de vidrio que fueron esterilizados y sellados. Posteriormente se añadió 1 mL de la solución de quitosano o COS al 1% correspondiente a cada tubo y se inoculó 0.1 mL de cultivo bacteriano en fase exponencial (10<sup>6</sup> CFU/mL). Las muestras fueron incubadas durante 24horas a 37°C en condiciones aeróbicas para *Salmonella* y anaeróbicas para *Clostridium*. Se midió la densidad óptica a 600 nm cada hora hasta cumplir las 10 horas y después se midió de nuevo a las 24 h. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición de

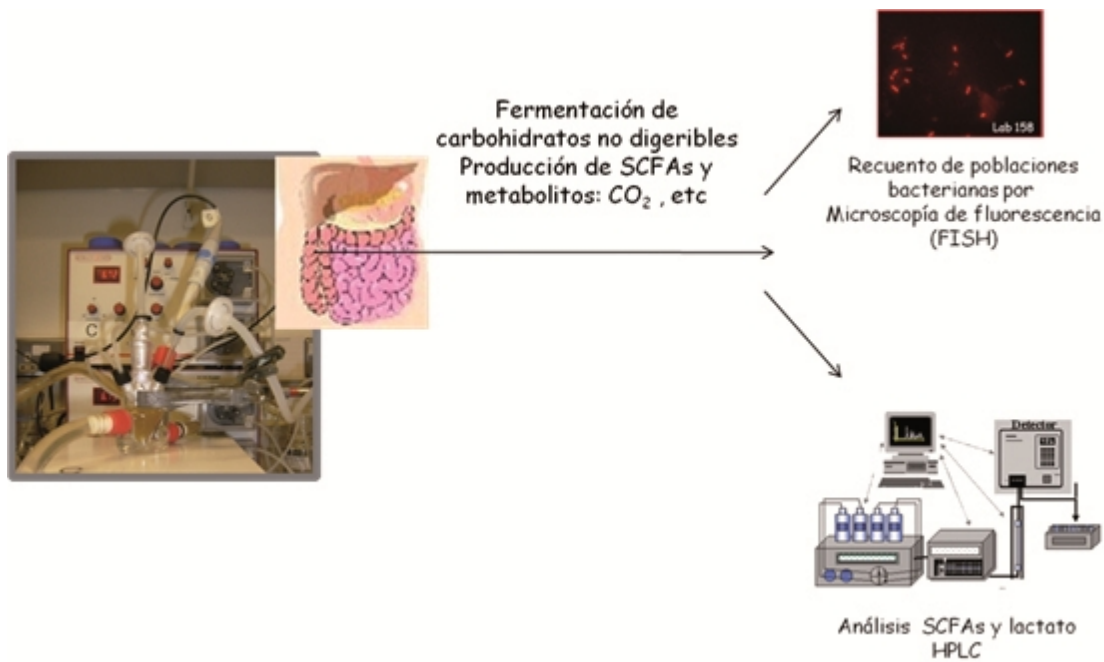
crecimiento de la bacteria respecto al control positivo (IRC) sin los sustratos. Las medidas se realizaron por triplicado.

### **7.1.3. Fermentación *in vitro* en cultivos mixtos**

#### **7.1.3.1. Ensayo cultivos fecales “in batch” a pH controlado**

La fermentación *in vitro* de los COS fue estudiada mediante un simulador de fermentación intestinal con control de pH. Se utilizaron muestras fecales de tres voluntarios adultos sanos, sin ningún desorden de tipo gastrointestinal. El medio de cultivo basal empleado contenía: agua de peptona (Oxoid) 2g/L, extracto de levadura (Oxoid) 2g/L, NaCl (BDH. Poole, Dorset, UK) 0.1 g /L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (BDH) 0.04 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (BDH) 0.04, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (BDH) 0.01 g /L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (BDH) 0.01 g/L, NaHCO<sub>3</sub> (BDH) 2 g/L, Tween 80 (BDH) 2 mL/L, Hemin (Sigma, Dorset, UK) 5 mg/L, vitamina K (Sigma) 10 µL/L, Cysteine–HCl (Sigma) 0.5 g/L, sales biliares (Oxoid) 0.5 g/L, resazurina (Sigma) 1 mg/L).

Para llevar a cabo la técnica se dispuso de vasijas de fermentación de 5mL de capacidad, donde se adicionó 4 mL de medio y que se mantuvieron en condiciones anaeróbicas haciendo pasar flujo de nitrógeno libre de oxígeno y a una temperatura de 37°C. Estas vasijas fueron conectadas a controladores de pH previamente calibrados para mantener el pH entre 6.7 y 6.9. Posteriormente, 50 mg de las muestras y del control positivo fructoligosacáridos (FOS, Raftilose P95, Orafiti, Tienen, Belgium) se añadieron sobre el medio basal dentro de las vasijas con la correspondiente corrección de pH, mediante controladores de pH que añadían NaOH o HCl 0.25 M para mantener el pH constante a 6.8. Se inoculó 1 mL de heces de voluntarios humanos disueltas en tampón fosfato salino (PBS, 0.116M NaCl, 0.003M KCl, 0.008M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3, Oxoid). Cada experimento de fermentación se realizó por triplicado. Además, se preparó una muestra sin adición de sustrato y actuó como control negativo. Todas las adiciones, inoculaciones e incubaciones se hicieron bajo condiciones anaeróbicas gracias a un suministro continuo de nitrógeno libre de oxígeno. La temperatura se mantuvo a un valor constante de 37°C. Se tomaron alícuotas de 1mL de las vasijas a 8, 24 y 36 horas, y a 0 h directamente del inóculo para su posterior análisis .



**Figura III.5.** Sistema de fermentación *in vitro* empleado en el estudio de recuento de bacterias procedentes de muestras fecales humanas.

### 7.1.3.2. Cuantificación de poblaciones bacterianas por microscopía de fluorescencia (FISH)

La cuantificación de las diferentes poblaciones bacterianas se llevó a cabo mediante su hibridación por fluorescencia. La hibridación de las muestras se llevó a cabo usando sondas de oligonucleótidos apropiadas para cada género de bacterias. Dichas sondas comerciales estaban marcadas con el colorante fluorescente cianina 5 (Cy5; Ebersberg Germany). Los grupos bacterianos estudiados fueron seleccionados por representar las poblaciones que predominan en el colon humano. Las sondas de oligonucleótidos utilizadas fueron Bif164 específico para *Bifidobacterium spp*; Bac303 específico para *Bacteroides/Prevotella*; Lab 158 para *Lactobacillus/Enterococcus*; Chis 150 para *Clostridium histolyticum*; Erec 482 para *Eubacterium rectale/Clostridium cocoides* y Prop 853 específico para *Clostridium* cluster IX. Para llevar a cabo el recuento de las distintas poblaciones bacterianas por FISH, en primer lugar, se fijaron las células y para ello 375  $\mu$ L de las alícuotas recogidas a las horas mencionadas se adicionaron a 1125  $\mu$ L de paraformaldehído, previamente dispuesto en microtubos y conservado en nevera. Esas alícuotas se dejaron en nevera a 4°C durante un mínimo de 4 horas. Tras la

fijación, las células se centrifugaron a 13400 g durante 5 min, se lavaron dos veces con PBS (0.1 M, pH 7.0), se resuspendieron en 300  $\mu$ L de una mezcla de PBS / etanol (1:1, v/v) y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Posteriormente, para ser analizadas las muestras se descongelaron y se procedió a hacer diluciones con PBS/SDS según el grupo de bacterias que se quiso analizar. Se dispusieron 20  $\mu$ L de esas diluciones en una placa de teflón con capacidad para 6 muestras. Las muestras se fijaron por medio de calor (46-50°C) durante 15 min y, posteriormente, se deshidrataron en alcohol (50, 80, 96% etanol; 3 min cada una). Este proceso tiene por objeto la rotura de la membrana celular y que la sonda fluorescente pueda penetrar en la célula, marcando de manera específica las bacterias. Una vez rota la membrana celular, se añadieron 50  $\mu$ L de la mezcla de hibridación (45  $\mu$ L de tampón de hibridación y 5  $\mu$ L de oligonucleótidos por cada muestra). El tampón de hibridación, en todos los casos, estaba constituido por 180  $\mu$ L de NaCl 5 M, 20  $\mu$ L de tampón Tris/HCl (pH 8) 1 M, 779  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de SDS al 10% para 1mL de solución final excepto para células totales, que estaba compuesto por 180  $\mu$ L de NaCl 5 M, 20  $\mu$ L de tampón Tris/HCl (pH 8) 1 M, 350  $\mu$ L de formamida, 449  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de SDS al 10% para 1mL de solución final. La hibridación se llevó a cabo durante 4 h en una incubadora a 46 ó 50°C dependiendo de la población bacteriana. Después de la hibridación, cada una de las placas se lavó sumergiéndola en 50 mL de un tampón de lavado constituido por 9 mL de NaCl 5 M, 1 mL de tampón Tris/ HCl (pH 8) 1M y 40 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada durante 15 min a la misma temperatura que la usada en la hibridación para todas las poblaciones excepto para las células totales, ya que el tampón de lavado estaba constituido por 0.7 mL de NaCl 5 M, 1 mL de tampón Tris/ HCl (pH 8) 1M, 0.5ml de EDTA 0,5M (pH 8) y 48.04 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada. Transcurrido este tiempo, se sumergieron en agua fría para evitar su cristalización, secándose finalmente con aire comprimido. Después, 5  $\mu$ L de reactivo Slowfade® se añadieron a cada muestra y se cubrieron con un cubreobjetos. La placa se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h y se examinó en un microscopio equipado con una lámpara fluorescente (Nikon Eclipse, E400). Las células hibridadas se visualizaron utilizando un filtro a 550nm. Para la enumeración de las bacterias se eligieron aleatoriamente al menos un mínimo de 15 zonas. Los análisis se realizaron por triplicado.

### **7.1.3.3. Análisis de lactato y ácidos grasos de cadena corta**

La determinación de lactato y ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) procedentes del metabolismo bacteriano permitió establecer si existía actividad metabólica de las bacterias. Para ello, el volumen sobrante de las alicuotas tomadas a las diferentes horas mencionadas, se centrifugó a 13400 g durante 5 min para eliminar las bacterias y material insoluble. El sobrenadante se congeló a -80°C hasta que se realizaron los análisis de HPLC. Las muestras se filtraron con filtros de 0.45µm y se inyectaron (80 µL) en un sistema de HPLC equipado con un detector UV y un inyector automático. Para el análisis se empleó una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (7.8 x 300 mm, Bio-Rad). Se utilizó como eluyente ácido sulfúrico de grado HPLC (0.005 M) en agua, previamente desgasificado con helio, a un flujo de 0.6 mL/min. La columna se termostató a 35°C. La detección se llevó a cabo a 210 nm. La calibración se realizó utilizándose como patrones los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico en concentraciones entre 12.5 y 100 mM.

## **7.2. Propiedades funcionales de los quitosanos modificados mediante reacción de Maillard**

### **7.2.1. Propiedades emulgentes**

Para la determinación de la capacidad emulgente de los productos de reacción se llevó a cabo el método propuesto por Pierce y col. (1978). Se disolvieron los productos de reacción en tampón acetato de sodio/acético 0.1M pH 4 en concentración 0.1% (p/v). A 2mL de la muestra se le añadió 1mL de aceite de girasol comercial. Posteriormente las mezclas se sometieron a agitación mediante la utilización de un Ultra-Turrax (T25 basic IKA® WERKE, Staufen, Germany) a 13000 rpm y 50 µL de la emulsión resultante fueron diluidos hasta 5mL en SDS 0.1%. A continuación la absorbancia fue medida a 500nm mediante un espectrofotómetro Specord 205 Analytikjena (Jena, Alemania). El índice de actividad emulgente (EAI) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EAI = \frac{2T Abs_{500} F}{\Phi c l}$$

Donde  $T$  es la turbidez que tiene un valor de 2.303,  $Abs_{500}$  es la absorbancia a 500nm,  $l$  la longitud de paso óptico que es igual a 1cm,  $\Phi$  es el volumen de la fase de aceite que tiene un valor de 0.25,  $c$  la concentración de la muestra y  $F$  el factor de dilución. La estabilidad de la emulsión se determinó midiendo la absorbancia de la misma emulsión a 500 nm pasados 2, 5 y 10 minutos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.2.2. Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de los productos formados mediante reacción de Maillard se llevó a cabo mediante los dos métodos descritos en el apartado 7.1.1. En este caso se disolvieron los productos de reacción en ácido acético 0.1M, en concentración 0.5% (p/v). Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.2.3. Propiedades gelificantes

Para caracterizar los productos insolubles gelificados formados después de la reacción de Maillard se llevaron a cabo experimentos de Imagen de Resonancia Magnética (IRM). Las muestras se hidrataron con agua destilada y se dejaron en agitación suave durante un día. Las muestras se dispusieron en un tubo de resonancia de 5mm de diámetro y se analizaron en grupos de tres. Los tres tubos fueron colocados en el centro de una sonda de radiofrecuencia de volumen de 3.5 cm de diámetro. Se usó un espectrómetro BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettingen, Alemania) de 4.7 Teslas equipado con un sistema de gradientes de campo magnético de 6 cm de diámetro interno, capaz de alcanzar un gradiente de 450 mT/m en 80  $\mu$ s. Los experimentos para el cálculo de las distribuciones continuas de T2 consistieron en una serie de imágenes de eco de espín a diferentes valores del tiempo de eco (TE) mientras el valor del tiempo de repetición (TR) permaneció constante. Para los estudios de los productos formados entre quitosano con -lg se adquirieron 40 ecos con TE desde 15 a 600 ms. El “*Field of View*” fue de 2.56 cm. En todos los casos el valor de TR fue de 3s, la anchura de los cortes de 1 mm y el tamaño de la matriz de 256x256. Para los estudios de los productos

formados a partir de quitosano en ausencia de proteína, se adquirieron 10 ecos con valores de TE que variaron de 25 ms a 330 ms. El “*Field of View*” en este caso fue 1.5 cm. Los datos adquiridos en el espectrómetro fueron transferidos a un PC para el cálculo de las distribuciones continuas de T2. El cálculo de dichas distribuciones se llevó a cabo mediante la aplicación AnalyzeNNLS. Para cada muestra se trazó un ROI que ocupaba la mayor parte del producto. De cada ROI se obtuvo la distribución continua de T2 a partir de la curva de decaimiento de T2 mediante el programa AnalyzeNNLS. (<http://sourceforge.net/projects/analyzennls/>)

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los experimentos realizados en este trabajo de tesis se llevó a cabo con el programa Statgraphics Plus 5.1. Se realizó un análisis de varianzas ANOVA simple. Diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas. El test de contraste múltiple de rango (Test de Duncan) fue usado para determinar si los valores medios fueron significativos ( $p < 0.05$ ) cuando la comparación fue llevada a cabo entre más de dos muestras.

La Tabla III.3 que aparece en la página siguiente, muestra un resumen con las determinaciones de propiedades funcionales llevadas a cabo en las muestras resultantes de la modificación de quitosano.

**Tabla. III.3.** Propiedades funcionales determinadas en las muestras obtenidas por modificación de quitosano.

		Actividad antioxidante	Actividad antimicrobiana	Fermentación "in vitro"	Propiedades emulgentes	Propiedades gelificantes
COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 3 por despolimerización con quitosanasa		✓	✓	✓		
	Qs A:β-Ig	✓			✓	✓
	Qs B:β-Ig	✓			✓	✓
MRPs	Qs A1:β-Ig	✓			✓	
	Qs A	✓				✓
	Qs B	✓				✓

## **IV. *RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---



## 1. ESTUDIO DE QUITOSANOS MODIFICADOS MEDIANTE DESPOLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA

Las propiedades químico-físicas del quitosano, como su flexibilidad en solución (Anthonsen y col., 1993; Ottøy y col., 1996), sus propiedades reológicas (Wang y col., 1991) y la cristalinidad (Harish Prashanth y col., 2002) dependen de características inherentes al polímero como son el DA, el patrón de distribución intramolecular de grupos acetilados en la cadena del polímero (PA) y el peso molecular promedio ( $M_w$ ). Estas características, a su vez, afectan a la afinidad entre la enzima y el quitosano para que se produzca su degradación y a las posteriores características estructurales y químico-físicas de los COS (Li y col., 2007). Por tanto, en este capítulo se pretende establecer una relación clara entre las **características químico-físicas** inherentes de los **COS** y la actuación enzimática; y a su vez, con las **propiedades funcionales** de los productos de degradación obtenidos. Para ello, la despolimerización enzimática se llevó a cabo en quitosanos con diferente grado de acetilación (DA).

En muchas ocasiones se encuentran discrepancias en los resultados obtenidos por distintos investigadores en lo que se refiere a propiedades biológicas de los quitooligosacáridos. Las cualidades de las fracciones de COS van a depender principalmente de la forma de obtención de éstos, pero hay que tener en cuenta que, en los resultados de sus características químico-físicas, van a influir en algunos casos las técnicas empleadas. De ahí la importancia dada al objetivo que se pretende llevar a cabo en este capítulo

Las muestras de partida empleadas en este estudio fueron quitosanos purificados de acuerdo con el método descrito en el apartado 2 de Materiales y Métodos. El DA, el  $M_v$  y el  $M_w$  de los quitosanos se determinó mediante los apartados 4.1 y 4.2 de Materiales y Métodos respectivamente y se muestran en la Tabla IV.1. Debido a la estrecha relación, como previamente se mencionaba, entre las características químico-físicas del quitosano y la forma de actuación de la enzima, se comparó cómo afectaba una mayor diferencia del valor de DA en el quitosano de partida.

**Tabla IV.1.** Características químico-físicas de los quitosanos empleados en el estudio de despolimerización enzimática.

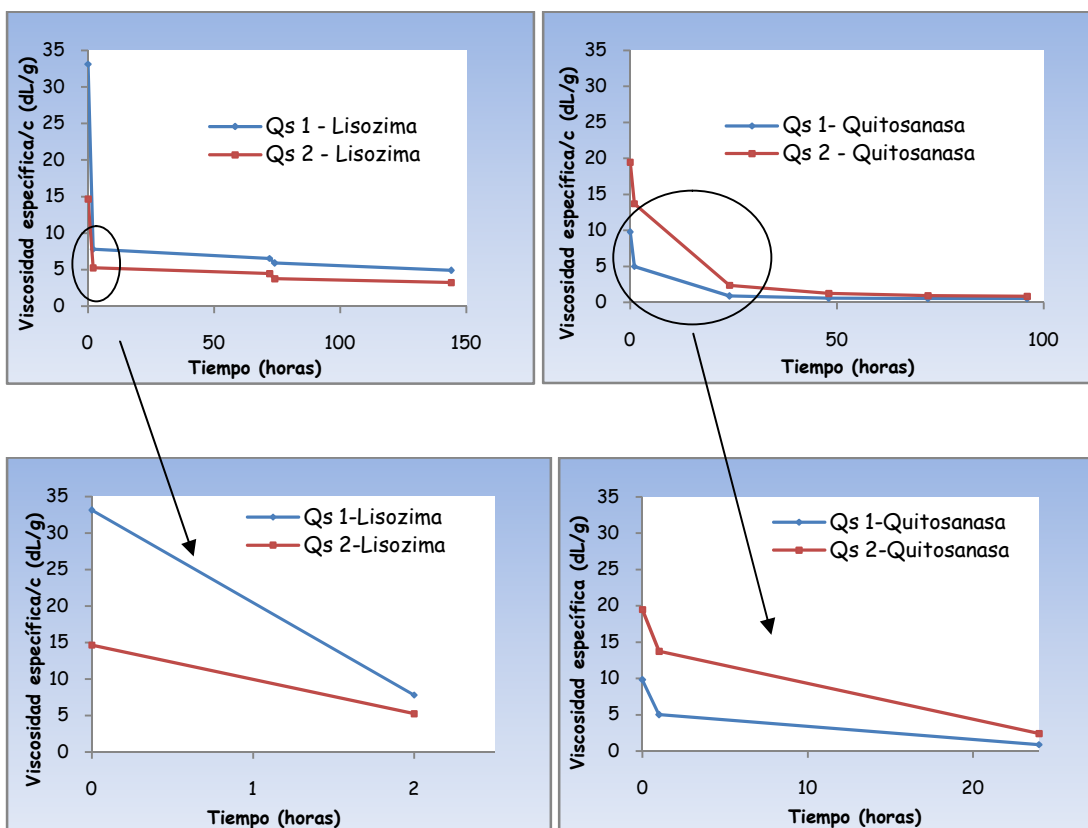
MUESTRA	DA (%)	$M_v(10^3\text{g/mol})$	$M_w(10^3\text{g/mol})$
		Viscosimetría	GPC
Qs 1	14	645	179
Qs 2	22	731	294
Qs 3	35	475	261

Se llevó a cabo la reacetilación del Qs 1 según el método descrito en el apartado 3 de Materiales y Métodos, y se obtuvo el Qs 3 que presentó un valor de DA un 21% por encima del DA del Qs 1 (14%) y un mayor  $M_w$  ( $261 \times 10^3$  g/mol) debido a la presencia de más residuos acetilados en su molécula. A su vez esta diferencia en el DA permitió ver también diferencias en las propiedades funcionales planteadas más adelante en la memoria, en las cuales también es conocido el efecto del porcentaje de grupos amino presentes en el polímero.

El peso molecular promedio ( $M_w$ ) y el peso molecular viscoso ( $M_v$ ) fueron determinados mediante distintas técnicas. La viscosimetría dio lugar a valores de  $M_v$  mayores con respecto a los obtenidos por las otras técnicas. Esta técnica se utiliza por ser útil en el análisis de rutina en la caracterización de quitosanos ya que es rápida y económica. Sin embargo, la determinación del peso molecular viscoso se ve influida por el solvente empleado y la temperatura. En este caso se empleó el solvente propuesto por Roberts y Domszy (1982), pero se ha comprobado que la función para el cálculo del  $M_v$  dada por estos autores es una función estática que supone una degradación aleatoria del polímero y que no tiene en cuenta la polidispersidad ni el DA (Kasaai, 2008). El menor  $M_v$  encontrado en el Qs 3 reacetilado con respecto al Qs 1 del que se partió para su obtención podría deberse a que los residuos acetilados producen interacciones intramoleculares y se producen fenómenos de autoagregación dando lugar a soluciones muchos menos viscosas (Hu y col., 2007).

### 1.1. Estudio de la despolimerización enzimática

El seguimiento de la reacción enzimática en el **Qs 1** y el **Qs 2** se llevó a cabo mediante medidas de viscosimetría. La Figura IV.1 muestra la evolución de viscosidad reducida (viscosidad específica/c, siendo c la concentración) en función del tiempo de reacción seleccionado para cada enzima. Debido a la completa extensión de las cadenas de quitosano en la solución del tampón correspondiente dependiendo de la enzima empleada, un cambio de viscosidad en las soluciones puede reflejar el cambio en el grado de polimerización de la cadena lineal del polímero (Zhang y col., 2001).



**Figura IV.1.** Viscosidad reducida frente a tiempo de despolimerización para Qs 1 y Qs 2 degradado con a) lisozima y b) quitosanasa.

La actividad degradativa de la **lisozima** resultó similar sobre ambos quitosanos. La viscosidad disminuyó drásticamente durante las dos primeras horas de la reacción de despolimerización enzimática, decreciendo muy ligeramente en las horas siguientes. A

pesar de existir estudios en los que se recomienda la adición de lisozima fresca después de 72 horas de reacción, no se observaron cambios importantes en la viscosidad reducida de las muestras a este tiempo. Este hecho sugiere, por tanto, que la degradación comienza a ser más lenta, no debido a la inactivación de la lisozima, sino a que esta podría no ser capaz de hidrolizar los enlaces glicosídicos que van quedando (Verheul y col., 2009).

En el caso del enzima **quitosanasa** también existió un descenso considerable de viscosidad durante la primera hora. Al finalizar la reacción se alcanzaron valores de viscosidad reducida cercanos a cero en los dos quitosanos. A pesar de que con quitosanasa parece ser que a las 48 horas de incubación no tiene lugar una despolimerización más profunda, porque el valor de viscosidad reducida permanece prácticamente constante, hay que tener en cuenta el efecto favorable de un largo periodo de incubación. Se ha descrito que este efecto se asocia con un contacto prolongado entre el quitosano y la enzima para que se produzca una mejor interacción entre ellos y ayuda a la formación del complejo enzima-sustrato para la posterior formación de productos de degradación (Abd-Elmohdy y col., 2010). A pesar de las diferencias en el mecanismo de actuación de las enzimas, la disminución menos acusada de viscosidad a partir de un determinado tiempo para ambas enzimas es esperable, ya que el mismo número de escisiones en una mezcla de moléculas de larga longitud permite una mayor disminución de la viscosidad frente al mismo número de escisiones, cuando existe una mezcla de moléculas más cortas (Holme y col., 2001).

Los valores de las velocidades iniciales de degradación ( $r$  medidas en  $g^2/(dL^2 \times \text{min})$ ) se pudieron determinar mediante la representación de viscosidad  $(1/(c_{\text{específica}}/c))$  medida en  $g/dL$  frente al tiempo de degradación según el método propuesto por Nordtveit y col. (1994). Para una reacción de primer o pseudo-primer orden la velocidad inicial de degradación  $r'$  viene dada por la ecuación:

$$r' = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{[S]_0 \times d\alpha}{dt}$$

Donde  $[S]_0$  y  $[S]$  son las concentraciones molares de los enlaces glicosídicos al comienzo de la reacción y a tiempo  $t$  respectivamente.  $Y$  es el grado de escisión ( toma valor 0 para  $M_w = M_0$  y valor 1 para el peso molecular igual al peso de la unidad monomérica). Si  $DP_{n0}$  y  $DP_{nt}$  son los grados de polimerización promedio cuando comienza la reacción ( $t=0$ ) y al tiempo  $t$  respectivamente, para una reacción de despolimerización aleatoria de primer orden, la fracción del número de enlaces hidrolizados ( $\alpha$ ) es inicialmente proporcional al tiempo:

$$\Delta\alpha = \frac{1}{DP_{nt}} - \frac{1}{DP_{n0}} = k' \times \Delta t$$

Donde  $k'$  es una constante. Como fue visto anteriormente, para un tipo de distribución de peso molecular, la viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ) se relaciona con el peso molecular promedio viscoso, a través de la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada:

$$[\eta] = k_m \times M_v^a$$

Donde  $M_v$  era el peso molecular promedio viscoso y  $k_m$  y  $a$  son constantes dependientes del solvente empleado y de la temperatura. Asumiendo que el exponente  $a$  es igual a la unidad y que  $M_0$  (peso del monómero  $M_v = M_0 \times DP_n$ ) es independiente del grado de N-acetilación, tenemos que:

$$k' = \frac{\Delta\alpha}{\Delta t} = \left( \frac{1}{[\eta]_t} - \frac{1}{[\eta]_{t0}} \right) \times K \times \frac{M_0}{\Delta t} = \frac{\Delta 1}{[\eta]} \times K \times \frac{M_0}{\Delta t}$$

Para concentraciones bajas de quitosano ( $c$ ) es posible asumir que la viscosidad reducida es igual a la viscosidad intrínseca ( $\eta_{\text{específica}}/c$  [ ]). Como se mide la velocidad de degradación inicial a valores muy bajos de escisión  $d\alpha/dt$  es igual a  $k'/t$ .

$$r' = k' x [S]_0$$

Puesto que se representan los datos de degradación como  $(1/(k_{\text{específica}}/c))$  frente al tiempo, la pendiente  $k$  obtenida experimentalmente está relacionada con  $k'$  a través de  $k = k'/(K \times M_0)$ .

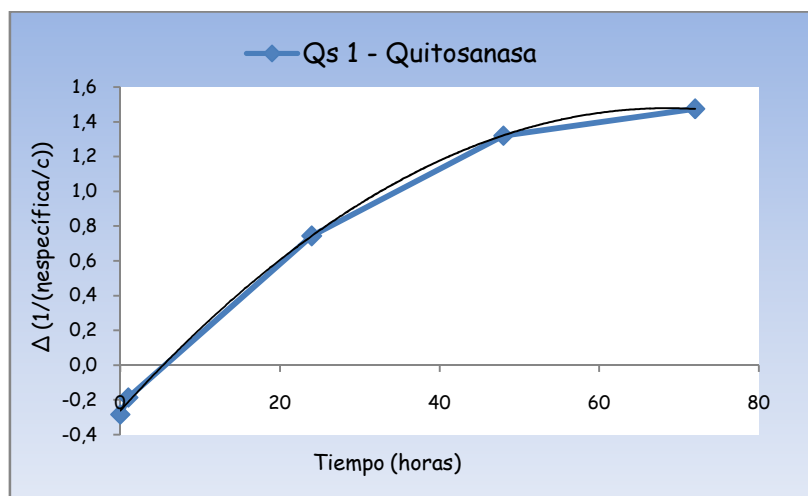
Para una reacción de degradación de un polisacárido relativamente inflexible ( $a$  cercano a 1) de primer orden y desarrollada de forma aleatoria, se obtiene que la gráfica que representa  $(1/(k_{\text{específica}}/c))$  frente al tiempo es lineal. Para la degradación del quitosano con las enzimas empleadas en este estudio esta representación no es lineal y la pendiente  $k$  se determina por ajuste de los datos a curvas polinomiales de segundo grado.

Como en los experimentos se expresa la concentración de las disoluciones de quitosano en g/dL, podemos expresar la velocidad  $r$  como  $r = k \times c$ . Las unidades de  $r$  serán  $\text{g}^2/\text{dL}^2 \times \text{min}$  cuando las viscosidades intrínsecas se dan en dL/g. Las velocidades de reacción  $r$  y  $r'$  están relacionadas por la ecuación:

$$r' \approx r x \frac{([S]_0 x K x M_0)}{c}$$

En el cálculo de los valores de la velocidad,  $r$ , para los distintos quitosanos empleados, se ha de tener en cuenta que al transformar la pendiente de la curva  $k$  en  $r$ , el peso molecular del monómero y el valor de  $a$  (constante de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada) son independientes de sus grados de acetilación (Nordtveit y col., 1994).

La Figura IV.2 muestra la degradación del Qs 1 con quitosanasa representada como  $(1/(k_{\text{específica}}/c))$  frente al tiempo e indica el tipo de comportamiento no lineal que fue encontrado para los distintos quitosanos independientemente de la enzima empleada.



**Figura IV.2.** Incremento de  $1/(específica/c)$  frente al tiempo de degradación para Qs 1 despolimerizado con quitosanasasa.

Este fenómeno indica que la despolimerización no ocurre al azar, ya que existen puntos de escisión enzimática distribuidos regularmente a lo largo de toda la cadena de quitosano. Los resultados coinciden con los encontrados por otros autores en lisozima (Nordtveit y col., 1994; Vårum y col., 1997) y proteasa (Li y col., 2007). Si se observan los valores de las velocidades iniciales de degradación ( $r$ ), estos aumentan al aumentar el DA, en el caso de la **lisozima** (Tabla IV.2). Teniendo en cuenta la mayor disminución de la viscosidad reducida con el tiempo de degradación para Qs 2 de mayor DA observada en la Figura IV.1, se podría concluir que la hidrólisis con lisozima va más rápida cuanto más similar a la quitina es el quitosano, ya que ésta es su sustrato original en la naturaleza.

La lisozima no puede actuar sobre secuencias de GlcN y sobre segmentos en los que existen pequeñas fracciones de residuos de GlcNAc distribuidos aleatoriamente (Aiba, 1992). Según Vårum y col. (1996) esta enzima hidroliza al quitosano por los enlaces AA-AA, y AA-AD, mientras que no podría hidrolizar a AD-AA y DD-AA o lo haría muy lentamente. Estos resultados coinciden con lo publicado por Sashiwa y col. (1990) ya que el Qs 2 tendría un valor de DA (22 %) más próximo al que se plantea en su trabajo de investigación como valor óptimo para la actuación de lisozima (30 %). Otros autores, sin embargo, presentan resultados en los que el mejor valor de DA del quitosano para que esta enzima lo hidrolice es de ~ 56 % frente a quitosanos con valores o muy pequeños o muy altos de DA: 3 y 89% respectivamente (Kurita y col., 2000).

**Tabla IV.2.** Velocidad inicial de degradación ( $r$ ) para Qs 1 y Qs 2 despolimerizados con lisozima y quitosanasa.

MUESTRA	DA (%)	
	Qs inicial	$r$ ( $dL^2/g^2 \times min$ )
Qs 1-Lisozima	14	0,0005
Qs 2-Lisozima	22	0,0010
Qs 1-Quitosanasa	14	0,0250
Qs 2-Quitosanasa	22	0,0090

La **quitosanasa** demostró inicialmente una actuación enzimática mayor en el Qs 1. Además, se observó un aumento de la velocidad inicial de degradación ( $r$ ) al disminuir el valor de DA del polímero (Tabla IV.2). La quitosanasa de *S. griseus* pertenece a la clase III y como se apuntaba en la introducción, puede hidrolizar enlaces tanto de tipo D-A como de tipo D-D en quitosanos parcialmente acetilados. El menor valor de DA del polímero podría hacer más probable encontrar secuencias de seis residuos de GlcN distribuidos aleatoriamente por los que quitosanasa tiene preferencia al comienzo de la despolimerización enzimática (Fukamizo y col., 1995).

En cuanto a la influencia del peso molecular promedio ( $M_w$ ) en la hidrólisis enzimática, existen estudios en los que se demuestra una mejor actuación de la enzima sobre quitosanos de bajo peso molecular (Zhang y col., 2001). Las diferencias encontradas en el estudio del seguimiento de la degradación mediante viscosimetría en el caso concreto de Qs 1 y Qs 2 parece que pudieran ser más atribuibles al DA, parámetro que parece ser que tiene una fuerte influencia en el proceso de despolimerización enzimática.

## 1.2. Separación y purificación de los productos obtenidos mediante la despolimerización enzimática.

Una vez que se llevó a cabo la despolimerización enzimática de los quitosanos presentados en la Tabla IV.1, se procedió a la separación y purificación de las fracciones de COS mediante ultrafiltración. Las fracciones obtenidas para los **Qs 1 y Qs**

**2** fueron separadas usando una célula agitadora de ultrafiltración mediante membranas de acetato de celulosa de tamaños de corte de 30, 10 y  $3 \times 10^3$  g/mol según el **método 1** descrito en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Posteriormente estas fracciones de COS se atomizaron y caracterizaron. Los rendimientos de atomización obtenidos en las fracciones intermedias fueron aproximadamente del 5 % para los COS obtenidos a partir del Qs 1 con quitosanasasa y entre el 0.5-1% para los obtenidos con lisozima.

Se trató de establecer un protocolo óptimo para la obtención de los COS a escala de laboratorio con mayores rendimientos y purificación, puesto que los COS obtenidos a partir del método 1 parecían contener acetato del tampón del tratamiento enzimático, lo que dificultaba su caracterización como se revela en resultados que se mostrarán a continuación. De manera que, a partir de **Qs 1** despolimerizado de nuevo y **Qs 3**, se llevaron a cabo algunos pequeños cambios en el sistema de trabajo de separación y purificación empleando el **método 2**. Este consistió en el uso de un sistema de filtración tangencial acoplado a un sistema de concentración con una bomba peristáltica que permitió separar un mayor volumen de solución y a una mayor velocidad. Las membranas de corte molecular empleadas fueron de 30, 10 y  $5 \times 10^3$  g/mol. Una vez separadas las fracciones F 30, F 10-30, F 5-10 y F 5 se dializaron para una purificación más completa. Por último se procedió a la liofilización de las soluciones de los COS siendo los rendimientos obtenidos en las fracciones intermedias aproximadamente del 6% para los COS obtenidos a partir del Qs 1 con quitosanasasa y aproximadamente del 0.5% para los obtenidos con lisozima. Aunque los valores de rendimientos no aparezcan mayores que los de los COS procedentes del método 1, hay que tener en cuenta que estos últimos no fueron purificados y por tanto los rendimientos fueron sobrestimados, por lo que el método 2 sirvió para aumentar en pureza y cantidad los COS obtenidos.

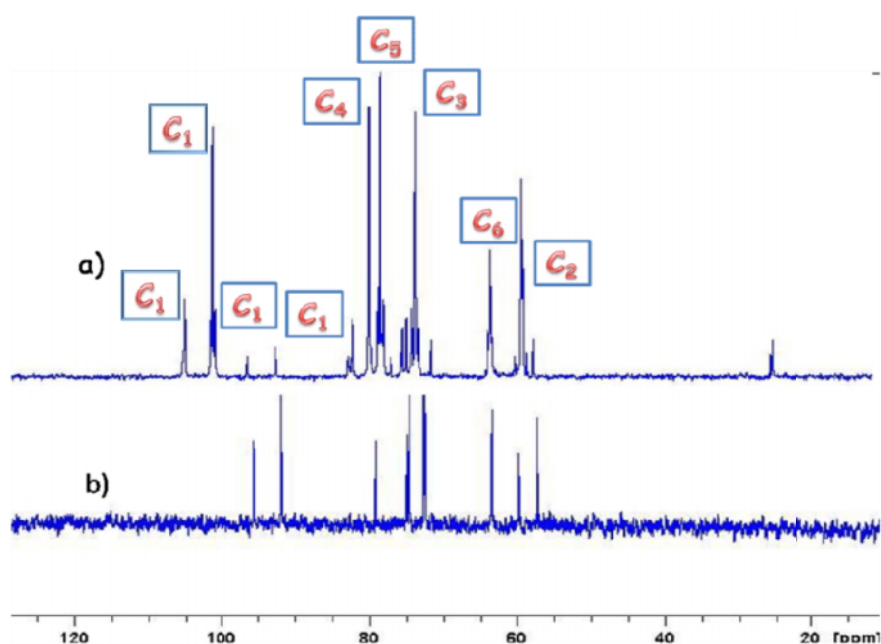
### 1.3. Caracterización químico-física de los quito-oligosacáridos (COS)

Puesto que tanto el  $M_w$  como el DA son dos de las características principales que afectan a las propiedades físicas, químicas y biológicas de quitosano y sus derivados (Aranaz y col., 2009), se hizo necesario el análisis estructural y la determinación de dichas características químico-físicas en las fracciones de COS obtenidas con el fin de establecer una relación con sus potenciales propiedades funcionales. Para poder

establecer una relación más exhaustiva con las propiedades estudiadas, además se llevaron a cabo estudios estructurales de las distintas fracciones de COS mediante espectrometría de masas de ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS).

### 1.3.1. Análisis estructural de los productos obtenidos mediante la despolimerización enzimática

La caracterización estructural de los distintos heterooligosacáridos se llevó a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). La espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -RMN es una técnica muy sensible a cambios en el orden de estructura local. Puesto que tras la despolimerización de quitosano se obtienen oligómeros de pocos residuos de N-glucosamina, se compararon los espectrogramas de las fracciones de los COS con el de glucosamina.



**Figura IV.3.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de a) COS F 10-30 Qs 1–Quitosanasa obtenidos mediante el método 1 y b) glucosamina.

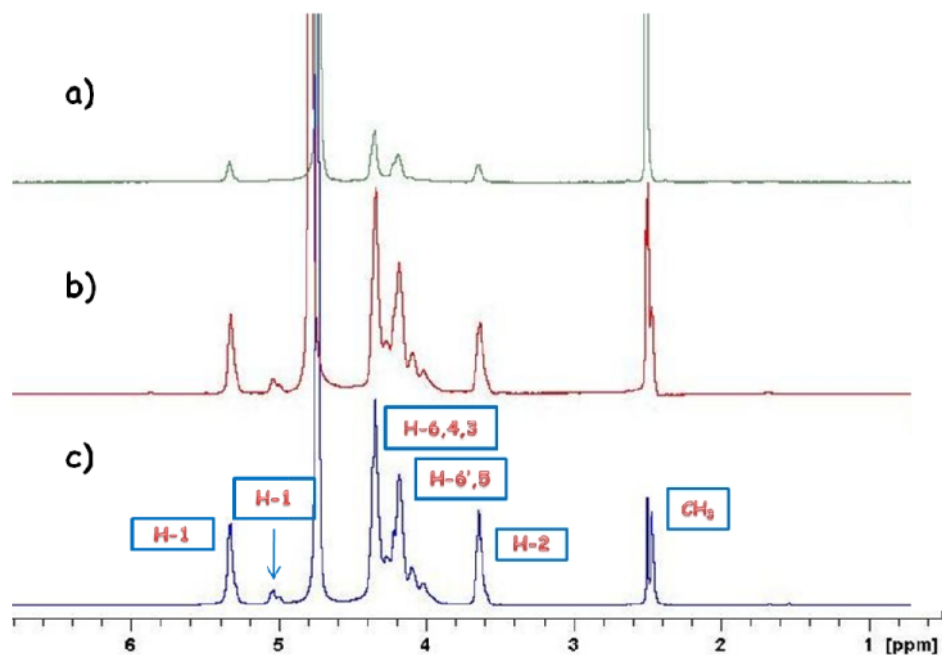
La Figura IV.3 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$  de la F 10-30 obtenida a partir del Qs 1 despolimerizado con quitosanasa comparado con el espectro de  $^{13}\text{C}$  de glucosamina. Las señales a 58.8, 63.1, 73.2, 77.7, 79.3 y 100.6 ppm se atribuyeron a los C-2, C-6, C-3, C-5, C-4 y C-1 de la estructura del polímero. La asignación de las señales está basada en

los datos encontrados en la bibliografía (Saitô y col., 1981; Fukamizo y col., 1991). Además, como consecuencia de la despolimerización, se pudo observar cómo las señales correspondientes a los C-1 y anoméricos presentes alrededor de 90 y 95 ppm disminuyeron en intensidad relativa respecto a las señales correspondientes a los carbonos internos de las unidades repetidas de glucosamina en las cadenas de los COS, que aumentaron. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Domard y Cartier (1989). En el caso de las señales correspondientes a glucosamina, éstas se encontraron solapando con el resto de la cadena del quitosano.

La Figura IV.4 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para **Qs 1** y sus COS **F10-30** procedentes de la despolimerización con quitosanasasa mediante el **método 1** y el **método 2**. Este experimento en las distintas fracciones de COS permitió, al igual que los espectros de  $^{13}\text{C}$  elucidar su estructura de forma sencilla mediante las señales características de los H (1-6) resonando al mismo desplazamiento químico que en el quitosano de partida. Por otra parte, se obtuvo información acerca de la presencia de residuos acetilados y desacetilados en las muestras. En relación a los desplazamientos químicos de las señales correspondientes a los protones, se conoce que los protones del C anomérico del extremo reductor resuenan a 5.43 ppm para la unidad GlcN y a 5.19 ppm para la unidad GlcNAc (Ishiguro y col., 1992), mientras que las unidades internas GlcN y GlcNAc resuenan a 4.9 y 4.6 ppm (Vårum y col., 1991). En base a estos datos, parece ser que las señales correspondientes a los protones de las unidades internas se encuentran enmascaradas por la señal del agua. Por otro lado, en el Qs 1 las señales observadas a 5.33 y 5.03 ppm podrían asignarse a los H-1 del extremo reductor de las unidades GlcN y GlcNAc, respectivamente.

Las intensidades relativas entre las señales también sugieren que la cantidad de residuos desacetilados situados en los extremos reductores son mayores que los acetilados para el Qs 1 que presenta un bajo DA. En el caso de los COS F 10-30 del Qs1-Quitosanasasa obtenidos mediante el método 1, el brusco descenso de las intensidades relativas de los protones presentes sugirió la menor pureza y mayor contenido en acetato procedente del tampón, respecto a las señales de los COS F 10-30 obtenidos con la misma enzima con el método 2. Esto, además pudo comprobarse por la intensa señal a 2.5 ppm que se asigna al protón presente en el grupo  $\text{CH}_3$  de los grupos acetilados en la estructura del quitosano, y que en este caso se estaba sumando a la de los protones del  $\text{CH}_3$  del

acetato. En esta misma fracción sólo se mostró la presencia de unidades desacetiladas a 5.33 ppm. Se cree que la menor solubilidad de los residuos acetilados ha provocado que estos no hayan sido recuperados en su totalidad tras la atomización.

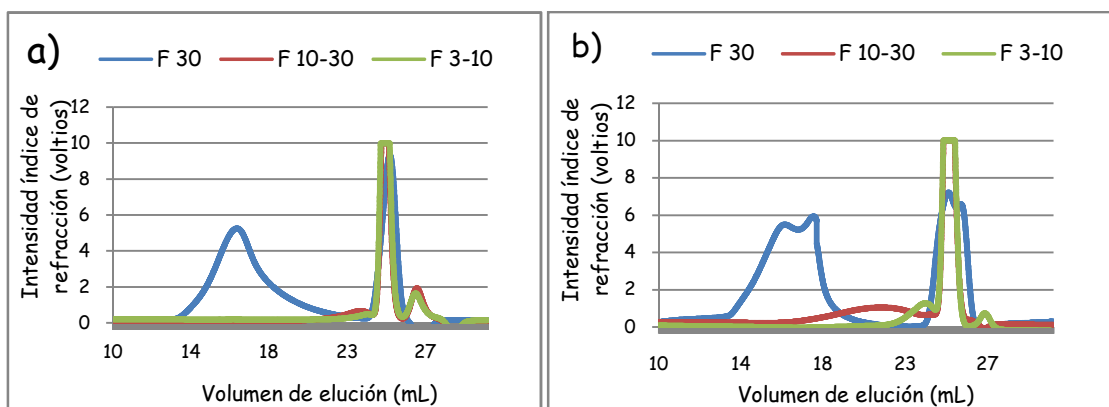


**Figura IV.4.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de a) COS F 10-30 Qs 1-Quitosanasa obtenidos mediante el método 1 b) COs F 10-30 Qs 1-Quitosanasa obtenido mediante el método 2 y c) Qs 1.

En el caso de los COS F 10-30 obtenidos por el método 2 (Figura IV.4b), se mantuvo la intensidad de las señales de todos los protones de la estructura del quitosano de partida, denotando la presencia de un producto de mayor pureza. En cuanto a las señales correspondientes a las unidades de GlcN y GlcNAc del extremo reductor, no se apreciaron diferencias importantes en las fracciones de COS intermedias obtenidas por el método 2, por lo que se procedió a la determinación del DA mediante el método de la primera derivada cuyos resultados se muestran más adelante en la memoria. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la F 3 obtenida a partir de Qs 1 y Qs 2 mediante el método 1 no permitieron la asignación de las señales de los protones correspondientes a la estructura del quitosano, por lo que se consideró un rendimiento insuficiente en COS en esta fracción para su análisis posterior.

### 1.3.2. Determinación del peso molecular promedio

El peso molecular promedio ( $M_w$ ) del quitosano afecta a la flexibilidad de la cadena del polímero en solución, lo que a su vez afecta a su afinidad por la enzima en reacciones de hidrólisis (Li y col., 2007). La cromatografía de exclusión molecular (GPC) es uno de los métodos más empleados para la determinación de pesos moleculares promedio y distribuciones de pesos moleculares en polímeros. La Figura IV.5 muestra los perfiles cromatográficos de GPC de las fracciones ultrafiltradas de **COS** obtenidas para **Qs 1** y **Qs 2** por el **método 1**. Las fracciones de menor  $M_w$  se fueron detectando a volúmenes de elución mayores. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos mediante viscosimetría (apartado 1.1) y demuestran que la actuación inicial de ambas enzimas probablemente sigue un mecanismo de endo-acción, en el cuál las enzimas producen la escisión de la cadena en enlaces glicosídicos internos, produciéndose un descenso rápido del peso molecular promedio del polímero (Li y col., 2007). Una modificación más ralentizada a partir de cierto tiempo de actuación de la enzima (lo que pudo comprobarse mediante el seguimiento de la viscosidad reducida), podría estar teniendo lugar como consecuencia de que a las enzimas cada vez les cuesta más encontrar enlaces a los que atacar.



**Figura IV.5.** Perfiles cromatográficos de GPC para a) Qs 1-Quitosanasa y b) Qs 2-Lisozima.

En general, las distribuciones de peso molecular promedio obtenidas fueron muy polidispersas y en algunos casos se encontraron distribuciones bimodales, lo que se atribuye por un lado a la polidispersidad ya implícita en el quitosano de origen, y a la

mezcla heterogénea de las fracciones, puesto que el peso molecular promedio de estas se encuentra dentro de un intervalo que se ha establecido en función del sistema de separación. La baja intensidad de las señales se atribuyó de nuevo al menor grado de pureza de las muestras obtenidas por el método 1.

Algunos autores proponen que los quitosanos de bajo peso molecular son más susceptibles de una mayor degradación enzimática (Zhang y col., 2001; Li y col., 2007). Sin embargo, esta actuación dependerá del tipo de enzima utilizada para la hidrólisis y también se debería tener en cuenta independientemente del  $M_w$ , el patrón de la distribución de distintos residuos en el polímero, aleatorio o no, en función de lo cual habría mayor o menor posibilidad de encontrar seis monómeros juntos con la distribución de residuos de GlcN y GlcNAc necesaria para dar lugar a una hidrólisis más efectiva (Vårum y col., 1996).

Los valores de peso molecular promedio alcanzados en las distintas fracciones de los COS se muestran en la siguiente tabla (Tabla IV.3).

**Tabla IV.3.** Valores de peso molecular promedio ( $M_w$ ) para los COS obtenidos por despolimerización de Qs 1 y Qs 2 con lisozima y quitosanasas mediante el método 1.

	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)
	Qs inicial	F 30	F 10-30	F 3-10
Qs 1-Lisozima	179	112	-	-
Qs 1-Quitosanasa	179	176	8	4
Qs 2-Lisozima	294	39	4	1
Qs 2-Quitosanasa	294	31	9	5

\*F 10-30 y F 3-10 Qs 1-Lisozima no cuantificada por alta polidispersidad presentada en la muestra.

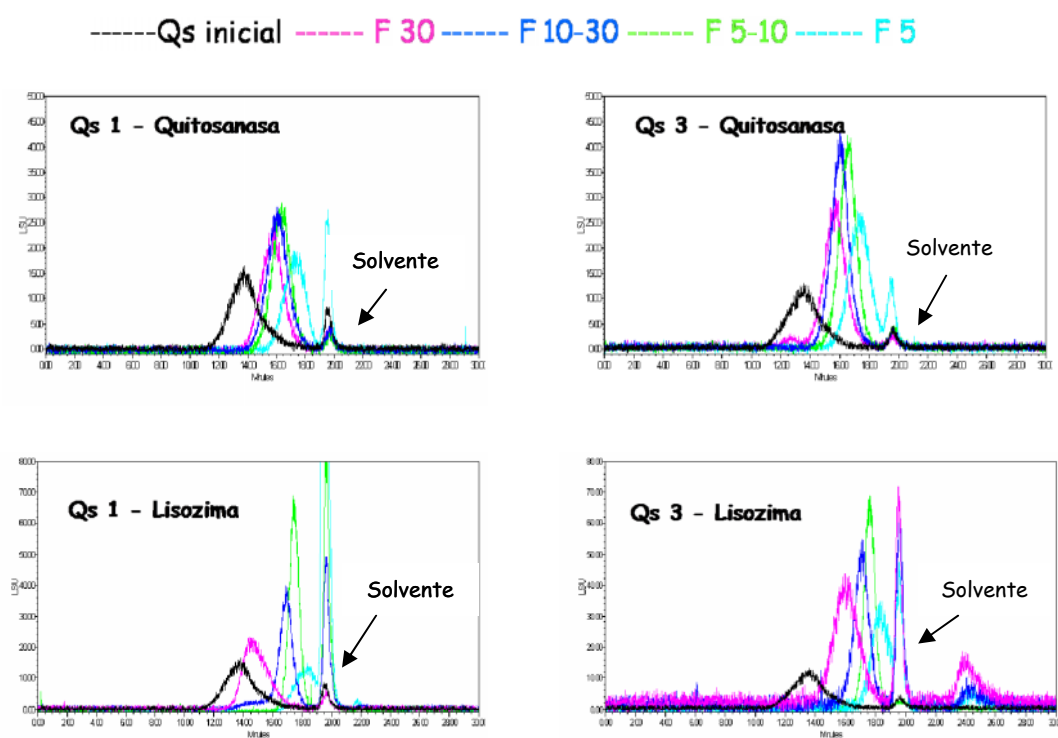
Las diferencias de  $M_w$  en las muestras empleadas en este apartado para la degradación enzimática no son muy grandes. Teniendo en cuenta el resultado encontrado en las fracciones F30, para las cuales se seleccionó el dato de  $M_w$  correspondiente a longitudes de cadenas más cortas encontradas (puesto que en algunos casos existió distribución bimodal por la presencia de agregados), el  $M_w$  fue menor en aquellas obtenidas a partir

de Qs 2 de mayor  $M_w$  independientemente de la enzima empleada. Este hecho se relaciona con la vía de desacetilación por la que se obtuvieron los quitosanos de partida. El Qs 1 fue obtenido por desacetilación homogénea, por lo que presentaría una distribución aleatoria de los diferentes residuos en la cadena del polímero (Vårum y col., 1996), pudiendo ser más difícil la actuación enzimática inicialmente. En el caso del Qs 2 obtenido por desacetilación heterogénea, este proceso daría lugar a una distribución no aleatoria de unidades con residuos de GlcN en la cadena de quitosano, siendo más probable encontrar segmentos de la cadena de seis monómeros con residuos de GlcN, por los que la **quitosanasa** tendría más afinidad o segmentos de seis unidades monoméricas con tres residuos alternos de GlcNAc por los que la **lisozima** tiene mayor afinidad (Fukamizo y col., 1995). El hecho de que en la F30, el  $M_w$  encontrado para Qs2-Quitosanasa sea menor con respecto a Qs 1-Quitosanasa y sin embargo, la viscosidad reducida encontrada fuese similar en ambos casos (véase apartado 1.1.) se atribuye a la presencia de cadenas de mayor longitud existentes en el caso del Qs 2, que dieron lugar a agregados.

Los resultados encontrados en las otras fracciones estudiadas F10-30 y F3-10 demuestran también que la despolimerización tuvo lugar hasta la formación de fragmentos menores del polímero. Sin embargo, los pesos moleculares determinados en algunas de las fracciones, no corresponden con el intervalo dentro del cual deberían encontrarse según el sistema de separación empleado, siendo menor en algunos casos. Se debe tener en cuenta que el  $M_w$  que se calcula es un promedio de peso molecular de todos los tamaños de cadena presentes en la mezcla. Además, Chen y col. 2010 aluden a la complicación de establecer un intervalo unificado de pesos moleculares promedio mediante membranas de corte de ultrafiltración en los COS. También hay que tener en cuenta la alta viscosidad del quitosano en solución, que puede contribuir a la obstrucción parcial de las membranas por su acumulación en los poros (Kim y Rajapakse., 2005). Esto ocurre sobre todo en el caso de las F 30, de ahí la alta heterogeneidad y polidispersidad de estas fracciones.

Por otro lado, se obtuvieron los perfiles cromatográficos mediante GPC detectados mediante Light Scattering Evaporativo (ESL) en función de la concentración de moléculas para todas las fracciones de COS obtenidas (F 30 F 10-30 F 5-10 y F 5) a partir de **Qs 1** y **Qs 3** sometido a despolimerización con lisozima y quitosanasa y

obtenidos mediante el **método 2** (Figura IV.6). Los resultados fueron similares a los obtenidos con Qs 1 y Qs 2 mediante el método 1 y mostraron que la despolimerización estaba teniendo lugar mediante el cambio de los perfiles de las fracciones de COS hacia volúmenes de elución mayores a medida que su  $M_w$  iba disminuyendo. En general, ambos quitosanos presentaron unas distribuciones de peso molecular promedio muy polidispersas. Los picos cromatográficos cambiaron a picos más estrechos a medida que fue disminuyendo el  $M_w$  de las fracciones de COS que fueron eluyendo a volúmenes mayores. Sin embargo, en la fracción más pequeña obtenida F 5 volvió a aumentar ligeramente la polidispersidad.



**Figura IV.6.** Perfiles cromatográficos de COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 3 con quitosanasa y lisozima mediante el método 2.

A partir de estos perfiles cromatográficos, por extrapolación en una curva de calibrado de quitosanos de peso molecular conocido, se obtuvieron los valores del  $M_w$  para cada uno de las fracciones de COS (Tabla IV.4). Al observar la F 30 se cumple, como se

venía viendo hasta ahora, que existe una mayor hidrólisis del Qs 3 por parte de la **lisozima**, ya que presenta un DA próximo al descrito como óptimo.

**Tabla IV.4.** Valores de peso molecular promedio ( $M_w$ ) para los COS obtenidos por despolimerización de Qs 1 y Qs 3 con lisozima y quitosanasa mediante el método 2.

	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)	$M_w$ ( $10^3$ g/mol)
	Qs inicial	F 30	F 10-30	F 5-10	F 5
Qs 1-Lisozima	179	64	4	1	0.6
Qs 1-Quitosanasa	179	31	17	12	3
Qs 3-Lisozima	261	21	3	1	0.3
Qs 3-Quitosanasa	261	30	18	8	2

Verheul y col. (2009) ya observaron la mayor susceptibilidad de derivados de quitosano reacetilados (DA 55%) a la hidrólisis de lisozima frente a quitosanos con bajo DA. Cuando se empleó **quitosanasa**, la degradación enzimática resultó ser semejante en los dos quitosanos empleados, debido quizás a la distribución aleatoria de los residuos en ambos quitosanos que han sido obtenidos por desacetilación homogénea y reacetilación. Los resultados encontrados en las otras fracciones fueron similares a los obtenidos para el Qs 1 y Qs 2 obtenidos mediante el método 1.

### 1.3.3. Determinación del grado de acetilación

En el caso de las fracciones de COS obtenidas a partir de **Qs 1** y **Qs 2** con quitosanasa y lisozima mediante el **método 1**, el contenido en acetato de estos COS, que se vio que estaba presente en los experimentos de análisis estructural por RMN, interfirió en este método. Esto es debido a que el acetato absorbe a la longitud de onda a la que se determina la N-acetilglucosamina, lo que dio lugar a valores muy bajos de DA .

Los valores de DA se obtuvieron mediante el método de la primera derivada descrito en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos para las diferentes fracciones de COS de **Qs 1** y **Qs 3** que se purificaron y separaron mediante el **método 2** (Tabla IV.5). Se comprobó

que los valores de DA, en todas las fracciones obtenidas a partir de ambos quitosanos y empleando lisozima y quitosanasa, excepto en F 5 para Qs 1-Quitosanasa, fueron superiores al DA del quitosano de partida.

**Tabla IV.5.** Valores de DA (%) para Qs 1 y Qs 3 despolimerizados con lisozima y quitosanasa mediante el método 2 (n=3).

	DA (%) Qs inicial	DA (%) F 30	DA (%) F 10-30	DA (%) F 5-10	DA (%) F 5
Qs 1-Lisozima	14±0.8	20±1.5	18±2.7	37±1.8	39±1.2
Qs 1-Quitosanasa	14±0.8	23±3.5	18±1.6	17±1.6	8±0.7
Qs 3-Lisozima	35±2.5	43±1.0	38±1.5	47±1.7	50±1.4
Qs 3-Quitosanasa	35±2.5	47±2.0	46±1.5	38±1.7	37±0.7

Se ha relacionado la despolimerización con la disminución del valor del DA en la despolimerización de quitosano con pepsina, papaína y pronasa como consecuencia de la desacetilación simultánea del quitosano (Vishu Kumar y col., 2004a; 2004b). En algunas investigaciones se ha observado que la despolimerización no provoca cambios importantes sobre el DA (Kittur y col., 2003b; Abd-Elmohdy y col., 2010). Sin embargo, en este caso los valores de DA mostraron que la desacetilación no estaba teniendo lugar y este aumento de DA podría deberse a la contribución de la mezcla heterogénea de oligosacáridos de distinto grado de polimerización (DP) y DA (Vishu Kumar y col., 2005). Por otro lado, si se tiene en cuenta la diferente forma de obtención de los quitosanos, uno obtenido por desacetilación homogénea (Qs 1) y otro por reacetilación del mismo (Qs 3) esto daría lugar a una distribución aleatoria de la cadena del polímero de los residuos GlcN o de los GlcNAc en la reacetilación. En el caso de la **lisozima**, su hidrólisis sobre enlaces de tipo AA-AA, y AA-AD hace que sea esperable encontrar un bajo porcentaje de grupos desacetilados frente al de acetilados, pudiendo originar pocos extremos AD que pasen a las fracciones más pequeñas, y menos en el caso del Qs 3 de mayor DA. Por otro lado, en el caso de la actuación de la **quitosanasa**, ésta no daría lugar a un alto porcentaje de grupos desacetilados debido a que sería más difícil que encontrar a enlaces de tipo D-A o D-D al ser la distribución más aleatoria. Igualmente sería más difícil en el caso de Qs 3, que además tiene pocos residuos

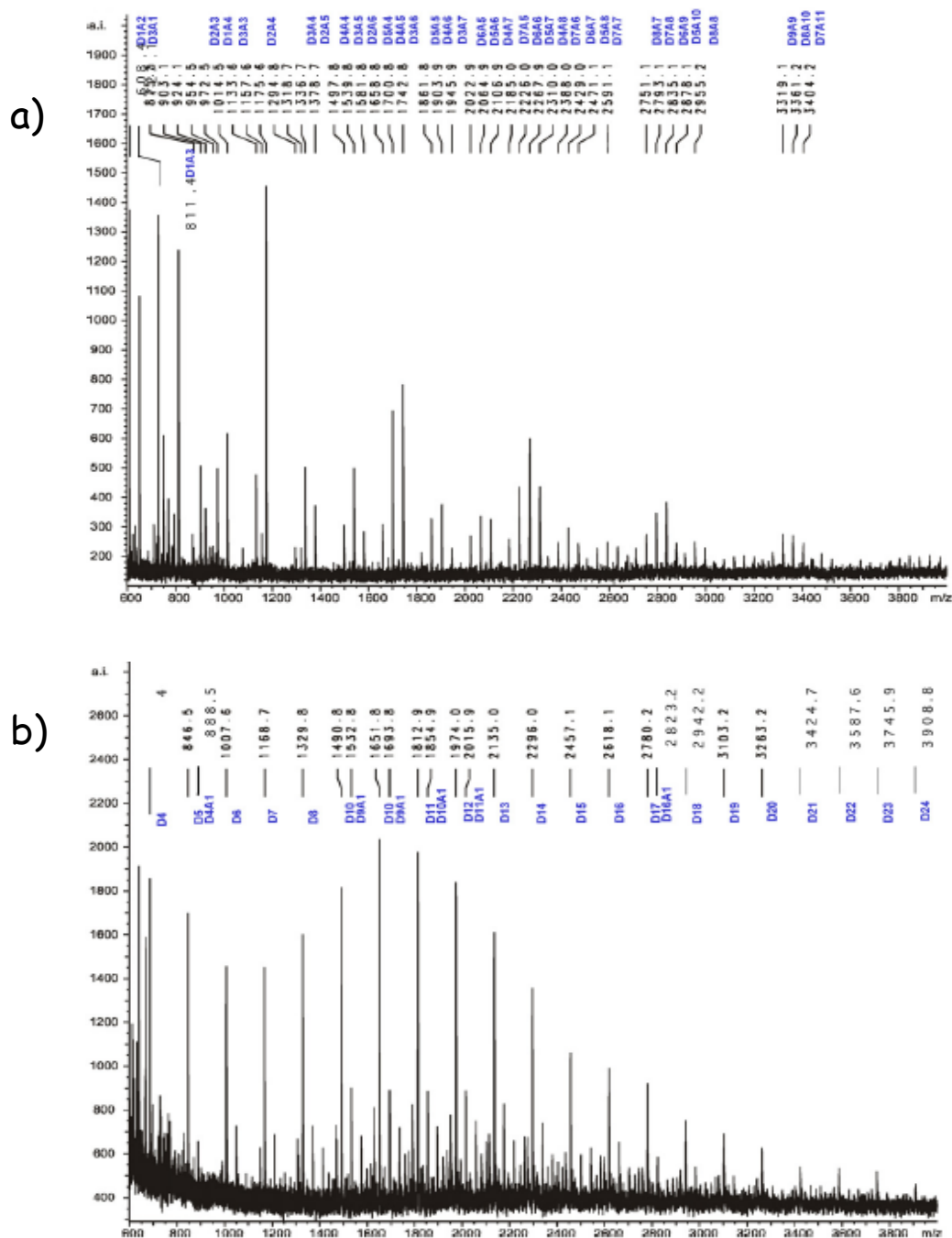
desacetilados. En la F 5 obtenida a partir de Qs 1 mediante quitosanasa, el DA disminuyó hasta un 8%. Esto podría ser debido a que la enzima tuviera más facilidad para encontrar residuos de tipo D-A y D-D, a medida que se encontrara cadenas más cortas.

#### 1.3.4. Análisis del patrón de distribución intramolecular de grupos acetilados

La despolimerización puede producir cambios en la estructura primaria y superior del quitosano, dando lugar a modificaciones en la distribución de residuos de GlcNAc, en el número de extremos reductores, en la disposición y conformación de las cadenas y en la cristalinidad. El estudio del patrón de distribución de residuos de GlcN y GlcNAc (PA) en la cadena del polímero se llevó a cabo mediante espectrometría MALDI-TOF-MS. Esta es una técnica de alta sensibilidad que ofrece la posibilidad de estudiar como se ha producido la degradación enzimática a nivel molecular (Dennhart y col., 2008).

En general, los resultados mostraron que se había obtenido una mezcla de COS con diferentes grados de despolimerización en función de la enzima y el quitosano empleado, encontrándose COS con el mismo DP pero con diferente número de residuos acetilados en posiciones distintas. Estos resultados son similares a los perfiles obtenidos por espectrometría de masas por otros autores (Caiqin y col., 2008; Xie y col., 2009).

En el caso de la despolimerización con **lisozima**, los productos mayoritarios encontrados derivados de la acción de la enzima presentaron un mayor contenido de residuos acetilados con respecto a los encontrados en los productos obtenidos con quitosanasa (Figura IV.7). El número de residuos acetilados osciló entre un valor máximo de 11-16 dependiendo de la fracción y el quitosano. Para la fracción F3-10 obtenida para el **Qs 2**, sobre el que se ha visto que esta enzima tendría una mayor afinidad, se obtuvieron mezclas de heterooligosacáridos con un DP comprendido entre 3-30 monómeros (Figura IV.7a). La distribución de residuos hallados dentro de estas cadenas fueron:  $D_1A_2$ ,  $D_3A_1$ ,  $D_2A_4$ ,  $D_3A_6$ ,  $D_5A_7$ ,  $D_7A_6$ ,  $D_6A_9$  y  $D_8A_{10}$  como distribuciones mayoritarias dentro de los DP 3, 4, 6, 9, 12, 13, 15 y 18 respectivamente. La F 10-30 para este mismo quitosano presentó un contenido de residuos acetilados altos pero menor con respecto a la F 3-10 siendo 13 el número máximo de residuos acetilados en una cadena.



**Figura IV.7.** Patrón de distribución de grupos acetilados (PA) mediante MALDI-TOF MS de la F 3-10 obtenida a partir de a) Qs 2-Lisozima y b) Qs 2-Quitosanasa.

En el caso del **Qs 1**, los COS presentaron menor número de residuos acetilados con respecto al Qs 2. Según Vårum y col. (1996), la lisozima hidroliza al quitosano por los enlaces AA-AA, y AA-AD, mientras que no podría hidrolizar a los enlaces AD-AA y

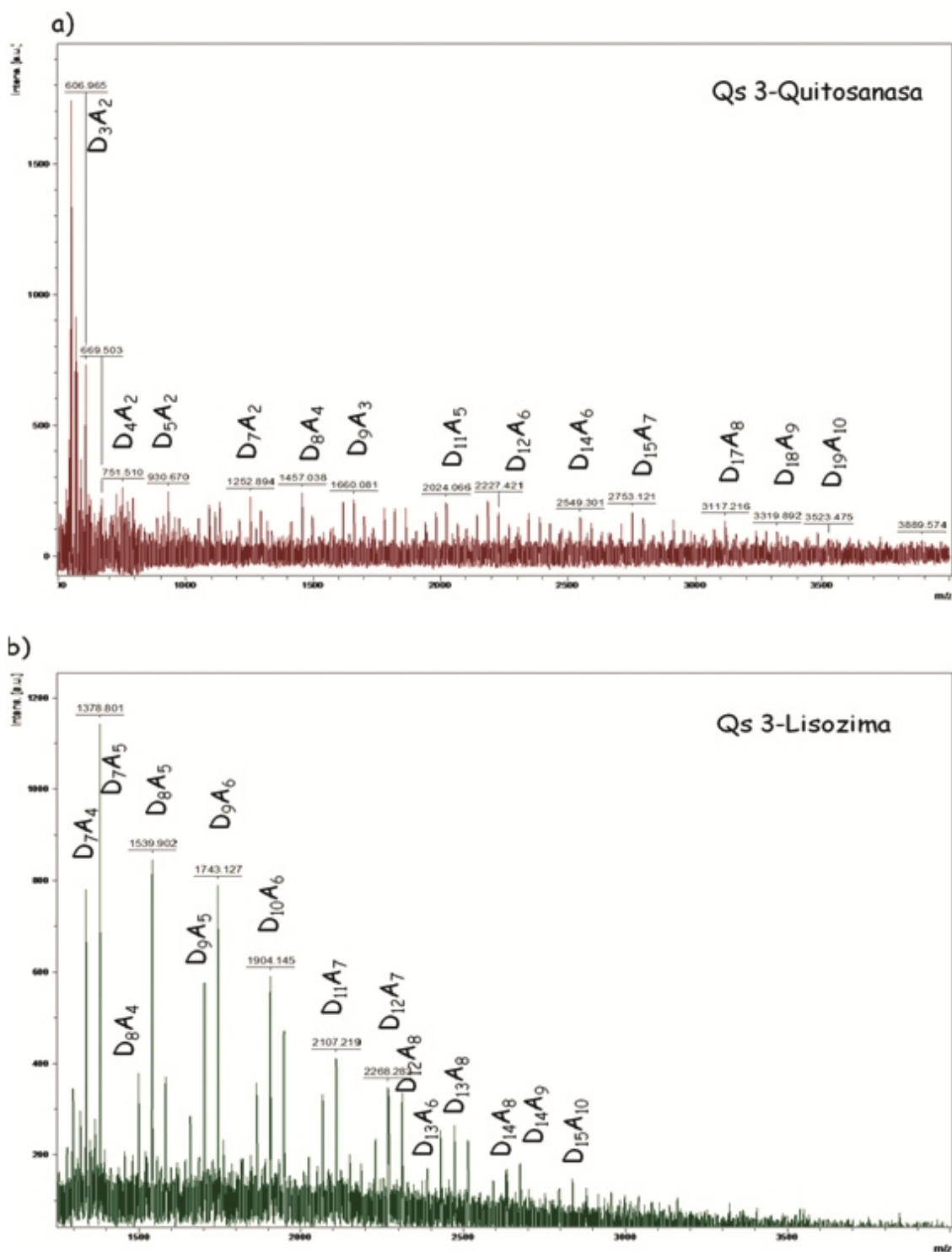
DD-AA o lo haría muy lentamente, de ahí la mayor probabilidad de actuación de esta enzima sobre el Qs 2 de mayor DA (22%).

En el tratamiento con **quitosanasa**, los productos mayoritarios encontrados derivados de la acción de la enzima presentaban un perfil en el que destacaban los picos de productos totalmente desacetilados (Figura IV.7b). El número máximo de residuos acetilados encontrado en todas las fracciones estudiadas a partir de los dos quitosanos fue tres. Los residuos fueron del tipo  $D_{n-m}A_m$  siendo  $m=0-3$  y tomando  $n$  un valor comprendido entre el valor mínimo y máximo del grado de polimerización. La existencia de un alto contenido de residuos GlcN indica que la enzima hidrolizó preferentemente los enlaces tipo A-D o D-A y no enlaces de tipo D-D. Hay que tener en cuenta que la quitosanasa de *S. griseus* pertenece a la clase III y puede hidrolizar enlaces tanto del tipo D-A como del tipo D-D en quitosanos parcialmente acetilados. De hecho, los residuos GlcNAc son importantes para una hidrólisis efectiva de la quitosanasa ya que son un requisito imprescindible para la unión a su centro activo (Tanabe y col. 2003). Estos resultados son coincidentes con los resultados publicados por Yalpani y Halls. (1984) para el caso de la quitosanasa de *Bacillus circulans* que tiene una especificidad de sustrato similar a la de quitosanasa de *S. griseu* utilizada en este trabajo. La diferencia más notable en cuanto a la distribución de residuos en la cadena polimérica entre los dos quitosanos, fue encontrada en la F3-10, que para el **Qs 1** se encontraron cadenas poliméricas con un DP comprendido entre 6-19 monómeros y para el **Qs 2** con un DP comprendido entre 4-30 monómeros, mostrándose de nuevo una mayor actuación de la quitosanasa sobre el quitosano de menor DA en el que, aparte de hidrolizar enlaces de tipo D-A, sería probable que encontrara una mayor proporción de D-D también para hidrolizar y se llegaría hasta grados de polimerización más bajos, resultados coincidentes con los encontrados por viscosimetría en el apartado 1.1. Los grados de polimerización encontrados en la F 10-30 (Qs 1 DP 4-33 y Qs 2 DP 4-37) fueron similares en ambos quitosanos. Por otro lado, en las fracciones F 3-10 y F 10-30 de Qs 2 habría una mayor proporción de cadenas con grupos acetilados (máximo 3 residuos acetilados por fragmento). El hecho de que no existan diferencias muy grandes entre la F 3-10 y F 10-30 vuelve a mostrar que no existe una separación precisa mediante las membranas de ultrafiltración, debido probablemente a la conformación del polímero en la solución; y esto da lugar a fracciones muy heterogéneas en cuanto a longitud de las cadenas.

Por otro lado se llevó a cabo el estudio de la distribución de residuos de GlcN y GlcNAc en las fracciones obtenidas a partir de **Qs 1** y **Qs 3** mediante el **método 2** (Figura IV.8).

Los productos mayoritarios derivados de la acción de la **lisozima** presentaron un mayor contenido de residuos acetilados con respecto a los encontrados en los productos obtenidos con quitosanasa, como ya se había visto anteriormente en el **Qs 1** y **Qs 2**. En el caso del **Qs 1** en las dos fracciones más pequeñas F 5-10 y F 5, el DP detectado fue semejante oscilando entre 4-30 monómeros, y encontrándose secuencias con un alto número de residuos acetilados y desacetilados. La secuencia con el máximo número de ambos residuos en estas fracciones fue  $D_{18}A_{12}$  para F 5-10 y  $D_{15}A_{10}$  para F 5, siendo mayoritarias las secuencias con un número intermedio de residuos acetilados.

En el **Qs 3** el número de residuos acetilados también fue alto. El DP de las fracciones analizadas osciló entre 3-32 unidades monoméricas. En la F 10-30 la secuencia más acetilada que se encontró fue  $D_{16}A_8$ , siendo las secuencias mayoritarias las de seis residuos acetilados. En las fracciones más pequeñas F 5-10 y F 5 el número de residuos acetilados dentro de una secuencia fue mayor:  $D_{16}A_{11}$  y  $D_{13}A_{11}$  respectivamente, siendo el número mayoritario de secuencias de seis y siete residuos acetilados. Como inicialmente el **Qs 3** presenta un mayor DA, la lisozima tendría mayor probabilidad de encontrar enlaces de tipo A-A por los que tiene más especificidad. Una vez iniciada la hidrólisis, mayoritariamente podrían existir secuencias alternas de residuos acetilados y desacetilados y por ello el número de estos sigue siendo elevado en los heterooligosacáridos encontrados en las fracciones más pequeñas. Cabría esperar que para este quitosano con un DA cercano al valor óptimo de la actuación de la enzima la hidrólisis fuera mayor. Sin embargo, debemos tener en cuenta que se trata de un quitosano reacetilado en el que la distribución de residuos acetilados se produce de forma aleatoria y por ello las diferencias entre un quitosano y otro no son tan grandes.



**Figura IV.8.** Patrón de distribución de grupos acetilados (PA) mediante MALDI-TOF MS de la F 5-10 obtenida a partir de a) Qs 3-Quitosanasa y b) Qs 3-Lisozima .

Los productos mayoritarios derivados de la acción de la **quitosanasa** sobre el **Qs 1** presentaron un perfil en el que destacaban las señales de productos totalmente desacetilados, presentando un máximo de tres residuos acetilados. La F 5-10 presentó

residuos del tipo  $D_{n-m}A_m$  siendo  $m=0-3$  y tomando  $n$  un valor comprendido entre el valor mínimo y máximo del grado de polimerización. El DP para esta fracción presentó de 3-25 monómeros, encontrándose sólo un residuo triacetilado en una de las secuencias:  $D_{18}A_3$ . La F 5 presentó también un solo residuo triacetilado. De nuevo se vuelve a comprobar que la enzima hidrolizó preferentemente enlaces tipo D-A y no enlaces D-D por el elevado número de grupos desacetilados que quedaron sin hidrolizar. Además de por el tipo de enzima, que como se apuntaba anteriormente hidroliza enlaces con grupos acetilo, pudiera ser que cada vez encontrara menos enlaces específicos que atacar como ya se sugería anteriormente. En el caso del **Qs 3** los productos obtenidos con quitosanasa presentaron un perfil en la distribución de residuos GlcNAc y GlcN muy diferente al encontrado normalmente con la actuación de esta enzima. Hay que tener en cuenta que el quitosano del que partimos tiene un DA del 35 %, por lo que es esperable encontrar más unidades acetiladas en este caso y puede ser que la actuación de la enzima no esté tan favorecida con estos valores de DA. En la F 5-10 y F 10-30 se detectaron moléculas de prácticamente el mismo DP~4-34, presentándose en las moléculas como máximo un número de 11 y 13 residuos acetilados y 21 residuos desacetilados en ambas fracciones, siendo mayoritarias las secuencias con un número intermedio de residuos acetilados. Pudiera ser que en este caso la enzima rompiera más o menos por igual enlaces tipo A-D, D-A o D-D, hasta llegar un punto en el cual se pudiera saturar. La F 5 presentó un DP de 3-18 unidades monoméricas, siendo 6 el número máximo de unidades acetiladas y predominando las secuencias di y triacetiladas.

La Tabla IV.6 muestra un resumen con los DP y el número máximo de residuos acetilados encontrado en las fracciones obtenidas a partir de Qs 1 y Qs 2 mediante el método 1 y de Qs 1 y Qs 3 mediante el método 2. En general, se puede establecer que en el caso de los **COS obtenidos partir de Qs 1 y Qs 2**, la actuación de la **lisozima** da lugar a un mayor número de residuos acetilados en el caso del Qs 2, por el que tiene mayor afinidad, y en el que existe una distribución no aleatoria de los residuos acetilados inicialmente. La actuación de la **quitosanasa**, sin embargo, da lugar a COS con un máximo de tres residuos acetilados en sus moléculas independientemente del quitosano empleado, siendo mayor la proporción de cadenas con grupos acetilados presentes en el caso del Qs 2, de mayor DA. En los **COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 3** mediante **lisozima** existe un alto número de residuos acetilados en ambos

quitosanos en los que existe una distribución aleatoria inicialmente de los residuos acetilados. En el caso de **quitosanasa**, fue mayor el contenido de residuos acetilados en el caso de los COS obtenidos a partir del Qs 3 por el que tendría menor afinidad al tener una alto DA. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante la determinación del DA en Qs 1 y Qs 3 por el método de la primera derivada.

**Tabla IV.6.** Valor de intervalo de DP y número de residuos máximos acetilados en las distintas fracciones de COS obtenidas a partir de Qs 1 y Qs 2 mediante el método 1 y de Qs 1 y Qs 3 mediante el método 2.

MUESTRA	DP		Nºmáximo residuos acetilados	
	Quitosanasa	Lisozima	Quitosanasa	Lisozima
MÉTODO 1				
Qs 1 F 10-30	4-33	3-22	3	11
Qs 1 F 3-10	6-19	ND	3	ND
Qs 2 F 10-30	4-37	3-21	3	13
Qs 2 F 3-10	4-30	3-30	3	16
MÉTODO 2				
Qs 1 F 10-30	ND	ND	ND	ND
Qs 1 F 5-10	3-25	4-30	3	12
Qs 1 F 5	3-9	4-25	3	10
Qs 3 F 10-30	5-32	4-24	11	8
Qs 3 F 5-10	4-34	6-27	13	11
Qs 3 F 5	3-18	5-23	6	11

ND: Análisis con poca resolución de señales en los que no se pudo asignar la distribución de residuos acetilados.

En cuanto al DP encontrado, existen numerosos estudios que revelan la especificidad en la obtención de COS con bajos DP cuando se utiliza quitosanasa (Dvoraková y col., 2001; Hsiao y col., 2008). Park y col. (1999) plantearon que la mayoría de las quitosanasas producen dímeros, trímeros y tetrámeros frente a oligómeros con un alto

DP, encontrando que quitosanasas de *Matsuebacter chitosanotabidus* daban lugar desde monómeros a trímeros. Shimosaka y col. (1995) estudiaron la producción de dímeros y trímeros por parte de quitosanasas de *Acinetobacter spp.* Kuroiwa y col. (2009) observaron como con quitosanasas de *Bacillus pumilus* BN-262 la concentración de pentámeros y hexámeros inicialmente crecía, y como después de un tiempo estos pasaron de ser intermedios de reacción que se degradaban dando lugar a una alta concentración de dímeros y trímeros. Sin embargo, los DP encontrados en las distintas fracciones de COS estudiadas en este trabajo fueron altos para la quitosanasas, y también para la lisozima. Se encontraron como fragmentos más pequeños, tetrámeros en el caso de la quitosanasas y trímeros en el caso de la lisozima. Este hecho se podría atribuir a varios factores. Por un lado, a medida que progresa la despolimerización, la enzima cada vez tendría menos centros específicos a los que atacar, o por el contrario, pudiera llegar un momento en el que la enzima se podría saturar. Por otro lado, todo apunta a que el efecto de la transglicosilación podría estar teniendo lugar. Esta reacción consiste en la transferencia de un residuo N-acetilglucosamina (GlcNAc) a un grupo (GlcNAc)<sub>2</sub> para formar (GlcNAc)<sub>3</sub>. Este es el paso limitante de la reacción, puesto que una vez que este trisacárido alcanza su máximo de formación la cadena se puede elongar hasta formar tetrámeros o pentámeros, resultados que se han visto bajo la utilización de lisozima (Yoon, 2005). Esta reacción también se ha descrito en el caso de la quitosanasas, para la que algunos autores proponen que los trímeros pueden actuar como aceptores de grupos y los pentámeros como donadores (Tanabe y col., 2003). Otros resultados demuestran que, además, los pentámeros y hexámeros también pueden actuar como aceptores de grupos dando lugar a una mayor elongación de la cadena (Hsiao y col. 2008). La acumulación de dímeros y trímeros aumentaría la posibilidad de que la reacción de transglicosilación ocurriese. La reacción también se vería favorecida por una alta concentración de sustrato ya que se ha descrito que la eficiencia de la transglicosilación depende de la capacidad del aceptor o donador glicosídico para competir con una molécula de agua, inhibiendo la acción de despolimerización de la enzima (Anna y col., 1998).

Teniendo en cuenta los valores altos de DP que se obtuvieron, no existe una relación directa con los  $M_w$  obtenidos por GPC. Hay que considerar que la composición de las fracciones de COS depende del DP y del número de residuos de GlcNAc presentes y ello no tiene que ir siempre en paralelo al  $M_w$ , que viene dado por una aproximación al

promedio de una distribución de pesos moleculares (Chen y col., 2010). Un mismo valor de DP puede dar lugar a un diferente  $M_w$  en función de los grupos acetilados presentes en la molécula.

### Conclusiones parciales

- La despolimerización enzimática está más favorecida por parte de la lisozima en la degradación de quitosanos con un DA entre 22-35% y de la quitosanasa en quitosanos con bajo DA (14%). Además, se demostró una mejor actuación de las enzimas en quitosanos en los que existe una distribución no aleatoria de residuos acetilados y desacetilados.
- Se probaron dos métodos de separación y purificación de COS y se consiguió establecer una metodología de trabajo para un mayor grado de purificación y mejor rendimiento.
- La caracterización de los COS obtenidos en cuanto al  $M_w$ , el DA y el patrón de distribución de patrones de residuos acetilados permitió establecer la formación de COS con mayor contenido de residuos acetilados en el caso de la actuación de lisozima. La quitosanasa dio lugar a COS con un máximo de 3 residuos acetilados en el caso de quitosanos con DA 14-22%; sin embargo, en quitosanos con un DA mayor (35%) dio lugar a COS número de residuos acetilados entre 6 y 13. Los COS obtenidos con lisozima presentaron cadenas de monómeros con un número máximo de residuos acetilados comprendido entre 8 y 16.

#### 1.4. Propiedades funcionales de los quito-oligosacáridos (COS)

La determinación de todas las propiedades funcionales se ha llevado a cabo en las fracciones de COS obtenidas a partir de Qs 1 y Qs 3 por despolimerización con quitosanasa mediante el método 2 de separación y purificación.

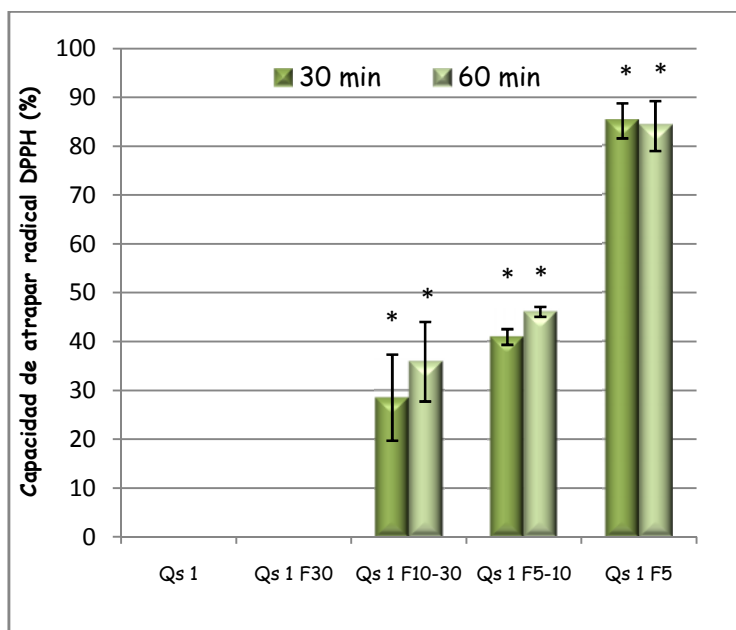
#### **1.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante de los COS**

Existen numerosos estudios que demuestran que tanto el quitosano como los COS obtenidos a partir de este polímero presentan actividad antioxidante (Yin y col., 2002; Je y col., 2004; Chien y col., 2007). Liu y col. (2008), llevaron a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* demostrando que el quitosano es capaz de regular la actuación de las enzimas con mayor capacidad antioxidante en el organismo y de reducir la peroxidación lipídica. Park y col. (2003b) mostraron la capacidad de los COS con un  $M_w$   $1-3 \times 10^3$  g/mol para secuestrar radicales libres. Je y col. (2004) comprobaron la mayor capacidad de atrapar radicales de DPPH de oligosacáridos de quitosano con un peso molecular promedio  $5-1 \times 10^3$  g/mol frente a pesos moleculares de  $10-5 \times 10^3$  g/mol.

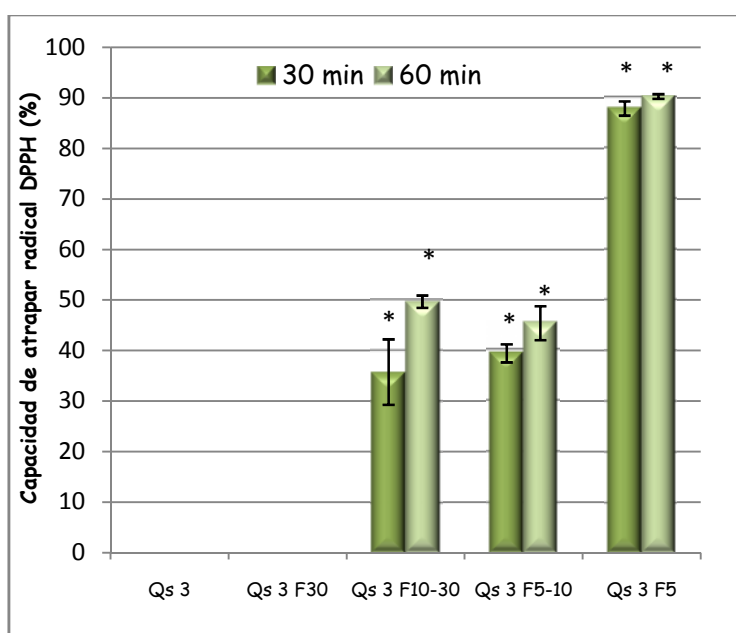
Para llevar a cabo la determinación de la actividad antioxidante de los COS, se emplearon dos métodos distintos con el fin de estudiar el posible mecanismo de la propiedad antioxidante del polímero. Se empleó el método de 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) basado en la neutralización de radicales libres y el método “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP) basado en el poder de reducción sobre soluciones de  $Fe^{3+}$ .

##### **1.4.1.1. Capacidad para atrapar radicales libres DPPH**

Las Figuras IV.9 y IV.10 muestran la capacidad de secuestrar radicales libres a 30 y 60 min para los COS obtenidos mediante despolimerización enzimática de Qs 1 y Qs 3 con quitosanasas, respectivamente. En primer lugar, se comprobó que cuando la capacidad de atrapar radicales libres era alta no existían diferencias importantes entre las medidas de absorbancia a 30 y 60 min. Sin embargo, cuando los productos desarrollaban una menor capacidad de secuestrar radicales libres, era necesario dejar actuar al COS frente al radical libre durante 60 min.



**Figura IV.9.** Porcentaje de la capacidad de atrapar radicales DPPH de Qs 1 y los COS obtenidos a partir de Qs 1 (n=3) (\* indica diferencias significativas  $p < 0.05$  con respecto al Qs 1).



**Figura IV.10.** Porcentaje de la capacidad de atrapar radicales DPPH de Qs 3 y los COS obtenidos a partir de Qs 3 (n=3) (\* indica diferencias significativas  $p < 0.05$  con respecto al Qs 3 ).

Los resultados mostraron que la capacidad de atrapar radicales libres de las fracciones de COS aumentaba de forma significativa ( $p < 0.05$ ) a medida que disminuía el  $M_w$  de las fracciones, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Liu y col. (2008). No se desarrolló actividad antioxidante en el caso de los quitosanos de partida y las fracciones

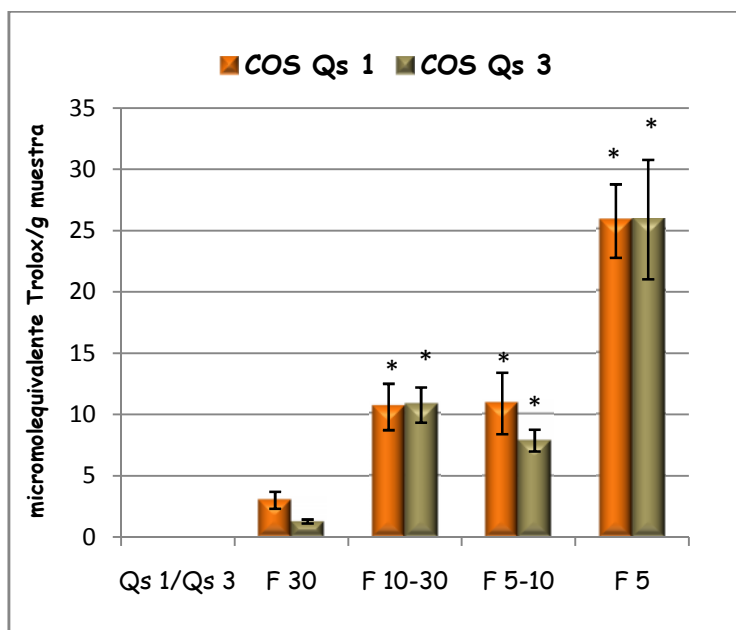
mayores de  $30 \times 10^3$  g/mol, lo que se atribuye a la baja solubilidad del polímero y de las fracciones de alto  $M_w$  en estas condiciones. No existieron diferencias significativas en los valores de capacidad para secuestrar radicales DPPH entre las fracciones de COS con mayor DA obtenidas a partir de Qs 3 reacetilado y las obtenidas a partir de Qs 1 que presentaron menor número de residuos acetilados. Estos resultados no concuerdan con los demostrados por Je y col. (2004) según los cuales, son los COS con un bajo DA (10%) los que preferentemente demuestran capacidad para neutralizar radicales DPPH, hidroxilos y superóxidos.

El mecanismo mediante el cual los COS presentan capacidad antioxidante no es aún muy claro, aunque parece ser que se atribuye a la capacidad de donar protones o de ceder electrones de transferencia de los grupos amino, y también a la capacidad de donar protones de los grupos hidroxilos unidos a carbono en las posiciones C-2, C-3 y C-6 del anillo de glucopiranososa (Xie y col., 2001; Park y col., 2003a, Park y col., 2004a; Je y col., 2004; Xing y col., 2005; Kim y Rajapakse., 2005). Según los resultados obtenidos, parece ser que el mecanismo de actividad antioxidante no estaría relacionado en este caso con la mayor o menor presencia de grupos amino, sino con los grupos hidroxilo; y por tanto, no observándose la contribución de un menor DA de los COS al desarrollo de una mayor capacidad de atrapar radicales libres. Sin embargo, sí que parece clara la relación de un menor  $M_w$  con una capacidad preferente para neutralizar radicales DPPH.

#### **1.4.1.2. Poder reductor**

La Figura IV. 11 muestra el poder reductor de los COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 3 sobre soluciones de  $Fe^{3+}$ . La F 5, de menor  $M_w$ , presentó la mayor capacidad reductora respecto a las otras fracciones. Esto coincide con la mayor capacidad de secuestrar radicales libres que presentó esta fracción. No existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de capacidad reductora desarrollada en las F 5-10 ( $M_w$  12 y  $8 \times 10^3$  g/mol para la fracción obtenida con Qs 1 y Qs 3, respectivamente) y las F 10-30 ( $M_w$  17 y  $18 \times 10^3$  g/mol para la fracción obtenida con Qs 1 y Qs 3, respectivamente). Por ello, teniendo en cuenta sólo estas dos fracciones, no se puede establecer una relación clara entre un menor  $M_w$  y una mayor capacidad reductora. Se observó que los quitosanos controles no presentaron capacidad reductora como ocurrió en el método del DPPH, y la

F 30 presentó un valor mínimo de poder reductor, lo que atribuimos de nuevo a la baja solubilidad de las muestras en medio acuoso. No existieron diferencias significativas en cuanto al poder reductor de los COS obtenidos con el Qs 1 y el Qs 3.



**Figura IV.11.** Capacidad reductora de los COS obtenidos a partir de Qs 1 y Qs 3 expresado como micromolequivalente Trolox/g muestra (n=3) (\* indica diferencias significativas  $p < 0.05$  con respecto al Qs 1 y Qs 3).

La capacidad reductora de los COS, estaría relacionada con su capacidad de donar electrones y la transición de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Según los resultados obtenidos, ni los quitosanos ni los COS parecen presentar altas capacidades de reducir  $Fe^{3+}$ . Otros autores han encontrado bajo poder reductor por parte del quitosano (Kanatt y col., 2008). Sin embargo, se ha descrito que el quitosano retarda la oxidación lipídica mediante la quelación de iones  $Fe^{2+}$  a través de sus grupos amino o hidroxilos, eliminando así la actividad prooxidante de este metal o su conversión en iones férricos  $Fe^{3+}$  (Kim y Thomas., 2007). A pesar de haberse descrito esta importante acción quelante de iones ferrosos por parte del quitosano (Tikhonov y col., 1996 ; Kim y Thomas., 2007), no existen demasiadas investigaciones de la actividad antioxidante del polímero mediante su capacidad quelante. La capacidad de atrapar radicales hidroxilo

por parte de los COS podría deberse a la capacidad de quelar  $\text{Fe}^{2+}$ , además de a la donación de protones vía grupos hidroxilo y aminos (Kim y Rajapakse., 2005). Por otra parte, Huang y col. (2006) comprobaron la contribución indirecta de la quelación de iones  $\text{Fe}^{2+}$  en la actividad de atrapar radicales hidroxilo. Por ello, hay que considerar la posible interferencia de la capacidad quelante del quitosano en este método.

### Conclusiones parciales

- Se puede establecer que los COS con un  $M_w$  comprendido entre  $2-3 \times 10^3$  g/mol presentaron mayor capacidad para atrapar radicales libres DPPH y mostraron un mayor poder reductor sobre soluciones de  $\text{Fe}^{3+}$ , independientemente del DA.

#### 1.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los COS

Existen numerosos estudios que relacionan la actividad antimicrobiana con la fuente de obtención del quitosano y los COS, pero también son importantes otros parámetros como el DP (Park y col., 2002; Park y col., 2004; Tsai y col., 2004), las especies de microorganismos (Gerasimenko y col., 2004; Park y col., 2004b), el  $M_w$  y el DA (Tsai y col., 2002; Mengibar y col., 2011). Existen varias hipótesis acerca del mecanismo de actividad antimicrobiana del quitosano. La más plausible es un cambio en la permeabilidad de la célula debido a las interacciones entre el quitosano, que es un polication, y las cargas electronegativas de la superficie de la pared celular (Devlieghere y col., 2004). Además, se le atribuye la posible penetración en la bicapa fosfolipídica de la membrana citoplasmática con la consiguiente perturbación de esta y la posterior muerte celular (Li y col., 2010). El bajo  $M_w$  de los COS permitiría de forma fácil la penetración de estas moléculas en la membrana citoplasmática (Coma y col., 2003; Vishu Kumar y col., 2005). Por otro lado, parece que este polímero es capaz de unirse al ADN e inhibir la síntesis de mRNA y la transcripción de ADN (Sudarshan y col., 1992).

La mayoría de las bacterias Gram-positivas resultan ser más susceptibles al quitosano que las Gram-negativas. Esto es debido a las diferencias estructurales de sus envolturas celulares, ya que las bacterias Gram-negativas presentan una barrera externa que el quitosano tendría que superar (No y col., 2002; Zhong y col., 2008) y un alto número de cargas negativas presentes en la superficie de su pared celular que les confiere más

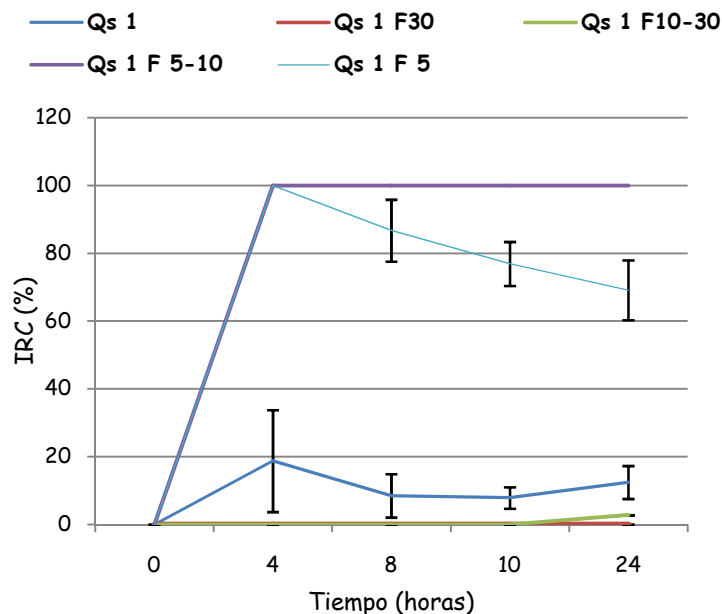
hidrofobicidad (Wang, 1992; Chung y col., 2004). Aunque Cuero y Osuji (1991) han demostrado que en bacterias Gram-negativas el quitosano es capaz de quelar fácilmente los metales divalentes de la membrana externa, desestabilizando y superando la barrera antes de entrar en la membrana citoplasmática. En otros estudios se plantea que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de bacterias (Wang y col., 2004).

En este trabajo de investigación se han testado como bacteria Gram-negativa *Salmonella typhimurium* y como bacteria Gram-positiva: *Clostridium difficile*, pudiendo estudiar si existe alguna diferencia en cuanto a la actuación del quitosano y los COS como agente bactericida frente a bacterias diferentes estructuralmente.

#### **1.4.2.1. Actividad antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium***

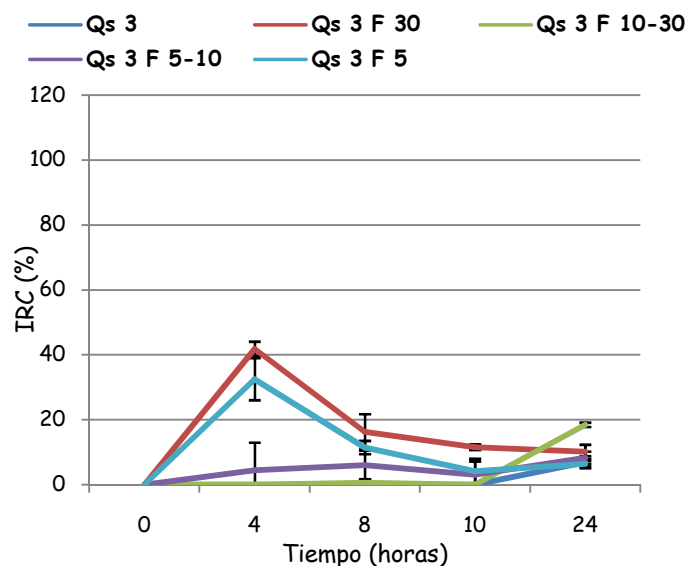
La Figura IV.12 muestra el porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) con el tiempo de incubación para Qs 1 y sus COS. El efecto antimicrobiano frente a *Salmonella typhimurium*, bacteria Gram-negativa, fue estudiado mediante la evolución del efecto de los COS a lo largo de distintas horas hasta alcanzar las 24 horas de incubación.

En general, a excepción de dos fracciones que presentaron un notable porcentaje de inhibición de esta bacteria, los resultados mostraron que la mayoría de las fracciones de COS consiguen ralentizar el crecimiento de la bacteria durante las cuatro primeras horas, para después alcanzar valores de crecimiento semejantes a los presentados por el control positivo. El Qs 1 presentó valores semejantes al control positivo durante las diez primeras horas de incubación y a partir de aquí ralentizó el crecimiento de la bacteria aunque en muy bajo porcentaje. Las fracciones procedentes de Qs 1, F 30 y F 10-30 no presentaron inhibición frente a *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, F5-10 presentó un 100% de inhibición para todos los tiempos estudiados y F 5 ralentizó en un alto porcentaje el crecimiento de la bacteria durante las primeras horas, presentando finalmente un IRC del 69 %.



**Figura IV.12.** Porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) frente a *S. typhimurium* de Qs 1 y COS obtenidos a partir de Qs 1 (n=3).

El IRC (%) con el tiempo de incubación para Qs 3 y los COS obtenidos a partir de él, se muestran en la Figura IV.13. El Qs 3 no presentó inhibición frente a *Salmonella typhimurium*. En cuanto a todas las fracciones obtenidas a partir de este quitosano, éstas ralentizaron el crecimiento de la bacteria durante las cuatro primeras horas y a partir de aquí, dieron lugar a un crecimiento similar al del control positivo.



**Figura IV.13.** Porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) frente a *S. typhimurium* de Qs 3 y COS obtenidos a partir de Qs 3 (n=3).

La Tabla IV.7 muestra los resultados encontrados en las muestras en porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) de crecimiento de *Salmonella typhimurium* después de 24 horas de incubación. Los resultados muestran que no existe un alto porcentaje de inhibición de los COS frente a esta bacteria, salvo en el caso de la F 5-10 y la F 5 obtenidas a partir del Qs 1 que inhibieron el crecimiento de la bacteria significativamente ( $p < 0.05$ ). Se puede establecer una relación entre la presencia de residuos acetilados y la actividad antimicrobiana de los COS. De manera que las fracciones que presentaron tan sólo tres residuos acetilados, según los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas, y que tienen el menor DA, como se vio en el apartado 1.3.4, fueron las más activas inhibiendo a *Salmonella typhimurium*. Las mismas fracciones procedentes de Qs 3 con un mayor número de residuos acetilados no presentaron inhibición.

Esto concuerda con lo mostrado por Tsai y col. (2002). Chen y col. (1998) y Takahashia y col. (2008) también encontraron que a menor DA, la actividad antimicrobiana tiende a aumentar. Vishu Kumar y col. (2007) relacionan la alta inhibición bacteriana de los COS con el bajo valor de DA (~14–19%), y por consiguiente con la protonación de los grupos amino del C2, producida en las condiciones experimentales

**Tabla IV.7.** Porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) frente a *S. typhimurium* de Qs 1, Qs 3 y COS obtenidos a partir de estos (n=3) (\* indica diferencias significativas  $p < 0.05$  con respecto al quitosano inicial).

	IRC (%) Qs inicial	IRC (%) F 30	IRC (%) F 10-30	IRC (%) F 5-10	IRC (%) F 5
Qs 1-Quitosanasa	12.4±4.9	0.0 ± 0.0	2.8±0.0	100.0*± 0.0	69.1*±8.
Qs 3-Quitosanasa	6.9±1.9	10.1±2.1	18.4±0.6	8.3±1.9	6.5±0.8

Con respecto al  $M_w$ , se pudo comprobar que la F 5-10 con un  $M_w$  de  $12 \times 10^3$  g/mol, presentó una inhibición completa de la bacteria. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kittur y col. (2005) que establecieron que fracciones de COS con un

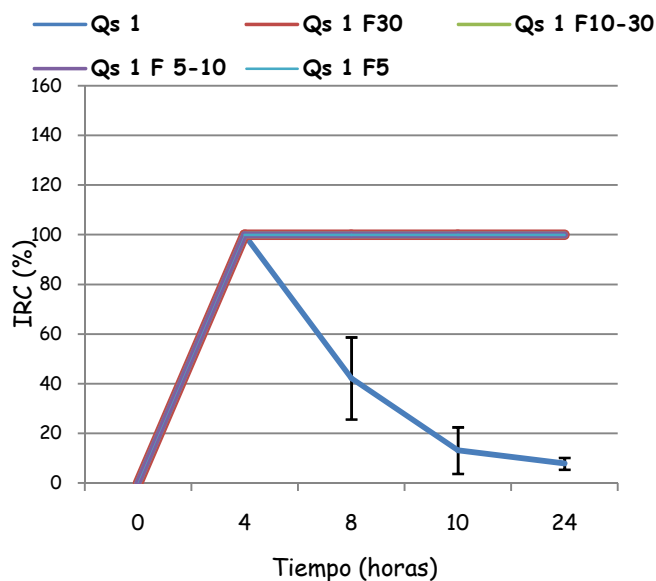
intervalo de  $M_w$  de  $5-10 \times 10^3$  g/mol producen una fuerte actividad antimicrobiana frente a *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*. Algunos autores (Jeon y col., 2001; Park y col., 2004b; Zivanovic y col., 2004; Kim y col., 2011; Mengíbar y col., 2011) han establecido que puede existir una relación importante entre el  $M_w$  y la actividad antimicrobiana de quitosanos y COS en distintos estudios. El efecto de quitosanos de distinto  $M_w$  frente a *S. typhimurium*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes* mostrado por Kim y col. (2011) fue la completa inhibición de *L. monocytogenes* mediante quitosanos de un amplio intervalo de  $M_w$ , sin embargo en el caso de *S. typhimurium* y *E. coli* fueron los quitosanos de menor  $M_w$  estudiado ( $30$  y  $90 \times 10^3$  g/mol) los que presentaron inhibición frente a estas bacterias. Parece ser que un quitosano parcialmente hidrolizado da lugar a una mejor actividad antimicrobiana frente a un quitosano sometido a una hidrólisis más completa según Uchida y col. (1989). En cuanto al efecto de COS, Jeon y col. (2001) demostraron que los COS con un  $M_w$  comprendido entre  $1$  y  $10 \times 10^3$  g/mol, presentaban un comportamiento crítico en la inhibición de diferentes microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, y que sin embargo esta aumentaba cuando el valor de  $M_w$  se incrementaba. Estudios previos en nuestro laboratorio Mengíbar y col. (2011) mostraron que los COS con un  $M_w$  comprendido entre  $10$  y  $30 \times 10^3$  g/mol presentaron la mayor acción antimicrobiana frente a *Campylobacter jejuni*. Ueno y col. (1997) obtuvieron resultados similares, ya que el empleo de COS con un  $M_w$  menor de  $2.2 \times 10^3$  g/mol no es capaz de inhibir el crecimiento de distintas bacterias mientras que los COS de  $5.5 \times 10^3$  g/mol son capaces de inhibirlo en función de la concentración.

Por tanto, en la mayoría de los casos, se atribuye una alta actividad antimicrobiana a COS con un DA comprendido entre  $10$  y  $15$  %, y se establece que la actividad antimicrobiana aumenta en los COS con un  $M_w$  intermedio (Kim y Rajapakse., 2005). Pero no parece existir un consenso totalmente claro en el establecimiento de un  $M_w$  óptimo que pueda producir una supresión total del crecimiento bacteriano. En general, se podría decir que las fracciones de COS con un intervalo de  $M_w$  comprendido entre  $5$  y  $27 \times 10^3$  g/mol son las más efectivas como agentes antimicrobianos (Gerasimenko y col., 2004). También hay que tener en cuenta que la actividad antibacteriana dependerá del peso molecular promedio dependiendo de la bacteria estudiada, como propusieron No y col. (2002) que estudiaron una amplia batería de quitosanos y COS frente a distintos microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.

El bajo porcentaje de IRC encontrado en los quitosanos de partida y las fracciones de mayor peso molecular (F 30) se podría explicar debido a la baja solubilidad de estos en las condiciones experimentales, o bien a la posibilidad de que los grupos aminos se encuentren formando puentes de hidrógeno debido a un alto contenido en estos en el caso del Qs 1, que puede promover el entrecruzamiento de cadenas poliméricas reduciéndose su número para atacar la superficie bacteriana (Aranaz y col., 2009). Además, su mayor tamaño podría contribuir a una mayor dificultad para atravesar la membrana citoplasmática y dar lugar al bloqueo de nutrientes y a la lisis de la bacteria (Cuero y Osuji., 1991; Tokura y col., 1997). Aún así, los Qs de partida y sus F 30 presentaron una débil inhibición frente a la bacteria (excepto la F 30 obtenida a partir de Qs 1), lo que sugiere que las cadenas de menor tamaño, presentes en estas muestras tan polidispersas, se podrían solubilizar, siendo las responsables de esta inhibición. Las fracciones de peso molecular intermedio F 10-30 presentaron una inhibición muy débil para el Qs 3 o prácticamente nula en el caso del Qs 1. Esto coincide con los resultados mostrados por No y col. (2002) que no detectaron inhibición para esta misma bacteria con un quitosano de  $28 \times 10^3$  g/mol.

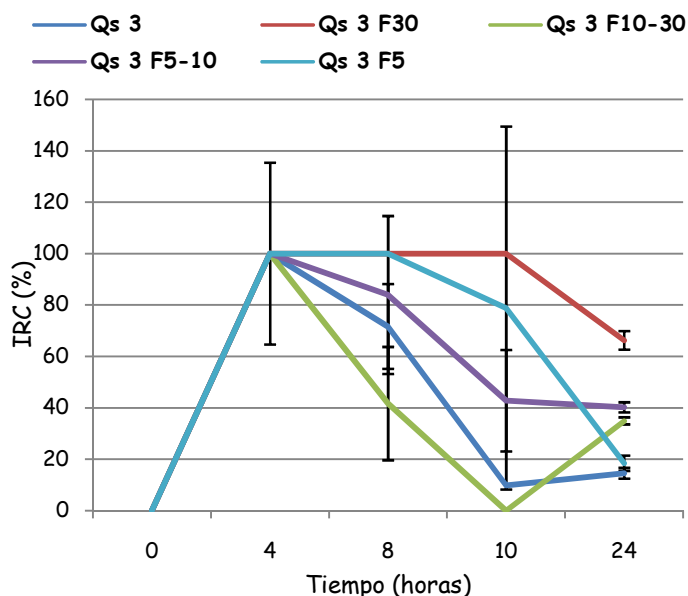
#### 1.4.2.2. Actividad antimicrobiana frente a *Clostridium difficile*

El estudio de la actividad antimicrobiana frente al crecimiento de *Clostridium difficile*, bacteria Gram-positiva, se llevó a cabo de la misma forma que frente a *Salmonella typhimurium*. Así, se estudió el porcentaje de inhibición que presentaban los COS a las 4, 8, 10 y 24 horas de incubación obtenidos con uno y otro quitosano (Figuras IV.14 y IV.15). En el caso de todas las fracciones de COS obtenidos a partir de Qs 1 las densidades ópticas medidas a las 4 horas de incubación fueron cero al igual que en el control negativo. A partir de este tiempo, se mantuvo un IRC del 100 % hasta las 24 horas de incubación. El Qs 1 ralentizó el crecimiento de la bacteria durante las cuatro primeras horas, sin embargo a partir de este tiempo se observó el crecimiento de *C. difficile* (Figura IV.14).



**Figura IV.14.** Porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) frente a *Clostridium difficile* de Qs 1 y COS obtenidos a partir de Qs 1 (n=3).

En el caso del Qs 3 y los COS obtenidos a partir de este, las densidades ópticas medidas durante las cuatro primeras horas fueron cero al igual que el control negativo y por tanto se ralentizó el crecimiento de la bacteria, como en el caso de los COS obtenidos a partir de Qs 1. Sin embargo, en este caso a partir de 4 horas, la bacteria creció tanto sobre el Qs 3 como sobre las fracciones obtenidas a partir de este (Figura IV.15).



**Figura IV.15.** Porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) frente a *Clostridium difficile* de Qs 3 y COS obtenidos a partir de Qs 3 (n=3).

Si se observa el valor de IRC que se obtuvo tras 24 horas de incubación de las muestras, se ve como se mantiene el 100% de inhibición respecto al control de todas las fracciones obtenidas a partir de Qs 1 (Tabla IV.8), como se comentaba anteriormente.

**Tabla IV.8.** Porcentaje de inhibición respecto al control (IRC) frente a *Clostridium difficile* de Qs 1, Qs 3 y COS obtenidos a partir de estos (n=3) (\* indica diferencias significativas  $p < 0.05$  con respecto al quitosano inicial).

	IRC (%) Qs inicial	IRC (%) F 30	IRC (%) F 10-30	IRC (%) F 5-10	IRC (%) F 5
Qs 1-Quitosanasa	7.8±2.4	100*	100*	100*	100*
Qs 3-Quitosanasa	14.6±2.1	66.3±3.6	34.9±1.4	40.2±2.0	18.5±3.0

Lo primero a destacar es que existe un efecto antimicrobiano mayor en el caso de bacterias Gram-positivas como ya lo indicaron (Zhong y col., 2008, No y col., 2002a, Chung y col., 2004 y Wang, 1992); y como se ha visto en los resultados frente a *S. typhimurium* expuestos en el apartado anterior.

En el estudio de la inhibición de *Clostridium difficile*, se vuelve a observar una relación importante entre el número de residuos acetilados en los COS y su inhibición. Así las fracciones que presentaron un máximo de moléculas con tres residuos acetilados y un menor DA fueron las que presentaron una total inhibición frente a la bacteria. Sin embargo, no se aprecia una relación clara entre el  $M_w$  y la inhibición del crecimiento de *Clostridium difficile*. Por tanto, la tendencia a un aumento de la actividad antimicrobiana con la disminución de  $M_w$  hasta un límite, como se observa en bacterias Gram-negativas normalmente, no es observada en el caso de esta bacteria Gram-positiva. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por No y col. (2002). Vishu Kumar y col. (2007), por otro lado, plantearon que parece existir una mayor resistencia de las bacterias Gram-positivas a la inhibición por parte de quitosano, puesto que el polímero tendría que atravesar la pared celular para encontrar grupos electronegativos con los que interaccionar. Sin embargo, los resultados encontrados en este trabajo muestran la completa inhibición de esta bacteria por parte de fracciones de COS obtenidas a partir de un quitosano de bajo DA y resultan totalmente novedosos puesto

que no se han encontrado trabajos de investigación en los que se determine el efecto antimicrobiano de COS frente a esta bacteria.

### Conclusiones parciales

- Los COS que presentaron un bajo DA (8-18%) y un número máximo de tres residuos desacetilados presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. thyphimurim*, cuando el  $M_w$  no fue superior a  $12 \times 10^3$  g/mol y a *C. difficile* independientemente del  $M_w$ . Por tanto, los COS de bajo DA obtenidos en este estudio presentaron efecto antimicrobiano tanto frente a la bacteria Gram-negativa *S. thyphimurim*, como la Gram-positiva, *C. difficile*.
- Parece ser que el  $M_w$  sólo tuviese importancia en el caso de *S. thyphimurim*, ya que los COS tendrían que atravesar la membrana externa formada por lipopolisacáridos que esta bacteria Gram-negativa presenta antes de penetrar en la membrana citoplasmática.

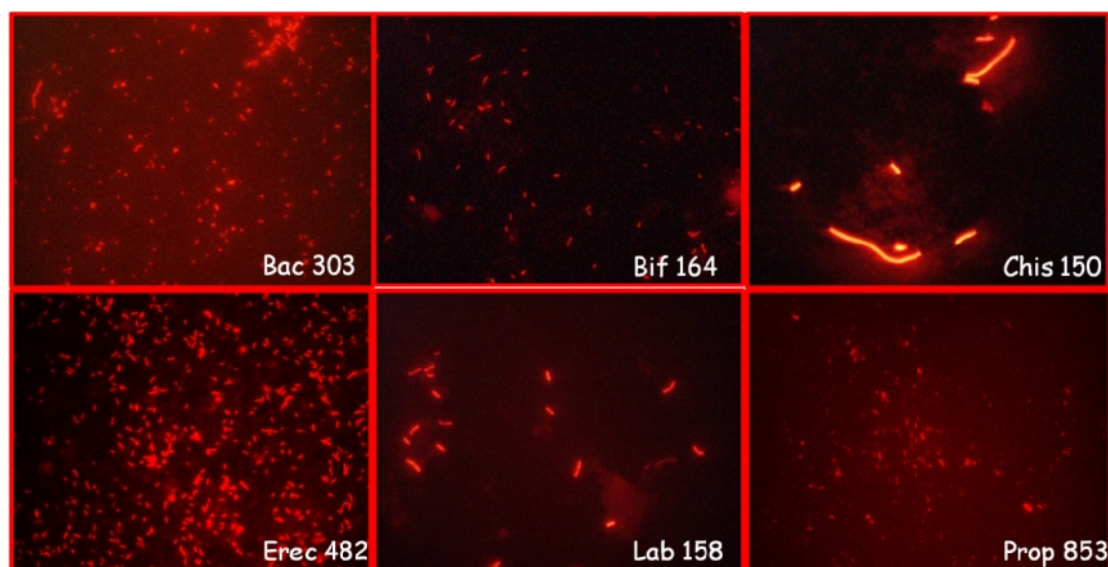
#### 1.4.3. Determinación de la fermentación *in vitro* de COS en cultivos mixtos procedentes de muestras fecales humanas

Una de las propiedades biológicas más importantes que se le atribuyen a los COS es la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas, como se mencionaba en el apartado anterior. Sin embargo, Lee y col. (2002) mostraron el efecto estimulante de los COS en el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus* spp. en cultivos puros. Por otro lado, Vernazza y col. (2005) no observaron ningún crecimiento de esas poblaciones beneficiosas e incluso observaron un aumento de algunas poblaciones menos deseables cuando testaron la fermentación de quitosanos de distinto  $M_w$  y de una fracción de COS en cultivos mixtos de bacterias procedentes de material fecal humano. Por tanto, deberían llevarse a cabo estudios más exhaustivos para poder estudiar la posible fermentabilidad de los COS y comprobar si estos podrían presentar un potencial efecto prebiótico, ya que los resultados son pocos y el posible mecanismo de estimulación de los COS en el crecimiento de algunas poblaciones beneficiosas en la microbiota intestinal no se conoce. Por ello, se consideró interesante llevar a cabo el estudio del comportamiento de los COS frente a las bacterias constituyentes de la

microbiota intestinal, y relacionar los resultados obtenidos con las características químico-físicas y sus propiedades antimicrobianas expuestas previamente.

#### 1.4.3.1. Recuento de poblaciones bacterianas

Los experimentos se realizaron mediante fermentaciones *in vitro* empleando muestras fecales humanas. Las células totales y Bif164, Bac303, Lab158, Chis150, Erec482 y Prop853 correspondientes a las poblaciones bacterianas de *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides/Prevotella*, *Lactobacillus/Enterococcus*, Grupo *Clostridium histolyticum*, *Eubacterium rectale/ Clostridium cocoides* y *Clostridium* cluster IX fueron enumeradas mediante microscopía de fluorescencia previa hibridación *in situ* (Figura IV.16). El estudio fue llevado a cabo en los productos obtenidos por despolimerización enzimática de los Qs 1 y Qs 3 con quitosanasa.

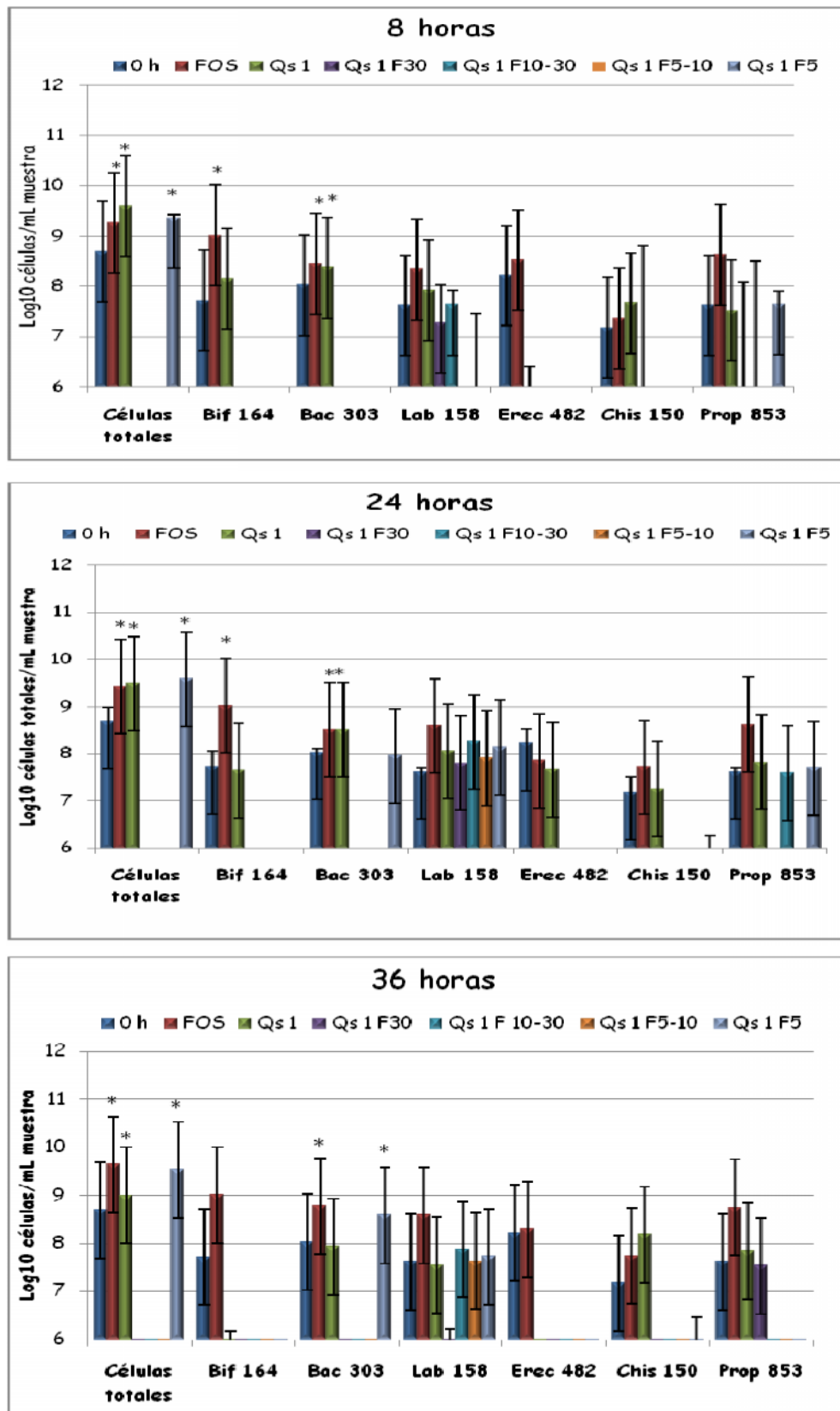


**Figura IV.16** Fotografías de las poblaciones *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium rectale/ Clostridium cocoides*, *Lactobacillus* y *Clostridium* cluster IX.

La Figura IV.17 muestra el efecto de los sustratos obtenidos mediante la despolimerización de Qs 1 y sus COS para cada población bacteriana estudiada a las **8**, **24** y **36 horas** de fermentación respectivamente. No se observaron bacterias al microscopio cuando se procedió al recuento de las diferentes poblaciones testadas para

los **COS F 30, F 10-30 y F 5-10** procedentes del Qs 1, quedándose, por tanto, estas poblaciones estudiadas por debajo del límite de detección del microscopio, a excepción de la población de *Lactobacillus/Enterococcus*, *Clostridium histolyticum* y *Clostridium* cluster IX. La población de *Lactobacillus/Enterococcus* presentó recuentos similares a los presentados a 0 horas, por el control negativo (inóculo) y por control positivo (fructo-oligosacáridos. FOS) a **8, 24 y 36 horas**, excepto F 30 a 36 h, similar a 0 horas e inóculo pero menor ( $p<0.05$ ) que FOS. Sin embargo, *Clostridium histolyticum* y *Clostridium* cluster IX tendieron a disminuir. En el **COS F 5**, todas las poblaciones estudiadas se pudieron contar al microscopio de fluorescencia, excepto *Bifidobacterium* spp. y *Eubacterium rectale/Clostridium cocoides*, probablemente por que aparecieron por debajo del límite de detección. Las poblaciones contadas presentaron recuentos menores ( $p<0.05$ ) que 0 h y el inóculo a las **8 h** de fermentación. Sin embargo, las células totales presentaron valores mayores ( $p<0.05$ ) que 0 h y el inóculo y valores similares a FOS.

Las poblaciones enumeradas presentaron recuentos similares en el caso del **Qs 1** que a 0 h, que el control negativo y que FOS a las **8 y 24 horas** de fermentación, excepto *Bifidobacterium* spp. Y *Eubacterium rectale/Clostridium cocoides* a **8h** que presentaron recuentos menores ( $p<0.05$ ) que FOS, al igual que *Bifidobacterium* spp. a **24h**. Sin embargo, a las **36 h**, sólo las poblaciones del grupo *Clostridium histolyticum* y *Clostridium* cluster IX presentaron valores similares a FOS. Las poblaciones de *Eubacterium rectale/Clostridium cocoides* disminuyeron ( $p<0.05$ ) por debajo de los valores que presentó el control negativo y 0h. Por tanto, *Lactobacillus/Enterococcus*, Grupo *Clostridium histolyticum* y *Clostridium* cluster IX mantuvieron recuentos similares al inóculo y a FOS con los COS procedentes de Qs 1 tras **36h** de fermentación. En el caso de la comparación sólo con FOS, F5-10 presentó un menor recuento ( $p<0.05$ ) de Grupo *Clostridium histolyticum* y F30 de *Lactobacillus/Enterococcus*. Las células totales y las poblaciones de *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides/Prevotella* y *Eubacterium rectale/ Clostridium cocoides* se vieron probablemente disminuidas con respecto al control negativo y al tiempo 0 h, ya que no se detectaron al microscopio, excepto las poblaciones de *Lactobacillus/Enterococcus*, Grupo *Clostridium histolyticum* y *Bacteroides/Prevotella* en F 5 que presentaron valores similares a FOS.

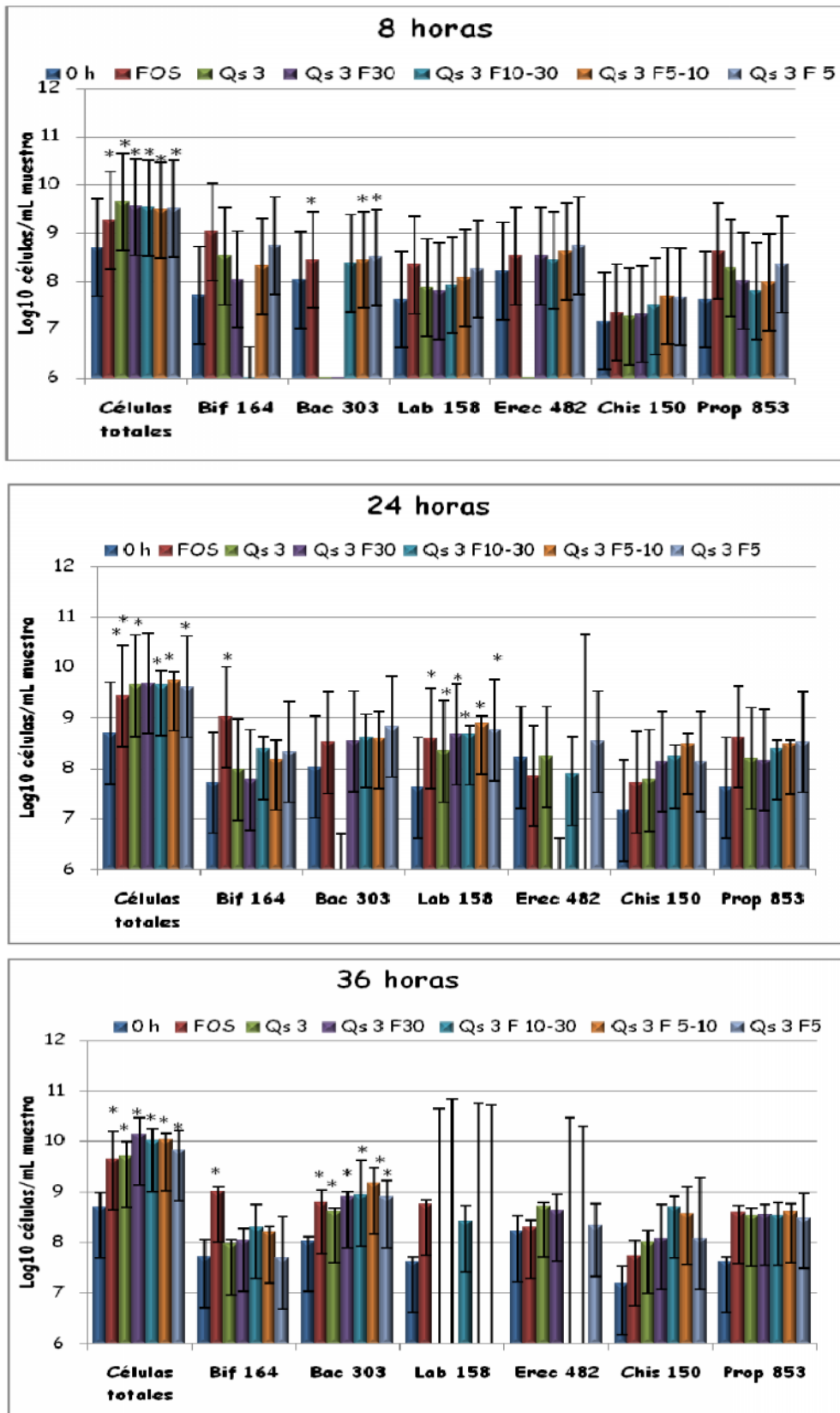


**Figura IV.17.** Cambios en las poblaciones bacterianas (Log<sub>10</sub> células/mL muestra) de los cultivos fecales después de 8, 24 y 36 horas de incubación a partir de los sustratos obtenidos con Qs 1 (n=3) (\* indica diferencias significativas de crecimiento  $p < 0.05$  con respecto a 0 h).

Los resultados de fermentación obtenidos para los **COS** procedentes del **Qs 3** se muestran a continuación. El estudio se llevó a cabo de la misma manera que para los **COS** obtenidos a partir de **Qs 1**. El **Qs 3** y todos los **COS** procedentes de este presentaron un recuento de células totales semejante a **FOS** a las **8, 24 y 36 h** de fermentación (Figura IV.18), y mayores ( $p < 0.05$ ) que a tiempo 0 h y que los presentados por el control negativo a las mismas horas. *Bacteroides/Prevotella* no se pudo detectar a las **8 h** de fermentación en **F 30**, probablemente por encontrarse por debajo del límite de detección del microscopio, para el resto de fracciones esta población sí creció de forma similar al control positivo. Todas las demás poblaciones enumeradas presentaron valores semejantes a **FOS** en todos los **COS**. La población de *Lactobacillus/Enterococcus* presentó valores similares que el control negativo, a 0 h y **FOS** en los **COS F 10-30 y F 5-10**, pero en **F 5**, los valores de esta población fueron mayores que los presentados a 0 h, y similares al control negativo y a **FOS**

A las **24 y 36** horas estos **COS** parecen presentar un efecto semejante a **FOS** en todas las poblaciones bacterianas enumeradas, ya que estas presentan valores semejantes a los que se recuentan cuando su fuente de carbono es **FOS**, excepto en el caso de *Bifidobacterium* spp. Esta población no se vio aumentada ( $p < 0.05$ ) con el uso de estos **COS** como en el caso del uso de **FOS**, pero presentó valores semejantes a 0 h y al control negativo. *Lactobacillus/Enterococcus* presentó valores significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) con respecto al control negativo y el tiempo 0 h.

En el caso del **Qs 3** además de las células totales, las poblaciones de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus/Enterococcus*, *Clostridium histolyticum* y *Clostridium* cluster IX presentaron valores semejantes a 0 h, control negativo y **FOS** a las **8 h**. *Eubacterium rectale/Clostridium cocoides* y *Bacteroides/Prevotella* fueron menores ( $p < 0.05$ ) que el control negativo y a 0 h. Las poblaciones estudiadas mantuvieron valores semejantes al control negativo y **FOS** a las **24 y 36 h**, excepto *Bifidobacterium* spp. que presentó recuentos mayores ( $p < 0.05$ ) para **FOS**.



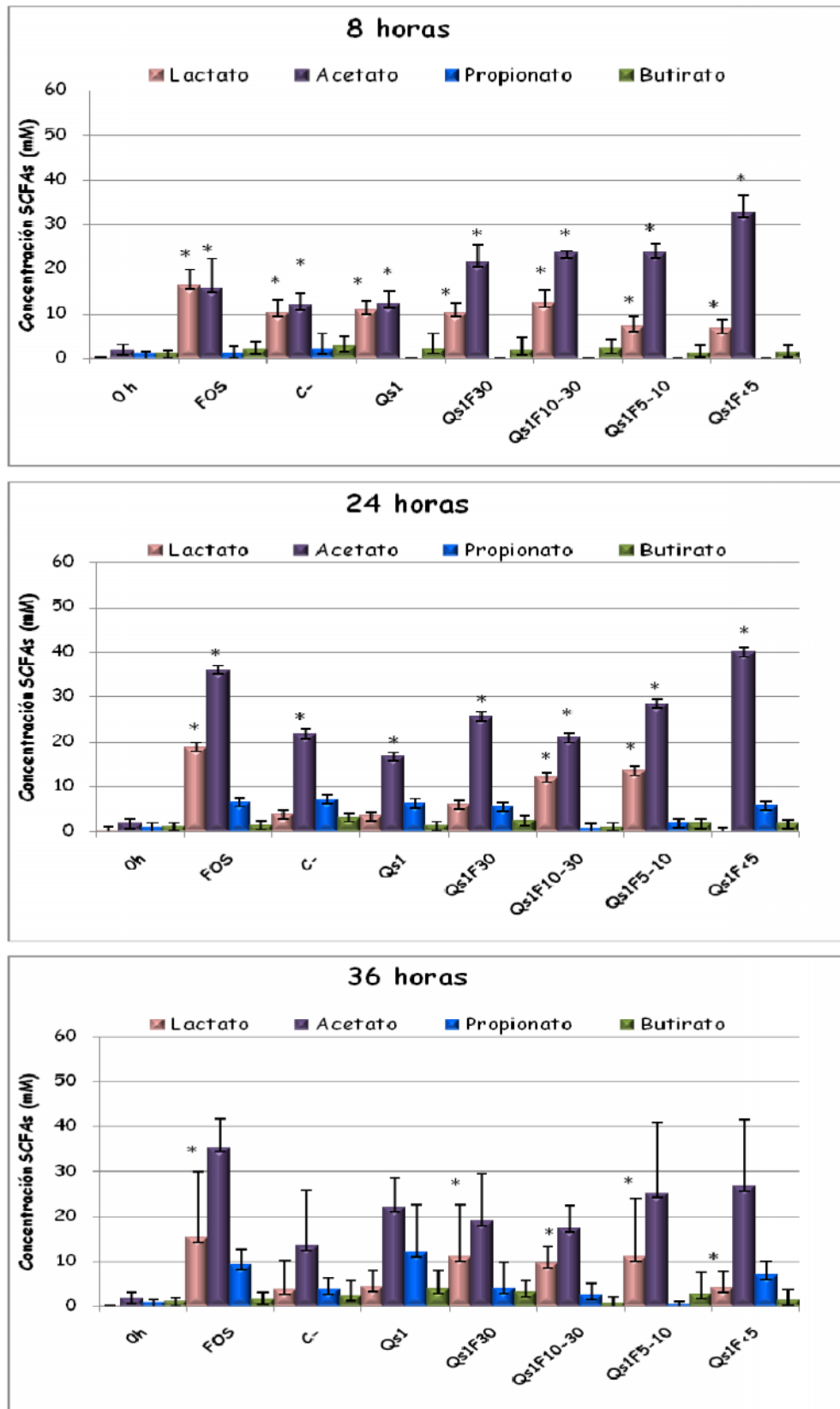
**Figura IV.18.** Cambios en las poblaciones bacterianas (Log<sub>10</sub> células/mL muestra) de los cultivos fecales después de 8, 24 y 36 horas de incubación a partir de los sustratos obtenidos con Qs 3 (n=3) (\* indica diferencias significativas de crecimiento  $p < 0.05$  con respecto a 0h).

De manera que, en el caso de los **COS procedentes del Qs 3** tras **36 h** de fermentación, aunque no estimulan el crecimiento de *Bifidobacterium* spp., y por tanto no son prebióticos, no parecen presentar ningún efecto negativo frente a ninguna población bacteriana probada, manteniendo constantes las poblaciones de la microbiota humana e incluso aumentando los niveles de *Lactobacillus/Enterococcus* a niveles similares a los que presenta FOS. Este comportamiento es esperable debido a que en un ecosistema microbiano complejo como la microbiota humana, ciertos grupos de bacterias pueden trabajar en conjunto para degradar determinadas moléculas, lo que hace que la competencia entre poblaciones pueda provocar que algunos de estos grupos no accedan de la misma manera a los nutrientes no pudiendo crecer sobre los sustratos (Vernazza y col. 2005).

#### **1.4.3.2. Análisis de los SCFAs y lactato**

Por otro lado, además del recuento bacteriano, se llevó a cabo la determinación de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y el lactato, que se producen durante el proceso de fermentación y que son de gran importancia en diversos procesos fisiológicos. De manera que la aparición de estos SCFAs y del lactato permitiría determinar si los sustratos empleados se estarían metabolizando. Estos ácidos se absorben y utilizan eficazmente por las células del intestino estimulando su crecimiento, así como la absorción de agua y sales (Macfarlane y col., 2008).

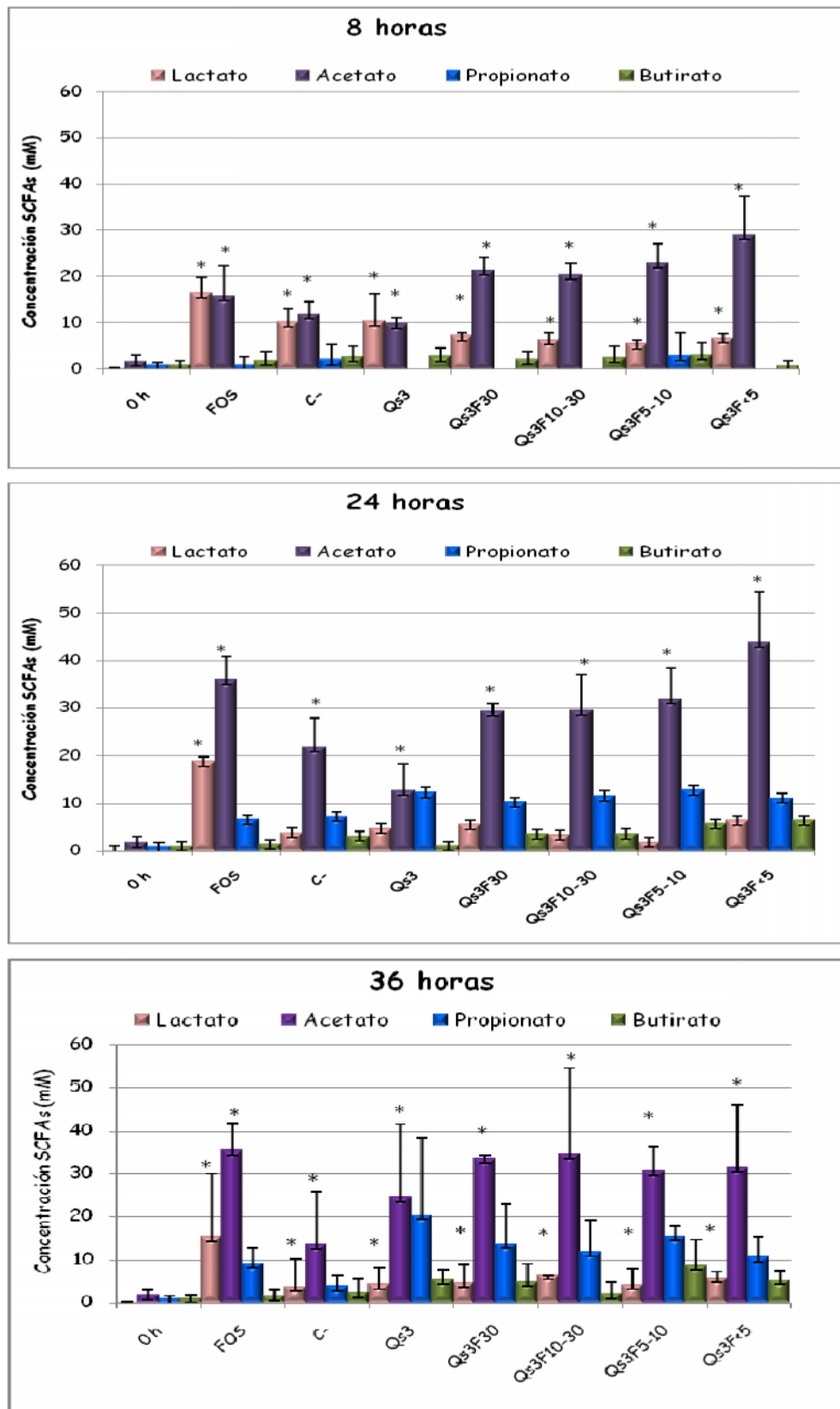
De la misma manera que para el recuento bacteriano, se obtuvieron datos de la producción de **lactato** y de los **SCFAs acetato, propionato y butirato** para **0, 8, 24 y 36** horas de fermentación (Figura IV.19). En el caso del **Qs 1** a las **8 horas** se encontraron niveles cuantificables de lactato y acetato siendo su producción mayor ( $p < 0.05$ ) que 0 h y similar al control negativo. No se detectó propionato en los análisis realizados. Respecto a los **COS**, la concentración de lactato detectada fue mayor ( $p < 0.05$ ) en todos ellos que a 0 h y similar que el control negativo. El acetato presentó niveles mayores ( $p < 0.05$ ) en todos los COS que a 0 h y que el control negativo. F 5 presentó valores de acetato mayores ( $p < 0.05$ ) que FOS. El propionato sólo fue detectado en 0 h, control negativo, FOS y F 5-10. La producción de butirato fue baja y similar para el Qs 1, los COS y FOS.



**Figura IV.19.** Concentración de ácidos grasos de cadena corta (mM) de los cultivos fecales después de 8, 24 y 36 horas de incubación a partir de los sustratos obtenidos con Qs 1 (n=3) (\* indica diferencias significativas de crecimiento  $p < 0.05$  con respecto a 0h).

A las **24 horas** para **Qs 1**, los niveles de lactato fueron similares a los del control negativo y 0 h. El acetato fue mayor ( $p<0.05$ ) que a 0 h, pero sus valores fueron similares al control negativo. El propionato se empezó a producir dando unos niveles semejantes a los del control negativo y FOS. También se mantuvo la producción de butirato similar con respecto a control negativo y FOS. En cuanto a los **COS**, la concentración de butirato fue similar al control negativo y FOS, y en el caso del lactato, F10-30 y F5-10 presentaron valores semejantes a FOS, pero F 30 y F 5 presentaron valores menores ( $p<0.05$ ) a FOS, aunque similares al control negativo y a 0h. Con respecto al acetato, sus niveles fueron mayores que los encontrados a 0 h pero similares al control negativo. F5 presentó valores de acetato semejantes a FOS. El propionato se cuantificó en todas las muestras y presentó valores semejantes al control negativo, 0h y FOS. A las **36 h** tanto **Qs 1** como los **COS** dieron lugar a la producción de acetato y butirato en concentración similar a la del control negativo y los FOS. En cuanto a la producción de lactato fue similar a la del control negativo, excepto para F 30 y F 5-10 que fueron similares a FOS. Se cuantificó propionato en todas las muestras estudiadas y este presentó valores semejantes a 0 h, al control negativo y a FOS.

Para **Qs 3** y los **COS** obtenidos a partir de éste, a las **8 h** de fermentación se detectaron niveles cuantificables de lactato mayores ( $p<0.05$ ) que a 0 h, en concentración similar a la del control negativo, y menores ( $p<0.05$ ) que para FOS (Figura IV.20). El butirato presentó valores similares en todas las muestras analizadas. Sólo existieron niveles cuantificables de propionato en la F 5-10. Los niveles de acetato fueron semejantes al control negativo en el caso del **Qs 3** y mayores ( $p<0.05$ ) que este y semejantes a FOS para sus **COS**, excepto F 5 que presentó valores mayores ( $p<0.05$ ) que FOS. A las **24 horas** de fermentación, las concentraciones de lactato se siguen manteniendo en los niveles de las encontradas para el control negativo y menores ( $p<0.05$ ) que las presentes para FOS. Los niveles de acetato son mayores ( $p<0.05$ ) que a 0 h y similares al control negativo, excepto F 5, que presenta valores mayores que el control negativo ( $p<0.05$ ) y semejantes a FOS



**Figura IV.20.** Concentración de ácidos grasos de cadena corta (mM) de los cultivos fecales después de 8, 24 y 36 horas de incubación a partir de los sustratos obtenidos con Qs 3 (n=3) (\* indica diferencias significativas de crecimiento  $p < 0.05$  con respecto a 0h ).

Por otro lado, la producción de propionato llega a niveles mayores que a 0 h y semejantes al control negativo y a FOS. El butirato se presenta en valores semejantes a 0 h, control negativo y FOS, excepto F 5-10 y F 5 que presentaron niveles mayores ( $p < 0.05$ ) que FOS de este SCFA. A **36 h**, los niveles de lactato son similares al control negativo y menores ( $p < 0.05$ ) que FOS. Los valores de acetato fueron semejantes a los presentados por el control negativo y FOS, excepto F 5 que presentó niveles mayores ( $p < 0.05$ ) que FOS. El propionato y butirato presentaron niveles similares a los encontrados en el control negativo y FOS.

En general, se encontraron altas concentraciones de lactato y acetato en la fermentación de la mayoría de los **COS** a **8 horas** de fermentación. El lactato es un producto intermedio de la fermentación de los carbohidratos que se caracteriza porque tiene una vida relativamente corta en el metabolismo anaeróbico del intestino por contener un electrón fácilmente atacable y usado por las bacterias reductoras de sulfato (Gibson, 1990), de manera que es normal que este ácido vaya disminuyendo según avanza la fermentación. El acetato pasa a los tejidos periféricos, siendo el principal ácido graso presente en la sangre y el sustrato más importante en la síntesis del colesterol (Isolauri y col., 2004). El acetato y el lactato se consideran productos resultantes típicos de la fermentación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Sanz y col., 2006; Macfarlane y col., 2008). Los resultados mostraron que no se promovió el crecimiento de *Bifidobacterium* spp. pero sí el de *Lactobacillus/Enterococcus* y células totales que aumentaron a **8 horas** y **24 horas** de fermentación para algunos **COS** **procedentes del Qs 3**. La producción de propionato se vio aumentada a las 24 horas cuando la concentración de lactato disminuyó. El propionato pasa al torrente sanguíneo y es metabolizado en el hígado como precursor de la gluconeogénesis. Además, el aumento de su producción y la relación existente entre propionato/acetato se asocia con una disminución de lípidos en sangre y con la inhibición de la síntesis de colesterol en el hígado (Wolever y col., 1996; Cheng y Lai., 2000). El acetato también participa en la formación de butirato (Duncan y col. 2002). La producción de butirato fue similar a la del control negativo y positivo a las **8** y **36 horas**, ya que a las **24 h** aumentó llegando a ser mayor en las fracciones de menor  $M_w$ . El butirato se metaboliza más activamente en el epitelio intestinal con respecto a los otros ácidos. Este SCFA está implicado en el control de todos los mecanismos que controlan la apoptosis, división y proliferación celular a nivel de colon (Cummings, 1995) y participa en el mantenimiento de la barrera intestinal

(Marcil y col. 2002) y junto con el propionato se relaciona con la prevención del cáncer de colon (Cummings, 1981; Bornet y col., 2002).

#### 1.4.3.3. Relación entre poblaciones bacterianas testadas, ácidos orgánicos producidos y características químico-físicas de los COS

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en los estudios de fermentación *in vitro*, se podría establecer que en el caso de la utilización de **Qs 1** y sus **COS** no existió un crecimiento de las poblaciones de bacterias testadas, y en algunos casos pudo haber alguna disminución. *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium rectale*/ *Clostridium cocoides*, y en algunos **COS** *Bacteroides/Prevotella*, se quedaron por debajo del límite de detección del microscopio a la misma dilución que se usó para FOS u otros **COS** que sí pudieron contarse, de manera que esto pudo significar un descenso de estas poblaciones. Sin embargo, sí que se detectaron **lactato**, **acetato** y **butirato** a todas las horas estudiadas y **propionato** a 24 y 36 horas, incluso a veces en concentraciones similares a los que se encontraron para FOS. Esto último sugiere por tanto, que los sustratos empleados se están **metabolizando** por la microbiota intestinal y podrían ser **absorbidos** y **empleados** en diferentes **procesos biológicos**. Sin embargo, **no son estimulantes de las poblaciones bacterianas** consideradas positivas pudiendo incluso, como se ha dicho antes, haber provocado su disminución. En el caso del **Qs 3** y sus **COS** se puede establecer que existió un efecto de **mantenimiento de las poblaciones ensayadas**, similar al presentado por los FOS. Sin embargo, *Bifidobacterium* spp. no aumentó como sucede cuando se utiliza FOS; pero sí existió un **aumento** significativo de la población de *Lactobacillus/Enterococcus* como en el caso de FOS. También tuvo lugar la **producción de lactato y SCFAs** cuantificables por parte de estos productos que pueden ser absorbidos desarrollando los diferentes procesos biológicos comentados anteriormente.

Los **COS obtenidos a partir de Qs 3** tienen un **mayor DA** y un **mayor contenido de residuos acetilados** y parecen ejercer un efecto más beneficioso en su empleo como sustratos en la fermentación *in vitro* de los cultivos mixtos estudiados. Hay que tener en cuenta que ha sido propuesto como mecanismo de actuación en la actividad antimicrobiana del quitosano, la interacción de los grupos amino positivamente cargados y los residuos negativamente cargados de la superficie de la pared bacteriana

(Hadwiger y col.,1988). Como ya se había comentado en el estudio de la actividad antimicrobiana de este capítulo, se ha visto la mayor actividad antimicrobiana de fracciones que presentan un menor DA. Por ello, sería de esperar que una menor concentración de grupos amino pueda contribuir a un mantenimiento y/o crecimiento de determinadas poblaciones de bacterias en el intestino. Lee y col. (2002) observaron que los COS con un DP entre 2 y 8 estimulaban el crecimiento de bifidobacterias en cultivos puros, independientemente de que los COS estuvieran completamente desacetilados. En éste estudio con cultivos mixtos de bacterias intestinales procedentes de la microbiota humana, ese posible efecto bifidogénico no se apreció, como sucedió en el estudio previo de Vernazza y col. (2005). Este comportamiento es esperable debido a que en un ecosistema microbiano complejo como la microbiota humana, la competencia entre poblaciones puede provocar que algunos de estos grupos no accedan de la misma manera a los nutrientes (Vernazza y col., 2005). Sin embargo, en cultivos puros aislados, como sucede en el estudio de Lee y col. (2002), estas interacciones no pueden apreciarse. En cuanto al  $M_w$ , parece ser que son aquellos **COS de menor peso molecular** los que dieron lugar a un efecto positivo en el mantenimiento e incluso crecimiento de algunas poblaciones de bacterias y en la producción de SCFAs. Por ello, se podría sugerir que los **COS con un menor  $M_w$  y un alto DA** no afectarían de manera negativa a la microbiota intestinal y por lo contrario podrían producir ácidos orgánicos que desarrollan **efectos positivos locales y sistémicos**.

### Conclusiones parciales

- Los COS con un bajo DA (8-17%) que presentan secuencias con un número máximo de tres residuos acetilados e independientemente del  $M_w$  podrían actuar disminuyendo algunas de las poblaciones bacterianas intestinales ensayadas provocando un desequilibrio de la microbiota intestinal.
- Los COS con un bajo  $M_w$  ( $2-8 \times 10^3$  g/mol), un alto DA (37-38%) y secuencias que contienen entre 6 y 11 residuos acetilados, aunque no puedan ser considerados bifidogénicos y por tanto prebióticos, mantienen la flora intestinal e incluso pueden ejercer efectos fisiológicos beneficiosos mediante la producción de ácidos orgánicos.

## 2. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS FORMADOS A PARTIR DE QUITOSANO MEDIANTE REACCIÓN DE MAILLARD

En este capítulo se aborda el estudio de la modificación del **quitosano** mediante la reacción de Maillard. Se utilizó la **-lactoglobulina** (-lg), con el fin de comprobar si la reacción estaba teniendo lugar y que si se formaban **glicoconjugados** y **productos avanzados de la reacción de Maillard** y estudiar la relación que guarda la formación de éstos con la mejora de algunas **propiedades funcionales**. El quitosano, por su estructura, podría dar lugar a la reacción ya que posee tanto el grupo carbonilo reductor libre como grupos aminos libres en su molécula. Este punto se ha intentado dilucidar mediante la reacción en ausencia de proteína. Todas las reacciones se llevaron a cabo en estado sólido.

Numerosos estudios de glicosilación de proteínas con polisacáridos indican que las condiciones ensayadas (temperatura, pH, actividad de agua ( $a_w$ ), proporción del polisacárido empleado y tiempo de reacción) influyen en la velocidad de reacción de Maillard (Chevalier y col., 2001b; Ajandouz y col., 2001; Morales y col., 2001; Rufian-Henares y col., 2004; Lertittikul y col., 2007). Se fijaron las variables temperatura,  $a_w$  y se estableció una proporción quitosano:proteína 2:1, ya que en experimentos previos se había demostrado que el empleo de una proporción mayor de quitosano con respecto a proteína daba lugar a la formación excesiva de material insoluble. Las condiciones variables seleccionadas fueron el  $M_w$  del quitosano y el tiempo de reacción. No se quiso introducir la variable grado de acetilación (DA), puesto que esta tendría implicación en la reacción.

Se utilizaron quitosanos comerciales, uno de los cuales fue obtenido mediante despolimerización enzimática con quitosanasas. La Tabla IV.9 muestra los resultados obtenidos en la determinación del DA y del peso molecular promedio ( $M_w$ ) y el peso molecular viscoso ( $M_v$ ) mediante distintas técnicas.

**Tabla IV.9.** Características químico-físicas de los quitosanos empleados en el estudio de la reacción de Maillard.

MUESTRA	DA (%)	$M_v$ ( $10^3$ g/mol) Viscosimetría	$M_w$ ( $10^3$ g/mol) GPC	$M_w$ ( $10^3$ g/mol) SE
Qs A	12	85	36	35
Qs B	11	248	80	52
Qs C	16	938	177	-
Qs A1	12	-	1.3	-

\*Qs A1 obtenido por despolimerización enzimática de Qs A con quitosanasas y ultrafiltrado mediante membranas de corte de  $5-10 \times 10^3$  g/mol

La viscosimetría dio lugar a valores de  $M_w$  mayores con respecto a los obtenidos por las otras técnicas como ya se describió en el apartado 1 de Resultados y Discusión. En cuanto a los resultados obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular y equilibrio de sedimentación fueron semejantes en el caso del Qs A y variaron en el caso del Qs B, lo cual pudiera ser debido a la no idealidad del quitosano en solución, y a que no se obtuvo una buena correlación entre el peso molecular aparente y la concentración de éste, en el intervalo de concentraciones estudiado para este quitosano.

### 2.1. Estudio de la interacción entre el quitosano y la $\alpha$ -lactoglobulina

Puesto que tanto el quitosano como la proteína son polielectrolitos, se realizó un estudio de su interacción en solución. Con el ajuste del pH a 6, es de esperar que al principio exista una atracción electrostática debido a la carga negativa de la proteína, puesto que nos encontramos por encima de su  $pK_a$  (5.2) y a la carga positiva del quitosano que se encuentra por debajo de su  $pK_a$  (~6.5). Con el fin de comprobar este aspecto, se realizaron medidas de potencial zeta, mediante espectroscopia de correlación fotónica (Tabla IV.10).

**Tabla IV.10.** Valores de potencial zeta de  $\beta$ -lg, Qs A y Qs B y las mezclas liofilizadas de cada quitosano con proteína en concentración 0.25% en agua (n=3).

MUESTRA	$\beta$ -lg	Qs A	Qs A: $\beta$ -lg	Qs B	Qs B: $\beta$ -lg
Potencial zeta (mV)	-27.56 $\pm$ 3.96	51.06 $\pm$ 1.68	36.35 $\pm$ 3.94	70.00 $\pm$ 5.60	33.80 $\pm$ 4.74

Se observó como el valor de potencial zeta se redujo en las mezclas liofilizadas de los dos polímeros con respecto a los quitosanos de partida. Se demostró, por tanto, la formación de un complejo electrostático en la mezcla inicial de ambos quitosanos con la proteína antes de someterla a las condiciones de reacción. En dicha mezcla, se alcanzaron valores de potencial zeta similares entre 30-40mV. Teniendo en cuenta el potencial zeta inicial de los quitosanos de partida, se produciría una interacción electrostática más favorecida en el caso del Qs B.

Se determinó el material soluble en las mezclas de quitosano y proteína liofilizadas y se comprobó la formación de complejos electrostáticos insolubles a partir de los dos quitosanos. El producto formado a partir de Qs A y proteína presentó un 93  $\pm$  1.2% de material soluble. El formado a partir de Qs B y proteína presentó un 96  $\pm$  4.7%. Guzey y McClements (2006) demostraron la formación de complejos insolubles entre la  $\beta$ -lg y el quitosano para valores de pH entre 6 y 7. Mounsey y col. (2008) llegaron a la conclusión de que el máximo de insolubilización se producía a pH 6.2. A pH 6 más de la mitad de grupos amino (65%) en la molécula de quitosano estarían positivamente cargados para valores de DA del 15% y se esperaría que la proteína al mismo pH tuviera sobre 28 grupos carboxílicos cargados negativamente (16 ácidos glutámicos ( $pK_a=4.3$ ) y 10 aspárticos ( $pK_a=3.7$ ) por molécula) (Berman y col., 2000). Se ha propuesto que la astringencia provocada por alimentos que contienen quitosano es debida a la formación de un complejo insoluble entre el quitosano como polímero catiónico y las proteínas aniónicas de la saliva (Rodríguez y col., 2003).

Por otro lado, con el fin de profundizar en el estudio de la interacción quitosano y proteína durante la preparación de las muestras se realizaron medidas de potencial zeta

en la mezcla de Qs B con  $\beta$ -lg antes del ajuste del pH a 6, después de éste y tras el proceso de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  previo a la liofilización (Tabla IV.11).

**Tabla IV.11** Valores de potencial zeta de Qs B antes y después del ajuste de pH a 6 de la mezcla con la proteína y después del proceso de congelación (n=3).

	Mezcla pH 4.2	Mezcla pH 6	Mezcla pH 6 después congelación $-80^{\circ}\text{C}$
Qs B: $\beta$ -lg	67.60 $\pm$ 4.09	38.40 $\pm$ 4.26	43.90 $\pm$ 4.46

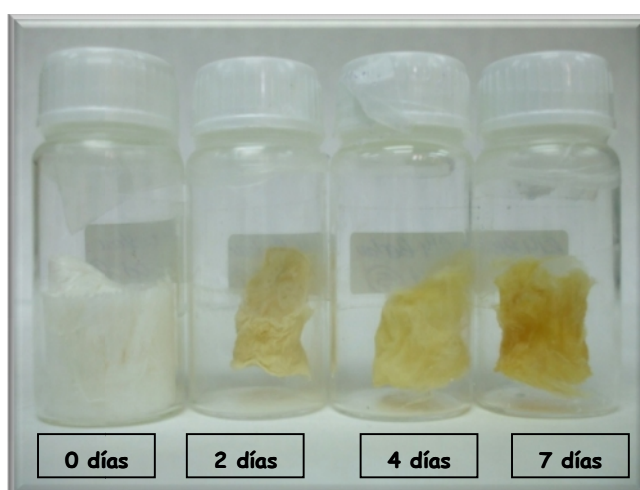
Como puede observarse, el potencial zeta disminuyó en la mezcla cuando el pH se ajustó a 6, como consecuencia de la interacción electrostática que se produce en este momento. Durante el proceso de congelación y posterior descongelación esta interacción se debilitó provocando un ligero aumento del valor del potencial zeta, sin embargo, después del proceso de la liofilización se originó una disminución del valor de potencial zeta hasta 33.80 $\pm$ 4.74 mV lo que demuestra que la interacción electrostática se hizo más fuerte durante dicho proceso.

Se sabe que el valor del pH inicial afecta significativamente al desarrollo de la reacción de Maillard, y que en condiciones ligeramente alcalinas se favorece la formación de la base de Schiff y se promueve la formación de los productos de reacción de Maillard (MRPs) (Gu y col., 2009). Otros autores previamente establecieron el efecto promotor del pH en el pardeamiento no enzimático (Ashoor y Zent., 1984; Petriella y col., 1985; Baxter, 1995). Umemura y Kawwai (2007) también han encontrado un fenómeno de formación de productos insolubles y solubles mediante la reacción de Maillard cuando modifican quitosano con glucosa y celobiosa.

## 2.2. Estudio del pardeamiento de los productos resultantes

El desarrollo de color es un signo importante y obvio del avance de la reacción de Maillard y puede oscilar entre amarillo pálido y marrón oscuro (Morales y col., 2001).

Se pudo comprobar mediante observación visual, que en todas las muestras de quitosano modificado con y sin proteína, los productos mostraban desarrollo de una coloración amarillenta conforme aumentaba el tiempo de reacción (Figura IV.21). Existen estudios en los que se ha observado el pardeamiento en muestras de polisacáridos y proteínas sometidas a reacción de Maillard con el tiempo de incubación. Sus autores lo han relacionado con el avance de la reacción hacia la formación de productos avanzados de Maillard (Manzocco y col., 2000; Rufian-Henares y col., 2004; Lertittikul y col., 2007).



**Figura IV.21.** Aspecto de las muestras de QsB: -lg a t=0,2 4 y 7 días de reacción.

Una de las medidas más frecuentemente utilizadas para ver la extensión de la reacción en función de la coloración de los productos cuando se trabaja en medio líquido, es el estudio de absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Sin embargo, en este caso, en que se llevó a cabo la reacción en estado sólido, se considera más adecuado el empleo de la escala CIE Lab para describir los cambios de color que se producen en términos de propiedades visuales de los compuestos coloreados. Esta escala establece un sistema de coordenadas numéricas para ubicar el color individual en un espacio visualmente uniforme de color. Además de la simple observación visual, para la cual se tomaron fotografías de las muestras a los distintos tiempos de reacción, en algunas muestras se empleó este sistema para demostrar el desarrollo de color a medida que transcurría la reacción.

La Tabla IV.12 muestra los resultados de los productos obtenidos con QsB y -lg. Se pudo observar un ligero incremento en el valor de  $a^*$  con el tiempo de reacción que fue significativo a partir de 4 días, mientras que el valor de  $L^*$  disminuyó y el de  $b^*$  aumentó bruscamente a partir de los 2 días de reacción hasta los 7 de forma significativa ( $p < 0.05$ ) para  $L^*$  y  $b^*$ .

**Tabla IV.12.** Desarrollo de color en productos de reacción con Qs B para Qs B: -lg mediante escala CIELab (n=3).

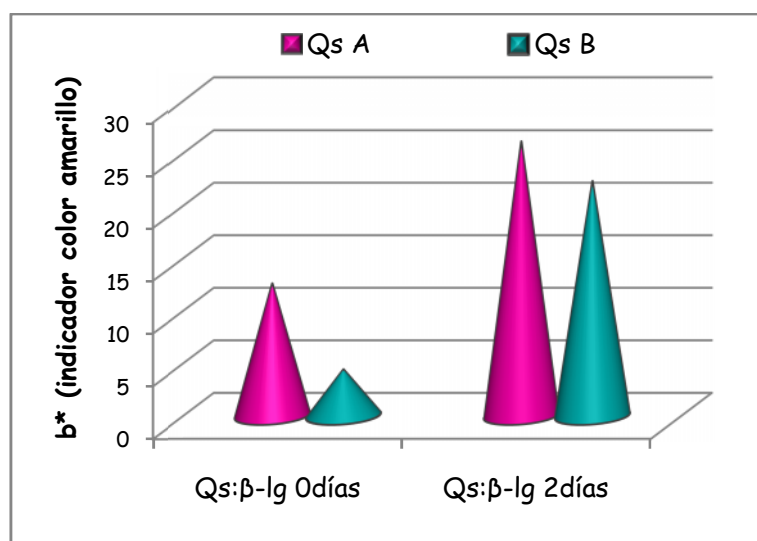
MUESTRA	QsB	QsB:βlg 0días	QsB:βlg 2días	QsB:βlg 4días	QsB:βlg 7días
$L^*$	90.00 <sup>c</sup> ±0.55	92.44 <sup>d</sup> ±0.85	84.06 <sup>b</sup> ±0.73	81.57 <sup>a</sup> ±1.15	79.78 <sup>a</sup> ±1.41
$a^*$	-0.03 <sup>a</sup> ±0.16	-0.07 <sup>a</sup> ±0.20	0.84 <sup>a</sup> ±0.59	1.69 <sup>b</sup> ±0.54	2.64 <sup>c</sup> ±0.54
$b^*$	6.28 <sup>a</sup> ±2.87	4.43 <sup>a</sup> ±0.80	22.53 <sup>b</sup> ±0.83	27.00 <sup>c</sup> ±0.77	29.41 <sup>c</sup> ±0.89
E	90.25 <sup>c</sup> ±0.62	92.54 <sup>d</sup> ±0.87	86.98 <sup>b</sup> ±0.51	85.94 <sup>ab</sup> ±1.01	85.07 <sup>a</sup> ±1.03
c	6.28 <sup>a</sup> ±2.87	4.43 <sup>a</sup> ±0.79	22.36 <sup>b</sup> ±0.83	27.05 <sup>c</sup> ±0.78	29.53 <sup>c</sup> ±0.92

<sup>abc</sup> y <sup>d</sup> indican diferencias significativas entre los valores ( $p < 0.05$ ) cuando las letras son distintas.

La pérdida de luminosidad ( $L^*$ ) y el aumento de color y saturación en el eje azul-amarillo ( $b^*$ ) en las muestras a medida que aumentaba el tiempo de reacción demostró el pardeamiento. La ligera disminución del valor E, influenciado por  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , indicó el efecto neto producido por la pérdida de luminosidad y el aumento de pardeamiento de una forma gradual significativamente ( $p < 0.05$ ) a partir de dos días. El valor c también aumentó de forma significativa con el tiempo de reacción ( $p < 0.05$ ) a partir de 2 días. Este parámetro indica el grado de saturación, pureza o intensidad del color visual y es definido como la distancia desde el color gris al tono cromático puro ( $a^*$  y  $b^* = 0$ ). Un aumento en el valor c indicó más características rojas y amarillas en las muestras y que la saturación no fue alcanzada. Otros autores han obtenido resultados similares con este sistema en el avance de la reacción de Maillard entre el caseinato sódico y

maltodextrinas (O'Regan y Mulvinill. 2010), y en diferentes sistemas modelos de aminoácidos y azúcares (Chawla y col., 2009).

La Figura IV.22 muestra la comparación del parámetro en el eje azul-amarillo ( $b^*$ ) según el sistema CIE Lab como indicador de coloración amarilla entre cero y dos días para Qs A y Qs B modificados con  $\beta$ -lg. Como puede observarse la mezcla de partida entre quitosano y proteína, presentaba valores diferentes de  $b^*$ . A los 2 días de reacción se produjo un aumento de coloración importante en los productos de reacción. El Qs B modificado con proteína mediante reacción de Maillard fue el que dio lugar a un mayor desarrollo de color.



**Figura IV.22.** Parámetro en el eje azul-amarillo ( $b^*$ ) como indicador de coloración amarilla según escala CIE Lab en las mezclas de Qs:  $\beta$ -lg a 0 y 2 días con Qs A y Qs B.

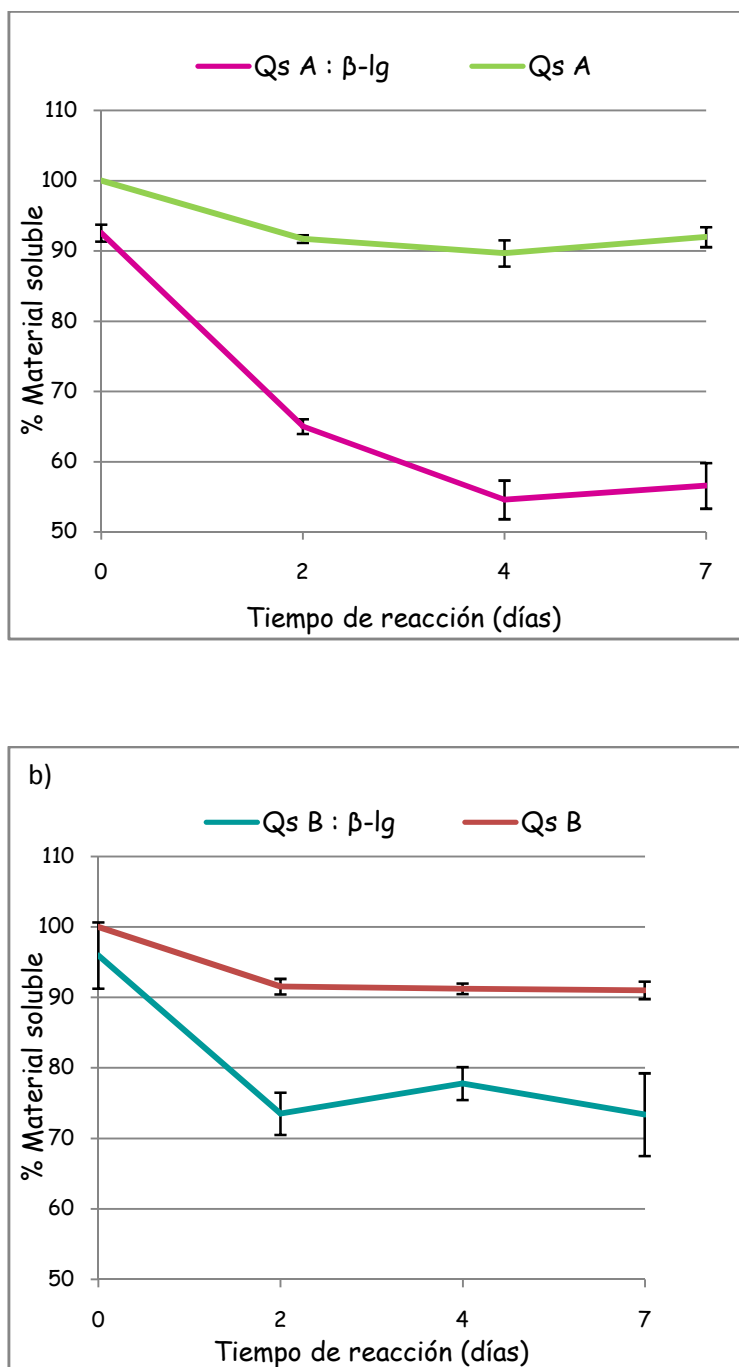
En las etapas iniciales de la reacción de Maillard, en la cuales tiene lugar la formación de los compuestos de Amadori, no se han descrito cambios estructurales importantes en proteínas y no se asocia esta etapa con desarrollo de color. Las etapas intermedias de la reacción comienzan con la degradación de Strecker de los compuestos de Amadori. Sí es conocido que en esta etapa intermedia algunos de los compuestos son coloreados y fluorescentes, y que la coloración va aumentando hacia los estados finales, en los cuales tiene lugar la polimerización de estos compuestos (Oliver y col., 2006). El desarrollo de

pigmentos marrones en las últimas etapas debido a la formación de compuestos cromóforos ha sido ampliamente estudiado en diferentes sistemas modelo y cada vez existen más estudios relativos a la formación de melanoidinas (Rizzi, 1997; Martins y col., 2003). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, según los cuales tuvo lugar el avance del pardeamiento de forma gradual y no se alcanzó la saturación, se podría sugerir la presencia de compuestos intermedios que podrían estar avanzando hacia los estados finales y la formación de melanoidinas.

### 2.3. Estudio de la solubilidad de los productos resultantes

Cuando los productos obtenidos tras la reacción se reconstituyeron en agua, se observó, a partir de los dos días de reacción, la formación de material insoluble con aspecto de gel en algunos de los quitosanos. Este material no se disolvía con la agitación a pH ácidos y básicos, y su consistencia aumentó con el tiempo de reacción. Cuando el quitosano en ausencia de proteína se sometió a las mismas condiciones de reacción se encontró que el porcentaje de material soluble para el Qs A y B, fue aproximadamente de un 90% y se mantuvo prácticamente constante con el tiempo de reacción. En el caso del Qs C, el porcentaje encontrado fue entre un 65-75 % para dos días de reacción y después fue aumentando ligeramente. Este hecho llevó a considerar menos apropiado el uso de un quitosano con un alto peso molecular promedio para la obtención de productos solubles de reacción de Maillard.

En la Figura IV.23 se muestra el porcentaje de material soluble encontrado en los Qs A y Qs B de diferente  $M_w$  modificados con proteína mediante reacción de Maillard y comparado con el quitosano modificado sin proteína. En el caso de los productos formados con Qs A1, no tuvo lugar la formación de material insoluble gelificado, por lo que no se cuantificó.



**Figura IV.23** Porcentaje de material soluble en los productos formados tras reacción de Maillard en a) quitosano: -lg a partir de Qs A y b) quitosano: -lg a partir de Qs B (n = 3).

Se pudo observar que cuando el quitosano fue modificado mediante reacción de Maillard con -lg, el porcentaje de material soluble encontrado fue menor que cuando el quitosano se modificó en ausencia de la proteína. Aproximadamente un 90 % de ambos quitosanos se solubilizó en ausencia de -lg, y este porcentaje se mantuvo prácticamente

constante con el tiempo de reacción. Cuando se añadió la proteína el porcentaje de material soluble disminuyó bruscamente hasta 2 días de reacción. Para el producto formado con el Qs A este porcentaje siguió disminuyendo hasta los 4 días de reacción. En el producto formado a partir del Qs B el material soluble se mantuvo prácticamente constante entre 2 y 7 días de reacción. El mayor porcentaje de material soluble encontrado para el Qs B indica que existió una mayor formación de productos solubles resultantes de la reacción de Maillard para este quitosano con respecto a los productos formados con Qs A, que fueron más insolubles. La mayor variabilidad en el porcentaje de material soluble encontrado entre los productos formados con Qs A y Qs B en los tiempos más prolongados de la reacción podría ser debida a la heterogeneidad de productos formados, una vez que avanza la reacción.

Algunos autores han descrito en muestras de pectina y proteínas de huevo en estado sólido en condiciones similares, una disminución de la solubilidad de los productos de reacción cercana a un 20 %. Sin embargo, el comportamiento reológico de los productos resultantes era el de una solución viscosa más que un gel (Al-Hakkak y col., 2010). Se ha descrito que la reactividad de los carbohidratos que participan en la reacción de Maillard depende en gran medida del medio en el que se encuentre según las condiciones de pH, la actividad de agua o el medio de reacción empleado (sólido o solución) (Baynes y col., 1989).

Entre los estudios que plantean distintos métodos para llevar a cabo la reacción de Maillard, se ha demostrado que, cuando ésta se lleva a cabo en estado sólido, se presentan como ventajas, que se realiza a la  $a_w$  óptima siendo el tiempo requerido menor, y además, no hay que retirar el agua o el tampón de disolución para recuperar los productos resultantes de la reacción. A pesar de ello, una de las desventajas es la formación de agregados insolubles (Li y col., 2009). Por otro lado es conocido que se produciría un aumento en la agregación de la proteína a pH cercanos a su punto isoeléctrico ( -lg pH 5.2) por una disminución de la repulsión entre sus moléculas (Fox 2003), a lo cual se suma el hecho de que el proceso de la liofilización favorece la tendencia de la proteína a autoagregarse. Sin embargo, la presencia de un polisacárido impide una agregación excesiva y la separación de fases de la proteína (Delben y Stefanich., 1997). Además, se ha demostrado que la formación de complejos de la proteína con un polisacárido puede preservar la funcionalidad de la proteína y prevenir

su desnaturalización (Galazka y col., 1999; Burova y col., 2002). Dickinson y Galazka (1991), Galazka y col. (1999) y Morgan y col. (1999b) han demostrado que cuando la  $\beta$ -lg se glicosila con lactosa en estado sólido no se producen cambios en la conformación nativa de esta proteína, a diferencia de lo que ocurre cuando la reacción tiene lugar en solución, en la que sí que se produce la desnaturalización. Se considera, por tanto, que es muy poco probable la contribución en la formación de material insoluble que está teniendo lugar, de la formación de agregados de proteína o su desnaturalización.

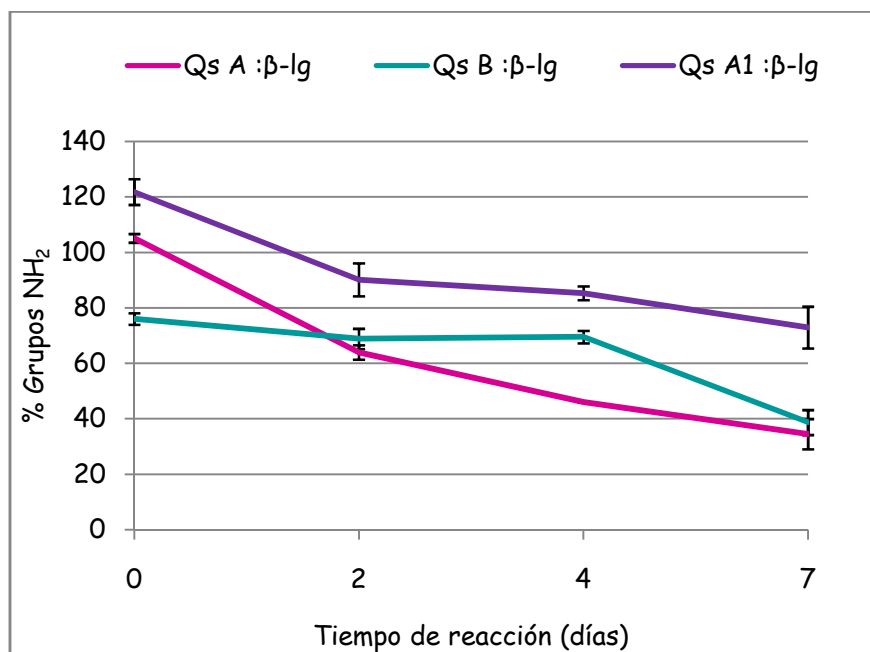
Teniendo en cuenta que la formación de un complejo electrostático entre quitosano y  $\beta$ -lactoglobulina se demostró, una de las hipótesis que se plantean en la formación del material insoluble es que parte de ese complejo se podría mantener. Al someterlo a las condiciones de reacción de Maillard la interacción podría hacerse más fuerte pudiendo dar lugar a un coacervado que afectado por la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción (40°C) da lugar a partículas de un hidrogel formado por una red tridimensional de moléculas de proteína con moléculas de quitosano con sus cadenas poliméricas entrecruzadas. Hong y McClements (2007) demostraron un fenómeno similar cuando sometían soluciones de quitosano y  $\beta$ -lg a calentamiento a 80°C. Sin embargo, ya observaban un cambio de la turbidez de las soluciones cuando aumentaban la temperatura de 40 a 55°C, lo que se atribuía a complejos moleculares inducidos por el calor. Pérez y col. (2006) demostraron que en la formación de hidrogeles de proteínas de suero lácteo e hidroxipropilmetilcelulosa, compiten dos fenómenos: la separación de fases y la gelificación, siendo esta última relativa a la agregación de las macromoléculas y a la disminución de los efectos de volumen excluido. En las muestras de quitosano en ausencia de proteína, en las cuales se observó el mismo fenómeno de formación de material insoluble, la novedosa hipótesis que se plantea es que estas mismas condiciones favorecen el propio entrecruzamiento de las cadenas del polímero mediante la formación de puentes de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas, dando también lugar a la formación de un hidrogel.

Algunos trabajos de investigación atribuyen la disminución de la solubilidad de la proteína y formación de material insoluble a la polimerización y entrecruzamiento de ésta debida a una glicosilación excesiva (Sato y col., 2000; Aoki y col., 2001; Tanabe y Saeki., 2001; Katayama y col., 2002). Sin embargo, en este caso más que a este fenómeno, se podría atribuir este hecho a la propia estructura de la proteína y a la

capacidad del quitosano para gelificar. La  $\alpha$ -lg es una proteína compacta con estructura globular, lo que podría estar limitando su grado de modificación mediante reacción Maillard así como su compatibilidad termodinámica con polisacáridos de estructura compleja (Hiller y Lorenzen., 2010). Sin embargo, este comportamiento se ha relacionado con efectos positivos. Oliver y col. (2006) plantean que se podrían mejorar las propiedades gelificantes de las proteínas mediante un control del avance de la reacción de Maillard, ya que podrían obtenerse glicoconjugados que dieran lugar a soluciones viscosas o incluso que pudieran dar lugar a una estructura gelificada cuando se reconstituyeran las muestras, como está ocurriendo en este caso.

#### **2.4. Determinación de grupos amino protonados libres**

La Figura IV.24 muestra la evolución del porcentaje de grupos amino libres en los productos solubles de reacción en los Qs A, Qs B y Qs A1 modificados mediante reacción de Maillard en presencia de proteína para los distintos tiempos de reacción. En primer lugar, se comparó el porcentaje de grupos amino protonados libres en los productos formados a partir de Qs A y Qs B, para los cuales tuvo lugar la formación de un producto insoluble gelificado. El porcentaje de grupos amino siguió una tendencia de disminución a medida que aumentó el tiempo de reacción. Para 2 días de reacción el porcentaje de grupos amino consumidos en la formación de productos fue prácticamente el mismo en Qs A y Qs B. Sin embargo, el consumo de grupos amino se mantuvo constante para el Qs B y siguió decreciendo para un periodo de reacción de 4 días para el Qs A. Para el producto formado con el Qs A se consumieron más grupos amino, lo que se puede atribuir a la mayor formación de material insoluble gelificado. Los productos formados a los 7 días de reacción presentaron un porcentaje de grupos amino similar en el caso de los dos quitosanos. Sin embargo, en este estudio hay que considerar que se trata de una medida relativa de la evolución del consumo de dichos grupos a medida que se produce la reacción puesto que se estarían cuantificando grupos aminos pertenecientes tanto al quitosano como a la proteína que no han reaccionado.

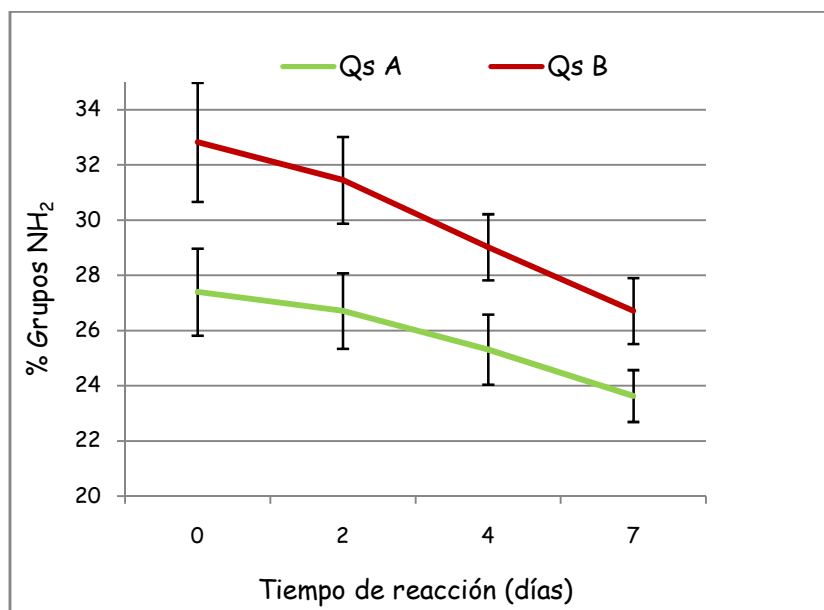


**Figura IV.24.** Porcentaje de grupos amino presentes en Qs A: -lg, Qs B: -lg y Qs A1: -lg con el tiempo de reacción de Maillard (n=3).

En el caso del Qs A1, el consumo de grupos amino protonados libres fue menor con respecto a Qs A y Qs B. Este quitosano fue obtenido mediante despolimerización enzimática y como consecuencia de ello se podría esperar que presentara un mayor número de extremos reductores con grupos aldehídos más disponibles para reaccionar, ya que se ha descrito que cuanto más pequeña sea la cadena de carbono del azúcar, mayor porcentaje de la forma acíclica y, por tanto, más reactivo sería el azúcar (Li y col. 2009). Sin embargo, el descenso de grupos amino no fue tan pronunciado en los productos formados con Qs A1. Esto se atribuye a que, no hubo formación de material insoluble gelificado que podría estar consumiendo grupos aminos libres, como en el caso de los productos formados con Qs A y con Qs B y que coincide en el caso de los productos formados a partir de Qs A, en el que disminuyó más el porcentaje de grupos amino, con una mayor formación de material insoluble gelificado para este quitosano. Para los productos formados a partir de Qs A1, el consumo de grupos amino sólo se relacionaría con la formación de MRPs solubles. Se podría establecer un mayor consumo de los grupos amino inicialmente en la mezcla liofilizada, lo que coincidió con una interacción electrostática más favorecida en presencia de la proteína para el Qs B.

Existen numerosos estudios de formación de conjugados entre polisacáridos y proteínas en los que el consumo de grupos amino libres presentes es un indicador que permite establecer la formación de MRPs, mediante la reacción de estos grupos aminos presentes en la proteína con el grupo carbonilo reductor de diferentes polisacáridos (Gu y col., 2009; Chawla y col., 2009; Guan y col., 2010). Al-Hakkak y col. (2010) encontraron una disminución del porcentaje de grupos amino en la mezcla de proteínas de huevo y pectina tras el proceso de liofilización y previo a la reacción de las muestras, sugiriendo que la conjugación estaba teniendo lugar durante la liofilización. El mayor descenso de grupos amino estaría relacionado con las primeras etapas de la reacción, en las que se produce una degradación de lisina en la proteína más rápida, que luego tiende a estabilizarse (Labuza y Baisier., 1992). Gu y col. (2009) demostraron en mezclas de caseína y glicina el rápido consumo de grupos amino de la lisina y la posterior estabilización que se producía en la glicosilación de las muestras durante los diez primeros minutos de calentamiento. Se ha descrito que la energía de activación necesaria para la desaparición de los grupos amino en mezclas azúcar-proteína podría decrecer a medida que disminuye el pH, sugiriéndose un menor consumo de grupos amino en el caso de productos avanzados de la reacción (Ajandouz y col., 2008). Otros autores han encontrado periodos de la reacción en los cuales no se produce pérdida de grupos amino cuando entre un 50-75 % de lisinas han sido consumidas (Labuza y Saltmarch., 1982). Esto, es lo que podría estar ocurriendo para los productos obtenidos con el Qs B para el periodo comprendido entre dos y cuatro días. El continuo descenso del porcentaje de grupos amino hasta el final de la reacción, aunque más ralentizado, podría estar también influenciado, como se ha descrito, por los grupos amino que se regeneran por parte de la base de Schiff o los compuestos intermedios de glicosilamina (Hodge, 1953; Labuza y Baisier.,1992).

La Figura IV.25 muestra la evolución del porcentaje de grupos amino protonados libres en los productos solubles para los quitosanos Qs A y Qs B en ausencia de -lg modificados mediante reacción de Maillard.



**Figura IV.25.** Porcentaje de grupos amino libres presentes en Qs A y Qs B modificado mediante reacción de Maillard (n=3).

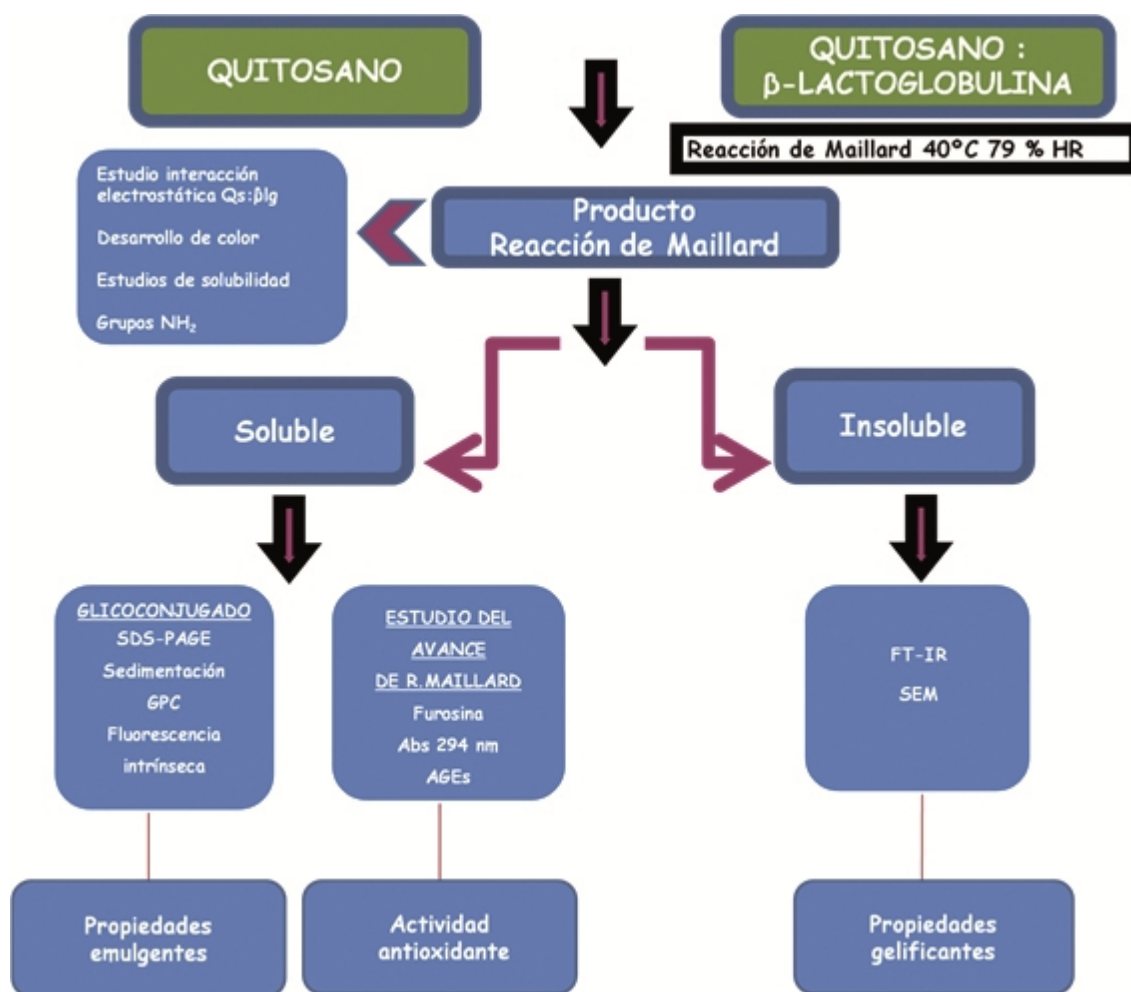
El porcentaje de grupos amino obtenido a tiempo 0 días indica que tras la liofilización existe aproximadamente una tercera parte de los grupos amino iniciales. Tommeraas y col. (2001) demostraron, que en el proceso de liofilización, muestras de oligosacáridos de quitosano eran capaces de formar la base de Schiff y 5-hidroximetilfurfural. Debido a la sublimación del ácido acético y al aumento de pH los grupos amino se desprotonan dando lugar a un fuerte nucleófilo que puede reaccionar con el grupo aldehído del extremo reductor del polímero. Por tanto, se podría suponer, según el bajo porcentaje de grupos aminos que se observa en los quitosanos en ausencia de proteína sometidos al proceso de liofilización, que se estaría iniciando la reacción de Maillard en el quitosano por sí solo. Con el almacenamiento, el porcentaje siguió disminuyendo ligeramente, alcanzándose aproximadamente un 24 % de grupos amino para Qs A y un 27 % para Qs B. Este descenso puede provenir de la formación de MRPs y de la formación de material insoluble. La diferencia no fue muy grande entre el Qs A y el Qs B, en contraste con la disminución de la solubilidad. No se puede establecer cuantitativamente que, aunque el descenso de grupos amino fue mayor para el Qs A, la formación de productos de reacción para este quitosano estuviera más favorecida, puesto que, aunque porcentajes similares de ambos quitosanos dieron lugar a la formación de material insoluble, podría haber una mayor participación de grupos amino de Qs A en el

entrecruzamiento en este quitosano consigo mismo, debido a un menor  $M_w$  y polidispersidad. Umemura y Kawwai (2007) también atribuyen la disminución de grupos amino a la formación de material insoluble provocada en su caso por una excesiva glicosilación. Lo que sí pudo observarse es que a partir de 4 días el porcentaje de grupos amino siguió descendiendo ligeramente y sin embargo el descenso de porcentaje de material soluble se detuvo, indicando la participación de estos grupos en la reacción de Maillard en el producto soluble. Teniendo en cuenta la cuantificación de grupos amino en el quitosano liofilizado a tiempo 0, en el que no tiene lugar la formación de material insoluble, fue en el Qs A en el que inicialmente el consumo de grupos amino implicados en la reacción de Maillard tuvo lugar de forma más rápida en ausencia de proteína indicando que este podría ser más reactivo.

### Conclusiones parciales

- Se demostró el pardeamiento no enzimático del quitosano y la  $\beta$ -lactoglobulina con el tiempo de reacción una vez producida la interacción electrostática entre ambos inicialmente, siendo esta interacción mayor en el quitosano de mayor  $M_w$ .
- El quitosano de bajo  $M_w$  dio lugar a una mayor formación de MRPs con proteína solubles frente a los quitosanos de  $M_w$  intermedio, que dieron lugar a la formación de MRPs solubles a la vez que a un material insoluble gelificado. La formación del material insoluble estuvo más favorecida en el caso de proteína y el Qs A de  $M_w$  intermedio bajo ( $M_w$   $36 \times 10^3$  g/mol).
- El quitosano en ausencia de proteína dio lugar a pardeamiento no enzimático y consumo de grupos aminos libres. La formación del producto insoluble gelificado también tuvo lugar en los quitosanos de  $M_w$  intermedio, siendo mayor el entrecruzamiento para el Qs A.

El esquema de trabajo del estudio de los productos de reacción de Maillard que se llevo a cabo a partir de este punto, se muestra en la Figura IV.26.

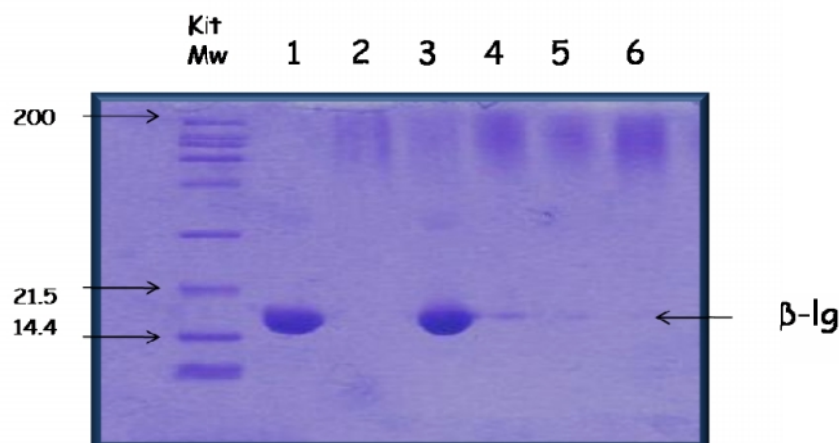


**Figura IV.26** Esquema de trabajo del estudio de la modificación de quitosano con  $\beta$ -lactoglobulina mediante reacción de Maillard.

## 2.5. Estudio de formación y caracterización estructural de los glicoconjugados entre el quitosano y la $\beta$ -lactoglobulina

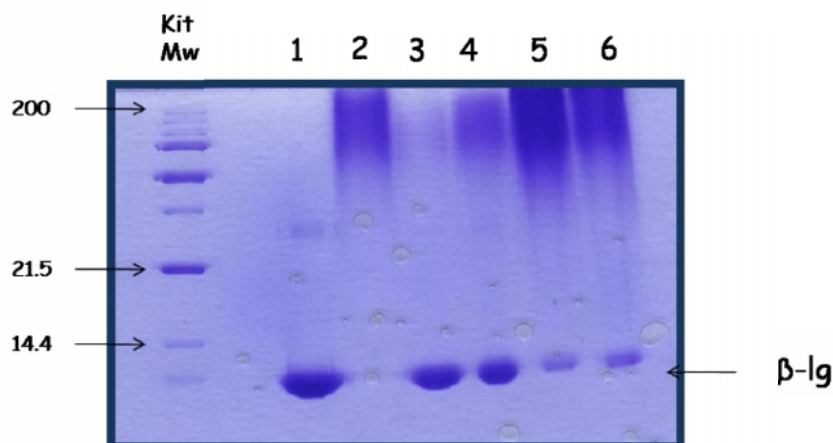
### 2.5.1. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE

El estudio de los cambios en los perfiles electroforéticos por SDS-PAGE se ha descrito como una herramienta útil para evaluar la modificación de la estructura de los conjugados formados entre proteínas y carbohidratos reductores vía reacción de Maillard porque la unión de carbohidratos a la estructura polipeptídica de la proteína incrementa su masa.



**Figura IV.27.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %. Calles: Patrón de pesos moleculares (kit *Mw*); 1)  $\beta$ -lactoglobulina; 2) Qs A; 3) Complejo Qs A y  $\beta$ -lg; 4) conjugado 2 días; 5) conjugado 4 días; 6) conjugado 7 días.

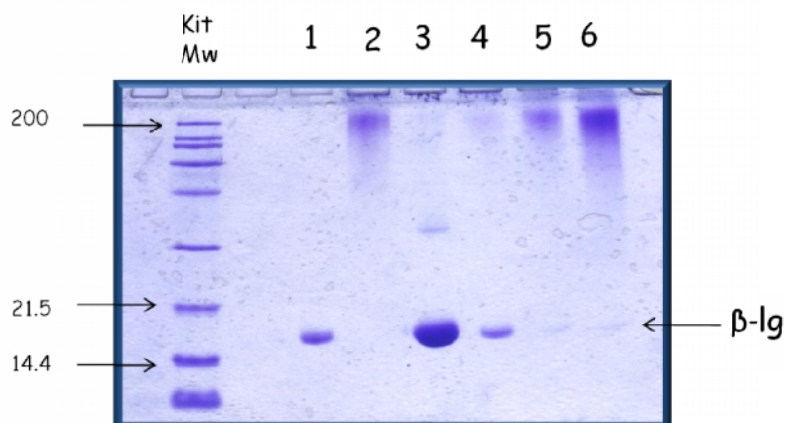
La Figura IV.27 muestra la separación electroforética SDS-PAGE de los productos solubles y ultrafiltrados obtenidos para QsA:  $\beta$ -lg. Se observa como, en condiciones reductoras, la intensidad de la banda correspondiente a la  $\beta$ -lg disminuyó a medida que avanzaba el tiempo de reacción, habiendo casi desaparecido cuando transcurrieron 7 días. En las calles 4, 5 y 6 pudo observarse una banda difusa con menor movilidad electroforética en la parte superior del gel separador. La intensificación de la nueva banda difusa en las calles correspondientes a las mezclas de reacción formadas por quitosano y  $\beta$ -lg sugiere la formación de MRPs de distintos pesos moleculares y grado de conjugación. Estas bandas son difícilmente cuantificables, pero sí que es observable que su intensidad es ligeramente mayor a medida que aumenta el tiempo de reacción. Resultados similares se observaron en el caso del Qs A1 (Figura IV.28). Algunos autores han encontrado un comportamiento semejante entre la  $\beta$ -lg (Chevalier y col., 2001b) y otras proteínas alimentarias como son la ovoalbúmina (Nakamura y col., 1992), las proteínas de la soja (Diftis y Kiosseoglou., 2003) o las caseínas (Kato y col., 1992) con diferentes carbohidratos reductores. Sin embargo, en esos casos el polisacárido no se podía visualizar en el gel teñido con Comassie, mientras que en este estudio se ha demostrado que el quitosano en ausencia de proteína se puede teñir con este colorante apareciendo una banda difusa que aumenta con el tiempo de reacción en los productos reaccionados con proteína. Anteriormente se ha descrito la capacidad de este polímero para teñirse con el colorante azul brillante Comassie (Audy, 1992).



**Figura IV.28.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %. Calles: Patrón de pesos moleculares (kit  $M_w$ ); 1)  $\beta$ -lactoglobulina; 2) Qs A1; 3) Complejo Qs A1 y  $\beta$ -lg; 4) conjugado 2 días; 5) conjugado 4 días; 6) conjugado 7 días.

Los resultados obtenidos en el caso de los productos solubles y ultrafiltrados formados entre Qs B ( $M_w$   $80 \times 10^3$  g/mol) de mayor peso molecular promedio que el Qs A ( $M_w$   $36 \times 10^3$ ) y el Qs A1 ( $M_w$   $1.3 \times 10^3$  g/mol) se muestran en la Figura IV.29. Como diferencia con respecto a Qs A y Qs A1 se encontró, que los compuestos de diferente peso molecular formados en el caso del Qs B:  $\beta$ -lg, se detectaron en una banda igualmente difusa, más cercana a la línea de separación entre el gel concentrador y el gel separador, por encima del patrón de pesos moleculares correspondiente a  $200 \times 10^3$  g/mol y cuya intensidad aumentó más con el tiempo de reacción. El mayor peso molecular promedio del Qs B podría contribuir a que en la mezcla heterogénea de productos resultantes de la reacción de diferente peso molecular existieran glico-conjugados unidos covalentemente de mayor peso molecular, junto con los diferentes MRPs que se puedan originar.

Por tanto, se sugiere la implicación de  $\beta$ -lg en la formación de productos de reacción a medida que aumenta el tiempo. La ligera banda de proteína que persiste desapareciendo con el tiempo, denota que hay una pequeña proporción de proteína que no estaría reaccionando independientemente del quitosano empleado. Además, la proteína no se está retirando mediante la ultrafiltración. Jiménez-Castaño y col. (2007) encontraron en conjugados entre  $\beta$ -lactoalbumina y dextrano la presencia de proteína sin reaccionar que no había sido capaz de atravesar la membrana de ultrafiltración.



**Figura IV.29.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %. Calles: Patrón de pesos moleculares (kit *Mw*); 1) -lactoglobulina; 2) QsB; 3) Complejo QsB: -lg; 4) conjugado 2 días; 5) conjugado 4 días; 6) conjugado 7 días.

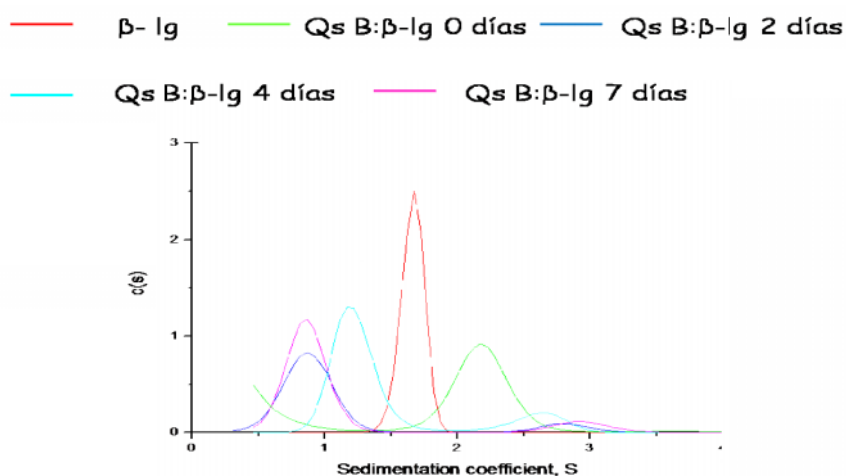
Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por algunos autores que han encontrado bandas en la parte superior del gel separador demostrando la presencia de una distribución polidispersa de compuestos de alto peso molecular en la conjugación de proteínas de leche, con diferentes azúcares y polisacáridos (Hiller y Lorenzen., 2010), de dextrano unido covalentemente a ovoalbúmina (Choi y col., 2005) y de galactomanano unido a ovoalbúmina (Nakamura y Kato., 2000). Se comprueba la formación de distintos productos de reacción y por lo tanto, que parte del descenso de los grupos amino se debe al desarrollo de la reacción, además de a su implicación en la formación de productos insolubles.

### 2.5.2. Perfiles de velocidad de sedimentación

Los experimentos de ultracentrifugación analítica se realizaron con el fin de evaluar la heterogeneidad de las especies macromoleculares presentes en los productos de la reacción en función de su coeficiente de sedimentación. El intervalo de velocidades al cual un polisacárido sedimenta bajo elevados campos centrífugos es función del peso molecular promedio y de la conformación (Harding y col., 1991), por lo que ésta es una técnica útil que permite ver afinidad entre complejos macromoleculares y estimar la forma aproximada de macromoléculas en disolución. Las interacciones entre

polisacáridos y proteínas han sido objeto de estudio mediante ultracentrifugación analítica (Cölfen y col., 1996; Easa y col., 1996).

La Figura IV.30 muestra las distribuciones del coeficiente de sedimentación. En la mayoría de los productos aparecieron dos picos anchos que denotaban fenómenos de difusión o polidispersidad correspondientes a componentes de sedimentación distintos. Se pudieron observar cambios en el coeficiente de sedimentación de los productos con respecto a la proteína. La proteína presentó un coeficiente de sedimentación mayor de lo esperado en el caso de quitosano (que no se detecta por UV) debido a que, a pesar de tener un peso molecular menor, tiene una conformación más compacta y, como se vio en la introducción, esto afectaría al valor del parámetro  $b$  de la ecuación propuesta por Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS). En el caso de los productos de reacción, cabría esperar la formación de productos con un aumento de la masa y por tanto del coeficiente de sedimentación. Esto se observó en todas las muestras que dieron lugar a una cambio conformacional hacia mayores coeficientes de sedimentación pero en baja concentración.



**Figura IV.30.** Coeficiente de sedimentación en función de la concentración de los productos de reacción formados a partir de Qs B: -Ig para los distintos tiempos de reacción detectados mediante absorbancia a 280 nm.

En el caso de la mezcla de quitosano y proteína, exclusivamente apareció un producto de mayor peso molecular y a mayor coeficiente de sedimentación. Además, para los

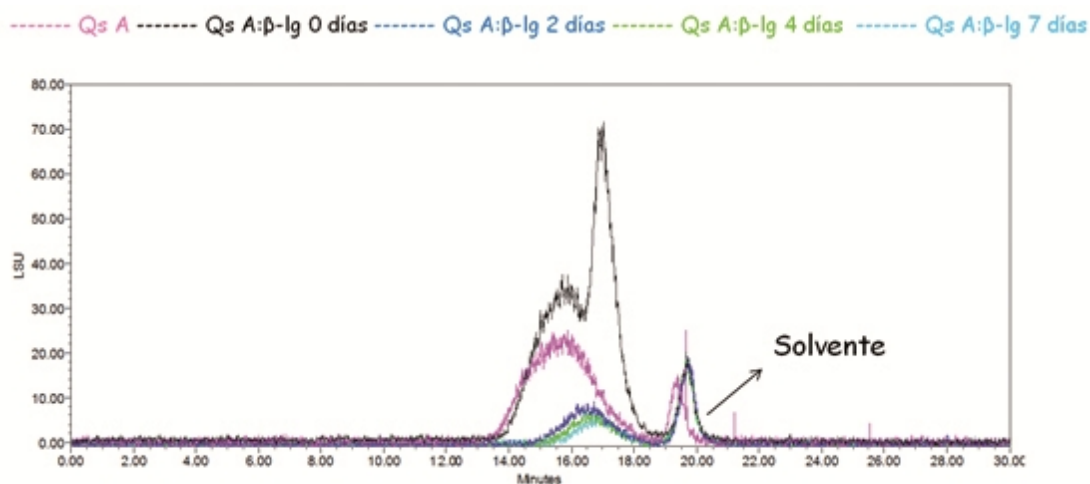
productos obtenidos para tiempos de reacción más prolongados, pudo observarse la presencia de otros productos con menor coeficiente de sedimentación.

Debido a la alta viscosidad del quitosano y a la conformación más extendida que se le atribuye por su conformación semiflexible (Brugnerotto y col., 2001b; Mazeau y col., 2000; Schatz y col., 2003; Lamarque y col., 2005), pudiera ser que estuviera dando lugar a otros productos con una conformación que diera lugar a una menor velocidad de sedimentación (Cölfen y col., 1996). Estos mismos autores propusieron que la formación de complejos debería suponer un aumento en la masa de los productos resultantes y por tanto en el coeficiente de sedimentación. Sin embargo, un incremento en la asimetría o la hidratación, podría tender a dar lugar a productos con un menor coeficiente. En parte, también la proteína podría estar afectando a la estructura conformacional semiflexible que se le ha atribuido al quitosano, reduciendo la relación entre el coeficiente de sedimentación y la concentración. Este es un fenómeno muy marcado en los perfiles de velocidad de polielectrolitos como el quitosano (Cölfen y col., 1996). Una vez que la heterogeneidad de los productos fue demostrada se llevó a cabo la cromatografía de exclusión molecular (GPC) para obtener una mayor información acerca de los cambios estructurales y de la formación de distintos productos que estaba teniendo lugar.

### **2.5.3. Perfiles cromatográficos de exclusión molecular**

La Figura IV. 31 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por GPC a partir de los productos formados con Qs A y proteína. El Qs A se detectó como una banda ancha de distribución de pesos moleculares, típica del polímero por presentarse como una mezcla polidispersa de cadenas de monómeros de distinta longitud. En la mezcla liofilizada de quitosano y proteína se observó una separación clara entre el quitosano y la proteína, que eluye entre 17 y 18 minutos. Dicha separación se debería al complejo electrostático que se demostró mediante medida de potencial zeta y que se disociaría en estas condiciones. Para los productos de tiempo de reacción más prolongados, un nuevo perfil correspondiente a un nuevo peso molecular intermedio entre el quitosano control y la proteína apareció y se fue desplazando hacia tiempos de elución correspondientes a distribuciones de pesos moleculares menores con el tiempo de reacción. El hecho de

que, cuando se sometió a la mezcla de polímeros a las condiciones de la reacción, no diera lugar a compuestos con volúmenes de elución menores correspondientes a compuestos de mayor peso molecular, sugirió que pueden existir productos de muy diferente peso molecular formados como consecuencia de la reacción.

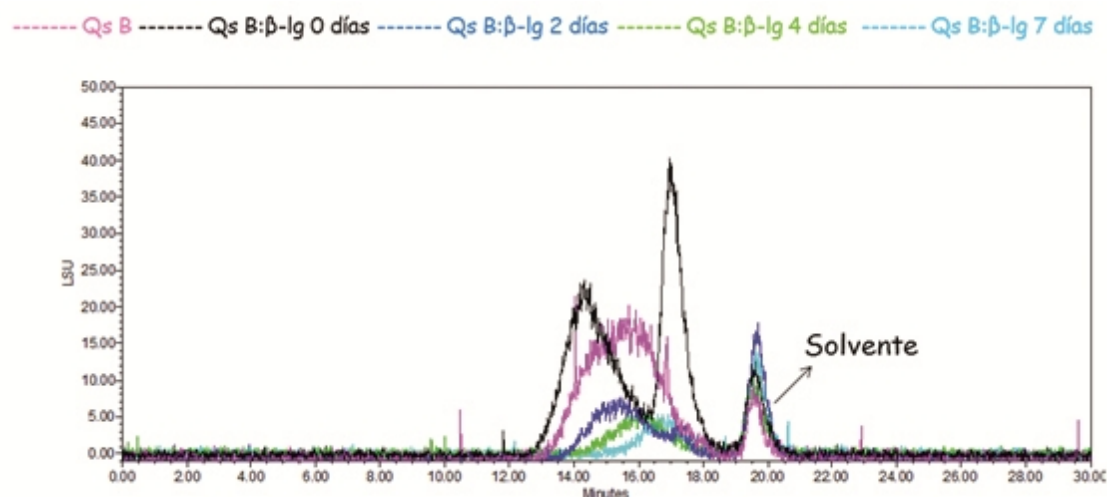


**Figura IV.31** Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GPC de los productos Qs A: -lg.

Entre los compuestos formados podrían existir glicoconjugados formados entre cadenas de longitud intermedia del quitosano y proteína, de distinto grado de conjugación de los formados inicialmente porque, podría ser posible la formación de productos intermedios de reacción a la vez que continua la glicosilación (Guan y col., 2010). Además habría que tener en cuenta que en este quitosano se vió más favorecida la formación de material insoluble gelificado pudiendo existir menos cadenas disponibles o de menor peso molecular promedio para la formación del glicoconjugados. Morris y col. (2004) demostraron que en la conjugación covalente de maltodextrinas y caseinato, la proteína se estaba uniendo principalmente a oligosacáridos de un grado de polimerización promedio entre 7 y 10. Los resultados son similares a los obtenidos por Bouhallab y col. (1999), quienes comprobaban que se formaban numerosos polímeros con diferentes perfiles cromatográficos a partir de -lg y lactosa. El desarrollo de la reacción implica la formación de un gran número de compuestos que podrían tener una diferente contribución al peso molecular total del quitosano modificado. Por lo tanto, el no conocimiento exacto de la cantidad de cada uno los productos de la reacción de Maillard

que se ha formado (compuestos iniciales, avanzados y finales) no permite establecer un peso molecular conocido para cada tipo de compuestos, ni determinar el número de residuos exactos de carbohidrato unido a la proteína.

La Figura IV.32 muestra los cromatogramas obtenidos en el caso de los productos formados entre el Qs B y la proteína. La diferencia más notable con respecto al Qs A, es que en la mezcla inicial de polímeros liofilizada se detectó un pico que se desplazó hacia un tiempo de retención menor con respecto a Qs B, además del correspondiente pico de proteína que muestra de nuevo la separación del complejo electrostático. Este desplazamiento denota la formación de productos de reacción de mayor peso molecular con el Qs B, demostrando que la reacción con proteína ya comienza en la liofilización, al igual que se había sugerido en el caso del quitosano en ausencia de proteína por el descenso de grupos amino a 0 días.

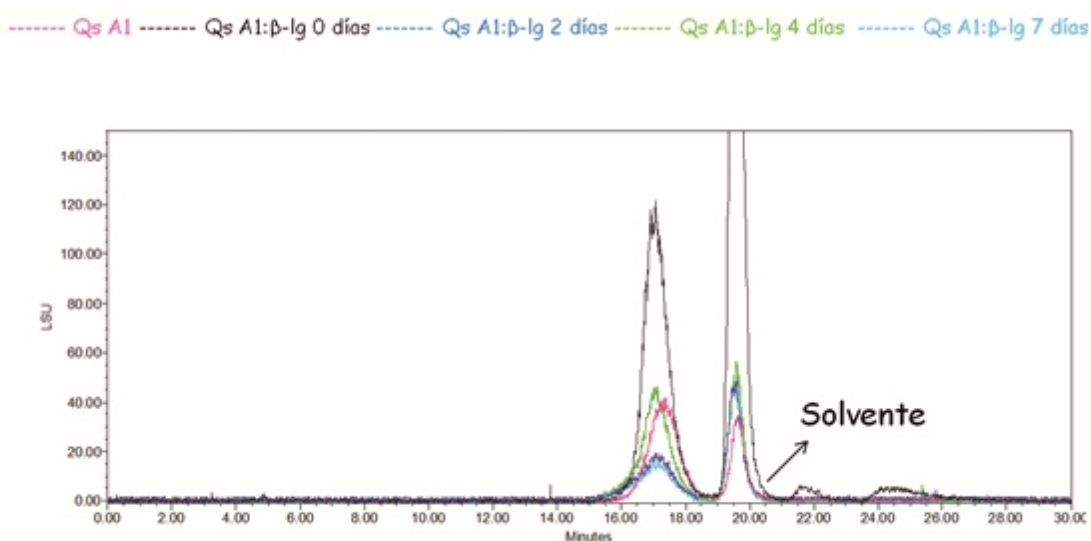


**Figura IV.32.** Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GPC de los productos Qs B: -Ig.

Es razonable que inicialmente se produzca un aumento del volumen hidrodinámico como consecuencia de la glicosilación entre quitosano y  $\beta$ -lactoglobulina. A partir de aquí el compuesto de Amadori formado tendería a la degradación mediante distintas reacciones y a la formación de compuestos heterocíclicos en los estados intermedios y finales (Silvan y col., 2006). Por esta razón, se podrían estar obteniendo productos con

un menor peso molecular promedio, dando lugar a la mezcla heterogénea de productos de distinta naturaleza. Aún así, a tiempos de reacción más prolongados, los productos formados con Qs B (productos eluidos entre 14-17min) presentaron un mayor peso molecular promedio que los encontrados para los productos formados con Qs A (productos eluidos entre 15-18min). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la electroforesis de SDS-PAGE. Li y col. (2009), también encontraron un descenso del peso molecular promedio de productos de reacción de Maillard entre proteínas de arroz y glucosa, sugiriendo que el grado de glicosilación entre ambos polímeros disminuye con la formación de MRPs y su degradación con el tiempo de reacción.

Los productos formados a partir de Qs A1 y proteína (Figura IV.33) también mostraron un perfil cromatográfico que se desplazó ligeramente a tiempos de elución menores, ya desde el proceso de liofilización, con respecto al quitosano solo. Por tanto, se demostró igualmente la formación de gliconcojugados, sugiriéndose la unión de cadenas de bajo grado de polimerización de este quitosano a la proteína debido al ligero desplazamiento producido.



**Figura IV.33.** Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GPC de los productos Qs A1: -lg.

Los picos de los productos eluidos entre 16-18min para el producto formado a los dos días fueron similares, estando más desplazado hacia tiempos de elución menores el producto a los cuatro días, presentando por tanto, un mayor peso molecular. Una vez alcanzado el máximo de glicosilación para el producto formado a 4 días podría tener lugar la posible degradación del compuesto de Amadori y la formación de una mezcla de productos heterogénea.

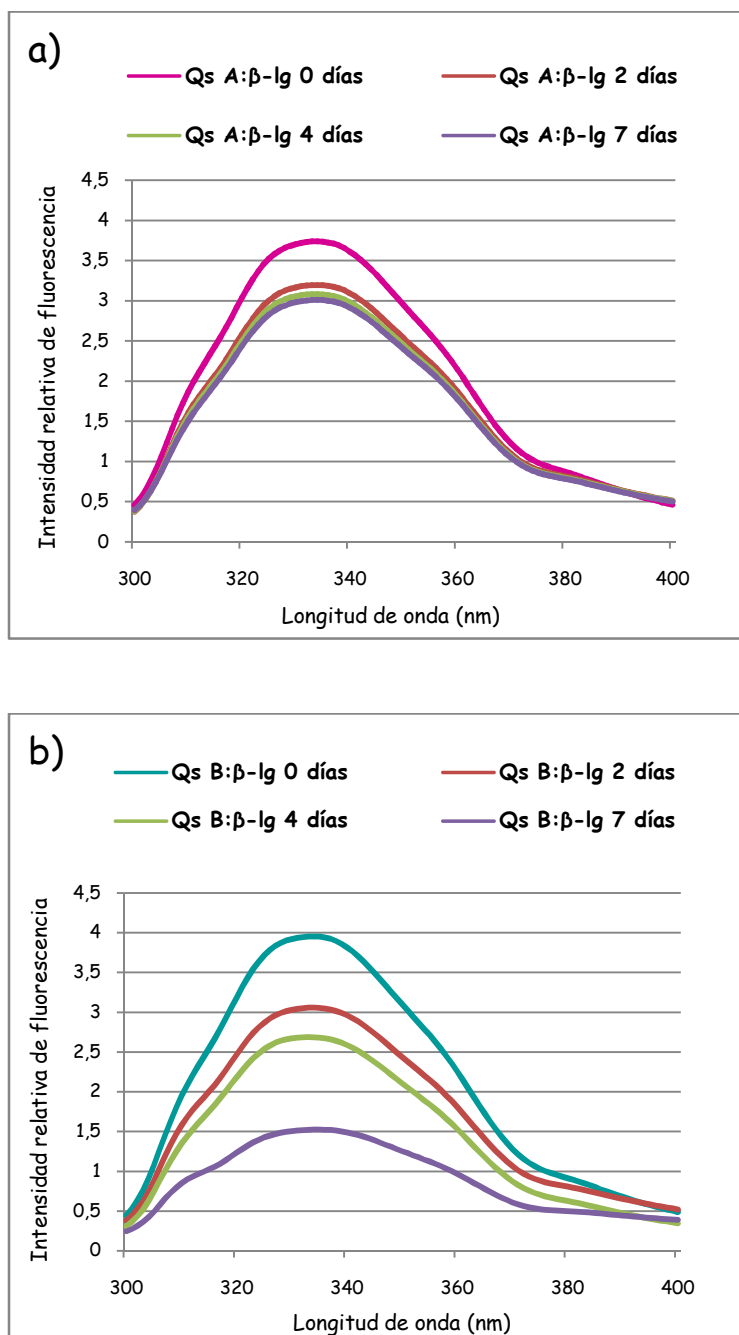
#### **2.5.4. Determinación de la fluorescencia intrínseca**

El estudio de la estructura de la  $\alpha$ -lg mediante fluorimetría proporciona información acerca de los posibles cambios estructurales que se producirían como consecuencia de su unión al quitosano. La fluorescencia intrínseca de las proteínas lácteas se debe principalmente a tres aminoácidos aromáticos: el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la fenilalanina (Phe). De los tres aminoácidos, el triptófano domina la emisión de fluorescencia de las proteínas debido a su elevado coeficiente de extinción. Por ello mediante la determinación de fluorescencia del Trp es posible tener información acerca de la estructura de la proteína, ya que sus propiedades de emisión son sensibles al entorno aminoacídico, y los cambios estructurales que afectan al Trp se van a poder detectar por variaciones en el espectro de emisión.

La Figura IV.34 muestra los espectros de emisión de fluorescencia del Trp de los productos de la reacción solubles formados con el tiempo de reacción. Tras excitar a 280 nm la proteína presentó una emisión de fluorescencia máxima a 333nm ( $\lambda_{\text{máxima}}$ ) en las mezclas de quitosano y proteína liofilizadas. Se pudo observar cómo la intensidad de fluorescencia relativa al Trp decreció en los productos de reacción con respecto a la mezcla inicial de quitosano y proteína. Puesto que no existió ningún desplazamiento de la  $\lambda_{\text{máx}}$  se supone que no existió un cambio del estado conformacional de la  $\alpha$ -lg alrededor de los residuos del Trp (19Trp y 61Trp), como consecuencia de la exposición de Trp hacia zonas más hidrofílicas; lo cual estaría provocado por las condiciones de calor y humedad relativa establecidas, como consecuencia de la desnaturalización y agregación de la proteína que se muestra en diferentes trabajos (Renard y col., 1998; Jiménez-Castaño y col., 2005a y 2007).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, según los cuales, en estado sólido la glicosilación no produce un cambio de la conformación de la proteína, ocurriendo sólo en el caso de la reacción llevada a cabo en solución, donde se produce un proceso de desnaturalización (Morgan y col., 1999b; Gauthier y col., 2001). La disminución de la intensidad de fluorescencia a medida que aumentó el tiempo de incubación de las muestras, se atribuye al efecto de apantallamiento de la emisión de intensidad de fluorescencia que podría ejercer el quitosano unido a la proteína (Hattori y col., 2000; Jiménez-Castaño y col., 2005a, 2007). Estos resultados, por tanto, demuestran que no se está afectando la estructura nativa de la proteína. Se observó un mayor descenso de intensidad de fluorescencia a medida que transcurrió el tiempo de incubación para los productos formados con Qs B: -lg. Jiménez-Castaño y col. (2007) encontraron menor intensidad de fluorescencia en los productos formados con -lg y dextrano de  $M_w$   $20 \times 10^3$  g/mol, respecto a un dextrano de  $M_w$   $10 \times 10^3$  g/mol.

Si se tiene en cuenta la disminución de grupos amino que se está produciendo con el tiempo de reacción, parece que existe mayor disminución de grupos amino con el tiempo de reacción en los productos formados con Qs A, lo que no coincide con la menor disminución de intensidad de fluorescencia que existe con respecto al Qs B, sugiriéndose de nuevo una mayor implicación de los grupos aminos en la formación de material insoluble gelificado en el caso del Qs A y una menor glicosilación en este quitosano con respecto al Qs B. Esto sugiere que las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia se relacionan con el grado de glicosilación de la proteína y el mayor efecto de apantallamiento provocado por un quitosano de mayor peso molecular promedio como es el Qs B. Según Moreaux y col. (1997), podría estar ocurriendo una disminución de la intensidad relativa de fluorescencia como consecuencia de la degradación del Trp en la proteína a medida que avanza la reacción de Maillard. Guan y col. (2010) plantearon que la reacción de Maillard podría estar continuando a la vez que los productos intermedios se podrían estar formando y polimerizando para dar lugar a productos finales de reacción.



**Figura IV.34.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de productos de a) QsA: Ig y b) QsB: Ig.

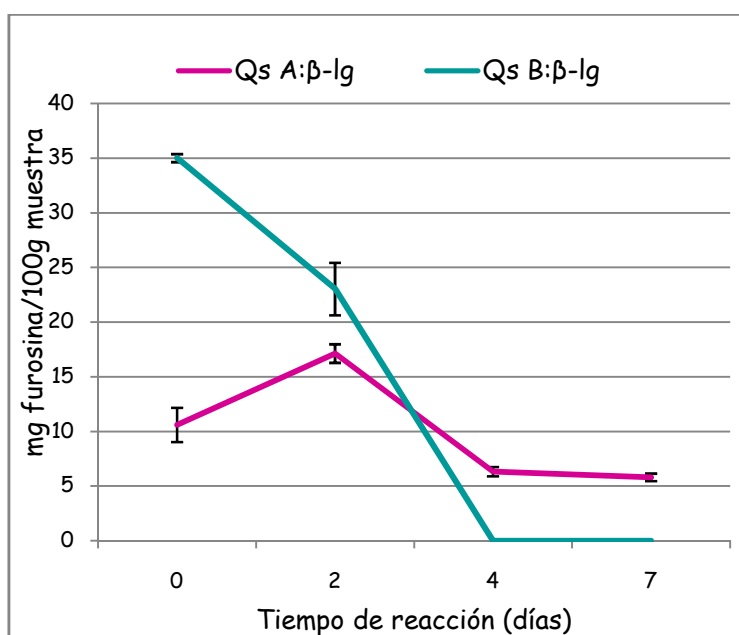
### Conclusiones parciales

- Se demostró la formación de glicoconjugados solubles con proteína. Para los quitosanos de  $M_w$  intermedio la glicosilación estuvo más favorecida en el Qs B de  $M_w$  intermedio alto. Los MRPs solubles mostraron ser mezclas de productos cada vez más heterogéneos de distinto peso molecular a medida que aumentaba el tiempo de reacción.

## 2.6. Estudio del avance de la reacción de Maillard

### 2.6.1. Determinación de furosina

Uno de los indicadores que se utilizan para llevar a cabo el seguimiento de la evolución de la glicosilación no enzimática de proteínas es determinación de la furosina (2-furoilmetil-lisina), derivado furoilo formado a partir de la hidrólisis ácida del compuesto de Amadori de la lisina (Moreno y col., 2002; Jiménez-Castaño y col., 2005a; 2005b). La cantidad formada de furosina depende de la intensidad del tratamiento térmico. Normalmente este compuesto se incrementa linealmente durante las etapas iniciales de la reacción de Maillard, mientras que disminuye en las etapas avanzadas, debido a una mayor degradación del compuesto de Amadori frente a su formación (Finot y col., 1981).



**Figura IV.35.** Evolución del contenido de 2-furoil/furil-metil-aminoácidos derivados de los compuestos de Amadori durante la formación de los conjugados QsA: Ig y QsB: Ig (n=2).

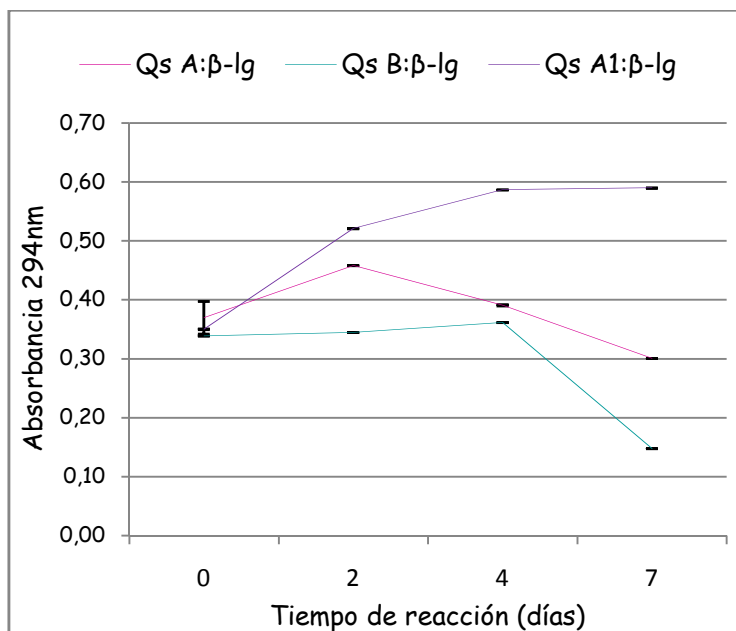
La Figura IV.35 muestra la evolución del contenido en furoil- y furil-derivados de los compuestos de Amadori para las reacciones llevadas a cabo para el Qs A y Qs B y la proteína. Los resultados indican que, como se sugería en los resultados previos de GPC,

en la mezcla inicial de ambos quitosanos con proteína, ya desde el proceso de liofilización se está produciendo la reacción de Maillard, puesto que se detectó furosina en estas muestras. En el caso del Qs A la concentración de furosina detectada en los productos, se incrementa cuando transcurren 2 días de reacción con respecto a la mezcla liofilizada de quitosano y proteína. A partir de los 2 días se produce una disminución en la concentración de ésta hasta unos niveles mínimos prácticamente constantes de 5mg de furosina/100g de muestra. Para los productos formados con el Qs B, es en la mezcla inicial donde se detectan los niveles de concentración máximos de furosina. Al cabo de 2 días se produce un descenso brusco de furosina, lo que puede estar relacionado con el hecho de que la velocidad de degradación del compuesto de Amadori supere a la de formación, y por tanto la reacción se encuentre en etapas más avanzadas (Rufian-Henares y col., 2004). Estos resultados podrían sugerir que la reacción evoluciona de una forma más rápida para el Qs B, siendo mayor la velocidad de formación de 2-furoilmetil-derivados. La degradación total de furosina en los productos de Qs B a partir de 4 días indicaría que la reacción se inicia más rápido, y la evolución hacia la formación de otros productos intermedios o avanzados también podría estar más favorecida.

### **2.6.2. Determinación de compuestos espectroscópicos que absorben en UV**

Para continuar con la evolución del avance de reacción, otro de los métodos empleados normalmente en la detección de compuestos intermedios de la reacción de Maillard es la medida de absorbancia a una longitud de onda de 294 nm, según el método descrito por Leric y col. (1990). Estos autores establecieron que, después de un intervalo de tiempo, la formación de dióxido de carbono mediante la degradación de Strecker daba lugar a la liberación de una serie de compuestos intermedios volátiles con propiedades espectroscópicas que les hacían absorber en el UV a esta longitud de onda como precursores de pigmentos marrones. Hodge en 1953, atribuyó estas propiedades espectroscópicas a la deshidratación y fragmentación de los carbohidratos. Posteriormente, numerosos estudios han demostrado la formación de compuestos intermedios de reacción mediante el incremento de la absorbancia a 294 nm en diferentes mezclas de proteína y polisacáridos ensayadas. (Ajandouz y col., 2001; Kanatt y col., 2008; Gu y col., 2009; Guan y col., 2010). Estos productos se suelen asociar a productos no coloreados (Shen y col., 2007).

La Figura IV.36 muestra las absorbancias medidas a 294 nm para los productos obtenidos a partir de los diferentes quitosanos y proteína.



**Figura IV.36.** Análisis de productos con propiedades espectroscópicas intermedios de la reacción determinados mediante medida de absorbancia a una longitud de onda de 294 nm durante la formación de los conjugados QsA: -Ig , QsB: -Ig y Qs A1: -Ig (n=3).

En todos los productos estudiados, a tiempo cero se detectó un valor de absorbancia similar denotando la formación de compuestos intermedios con propiedades espectroscópicas, lo que confirma que durante el proceso de liofilización se puede iniciar la reacción. Para los productos formados a partir de Qs A y Qs A1, existió un aumento de la absorbancia a 294 nm de 0 a 2 días de reacción, que puede ser atribuida a la acumulación de compuestos intermedios del pardeamiento no enzimático durante este periodo de tiempo. En el caso de los productos formados con el Qs B, entre 0 y 2 días la absorbancia y, por tanto, la concentración de estos productos permaneció constante. A partir de 2 días de reacción, la absorbancia aumentó para el Qs A1, disminuyó para el Qs A y se mantuvo constante para el Qs B. Después de cuatro días se produjo una disminución de la absorbancia para los productos formados con Qs A y Qs B, y permaneció prácticamente constante en el caso del Qs A, encontrándose en este punto la

menor concentración detectada de estos compuestos en los productos formados con el Qs B.

La formación de compuestos intermedios con características espectroscópicas estaría teniendo lugar ya en el proceso de liofilización y su formación estaría ocurriendo de forma simultánea a la formación de furosina. El aumento en la concentración de estos productos en el periodo de cero a dos días para los productos formados con Qs A y Qs A1, coincide con los resultados obtenidos por Gu y col. (2009) que encontraron una mayor formación de estos productos durante los 30 primeros minutos de reacción en productos formados a partir de caseína y glucosa. Teniendo en cuenta que, en este caso, la  $\alpha$ -lg es una proteína globular y la reacción transcurriría de una forma más lenta con respecto a otras proteínas, estos resultados podrían ser comparables con un periodo de tiempo mayor como es el alcanzado a los 2 días de reacción en este estudio. A partir de este momento, en el caso del Qs A1 el aumento de la absorbancia y de la formación de estos productos hasta alcanzar el último tiempo de la reacción se podría relacionar con la alta reactividad de los compuestos di- y policarbonilos generados durante estas etapas (Ajandouz y col., 2008), que podría estar más favorecido en el caso del avance de la reacción con este quitosano. En el caso de los productos formados con Qs A y Qs B, la disminución de estos compuestos a partir de 2 y 4 días, respectivamente, podría estar relacionada con el avance y la polimerización de los compuestos para formar melanoidinas frente a la pequeña cantidad de productos intermedios que ya se estarían formando (Lertittikul y col., 2007). Por ello, llegado a un determinado punto de la reacción, la concentración de estos compuestos podría permanecer constante, como ocurre en el caso del Qs B. Ajandouz y col. (2001) también atribuyeron la disminución de la absorbancia a 294 nm que se producía en sus muestras a la transformación de compuestos intermedios en pigmentos marrones. Un valor menor de absorbancia y la disminución más acusada de ésta en el caso de los productos formados con Qs B a partir de 4 días, estaría relacionada con la total degradación de furosina para los productos formados con este quitosano y podría sugerir un avance más rápido hacia la formación de melanoidinas.

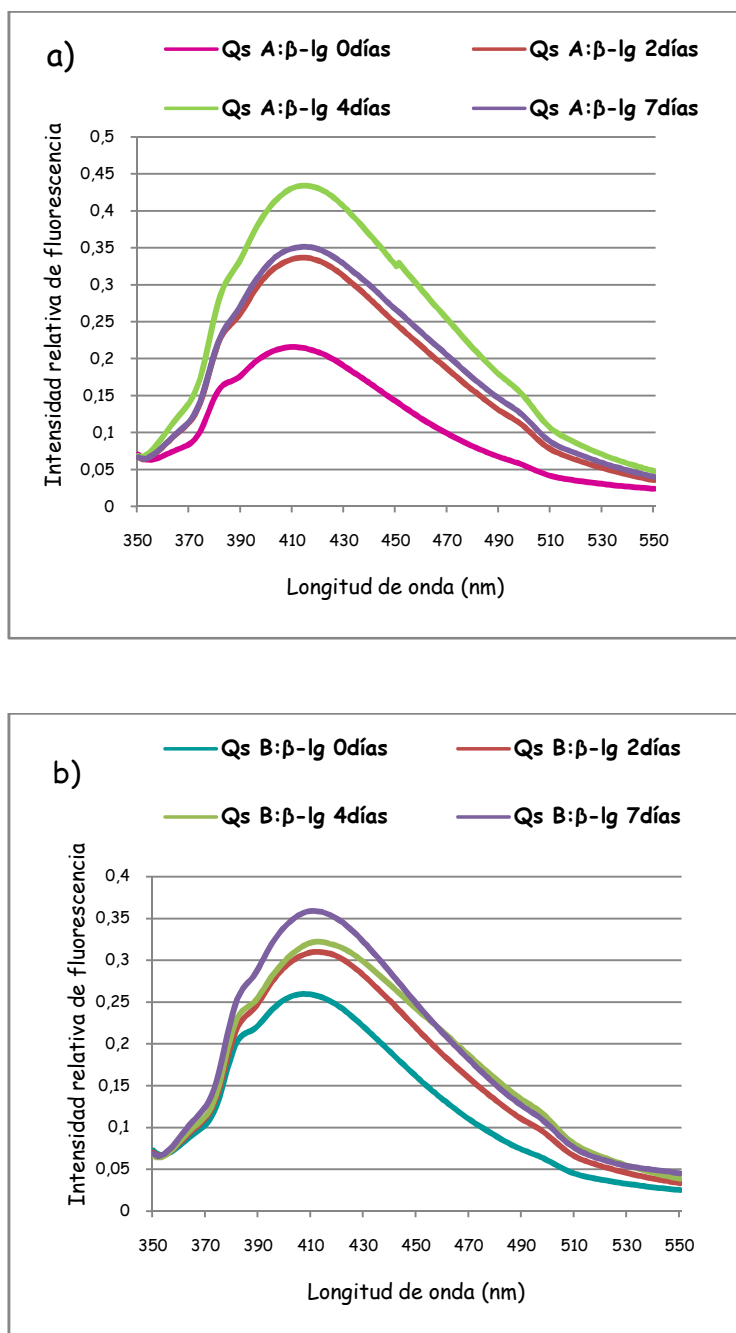
En el caso de los quitosanos modificados mediante reacción de Maillard en ausencia de proteína, la absorbancia medida a 294 nm dio valores muy próximos a cero, por lo que se estima que, en este caso, la disminución del porcentaje de grupos amino estaría mas

relacionada con la formación de material insoluble, siendo muy pequeña su implicación en la formación de MRPs solubles de etapas avanzadas.

### **2.6.3. Determinación de compuestos fluorescentes (AGEs)**

La formación de compuestos fluorescentes es indicativa de que se están alcanzando las etapas avanzadas de la reacción de Maillard. Existen estudios que muestran diferentes evoluciones en cuanto a la formación de dichos compuestos. Así, puede ser que se alcance un máximo de formación de estos productos con el tiempo de reacción (Labuza y Baisier., 1992; Benjakul y col., 2005), que aumenten continuamente (Yeboah y col., 1999), o podrían alcanzar un valor constante (Kato y col., 1989). La intensidad de fluorescencia comprendida en un intervalo entre  $\lambda_{EX}=340-370$  nm y  $\lambda_{EM}=420-440$  nm, es empleada como parámetro para la estimación de los niveles de AGEs fluorescentes. La fluorescencia obtenida se corresponde con la emitida por aquellas estructuras moleculares que se han podido formar entre los carbonilos reductores y los residuos de lisina de las proteínas presentes en el medio durante las etapas avanzadas de la reacción, por tanto esta característica es dependiente del grado de desarrollo de la reacción.

La Figura IV.37 muestra el perfil de los espectros de emisión de fluorescencia adquiridos a  $\lambda_{EX}=337$  nm y  $\lambda_{EM}=350-550$  nm para cada uno de los productos de reacción obtenidos. Se observaron modificaciones en el perfil de los espectros de fluorescencia máximos entre los 400-440 nm. Los resultados mostraron que la formación de compuestos de naturaleza fluorescente alcanzó un máximo a aproximadamente 410 nm para 4 días de reacción en los productos formados con Qs A, y siguió aumentando hasta los 7 días, en el caso de los productos formados con Qs B. Li y col. (2009) atribuyeron la disminución de intensidad de fluorescencia que se produce en sus muestras, a la formación de estructuras químicas de distinta naturaleza. Es decir, que podría ocurrir, que una vez que se ha alcanzado un máximo de fluorescencia, los fluorógenos actúen como precursores de pigmentos marrones como se viene planteando a lo largo de este apartado.



**Figura IV.37.** Espectros de fluorescencia de emisión de productos de reacción a) QsA: -lg b)QsB: -lg.

Por otro lado, se determinó el grado de desarrollo de la reacción de Maillard mediante la estimación del índice de productos avanzados fluorescentes y triptófano soluble según el método descrito por Birlouez-Aragon y col. (2001). Mediante la utilización de este otro método se aporta información cuantitativa complementaria a la obtenida anteriormente. Para ello se midió la intensidad de fluorescencia en un intervalo de longitud de onda de excitación  $E_X=330-350$  nm y de emisión  $E_M=400-450$  nm.

Considerando un factor corrector de la concentración proteica presente en la muestra, obtenido a través de la fluorescencia debida a los residuos de triptófano ( $\lambda_{EX}=290/\lambda_{EM}=340$  nm), el método permitió calcular el denominado *FAST Index*, que se define como la relación entre la fluorescencia emitida por los AGEs y la emitida por los residuos de Trp. La Tabla IV.13 muestra los resultados obtenidos para este parámetro en los productos de Qs A y Qs B modificados en presencia de proteína.

**Tabla IV.13.** Valores de índice *FAST Index* de los productos de reacción entre QsA: -lg y QsB: -lg para los distintos días de reacción (n=3).

MUESTRA	<i>FAST Index</i> 0 días	<i>FAST Index</i> 2 días	<i>FAST Index</i> 4 días	<i>FAST Index</i> 7 días
QsA:βlg	7.30±0.39	11.85±1.01	17.09±0.47	13.62±1.48
QsB:βlg	7.89±0.94	9.98±3.83	9.13±0.01	14.97±0.24

Los resultados están de acuerdo con los obtenidos por análisis del espectro de emisión fluorescente. Estos resultados mostraron que para los productos formados con Qs A de 4 a 7 días, prácticamente no aumenta el porcentaje de compuestos intermedios fluorescentes, comprobándose con la determinación del *Fast Index* que es a tiempo cuatro días donde se encuentran los productos que originan mayor fluorescencia. En el caso de los productos formados con Qs B, existió una tendencia del aumento de compuestos que emiten fluorescencia con el tiempo de reacción. Los resultados obtenidos para el Qs A coinciden con los obtenidos en algunos trabajos en los que se encuentra un máximo de intensidad de fluorescencia para los AGEs, como es el caso de Jing y Kitts (2002) que encontraron que sus AGEs presentaban un máximo de fluorescencia a las 2 horas de reacción, que decrecía hasta las 8 horas para productos formados a pH bajo. Sin embargo, se ha encontrado que la intensidad de fluorescencia aumenta con el tiempo en AGEs formados a pH más alto (Hidalgo y col., 1993). Matsuda y col. (1991) detectaron también una disminución de intensidad de fluorescencia en mezclas de -lg y lactulosa después de haberse alcanzado un máximo. Como se puede comprobar, los resultados obtenidos mediante la medida de absorbancia a 294 nm y la determinación de compuestos fluorescentes presentan algunas diferencias,

pero hay que tener en cuenta la distinta naturaleza y reactividad para dar lugar a pigmentos marrones de todos los compuestos intermedios que se forman. Parece ser, que aquellos compuestos que son fluorescentes evolucionan más rápido hacia la formación de melanoidinas frente a los que tienen capacidad para absorber en UV (Lertittikul y col., 2007). Sin embargo, en los resultados encontrados para los productos formados con el Qs A y Qs B, la desaparición de productos que absorben en el UV tuvo lugar antes que la de los productos fluorescentes. Parece existir un avance mayor hacia la formación de melanoidinas en los productos formados con Qs A, ya que la formación de AGEs comienza a disminuir a partir de 4 días. Se han identificado un total de 27 productos intermedios de reacción de Maillard donde 18 eran compuestos carbonilos. Mayoritariamente se encontraron furfurales y un compuesto el 2-C-formil-5-hidroximetilfurano, aceptor de electrones y que reacciona muy rápidamente con grupos amino, generando otra gran cantidad de compuestos intermedios, que o bien se acumulan, o evolucionan hasta productos más avanzados (Painter, 1998). De ahí la gran variabilidad de este grupo de compuestos y de que su formación pueda ser paralela a la de las melanoidinas (Rufian-Henares y col., 2002; Lertittikul y col., 2007). Los resultados revelados a lo largo de este apartado de la evolución del avance de la reacción de Maillard, parecen indicar la complejidad de las reacciones y productos formados durante este proceso en el cual las reacciones no se suceden de manera secuencial sino que pueden estar ocurriendo a la vez.

### Conclusiones parciales

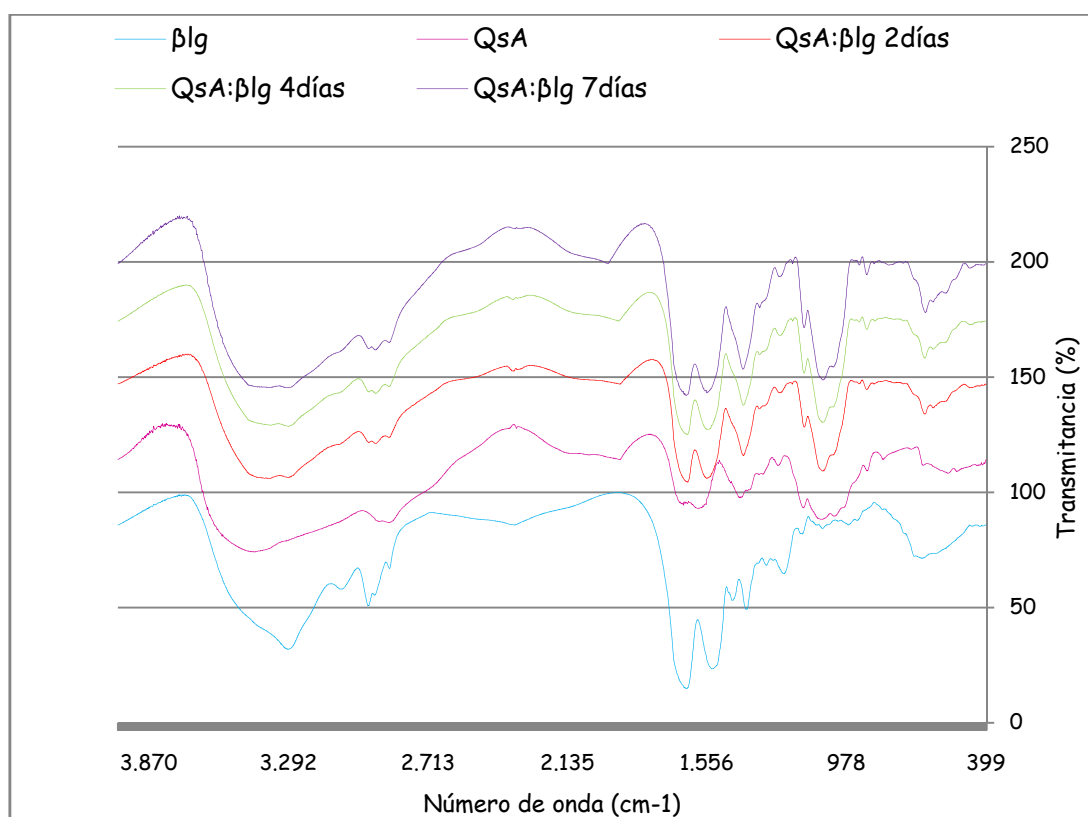
- Se comprobó que la reacción está avanzando hacia los productos finales mediante la formación de compuestos intermedios que absorben en el UV y AGEs. Además, avanzaría con mayor rapidez en los productos formados con Qs A, en los que se degradan antes los AGEs.

## 2.7. Caracterización de los productos insolubles procedentes de la reacción de Maillard

Según se describió en el apartado 2.3 se observó la aparición de un material insoluble con aspecto de gel que tuvo lugar cuando se reconstituyeron algunos de los productos de reacción, lo que sugiere la formación de un hidrogel a través de una red tridimensional entre el quitosano y la proteína.

### 2.7.1. Análisis estructural: espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)

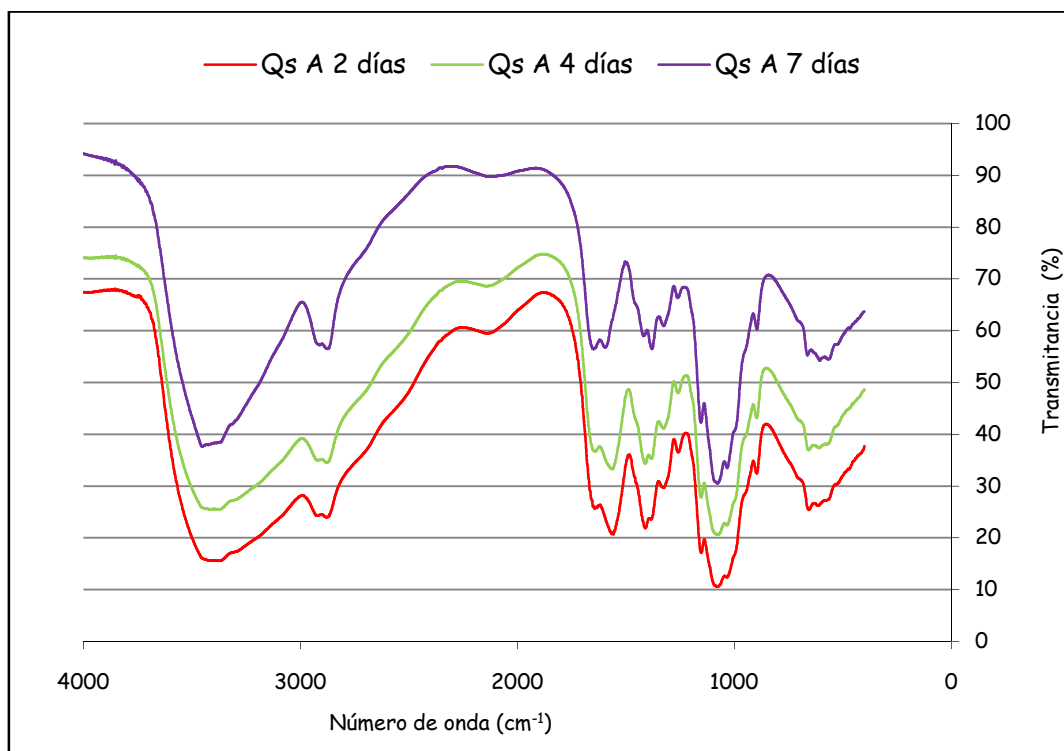
El estudio de los cambios producidos en los grupos funcionales de la estructura gelificada formada, se llevó a cabo mediante espectroscopía de infrarrojo y permitió establecer si la formación de nuevos enlaces había tenido lugar.



**Figura IV.38.** Espectros FT-IR de  $\beta$ lg, QsA sin modificar e hidrogel de QsA:  $\beta$ lg formados a distintos tiempos de reacción.

La Figura IV.38 muestra los espectros FT-IR de -lg, Qs A y los productos insolubles gelificados a los distintos tiempos de reacción. El quitosano sin modificar empleado como control presentó bandas de absorción a  $1596\text{ cm}^{-1}$  y  $1655\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuyeron a los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) y amida I ( $\text{C}=\text{O}$ ) respectivamente, siendo esa banda de menor intensidad debido al bajo DA de esta muestra de quitosano. Se observaron también las bandas de absorción a  $1420\text{ cm}^{-1}$ , debido a la deformación simétrica  $\text{C}-\text{CH}_3$  y a  $3448\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a la vibración del grupo  $-\text{OH}$  e indica la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en las moléculas de quitosano. El hidrogel formado con el tiempo de reacción en presencia de proteína, dio lugar a la desaparición de la banda a  $1655\text{ cm}^{-1}$  y se pudo comprobar de nuevo la aparición de una banda de absorción entre  $1636\text{-}1644\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la formación de un enlace imino ( $\text{C}=\text{N}$ ), como consecuencia de la formación de la base de Schiff. El cambio de la banda de grupos amino de  $1596\text{ cm}^{-1}$  que desapareció dando lugar a una banda de absorción a un número de onda más bajo, entre  $1553\text{-}1559\text{ cm}^{-1}$  sugiere también la participación de grupos amino en el enlace covalente. La nueva banda que aparece se relaciona con una transición de estructura de  $\text{C}=\text{N}$  a  $\text{C}-\text{N}$  dada la alta inestabilidad de la base de Schiff que podría estar hidrolizándose. Wang y col. (2004) obtuvieron resultados similares en hidrogeles formados a partir de quitosano y polivinil-alcohol. El grupo imino formado entre quitosano y otros aldehídos ha sido detectado por espectroscopía de infrarrojo alrededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$  por otros autores (Monteiro y col., 1999; Dos Santos y col., 2005; Umemura y Kawwai., 2007). Por ello se podría establecer que, en presencia de proteína, la disminución de la densidad de carga aparente del quitosano mediante una interacción electrostática entre sus grupos aminos y los grupos carboxílicos de la proteína que aumentó durante el proceso de liofilización, dio lugar a un coacervado. Este coacervado con la temperatura compite con el fenómeno de la gelificación, dando lugar a partículas de hidrogel, el cuál estaría formado por una red tridimensional de moléculas de proteína, unidas a moléculas de quitosano con sus cadenas poliméricas entrecruzadas mediante enlace covalente.

La Figura IV.39 muestra los espectros de infrarrojos obtenidos para el hidrogel liofilizado a distintos tiempo de reacción, que se formó cuando se sometió al quitosano a la reacción de Maillard, en ausencia de proteína.



**Figura IV.39.** Espectros FT-IR de hidrogeles de Qs A formados con el tiempo de reacción.

En este caso, para los productos formados no se observó la banda correspondiente al grupo imino que aparece a aproximadamente  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Lo que sí se observó, sin embargo, en los productos formados para dos y cuatro días, fue el cambio de la banda de grupos amino de  $1605\text{ cm}^{-1}$ , el cual desapareció dando lugar a una banda de absorción entre  $1561\text{-}1566\text{ cm}^{-1}$ . Esto se atribuyó al enlace C–N producido por la hidrólisis de la base de Schiff. Berger y col. (2004) establecieron una clasificación de hidrogeles de quitosano formados por entrecruzamiento covalente en la que introducen al quitosano entrecruzado consigo mismo. Por otro lado la formación de productos de Maillard a partir de oligosacáridos de quitosano ha sido demostrada por otros autores (Tommeraas y col., 2001; Zeng y col., 2007). Sin embargo, en el producto formado a los 7 días de reacción el comportamiento encontrado fue distinto. La banda a  $1652\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la amida I (C=O) aumentó, mostrando una posible reacetilación del quitosano. La conversión de acetato de quitosano soluble en quitina insoluble puede ocurrir bajo los efectos del calentamiento a temperatura altas, según han demostrado algunos autores (Toffey y col., 1996; Lim y col., 1999). En este caso, la temperatura alcanzada no fue tan alta comparada con estas investigaciones, sin embargo el aumento de la banda correspondiente a amida I demuestra la posible transformación de acetato

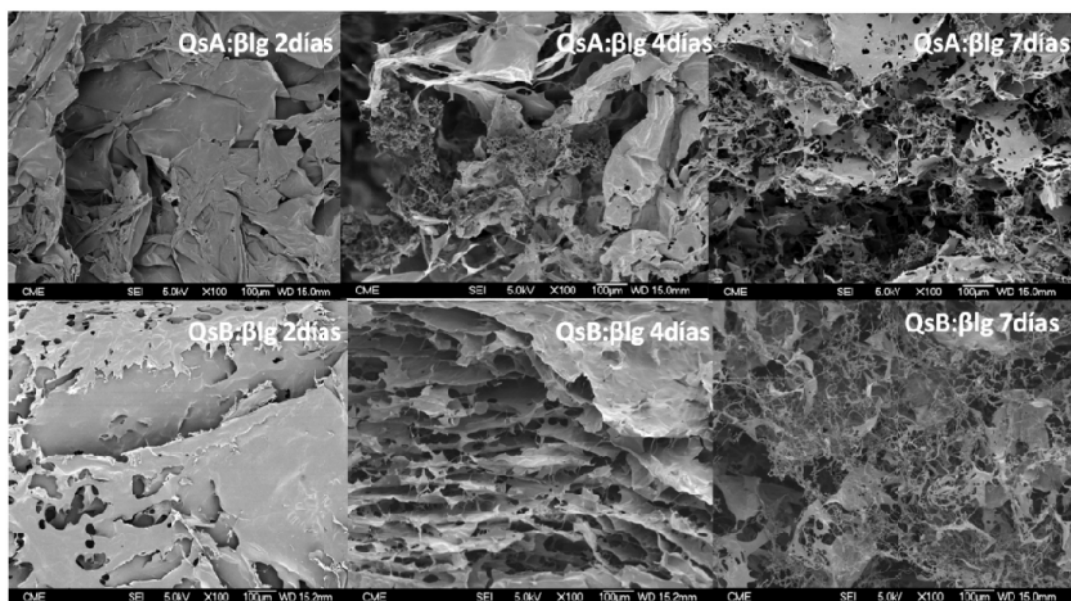
del quitosano en quitina. La disminución de la solubilidad se asocia con la formación de un cristal anhidro polimorfo, a partir de quitosano formado en presencia de agua (Ogawa, 1991) que podría estar ocurriendo como consecuencia de la deshidratación del acetato de quitosano; haciendo que las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno aumentasen al aumentar el DA, y dando lugar a una menor movilidad de la cadena del polímero que disminuiría su solubilidad (Qu y col., 1999).

A pesar de no haberse observado este mismo comportamiento en las muestras en presencia de proteína, se sugiere que, paralelamente a la formación del enlace covalente, podría estar ocurriendo este fenómeno de reacetilación en los grupos amino del quitosano. Estos grupos amino que habrían participado en la formación del enlace covalente, podrían estar acetilándose a través de los grupos carboxilos del acetato, e incluso, de la proteína por el efecto de la temperatura.

### **2.7.2. Análisis microscópico: Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Estos análisis permitieron estudiar la porosidad y características microscópicas superficiales de los hidrogeles. A pesar de que la estructura del hidrogel en el estado sólido no representa completamente la situación real del hidrogel en estado húmedo, las imágenes obtenidas por SEM permitieron ver la morfología de los poros presentes, lo que posteriormente permitió establecer relaciones con sus propiedades gelificantes y la capacidad de absorción de agua estudiadas mediante imagen de resonancia magnética.

En general, el comportamiento observado en las imágenes mostró la presencia de poros irregulares e interconectados en todas las muestras estudiadas (Figura IV.40). A pesar de que la liofilización, generalmente, crea estructuras en las que hay una morfología de poros abiertos, se pudo observar que, a medida que aumentó el tiempo de reacción, el número de poros aumentó y su tamaño disminuyó. Se pasó de una estructura más lisa y suave con poros distribuidos más homogéneamente en el interior de la muestra cuando el hidrogel obtenido correspondía a 2 días de reacción, a un hidrogel en el que prácticamente desaparece la estructura porosa a los 7 días.



**Figura IV.40.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los hidrogeles formados a 2, 4 y 7 días de reacción para los productos formados con QsA: -lg y QsB: -lg..

### Conclusiones parciales

- Las condiciones de Maillard establecidas dieron lugar a la formación de un hidrogel en el caso de los quitosanos de peso molecular promedio intermedio (Qs A y Qs B) con y sin proteína estabilizado mediante entrecruzamiento covalente, sin necesidad de agentes entrecruzantes, que normalmente son relativamente tóxicos. Se sugiere que este fenómeno podría estar compitiendo con el de una posible reacetilación y reversión a quitina con la consiguiente insolubilización del producto más evidente en el caso del quitosano en ausencia de proteína.

## 2.8. PROPIEDADES FUNCIONALES DEL QUITOSANO MODIFICADO MEDIANTE REACCION DE MAILLARD

### 2.8.1. Efecto de la glicosilación en las propiedades emulgentes

Existen numerosos estudios en los que se plantea la glicosilación de proteína vía reacción de Maillard como alternativa tecnológica para mejorar la capacidad de dichas

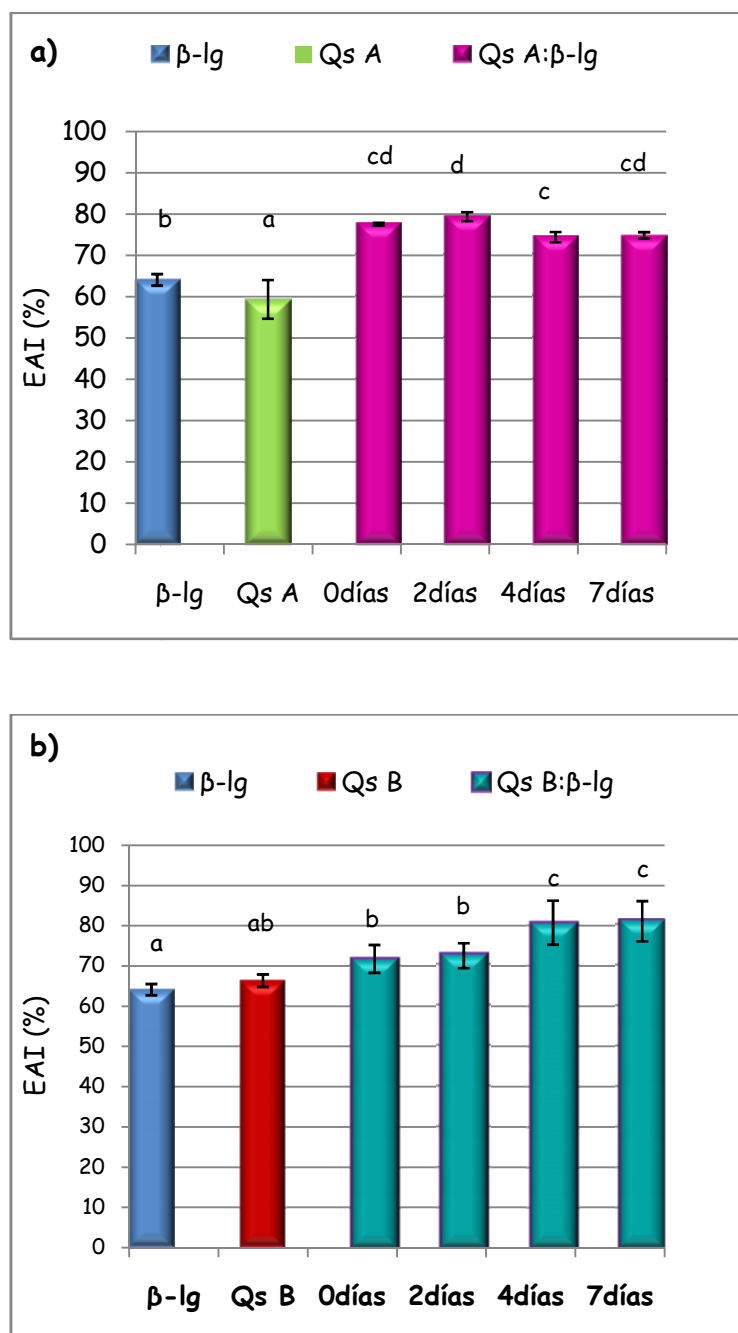
proteínas para formar emulsiones. Se ha encontrado esta mejora en la  $\gamma$ -lg conjugada con quitosano y derivados de quitosano (Hattori y col., 2000; Miralles y col., 2007), entre  $\gamma$ -lg y alginato (Hattori y col., 1997), entre proteínas de suero lácteo y pectina (Mishra y col., 2001; Einhorn-Stoll y col., 2005), entre BSA y dextrano (Dickinson y col., 1996), caseína y dextrano o maltodextrinas (Morris y col., 2004; Aminlari y col., 2005) y caseínas y pectinas (Al-Hakkak y col., 2002).

### **2.8.1.1. Índice de actividad emulgente (EAI)**

La Figura IV.41 muestra el EAI de los quitosanos controles y la  $\gamma$ -lg control, junto con el de los productos formados mediante reacción de Maillard. El Qs B control presentó un porcentaje de EAI similar al mostrado por la proteína. Fue mayor ( $p < 0.05$ ) el porcentaje de EAI en el caso de Qs B con respecto a Qs A. Los MRP's formados a partir del Qs A mostraron un EAI mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto a  $\gamma$ -lg y Qs A. En el caso de los productos formados con Qs B el EAI fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en todos los productos con respecto a  $\gamma$ -lg. Sólo los productos formados a 4 y 7 días presentaron un EAI mayor ( $p < 0.05$ ) al presentado por el Qs B. Entre los productos formados con Qs A, el formado a los 2 días fue el que presentó la mejor actividad emulgente. Sin embargo, con Qs B, los productos que mejoraron la actividad emulsionante se obtuvieron a los 4 y 7 días. En el caso de los productos de reacción obtenidos a partir de Qs A1, no se consiguieron mejorar las propiedades emulsionantes con respecto a la  $\gamma$ -lg.

La mejor actividad emulsionante en los productos obtenidos tras la glicosilación se atribuye, por un lado a una mayor flexibilidad y al aumento del carácter anfífilico que se produce en la proteína cuando esta expone nuevas áreas hidrofóbicas. Por otro lado, a la hidrofilia aportada por el carbohidrato covalentemente unido, ya que se favorece una adsorción más rápida y fuerte de la proteína a la interfase aceite/agua (Darewicz y Dziuba., 2001; Hattori y col., 1997). Song y col. (2002) utilizando quitosanos con diferente peso molecular consiguieron mejorar la actividad emulgente de lisozima mediante su conjugación con un quitosano de mayor peso molecular. Los autores sugieren que el número de grupos catiónicos desempeña un papel importante en la mejora del EAI inhibiendo la coalescencia de las gotas de aceite y dando lugar a una emulsión estable. Hattori y col. (2000) atribuyeron la mejora del EAI de la  $\gamma$ -lg

mediante su conjugación con quitopentosa a la alta carga neta del polímero. Matemu y col. (2009) también sugieren que las características de polimerización del quitosano ejercen un efecto de apantallamiento sobre los grupos negativamente cargados de la proteína influyendo en la emulsión.



**Figura IV.41.** Índice de actividad emulsionante (EAI) de los productos de reacción a) QsA: -lg y b) QsB: -lg y los quitosanos controles (n=3) (letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas  $p < 0.05$ ).

La mejora en las propiedades emulgentes de los MRPs va a depender del grado de glicosilación de la proteína. Se ha descrito que estas propiedades mejoran durante los estados iniciales de la conjugación y que luego decrecen gradualmente en estados más avanzados. Para dar lugar a un buen producto emulsionante, debería existir un buen balance entre el grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad. La pérdida del poder emulgente podría estar relacionada con la degradación de los productos iniciales de la reacción de Maillard que daría lugar a una mezcla de productos de menor peso o una variedad de distintos pesos (Li y col., 2009). Hay autores que relacionan la mejora de la actividad emulsionante con la baja tensión superficial que presentan los conjugados de alto peso molecular entre la  $\gamma$ -lg y la goma acacia (Schmitt y col., 2005), o entre la  $\gamma$ -lg y el dextrano (Dunlapy Côte., 2005). Se supone que se produciría una mejora de la estabilidad interfacial, debida al incremento de la hidrofilia aportada por los MRPs a la fracción de proteína, que se orienta a la fase lipídica y cubre la superficie de las gotas de aceite (Diftis y Kiosseoglou., 2006). Además, en el caso del quitosano, se ha relacionado que la viscosidad que aporta a los conjugados con proteína de alto peso molecular, mejora la hidratación estérica y la capacidad de atrapamiento de agua de estos productos (Matemu y col., 2009).

Sin embargo, otros trabajos de investigación han propuesto que la absorción retardada de MRPs de alto peso molecular en la interfase (Ganzevles y col., 2006) o el lento desplegamiento de la proteína en la interfase líquida (Thomas y col., 2004) podrían ser las causas de los bajos valores de actividad emulsionante obtenidos. Un producto con excesivo peso molecular podría cubrir una área insuficiente de la interfase (Dunlap y Côte., 2005; Wooster y col., 2006), además de que los MRPs con alto peso molecular podrían participar en la lamina superficial de diferentes gotas de aceite, facilitando así su coalescencia (Diftis y col., 2005).

Por todo ello, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se podría establecer que en el caso de los productos formados por QsA:  $\gamma$ -lg, en los primeros tiempos de reacción pudiera estar más favorecida la formación de productos de mayor peso molecular como resultado del efecto de la glicosilación de la proteína, lo que coincide con los resultados obtenidos por GPC para los productos obtenidos con este quitosano, y serían estos los productos responsables de una mejora de la actividad emulgente. Sin embargo en el caso de los productos formados por QsB:  $\gamma$ -lg, teniendo en cuenta los resultados de GPC,

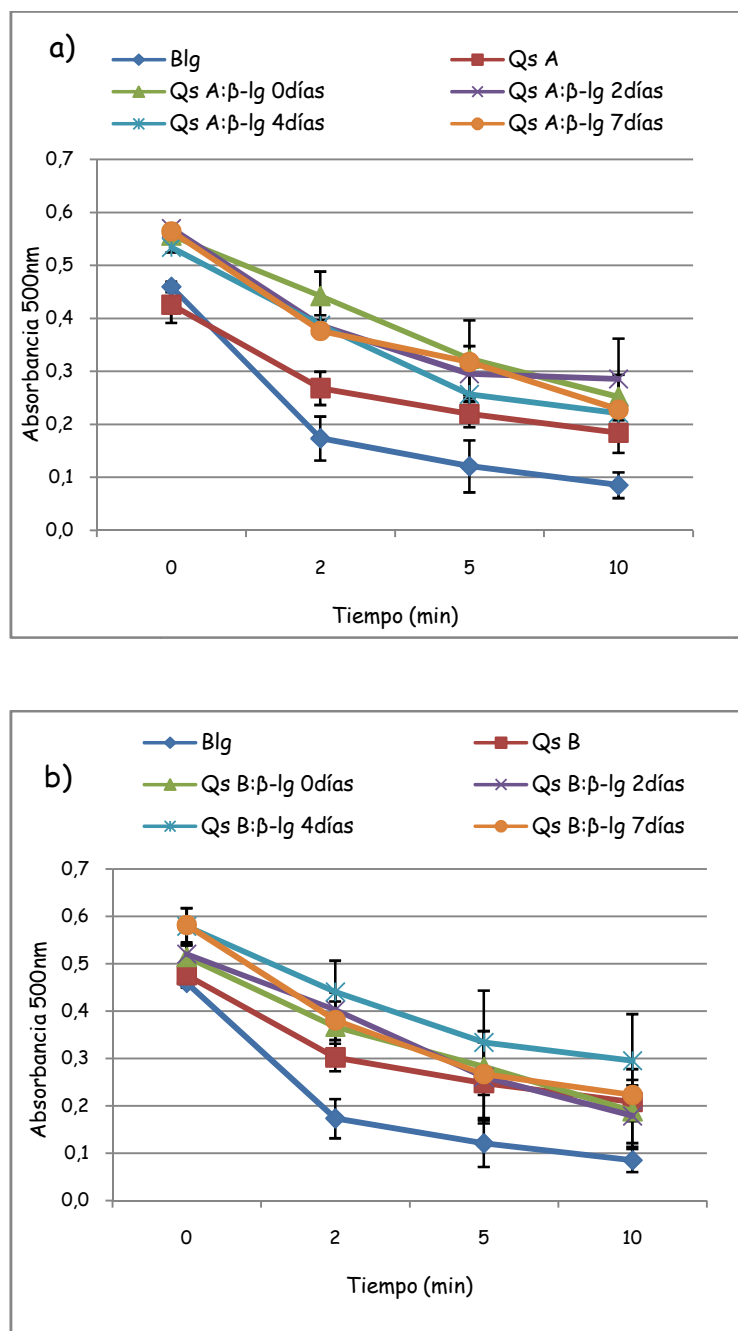
no fueron los productos de mayor peso molecular los responsables de una mayor actividad emulgente. Pudiera ser que el mayor peso molecular de estos productos que se comprobó que era mayor con respecto a los obtenidos con QsA, cubriese un área insuficiente de la superficie como proponían Dunlap y Côte (2005) y Wooster y col. (2006), y no se mejorara tanto la actividad emulgente frente a la mezcla de productos de diferente y menor peso molecular que se presenta en los productos formados a cuatro y siete días, en los que además de existir otros productos del avance de la reacción, el glicoconjugado podría mantenerse con un tamaño más adecuado para dar lugar a una mejora de la propiedad emulgente.

Para los productos formados con Qs A1, la mayor reactividad de sus grupos carbonilos reductores con los aminos de la proteína podría estar dando lugar a un mayor avance de la reacción dando lugar a una mayor concentración de productos intermedios y degradación de los productos de glicosilación iniciales, lo que se demostró mediante la medida de compuestos espectroscópicos que absorben en el UV. La mezcla de productos más avanzados de mayor heterogeneidad y distinta naturaleza estaría dando lugar a una menor capacidad emulgente.

### **2.8.1.2. Estabilidad de la emulsión**

Por otro lado, se evaluó la estabilidad de las emulsiones mediante la medida de turbidez durante los diez minutos siguientes a la formación de la emulsión (Figura IV.42).

Se observó una mejora significativa ( $p < 0.05$ ) en la estabilidad de las emulsiones para todos los MRPs formados con respecto a la  $\beta$ -lg. Para los productos formados con Qs A la mayor estabilidad a través del tiempo se observó para la mezcla de Qs A y proteína a 0 y 2 días. Para el Qs B, el producto que dio lugar a mayor estabilidad fue el producto formado a los 4 días de reacción. Se establece, por tanto, que aquellos productos que presentaron un mayor EAI inicialmente mantienen una estabilidad mayor en el tiempo.



**Figura IV.42.** Estabilidad de las emulsiones con el tiempo de reacción para a) QsA, -Ig y productos de reacción QsA: Ig a los distintos tiempos de reacción y b) Qs B, -Ig y productos de reacción QsB: Ig a los distintos tiempos de reacción (n=3).

Existen estudios en los que se encuentran glicoconjugados que mejoran la estabilidad de la emulsión pero que, sin embargo, no presentan cambios significativos en la capacidad emulgente (Dickinson y Galazka., 1991; Nagasawa y col., 1996). Los productos formados en este caso entre el quitosano y la proteína no sólo mejoraron la capacidad

emulgente con respecto a la proteína, y en algunos casos respecto al quitosano, sino que mejoraron también la estabilidad de la emulsión.

La mejora de la estabilidad de las emulsiones se ha relacionado con las propiedades reológicas de la película que se forma entre el polímero y la superficie globular de la proteína (O'Regan y Mulvinill., 2010). La disposición del quitosano de forma sobresaliente hacia la fase continua podría proporcionar una mejor estabilización estérica previniendo la floculación de las gotas y la coalescencia (Akhtar y Dickinson., 2003). Además, la presencia de quitosano no absorbido en la fase continua, podría dar lugar a un ligero aumento de la viscosidad resultando en un movimiento Browniano de las gotas, siendo así reducido su tamaño (O'Regan y Mulvinill., 2010) y reduciendo también, la frecuencia de colisión entre las gotas, y mejorando por tanto, la estabilidad. La formación de una película interfacial por parte de los MRPs que rodea a la proteína y estabiliza a las gotas de aceite contra la agregación y la coalescencia es apoyada por otras investigaciones (Mishra y col., 2001; Wooster y col., 2006; Fechner y col., 2007).

### **Conclusiones parciales**

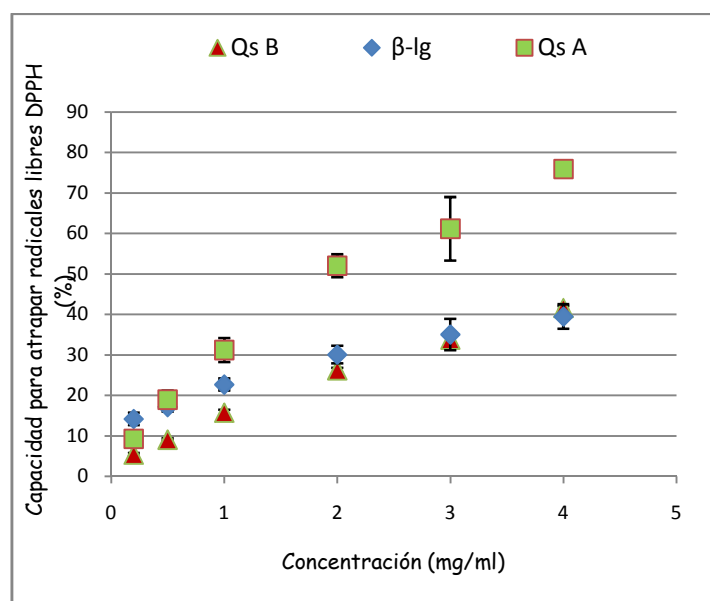
- Los quitosanos de peso molecular intermedio ( $M_w$  30-80 x 10<sup>3</sup> g/mol) dieron lugar a diferentes productos que, en algunos casos proporcionan propiedades emulgentes superiores a la proteína y una buena estabilización de la emulsión.

#### **2.8.2. Efecto del avance de la reacción de Maillard en la actividad antioxidante**

La capacidad antioxidante de los productos de reacción de Maillard se debe a complejas interacciones que según se han descrito en numerosos estudios pueden implicar la inactivación de especies reactivas de oxígeno (Bersuder y col., 2001), el atrapamiento de radicales libres (Eichner, 1981; Morales y col., 2001), la reducción de hidroperóxidos o la capacidad quelante de metales pro-oxidativos (Wijewickreme y col., 1997), entre otros mecanismos de acción. Por ello, es interesante el empleo de diferentes métodos con el fin de determinar las propiedades antioxidantes y verificarlas mediante mecanismos distintos de actuación que se basan en principios diferentes. Se empleó en este caso el método del DPPH basado en la neutralización de radicales libres y el

método FRAP basado en el poder de reducción de los posibles productos de reacción sobre soluciones de  $\text{Fe}^{3+}$ .

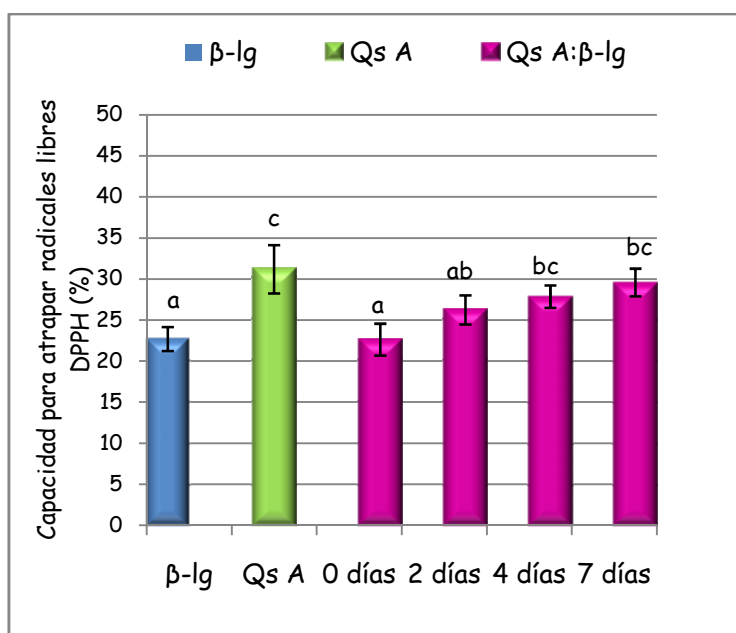
En primer lugar se determinó la evolución de la actividad antioxidante en función de la concentración en condiciones ácidas para los quitosanos (Figura IV.43). Previo a la evaluación de dicha actividad en los productos de reacción obtenidos a partir de ellos, se llevó a cabo el estudio de su capacidad antioxidante con el fin de establecer si la poseen o si existe alguna mejora de ésta. El Qs A de menor peso molecular promedio mostró una mayor capacidad para capturar radicales libres, que aumentaba con la concentración, con respecto a la proteína y al Qs B. Xie y col. (2001) atribuyen la capacidad de los quitosanos y derivados de este para secuestrar radicales hidroxilos a la capacidad de ceder protones por parte de los grupos OH o  $\text{NH}_2$  protonados del anillo del polímero. Además, se ha demostrado la influencia del  $M_w$  en la actividad antioxidante de quitosano, como se vio en los resultados obtenidos en los COS, ya que a menor  $M_w$ , mayor actividad antioxidante. Kim y Thomas (2007) mostraron una mayor capacidad de inhibir la peroxidación lipídica en salmón de un quitosano de  $30 \times 10^3$  g/mol frente a quitosanos de  $90$  y  $120 \times 10^3$  g/mol. La mayor actividad antioxidante de quitosanos de bajo peso molecular se relaciona con su estructura menos compacta y con la mayor cantidad de grupos hidroxilo y grupos amino disponibles para reaccionar con radicales libres (Ji y col., 2007).



**Figura IV.43.** Porcentaje de capacidad para atrapar al radical DPPH para los quitosanos controles: QsA, QsB y  $\beta$ -lg (n=3).

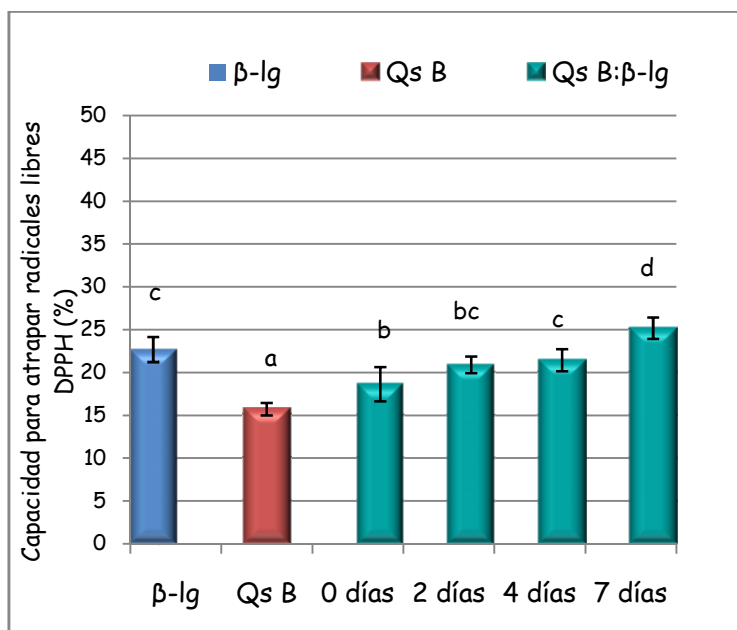
### 2.8.2.1. Capacidad para atrapar radicales DPPH

Por otro lado se evaluó la capacidad antioxidante de los productos de reacción obtenidos para Qs A, Qs B, y Qs A1 y esta se comparó con los polímeros controles en la misma concentración. La capacidad de capturar radicales libres aumentó en los MRPs formados a medida que aumentó el tiempo de reacción para los productos formados con Qs A y Qs B. Los productos formados entre el Qs A y la  $\beta$ -lg (Figura IV.44) no superaron la actividad de secuestrar radicales libres respecto al quitosano control a la misma concentración. Sin embargo, para 4 y 7 días de reacción los productos presentaron una mayor actividad antioxidante ( $p < 0.05$ ) respecto a proteína.

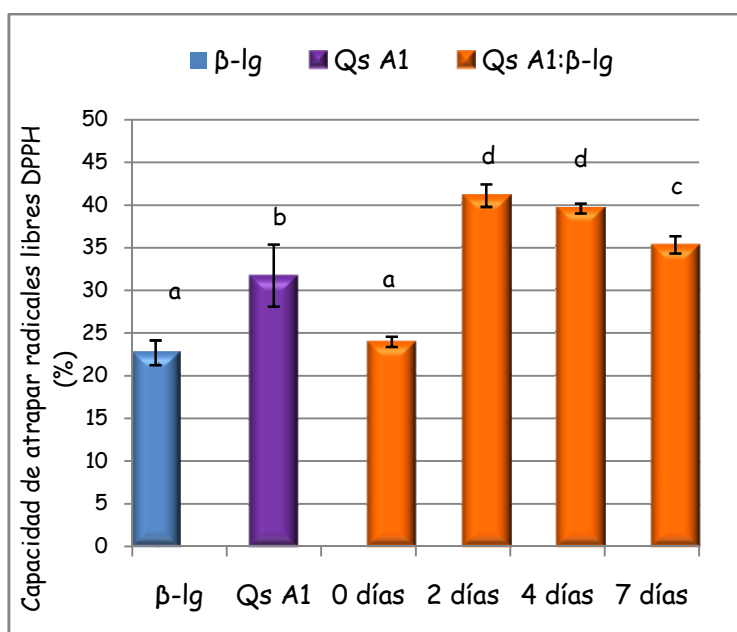


**Figura IV.44.** Porcentaje de la capacidad de atrapar radicales DPPH de los productos de reacción QsA: lg , Qs A y  $\beta$ -lg ( $n=3$  y a, b y c indican diferencias significativas  $p < 0.05$  cuando las letras son distintas).

En el caso de los productos Qs B:  $\beta$ -lg (Figura IV.45), todos ellos superaron la actividad antioxidante que presentaba el quitosano control de forma significativa ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la actividad antioxidante de la proteína sólo fue mejorada en el producto formado a los 7 días de reacción.



**Figura IV.45.** Porcentaje de la capacidad de secuestrar radicales DPPH de los productos de reacción QsB: lg , Qs B y  $\beta$ -lg (n=3 y a, b, c y d indican diferencias significativas  $p < 0.05$  cuando las letras son distintas).



**Figura IV.46.** Porcentaje de la capacidad de secuestrar radicales DPPH de los productos de reacción QsA1: lg , Qs A1 y  $\beta$ -lg (n=3 y a, b, c y d indican diferencias significativas  $p < 0.05$  cuando las letras son distintas).

Los productos formados con Qs A1 (Figura IV.46) presentaron la mayor capacidad ( $p < 0.05$ ) para atrapar radicales libres a los 2 días de reacción con respecto a quitosano y proteína. Los MRPS formados en la mezcla de los polímeros sin reaccionar no mejoró la capacidad de secuestrar radicales libres con respecto a proteína y quitosano. En el caso de los productos formados a 4 y 7 días de reacción sí que mejoró significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto a ambos polímeros, pero a diferencia del Qs A y Qs B, a partir de 2 días de reacción la actividad antioxidante no aumentó con el tiempo de reacción.

Por tanto, en relación con los resultados obtenidos, se puede sugerir que el quitosano ya es un polímero que por sus características químico-físicas presenta una importante actividad antioxidante por sí solo, la cual se ve aumentada con la concentración y que es mayor cuanto menor es el peso molecular promedio. Cuando este es modificado mediante reacción de Maillard en presencia de proteína, los productos a los que da lugar, también presentan actividad que mejora con respecto a la proteína, en el caso de productos formados con quitosanos de bajo  $M_w$  (Qs A y Qs A1). Con respecto al propio quitosano, sólo mejoró la actividad antioxidante en el caso del quitosano de mayor  $M_w$  (Qs B), ya que éste inicialmente presentaba una baja capacidad para secuestrar radicales libres DPPH. Esta actividad antioxidante también mejoró con respecto a la desarrollada por quitosano, en el caso de los productos formados con el Qs A1, que aún presentando él mismo una alta capacidad antioxidante, se mejoró notablemente dicha capacidad debido a los MRPs a los que dio lugar.

Se relaciona la mejor actividad antioxidante de los MRPs con las melanoidinas formadas en las últimas etapas de reacción, las cuales muestran una alta capacidad antioxidante a través de su capacidad para atrapar radicales libres, secuestrar especies reactivas de oxígeno o capacidad para quelar metales (Silvan y col., 2006). Delgado-Andrade y col. (2005) encontraron una mayor actividad antioxidante en melanoidinas de alto peso molecular formadas en estados avanzados de la reacción preparadas a partir de xilosa y glicina. Guan y col. (2010) asociaron el aumento del porcentaje del radical DPPH secuestrado en productos avanzados de reacción obtenidos a partir de seroalbúmina bovina y dextrano. Otros trabajos de investigación apoyan esta explicación de la donación de protones por parte de los productos formados en estados avanzados frente a los estados iniciales (Yen y col., 1995; Murakami y col., 2002;

Morales y col., 2001; Chevalier y col., 2001a; Calligaris y col., 2004; Benjakul y col., 2005; Sun y col., 2006).

Por ello, la baja capacidad de secuestrar radicales libres DPPH, en el caso de los productos formados con Qs A y Qs B a 2 y 4 días, podría deberse a que en estos productos no se hayan formado melanoidinas a las que se les atribuye una mayor actividad antioxidante; y que a siete días se hayan formado, pero no se encuentren en concentración suficiente para mejorar la actividad antioxidante frente al Qs A, o frente a la proteína en los productos formados con el Qs B; y por tanto, sugiriéndose que en el caso de los productos formados con Qs A1, las melanoidinas se formaron en mayor concentración. Los resultados previos del avance de la reacción mostraron que la formación de productos intermedios espectroscópicos que absorben en el UV (precursores de las melanoidinas) empezaban a disminuir a partir de 2 días de reacción en los productos formados con Qs A y de 4 días para los productos formados a partir de Qs B, demostrándose el avance de la reacción hacia la formación de las melanoidinas, por lo que sí se atribuye el aumento de la actividad antioxidante en estos quitosanos a la presencia de melanoidinas, aunque se encuentren en una baja concentración. En el caso de los productos formados con Qs A1, en los que se encontró la mayor actividad antioxidante para 2 días de reacción y luego disminuyó, no se podría establecer una relación entre la desaparición de productos espectroscópicos para formar melanoidinas y la capacidad de secuestrar radicales libres. La tendencia de los compuestos intermedios fue aumentar con el tiempo, sin embargo, esto no quiere decir que no tenga lugar la formación de pigmentos marrones, la cual podría estar ocurriendo a partir de otros compuestos de distinta naturaleza, como los AGEs que también son precursores de pigmentos marrones (Rufian-Henares y col., 2002; Jing y Kitts., 2002; Lertittikul y col., 2007). La alta reactividad de este quitosano podría dar lugar a un avance más rápido de la reacción dando lugar a una mayor concentración de melanoidinas a los dos días de reacción, que serían los responsables de la actividad de secuestrar radicales libres DPPH.

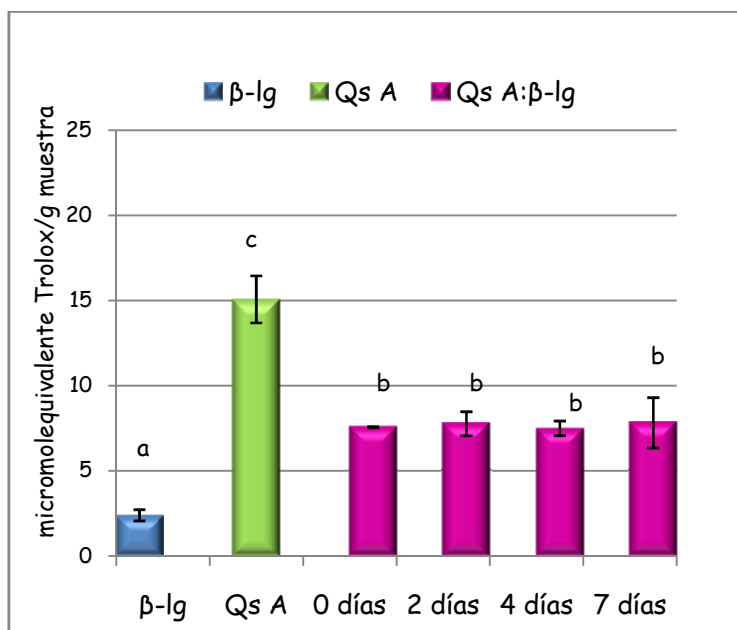
Los MRPs de menor peso molecular formados a partir de Qs A1 y proteína fueron los que presentaron la mayor actividad antioxidante. Estos resultados coinciden con los encontrados por Gu y col. (2009), los cuales relacionan el menor peso molecular con el

atrapamiento más eficiente de radicales hidrofílicos frente a los hidrofóbicos, por su mayor solubilidad (Jing y col., 2002).

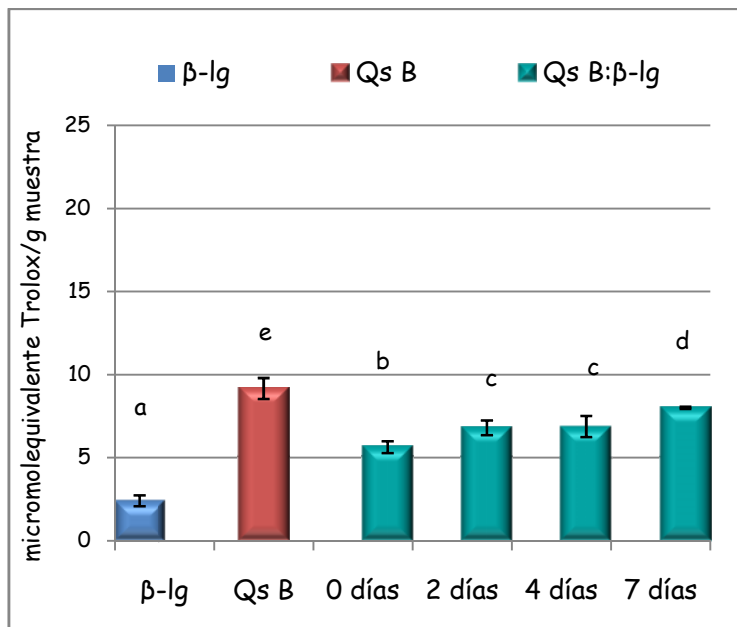
### 2.8.2.2. Poder reductor

Se ha relacionado el poder reductor de los MRPs con la formación de compuestos avanzados coloreados de la reacción a través de sus grupos hidroxilo que juegan un papel muy importante en su capacidad reductora (Yoshimura y col., 1997; Chawla y col., 2007; Gu y col., 2009). En contraposición, otros trabajos hablan de esta capacidad en relación con los productos formados a partir de la degradación del compuesto de Amadori en las primeras etapas (Chang y col., 2011). Se comparó la capacidad reductora de los MRPs sobre soluciones  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  con los polímeros controles y la proteína. En primer lugar, hay que resaltar la mayor capacidad ( $p < 0.05$ ) de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  de los quitosanos controles con respecto a la proteína y a los productos de reacción, siendo esta capacidad mayor en el quitosano de menor  $M_w$  (Figuras IV.47, 48 y 49). Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Kanatt y col. (2008) que encontraron mayor capacidad reductora en MRPs formados entre el quitosano y la glucosa mediante reacción de Maillard frente al quitosano solo.

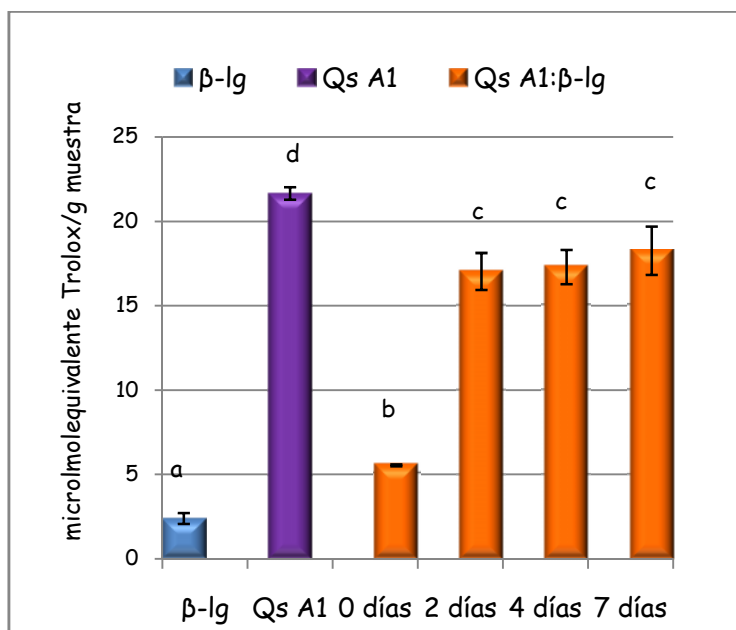
En cuanto a los productos de reacción, se observó que para los productos formados con Qs A, la capacidad reductora aumentó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la proteína para todos los tiempos de reacción, siendo similar entre estos productos (Figura IV.47). En el caso de los productos formados con Qs B, la capacidad reductora de todos los productos también fue mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto a proteína. Para 2 y 4 días de reacción fue similar y mayor con respecto a 0 días y para 7 días aumentó con respecto a 2 y 4 días (Figura IV.48). Los productos formados con Qs A1, mostraron una capacidad reductora mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto a proteína, que aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) desde el producto formado en la liofilización de quitosano:proteína hasta el resto de productos formados a tiempos más prolongados. Para 2, 4 y 7 días de reacción el poder reductor encontrado fue similar (Figura IV.49).



**Figura IV.47.** Micromolequivalente Trolox determinado mediante el método FRAP para los productos de reacción QsA: lg b) y polímeros controles: Qs A y -lg(n=3 y a, b y c indican diferencias significativas  $p < 0.05$  cuando las letras son distintas)



**Figura IV.48.** Micromolequivalente Trolox determinado mediante el método FRAP para los productos de reacción QsB: lg b) y polímeros controles: Qs B y -lg (n=3 y a, b, c, d y e indican diferencias significativas  $p < 0.05$  cuando las letras son distintas)



**Figura IV.49.** Micromolequivalente Trolox determinado mediante el método FRAP para los productos de reacción QsB: Ig b) y polímeros controles: Qs B y -lg (n=3 y a, b, c y d indican diferencias significativas  $p < 0.05$  cuando las letras son distintas).

Si se comparan los MRPs obtenidos con todos los quitosanos, no existieron diferencias significativas entre los productos formados con Qs A y Qs B, excepto en el producto formado para 2 días de reacción que presentó una mayor capacidad reductora para el producto formado con Qs B. Si se compara con los productos formados a partir de Qs A1, el poder reductor fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para los productos formados a 2, 4 y 7 días con respecto a Qs A y Qs B.

Estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos por Gu y col. (2010), que demostraron la mayor capacidad reductora por parte de las fracciones de mayor peso molecular obtenidas por ultrafiltración de un producto formado a partir de caseína y glucosa. Según los resultados obtenidos, se puede relacionar, la mayor capacidad para donar electrones con un menor peso molecular, una estructura menos compacta y una mayor solubilidad de los productos resultantes, como en el caso de la capacidad de secuestrar radicales libres DPPH. Además, el alto poder reductor de los MRPs se relaciona con los estados avanzados de la reacción y la formación de melanoidinas, aunque en baja concentración en el caso de los productos formados con Qs A y Qs B

para tiempos prolongados de reacción. En el caso de los productos formados con Qs A1, la capacidad reductora se relaciona igualmente, con la formación de melanoidinas que parece producirse a los dos días de reacción y que podría haber alcanzado un máximo puesto que la capacidad reductora con el tiempo de reacción presentó valores próximos.

La actividad antioxidante evaluada en el quitosano sometido a reacción de Maillard en ausencia de proteína por ambos métodos dio lugar a un porcentaje de capacidad de secuestrar radicales libres DPPH entre 7 y 12 % siendo similar en los productos formados a cero, dos y cuatro días y aumentando hasta el 12 % para siete días. El poder reductor se cuantificó en micromolequivalentes de Trolox, siendo el intervalo encontrado de 1-7 micromoles, no siguiendo una tendencia clara con el tiempo de reacción, pero encontrándose el mayor valor en el producto formado a siete días. La baja actividad antioxidante encontrada en estos casos vuelve a sugerir que la formación de MRPs solubles fue mínima.

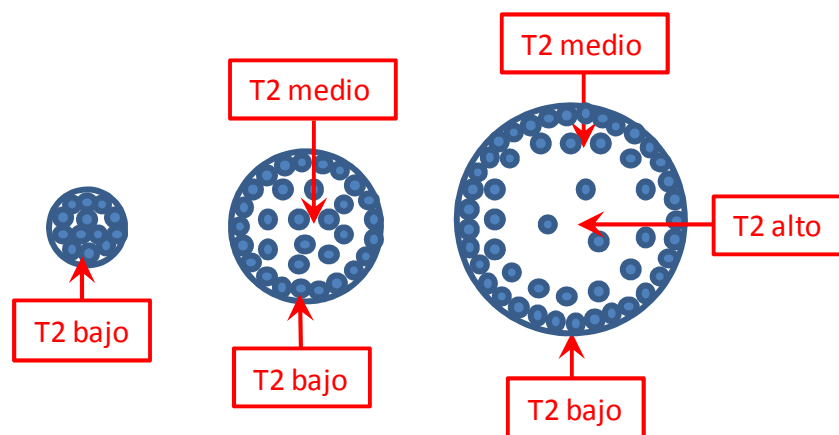
### Conclusiones parciales

- Los tres quitosanos ensayados dieron lugar a MRPs con capacidad de secuestrar radicales libres DPPH y capacidad reductora superior a la de  $\alpha$ -lactoglobulina, lo que se relaciona con la formación de melanoidinas en estados avanzados de la reacción de Maillard. Esta capacidad fue mayor en los productos formados con Qs A1 ( $M_w$   $1.3 \times 10^3$  g/mol). Además, se mejoró la capacidad de secuestrar radicales libres de estos productos en comparación con quitosano.

### 2.8.3. Propiedades gelificantes

Los hidrogeles se caracterizaron de forma cualitativa mediante el estudio de la movilidad del agua en su matriz. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de imagen de resonancia magnética (IRM) que permitieron observar la capacidad de retener agua por parte de las estructuras entrecruzadas que se habían formado. Esta técnica es ampliamente utilizada en medicina y biología y permite obtener imágenes de 3D de forma no destructiva y cada vez es más empleada en alimentos desde los años 70 (Mariette, 2009). Su aplicación es muy novedosa en el estudio de hidrogeles de quitosano, habiéndose usado por primera vez en la caracterización del comportamiento

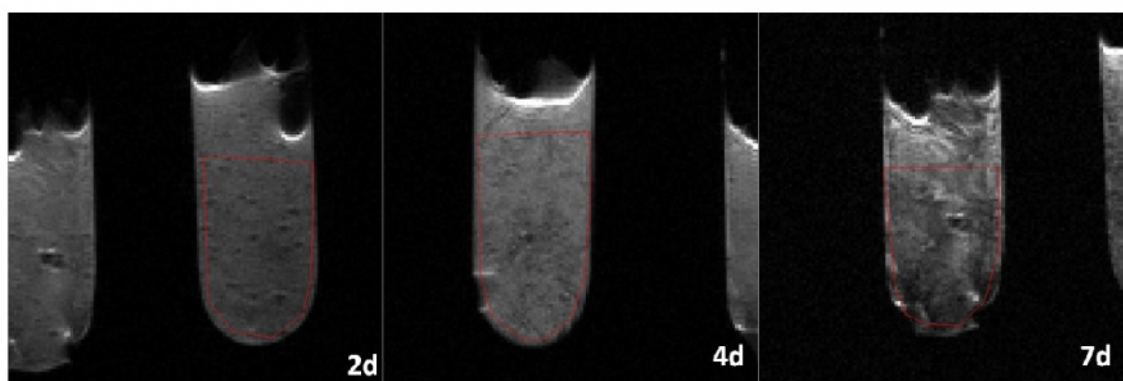
de difusión y relajación del hidrogel de quitosano por Goycoolea y col. (2011). Para caracterizar la inclusión del solvente y su efecto en las propiedades estructurales y dinámicas del polímero se midió el parámetro tiempo de relajación spin-spin del protón,  $T_2$ , que es sensible al movimiento de las moléculas de agua libre y agua ligada, dos estados de las moléculas de agua en los hidrogel que son ampliamente aceptados (Barbieri y col., 1998; Khare, 1993). El agua ligada caracterizada por el tiempo de relajación spin-spin de sus moléculas, es el agua unida a las cadenas poliméricas mediante puentes de hidrógeno o interacciones polares. El agua libre, que se encontraría lejos de las macromoléculas que ocupan el volumen libre entre las cavidades del polímero, presentará un valor mayor de  $T_2$  que se verá afectado por el volumen de agua comprendido entre las cavidades del gel del polímero (Kowalczyk y col., 2004). El mecanismo de relajación producido en las moléculas de agua, que implica interacciones magnéticas y el intercambio de protones de agua desde los poros (agua libre) con los protones unidos formando puentes de hidrógeno con el polímero (agua ligada) vendría dado por el parámetro  $T_2$  y permite establecer una relación con la forma en la que se encuentra distribuida el agua en la matriz del gel, e indirectamente, con el tamaño de los poros presentes en ésta (Figura IV. 50).



**Figura IV.50.** Esquema de valores de  $T_2$  según la distribución del polímero y los poros en la matriz de un hidrogel.

Según los resultados obtenidos de las imágenes potenciadas en  $T_2$  se pudo observar como en presencia de proteína (Figura IV.51) tanto para el Qs A como para el Qs B, el comportamiento de los hidrogel formados cambiaba con el tiempo de reacción,

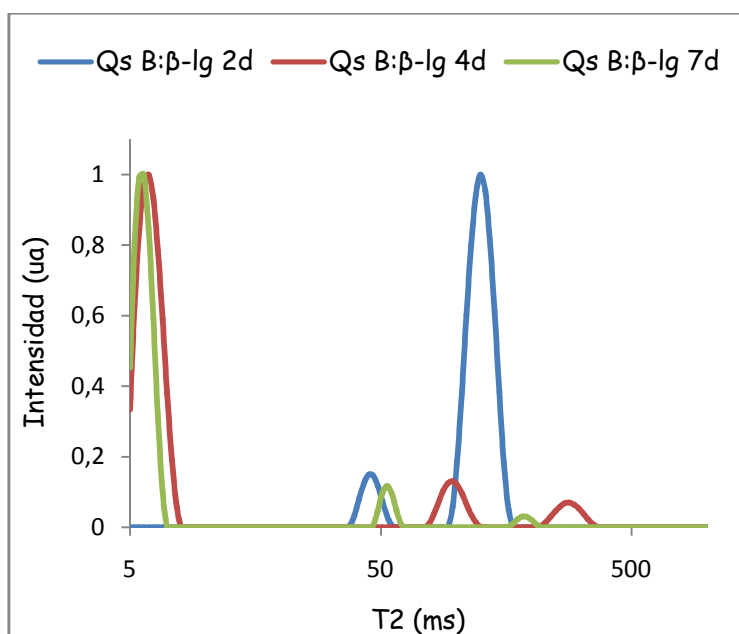
mostrándose a los 2 días una imagen más homogénea del gel, y cambiando la imagen a los 7 días de reacción donde coexistían zona oscuras (agua ligada) y brillantes (agua libre) a la vez, por lo que se deduce que existe agua libre en el producto formado a los 7 días, que podría no estar interaccionando con las cadenas del quitosano, sugiriendo que a medida que aumenta el tiempo de reacción este material se disgrega y va disminuyendo su capacidad de gelificación.



**Figura IV.51.** Imágenes potenciadas en T2 para los geles obtenidos a partir a) Qs A: -lg con el tiempo de reacción.

Estos mismos resultados se vieron cuando se representaron gráficamente las distribuciones continuas de los valores de T2 obtenidos (Figura IV.52). Se encontraron dos distribuciones a tiempos de relajación spin-spin distintos en el caso del gel formado a los 2 días de reacción y 3 distribuciones de T2 en el producto formado para cuatro y siete días de reacción. La presencia de varias distribuciones continuas de T2 podría deberse a diferentes fenómenos de gelificación y difusión presentes, dando lugar a un comportamiento anómalo, decreciendo el tiempo de relajación T2 desde las zonas del núcleo de la cadena polimérica a las zonas más externas hinchadas (Tritt-Goc y col., 2002). Los valores de T2 encontrados fueron bajos comparados con los del agua pura (2-3 s) sugiriendo que la red tridimensional se ha formado y las moléculas de agua están atrapadas en los poros del gel, limitándose por tanto, su libertad de movimiento y dando lugar a tiempos de relajación T2 más pequeños en comparación con los del agua pura (Kowalczyk y col., 2004). El mayor número de distribuciones continuas de T2 encontradas para los productos formados a los 4 y 7 días de reacción indicaría una

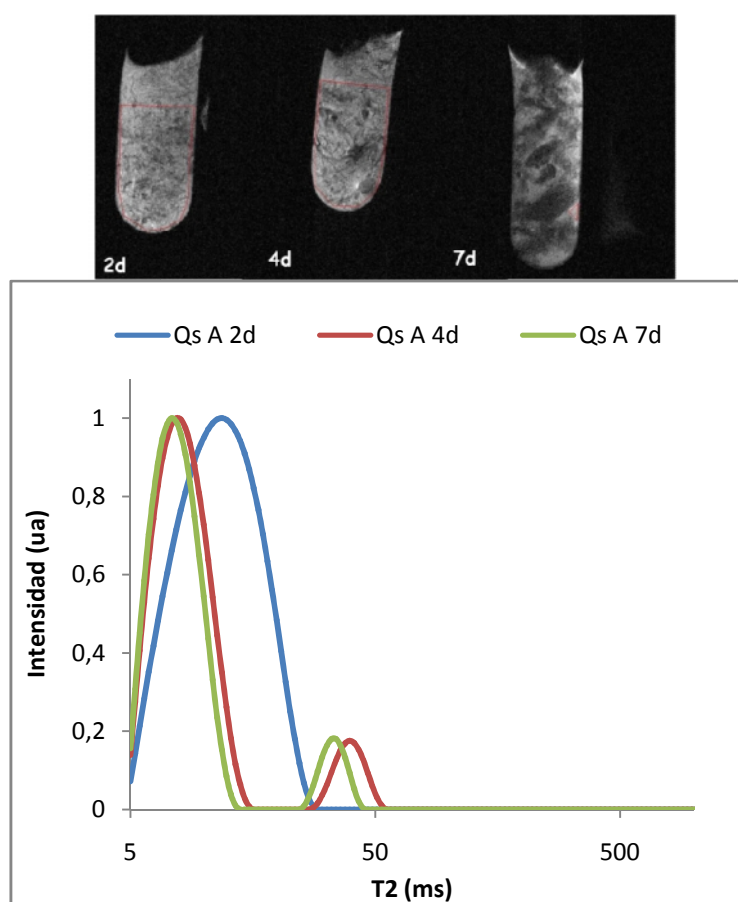
mayor heterogeneidad en la distribución del agua y el tamaño de los poros de la matriz formada por estos, presentándose una distribución a un alto valor de T2 que podría corresponder al agua libre no ligada que ya se había comprobado que existía mediante las imágenes, y otra, a un valor muy pequeño de T2 que podría corresponder a la parte oscura del material en la que los poros formados serían muy pequeños. Esto se observó anteriormente mediante microscopía de barrido electrónico el apartado 2.7.2 en el producto formado a los 7 días de reacción.



**Figura IV.52.** Distribuciones continuas de T2 para los geles obtenidos a partir de Qs B: -Ilg .

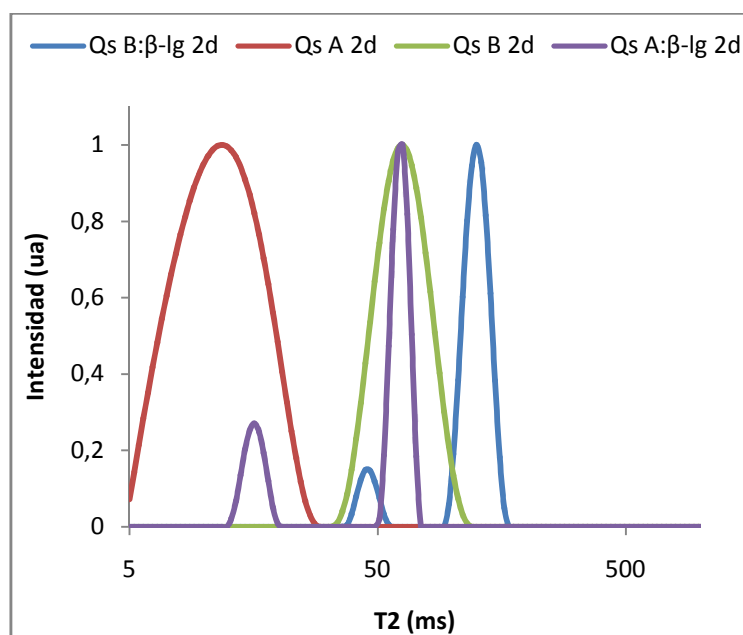
En el producto formado para 2 días de reacción, aparecieron dos únicas distribuciones continuas de T2 intermedias mostrando una mayor homogeneidad del producto. Un menor hinchamiento con el tiempo de reacción se podría relacionar con que existiera cada vez un mayor entrecruzamiento en el hidrogel no solo mediante enlaces covalentes como se comprobó con los espectros de infrarrojo, sino mediante interacciones físicas, pudiendo producirse, también, la reacetilación del quitosano con los iones carboxílicos del acetato y de la propia proteína, dando lugar a una mayor insolubilización del producto obtenido y menor capacidad de gelificación con el tiempo de reacción.

En el caso del quitosano en ausencia de proteína el comportamiento observado a medida que transcurría el tiempo de reacción fue similar al presentado cuando la proteína estaba presente (Figura IV.53), encontrándose en este caso una única distribución continua de T2 en el gel formado a los 2 días de reacción, y dos en el caso de los geles formados a 4 y 7 días de reacción, mostrando, de nuevo, más heterogeneidad en los poros y distribución del agua en los productos formados para estos tiempos de reacción. En este caso, además del enlace covalente producido mediante reacción de Maillard que podría ir aumentando el entrecruzamiento, se comprobó, por espectroscopía de infrarrojo en el producto formado a 7 días, que existió la reversión a quitina y de ahí que sea menos homogéneo y se insolubilizase, produciendo menor hinchamiento por el aumento de las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno.



**Figura IV.53.** Distribuciones continuas de T2 e imágenes potenciadas en T2 para los geles obtenidos a partir de Qs A .

La Figura IV.54 muestra la comparación de las distribuciones continuas de T2 en los geles formados a los 2 días de reacción en presencia y en ausencia de proteína y para los productos formados a partir de ambos quitosanos Qs A y Qs B.



**Figura IV.54.** Distribuciones continuas de T2 para los hidrogel obtenidos a partir de Qs A y Qs B con y sin  $\beta$ -lactoglobulina para dos días de reacción.

Como pudo observarse en presencia de la proteína para ambos quitosanos existió un cambio en el comportamiento del gel, ya que apareció una nueva distribución continua a un valor superior de T2. Según el resultado obtenido la presencia de la proteína daría lugar a la formación de nuevos productos que aumentarían la movilidad de los protones entre el agua y la cadena polimérica con respecto a la cadena del quitosano en ausencia de proteína, afectando al tiempo de relajación del agua ligada que aparece a un T2 mayor. Este hecho podría sugerir que, en la nueva estructura de la matriz del gel en presencia de proteína podrían existir poros más grandes. La proteína, por una lado, aportaría mayor número de grupos hidrofílicos aumentando la movilidad de protones entre el agua y el polímero y, por otro lado, su estructura globular podría estar abriendo la estructura del polímero dando lugar a poros mayores. Si se comparan el Qs A y el Qs

B y los productos formados a partir de ellos con proteína; en el caso del gel formado con Qs B presentó también poros más grandes con respecto al Qs A y sus productos que presentaron valores menores de distribuciones de T2, para el que ya se había supuesto un mayor entrecruzamiento entre sus cadenas mediante los estudios de solubilidad.

Se podría llevar a cabo un estudio más profundo de estos hidrogeles en cuanto a su estabilidad y capacidad de liberación ya que podrían presentar un potencial uso en la industria alimentaria en aplicaciones relativas a textura como gelificantes o espesantes o en sistemas de protección o de liberación de ingredientes bioactivos.

### Conclusiones parciales

- Se demostró la mayor capacidad de gelificación en los productos formados a dos días de reacción con quitosano y -lg, ya que aumentó el entrecruzamiento covalente y físico. Además, la reacetilación del quitosano podría estar provocando una mayor insolubilización y menor hinchamiento del producto.
- La presencia de la proteína podría contribuir a una mayor extensión de la cadena entrecruzada dando lugar a mayores distribuciones continuas de T2 con respecto a quitosano y a un mayor tamaño de poros.
- El entrecruzamiento fue mayor en el caso del Qs A, de  $M_w$  intermedio bajo.
- Se podrían obtener hidrogeles sin necesidad de agentes entrecruzantes que se caracterizan por mantener su estructura permanente porque los enlaces no son reversibles, tienen buenas propiedades mecánicas y no se disuelven incluso en condiciones extremas de pH.

## ***V. CONCLUSIONES***

---



1. La despolimerización enzimática del quitosano está más favorecida por parte de la lisozima en la degradación de quitosanos con un DA entre 22-35% y de la quitosanasa por quitosanos con bajo DA (14%). La actuación enzimática es más eficiente en quitosanos en los que existe una distribución no aleatoria de residuos acetilados y desacetilados.
2. El uso de membranas de ultrafiltración tangencial seguido de diálisis y liofilización es la metodología que proporciona mejores rendimientos de quito-oligosacáridos con un mayor grado de purificación.
3. La quitosanasa da lugar a quito-oligosacáridos con un máximo de tres residuos acetilados en el caso de quitosanos con DA entre 14-22% y en quitosanos con un DA mayor (35%) da lugar a quito-oligosacáridos con un número de residuos acetilados entre seis y trece. Los quito-oligosacáridos obtenidos con lisozima presentan cadenas de monómeros con un número máximo de residuos acetilados comprendido entre ocho y dieciseis.
4. Los quito-oligosacáridos con  $M_w$  por debajo de  $18 \times 10^3$  g/mol presentan actividad antioxidante, siendo los de un  $M_w$  comprendido entre  $2-3 \times 10^3$  g/mol los que mostraron mayor capacidad para secuestrar radicales libres DPPH y un mayor poder reductor sobre soluciones de  $\text{Fe}^{3+}$ , independientemente del DA.
5. Los quito-oligosacáridos con un bajo DA (8-18%) y un número máximo de tres residuos acetilados presentan actividad antimicrobiana frente a *S. thyphimurim*, cuando el  $M_w$  es inferior a  $12 \times 10^3$  g/mol y frente a *C. difficile* independientemente del  $M_w$ .
6. Los quito-oligosacáridos con alto DA (37-38%) y bajo  $M_w$  ( $2-8 \times 10^3$  g/mol), con secuencias predominantes de seis y once residuos acetilados, mantienen la microbiota intestinal, y aún sin poder ser considerados prebióticos, su fermentación produce ácidos grasos de cadena corta que pueden ejercer efectos fisiológicos beneficiosos. Los quito-oligosacáridos con un bajo DA (8-17%), un número máximo de tres residuos acetilados e independientemente del  $M_w$  pueden

actuar disminuyendo algunas poblaciones bacterianas intestinales provocando un desequilibrio de la microbiota intestinal.

7. La  $\alpha$ -lactoglobulina y el acetato de quitosano a pH 6 dan lugar a la formación de un complejo electrostático, siendo mayor la interacción en el caso de un quitosano de  $M_w$  intermedio alto ( $M_w$   $80 \times 10^3$  g/mol).
8. Entre el quitosano y la  $\alpha$ -lactoglobulina tiene lugar la formación de glicoconjugados solubles. Los productos de glicosilación formados con los quitosanos de peso molecular intermedio ( $M_w$  30-80  $\times 10^3$  g/mol) presentan mayor capacidad emulgente que la proteína y el quitosano.
9. Los productos de reacción de Maillard (MRPs) obtenidos tras 4 y 7 días de reacción mejoran la actividad antioxidante de la proteína. Los MRPs formados a partir de un quitosano de bajo  $M_w$  ( $1.3 \times 10^3$  g/mol) presentan la mayor actividad antioxidante, muy superior a la de la proteína y el quitosano inicial.
10. La reacción de Maillard se produce en acetatos de quitosano de pesos moleculares entre 1.3 y  $80 \times 10^3$  g/mol en estado sólido. Cuando el  $M_w$  está comprendido entre 30 y  $80 \times 10^3$  g/mol, se obtienen hidrogeles de acetato de quitosano, sin necesidad de agentes entrecruzantes. El gel producido a los 2 días de reacción es el que proporciona la estructura más homogénea.
11. Se obtienen hidrogeles de quitosano y  $\alpha$ -lactoglobulina mediante la reacción de Maillard. Se ha demostrado que en presencia de la proteína las distribuciones continuas de tiempo de relajación spin-spin, T2, aumentan y por tanto el tamaño de poro de estos geles sería superior que el de los quitosanos obtenidos sin proteína.

## VI. *BIBLIOGRAFÍA*

---



- Abd-Elmohdy, F.A., Z. El Sayed, S. Essam y A. Hebeish. Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosanolysis (2010). *Carbohydr. Polym* ,(3), 82, 539-542.
- Acosta, N., C. Jiménez, V. Borau y A. Heras. Extraction and characterization of chitin from crustaceans (1993). *Biomass Bioenergy*, (2) ,5, 145-153.
- Aiba, Sei-ichi. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans (1991). *Int. J.Biol. Macromol*, (1), 13, 40-44.
- Aiba, Sei-ichi. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans (1992). *Int. J.Biol. Macromol*, (4), 14, 225-228.
- Aiba, Sei-ichi. Studies on chitosan: 6. Relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans (1993) . *Int. J.Biol. Macromol*, (4), 15, 241-245.
- Ajandouz, El.H. y A. Puigserver. Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids: Effect of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics (1999). *J.Agric. Food Chem*, (5), 47, 1786-1793.
- Ajandouz, El.H., L. S. Tchiakpe, F. D. Ore, A. Benajiba y A. Puigserver. Effects of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics in Fructose-Lysine Model Systems (2001) . *J. Food Sci*, (7), 66, 926-931.
- Ajandouz, El H., V. Desseaux, S. Tazi y A. Puigserver. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems (2008). *Food Chem*, (3), 107, 1244-1252.
- Akhtar, M. y E. Dickinson. Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentrations (2003). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Food Colloids, Biopolymers and Materials Special Issue*, (1-4), 31, 125-132.
- Al-Hakkak, J. y S. Kavale. Improvement of emulsification properties of sodium caseinate by conjugating to pectin through the Maillard reaction (2002). *International Congress Series. The Maillard reaction in food chemistry and medical science: Update*, 1245, 491-499.
- Al-Hakkak, J. y F. Al-Hakkak. Functional egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction (2010). *J. Food Eng*, (1), 100, 152-159.
- Allan, C.R., y L.A. Hardwiger. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition (1979). *Experimental Mycology*, 3, 285-287.
- Amadori, M. The condensation product of glucose and p-anisidine (1929). *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei*, 9, 226-230.
- Ames, J.M. The Maillard reaction (1992). 99-153.

- Aminlari, M., R. Ramezani y F. Jadidi. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein (2005). *J. Sci. Food Agric* (15), 85, 2617-2624.
- Anna MF., David MA, Stephen D, Evgeny VN. Enzymatic transformations in supersaturated substrate solutions II. Synthesis of disaccharides via transglycosylation (1998). *Biotechnol Biochem*, 60, 197-203.
- Anraku, M., T. Fujii, N. Furutani, D. Kadowaki, T. Maruyama, M. Otagiri, J.M. Gebicki y H. Tomida. Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan (2009). *Food and Chemical Toxicology*, (1), 47, 104-109.
- Anthonsen, M., K.M. Vårum y O. Smidsrød. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation (1993). *Carbohydr. Polym*, (3), 22, 193-201.
- Aoki, T., K. Kitahata, T. Fukumoto, Y. Sugimoto, H.R. Ibrahim, T. Kimura, Y. Kato y T. Matsuda. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with glucose-6-phosphate through the Maillard reaction (1997). *Food Res. Int*, (6), 30, 401-406.
- Aoki,T., Y. Hiidome, K. Kitahata, Y. Sugimoto, H.R. Ibrahim y Y. Kato. Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the Maillard reaction (1999) . *Food Res. Int*, (2), 32, 129-133.
- Aoki,T., Y. Hiidome, Y. Sugimoto, H.R. Ibrahim y Y. Kato. Modification of ovalbumin with oligogalacturonic acids through the Maillard reaction (2001). *Food Res. Int*, (2-3), 34, 127-132.
- Aranaz, I., M. Mengíbar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta y G. Galed y A. Heras. Functional Characterization of Chitin and Chitosan (2009). *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.
- Argüelles,W. *Caracterización de quitina y quitosano*, in *Caracterización de quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones* (2004).
- Ashoor, S.H. y J.B. Zent. Maillard Browning of Common Amino Acids and Sugars (1984). *J. Food Sci*, (4), 49, 1206-1207.
- ASTM. Standar guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications (2007).
- Audy, P. y A. Asselin. Gel electrophoretic analysis of chitosan hydrolysis products (1992). *Electrophoresis*, 13, 334-337.
- Babiker, E., A. Hiroyuki, N. Matsudomi,H. Iwata, T. Ogawa, N. Bando, A. Kato. Effect of Polysaccharide Conjugation or Transglutaminase Treatment on the Allergenicity and Functional Properties of Soy Protein (1998). *J. Agric. Food Chem*, 46, 866-871.

- Barbieri, R., M. Quaglia, M. Delfini y E. Brosio. Investigation of water dynamic behaviour in poly (HEMA) and poly (HEMA-co-DHPMA) hydrogels by proton T2 relaxation time and self-diffusion coefficient n.m.r. measurements (1998). *Polymer*, (5), 39, 1059-1066.
- Barroca-Aubry, N., A. Pernet-Poil-Chevrier, A. Domard y S. Trombotto. Towards a modular synthesis of well-defined chitooligosaccharides: synthesis of the four chitodisaccharides (2010). *Carbohydr.Res.* (12), 345, 1685-1697.
- Barry J. McGookinay M-A. Augustin. Antioxidant activity of casein and Maillard reaction products from casein-sugar mixtures (1991). *Journal of Dairy Research*, 58, 313-320.
- Bates, L., J.M. Ames, D.B. MacDougall y P.C. Taylor. Laboratory Reaction Cell to Model Maillard Color Development in a Starch-Glucose-Lysine System (1998). *J. Food Sci*, (6), 63, 991-996.
- Baxter, J.H. Free Amino Acid Stability in Reducing Sugar Systems (1995). *J. Food Sci*, (2), 60, 405-408.
- Baynes, J.W., N.G.Watkins, C.I. Fisher, C.J. Hull, J.S. Patric, M.U. Ahmed, J.A. Dunn y S.R. Thorpe. The Amadori product on protein: structure and reactions (1989), 43-67.
- Benjakul, S., W. Lertittikul y F. Bauer. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system (2005). *Food Chem*, (2), 93, 189-196.
- Benzie, Iris F. Fy J.J. Strain. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay (1996). *Anal. Biochem*, (1), 239, 70-76.
- Berger, J., M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt y R. Gurny. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications (2004). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Chitosan*, (1), 57, 35-52.
- Berman, H.M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov y P.E. Bourne. The Protein Data Bank (2000) . *Nucleic Acids Research*, (1), 28, 235-242.
- Bersuder, P., M. Hole, y G. Smith. Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. Investigation of the copper (II) binding ability (2001). *Journal of American Oil Chemical Society*. 78, 1079-1082.
- Bertrand-Harb, C., A. Baday, M. Dalgalarondo, J.Chobert y T. Haertlé. Thermal modifications of structure and codenaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases (2002). *Food / Nahrung*, (4), 46, 283-289.

- Billaud, C., C. Maraschin y J. Nicolas. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with cysteine under various conditions of pH and temperature (2004). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, (1), 37, 69-78.
- Birlouez-Aragon, I., J. Leclere, C.L. Quedraogo, E. Birlouez y J. Grongnet. The FAST method, a rapid approach of the nutritional quality of heat-treated foods (2001). *Food / Nahrung*, (3), 45, 201-205.
- Bornet, F. R. J., F. Brouns, Y. Tashiro y V. Duvallier. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications (2002). *Digestive and Liver Disease*, (Supplement 2), 34, S111-S120.
- Bouhallab, S., F. Morgan, G. Henry, D. Mollé y J. Leónil. Formation of Stable Covalent Dimer Explains the High Solubility at pH 4.6 of Lactose-  $\alpha$ -Lactoglobulin Conjugates Heated near Neutral pH (1999). *J.Agric. Food Chem*, (4), 47, 1489-1494.
- Brands, C.M.J., G.M. Alink, van Boekel, Martinus A. J. S. y Wim M. F. Jongen. Mutagenicity of Heated Sugar-Casein Systems:Effect of the Maillard Reaction (2000). *J.Agric. Food Chem*, (6), 48, 2271-2275.
- Bressa, F., N. Tesson, M. Dalla Rosa, A. Sensidoni y F. Tubaro. Antioxidant Effect of Maillard Reaction Products: Application to a Butter Cookie of a Competition Kinetics Analysis (1996). *J.Agric. Food Chem*,(3), 44, 692-695.
- Brownlow, S., J.H.M Cabral, R. Cooper, D.R. Flower, S.J. Yewdall, I.N. Polikarpov, C.T. Anthony y L. Sawyer. Bovine  $\alpha$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution still an enigmatic lipocalin (1997). *Structure*, 5, (4), 481-495.
- Brugnerotto, J., J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Arguelles-Monal, J. Desbrieres y M. Rinaudo. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization (2001a). *Polymer*, (8), 42, 3569-3580.
- Brugnerotto, J., J. Desbrieres, G. Roberts y M. Rinaudo. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography (2001b). *Polymer*, (25), 42, 09921-09927.
- Burova, T.V., E.P. Varfolomeeva, V.Y. Grinberg, T. Haertlé y V.B. Tolstoguzov. Effect of polysaccharides on the stability and renaturation of soybean trypsin (Kunitz) inhibitor (2002). *Macromolecular Bioscience*,(6), 2, 286-292.
- Cabodevila, O., S.E. Hill, H.J. Armstrong, I. De Sousa y J.R. Mitchell. Gelation Enhancement of Soy Protein Isolate using the Maillard Reaction and High Temperatures (1994). *J. Food Sci*,(4), 59,872-875.
- Cabrera, J.C. y P. Van Cutsem. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan (2005). *Biochemical Engineering Journal*, (2),25,165-172.

- Caessens, P.W.J. R., S. Visser y H. Gruppen. Method for the isolation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product (1997). *Int. Dairy J.*, (4), 7, 229-235.
- Caiqin, Qin, W. Wei, P. Huie, H. Rong y L. Wei. Preparation and properties of reduced chitooligomers (2008). *Carbohydr. Polym.*, (4), 72, 701-706.
- Calligaris, S., L. Manzocco, M. Anese y M.C. Nicoli. Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk (2004). *Int. Dairy J.*, (5), 14, 421-427.
- Calvo, P., C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato y M.J. Alonso. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers (1997). *J Appl Polym Sci*, (1), 63, 125-132.
- Cämmerer, B. Y L.W. Kroh. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins (1995). *Food Chem*, (1), 53, 55-59.
- Chang, H.L., Y.C. Chen y F.J. Tan. Antioxidative properties of a chitosan–glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage (2011). *Food Chem*, (2), 124, 589-595.
- Chawla, S.P., R. Chander y A. Sharma. Antioxidant formation by  $\gamma$ -irradiation of glucose–amino acid model systems (2007). *Food Chem*, (4), 103, 1297-1304.
- Chawla, S.P., R. Chander y A. Sharma. Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins (2009). *Food Chem*, (1), 116, 122-128.
- Chen, C.S., W.Y. Lian y G.J. Tsai. Antimicrobial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzyl chitosan and application to oyster preservation (1998). *J. Food. Prot.*, 64, 1124-1128.
- Chen, C.Z. y S.L. Cooper. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes (2002). *Biomaterials*, (16), 23, 3359-3368.
- Chen, M., X. Zhu, Z. Li, X. Guo y P. Ling. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in preparation of chitosan oligosaccharides (COS) with degree of polymerization (DP) 5–12 containing well-distributed acetyl groups (2010). *International Journal of Mass Spectrometry*, (2-3), 290, 94-99.
- Chen, S.K., M.L. Tsai, J.R. Huang y R.H. Chen. In Vitro Antioxidant Activities of Low-Molecular-Weight Polysaccharides with Various Functional Groups (2009). *J. Agric. Food Chem*, (7), 57, 2699-2704.
- Cheng, H-H. y M-H Lai. Fermentation of Resistant Rice Starch Produces Propionate Reducing Serum and Hepatic Cholesterol in Rats (2000). *The Journal of Nutrition*, (8), 130, 1991-1995.

- Chevalier, F., J-M. Chobert, C. Genot y T. Haertle. Scavenging of Free Radicals, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities of the Maillard Reaction Products of  $\beta$ -Lactoglobulin Glycated with Several Sugars (2001a). *J.Agric. Food Chem*, (10), 49, 5031-5038.
- Chevalier, F., J-M. Chobert, Y. Popineau, M.G. Nicolas y T. Haertle. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar (2001b). *International Dairy Journal*, (3),11, 145-152.
- Chiang, M.T., H.T. Yao, y H.C. Chen. Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on A diet enriched with cholesterol (2000). *Biosci. Biotechnol. Biochem*, (5),64, 965-971.
- Chiang, C-L, C-T. Chang y H-Y. Sung. Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1 (2003). *Enzyme Microb. Technol*, (2), 32, 260-267.
- Chien, P-J., F. Sheu, W-T. Huang y M-S. Su. Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice (2007). *Food Chemistry*, (4), 102, 1192-1198.
- Chobert, J.M., C. Bertrand-Harb y M.G. Nicolas. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin (1988). *J.Agric. Food Chem*, (5), 36, 883-892.
- Choi, S.J., H.J. Kim, K.H. Park y T.W. Moon. Molecular characteristics of ovalbumin-dextran conjugates formed through the Maillard reaction (2005). *Food Chemistry*, (1), 92, 93-99.
- Chung, Y.C., Y.P. Su, C.C. Chen, G. Jia, H.L. Wang, J.C. Wu y J.G. Lin. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall (2004). *Acta Pharmacol. Sin*, (7), 25, 932-936.
- Chung, Y-C, C-L Kuo y C-C Chen. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction (2005). *Bioresource Technology*, (13), 96, 1473-1482.
- Clewlow, A.C., N. Errington, y A.J. Rowe. Analysis of data captured by an on-line image capture system from an analytical ultracentrifuge using schlieren optics (1997). *European Biophysics Journal*, 25, (5), 311-317.
- Cölfen, H., S.E. Harding, K.M. Vårum y D.J. Winzor. A study by analytical ultracentrifugation on the interaction between lysozyme and extensively deacetylated chitin (chitosan) (1996). *Carbohydr. Polym*,(1), 30, 45-53.
- Cölfen, H. y S.E. Harding. MSTAR and MSTAR: interactive PC algorithms for simple, model independent evaluation of sedimentation equilibrium data (1997). *European Biophysics Journal*, 25, (5),333-346.

Coma, V., A. Deschamps y A. Martial-Gros. Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer? Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants (2003). *J. Food Sci.*, (9), 68, 2788-2792.

Crittenden, R.G. Probiotics: A Critical Review (1999).

Cuero, R.G., G. Osuji y A. Washington. N-carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc (1991). *Biotechnology Letters*, (6), 13, 441-446.

Cummings, J.H. Short chain fatty acids in the human colon (1981). *Gut*, (9), 22, 763-779.

Cummings, J.H. Short chain fatty acids. In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, physiology and Health (1995). 101-130.

Damodaran, S. Amino acids, peptides, and proteins (1996). 321-429.

Damodaran, S. *Food Proteins and Their Applications. Part I: Physicochemical Bases of Protein Functionality* (1997). 1-25.

Darewicz, M. y J. Dziuba. The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine  $\alpha$ -casein (2001). *Food / Nahrung*, (1), 45, 15-20.

Davidek, T., N. Clety, S. Devaud, F. Robert y I. Blank. Simultaneous Quantitative Analysis of Maillard Reaction Precursors and Products by High-Performance Anion Exchange Chromatography (2003). *J. Agric. Food Chem.*, (25), 51, 7259-7265.

Delben, F. y S. Stefanich. Interaction of food proteins with polysaccharides, I. Properties upon mixing (1997). *Journal of Food Engineering*, (3), 31, 325-346.

Delgado-Andrade, C., J. Rufian-Henares y F.J. Morales. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods (2005). *J. Agric. Food Chem.*, (20), 53, 7832-7836.

Dennhart, N., T. Fukamizo, R. Brzezinski, M. Lacombe-Harvey y T. Letzel. Oligosaccharide hydrolysis by chitosanase enzymes monitored by real-time electrospray ionization-mass spectrometry (2008). *J. Biotechnol.*, (3-4), 134, 253-260.

Desbrieres, J. Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions (2002). *Biomacromolecules*, (2), 3, 342-349.

Devlieghere, F., A. Vermeulen y J. Debevere. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables (2004). *Food Microbiology*, (6), 21, 703-714.

Dickinson, E. y V.B. Galazka. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with polysaccharides (1991). *Food Hydrocoll.*, (3), 5, 281-296.

- Dickinson, E. y E. Izgi. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes (1996). *Colloids Surf. Physicochem. Eng.Aspects*, (1-2), 113, 191-201.
- Diftis, N. y V. Kiosseoglou. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose (2003). *Food Chemistry*, (1), 81, 1-6.
- Diftis, N. y V. Kiosseoglou. Competitive adsorption between a dry-heated soy protein-dextran mixture and surface-active materials in oil-in-water emulsions (2004). *Food Hydrocoll*, (4), 18, 639-646.
- Diftis, N.G., C.G. Biliaderis y V.D. Kiosseoglou. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture (2005). *Food Hydrocolloids*, (6), 19, 1025-1031.
- Diftis, N. y V. Kiosseoglou. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy protein isolate-dextran mixture (2006). *Food Hydrocolloids*, (6), 20, 787-792.
- Dills, W.L. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction (1993). *The American Journal of Clinical Nutrition*, (5), 58, 779S-787S.
- Domard, A. y N. Cartier. Glucosamine oligomers: 1. Preparation and characterization (1989). *Int. J. Biol. Macromol*, 11, 297-301.
- Dos Santos, J.E., E.R. Dockal y E.T.G. Cavalheiro. Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives (2005). *Carbohydrate Polymers*, (3), 60, 277-282.
- Duncan, S.H., A. Barcenilla, C.S. Stewart, S.E. Pryde y H.J. Flint. Acetate Utilization and Butyryl Coenzyme A (CoA): Acetate-CoA Transferase in Butyrate-Producing Bacteria from the Human Large Intestine (2002). *Appl. Environ. Microbiol*, (10), 68, 5186-5190.
- Dunlap, C.A. y G.L. Côte. -lactoglobulin-Dextran Conjugates: Effect of Polysaccharide Size on Emulsion Stability (2005). *J. Agric. Food Chem*, 53, 419-423.
- Dvoraková J., D. Schmidt, Z. Hunková, J. Thiem y V. Kren. Enzymatic rearrangement of chitine hydrolysates with -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* (2001). *J. Mol. Catal B: Enzym*, 11, 225-232.
- Easa, A.M., H.J. Armstrong, J.R. Mitchell, S.E. Hill, S.E. Harding y A.J. Taylor. Maillard induced complexes of bovine serum albumin — a dilute solution study (1996). *Int. J. Biol. Macromol*, (4), 18, 297-301.
- EFSA. Opinion of the safety of glucosamine hydrochloride from *Aspergillus niger* as food ingredient (2009). *The EFSA Journal*, 1099,1-19.
- EFSA. Scientific Opinion on the safety of 'Chitin-glucan' as a Novel Food ingredient (2010). *The EFSA Journal*, (7), 8, 1687.

- Eichner K. Antioxidant effect of Maillard reaction intermediates (1981). *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 441-451.
- Einhorn-Stoll, U., M. Ulbrich, S. Sever y H. Kunzek. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating (2005). *Food Hydrocolloids* (2), 19, 329-340.
- Errington, N., S.E. Harding, K.M. Vårum y L. Illum. Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation (1993). *Int. J. Biol. Macromol.*, (2), 15, 113-117.
- Espinosa-Martos y P. Rupérez. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food (2006). *Nutr Hosp.*, (1), 21, 92-96.
- Fechner, A., A. Knoth, I. Scherze y G. Muschiolik. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates (2007). *Food Hydrocoll.*, (5-6), 21, 943-952.
- Fee, M., N. Errington, K. Jumel, L. Illum, A. Smith, y S.E. Harding. Correlation of SEC/MALLS with ultracentrifuge and viscometric data for chitosans (2003). *European Biophysics Journal*, 32, (5), 457-464.
- Fenaille, F., F. Morgan, V. Parisod, J-C. Tabet y P.A. Guy. Solid-state glycation of -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry and gel electrophoresis techniques (2003). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (13), 17, 1483-1492.
- Ferrari, C.K.B. y E.A.F.S. Torres. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging (2003). *Biomedecine & Pharmacotherap.*, (5-6), 57, 251-260.
- Finot, P-A., R. Deutsch, y E. Bujard. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk (1981). *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 345-355.
- Fox, P.F. Milk proteins: General and historical aspects (2003). Volumen I.1-1-48.
- Friedman, M. Food Browning and Its Prevention: An Overview (1996). *J. Agric. Food Chem.*, (3), 44, 631-653.
- Fukamizo, T., A. Ohtakara, M. Mitsutomi y S. Goto. NMR spectra of partially deacetylated chitotrisaccharide (1991). *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2653-2655.
- Fukamizo, T., Y. Honda, S. Goto, I. Boucher, R. Brzezinski. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 (1995). *J. Biochem.*, 311, 377-383.
- Galazka, V.B., D. Smith, D.A. Ledward y E. Dickinson. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment (1999). *Food Chem.*, (3), 64, 303-310.

- Galed, G., B. Miralles, I. Paños, A. Santiago y A. Heras. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin (2005a). *Carbohydrate Polymers*, (4), 62, 316-320.
- Galed Ceresuela Gemma. Biopolímeros Quitina/Quitosano: Optimización de los procesos de Obtención y Caracterización Funcional (2005b).
- Ganzevles, R.A., M.A. Cohen Stuart, T.v. Vliet y H.H.J. de Jongh. Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air–water interface (2006). *Food Hydrocoll*, (6), 20, 872-878.
- Gauthier, F., S. Bouhallab y A. Renault. Modification of bovine  $\alpha$ -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: adsorption at the air–water interface (2001). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (1-3), 21, 37-45.
- Gerasimenko, D.V., I.D. Avdienko, G.E. Bannikova, O.Y. Zueva y V.P. Varlamov. Antibacterial Effects of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Chitosans on Different Microorganisms (2004). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, (3), 253-257.
- Gibson, G.R. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria (1990). *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 769-797.
- Gibson, G.R. Y M.B. Roberfroid. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics (1995). *The Journal of Nutrition*, (6), 125, 1401-1412.
- González-García, N., J. Gómez-Pavón y J.L. Martínez-Porras. Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile* (2005). *Revista Española de Geriatría y Gerontología*, (5), 40, 310-319.
- Goycoolea, F.M., W. Argüelles-Monal, C. Peniche, y I. Higuera-Ciapara. Chitin and chitosan (2000). Volume 41, 265-308.
- Goycoolea, F.M., M.E. Fernández-Valle, I. Aranaz y Á. Heras. pH- and Temperature-Sensitive Chitosan Hydrogels: Swelling and MRI Studies (2011). *Macromolecular Chemistry and Physics*, (9), 212, 887-895.
- Gu, F., K. Jin Moon, H. Khizar, X. Shuqin, F. Biao y Z. Xiaoming. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein–glucose model system (2009). *Food Chem.* (1). 117.48-54.
- Gu, F., K. Jin Moon, A. Shabbar, Z. Xiao-Ming, X. Shu-Qin y C. Zheng-Xing. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose (2010). *Food Chem*, (2), 120, 505-511.
- Guan, Y-G., H. Lin, Z. Han, J. Wang, S-J. Yu, X-A. Zeng, Y-Y. Liu, C-H. Xu y W-W Sun. Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin–dextran model system, a means of promoting the Maillard reaction (2010). *Food Chem*, (2), 123, 275-280.

- Guzey, D. y D.J. McClements. Characterization of [beta]-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study (2006). *Food Hydrocolloids*, (1), 20, 124-131.
- Hadwiger, L.A., C. Chiang, S. Victory y D. Horowitz, D. Chitin and chitosan (1988), 119-138.
- Halliwell, B., y J.M.C. Gutteridge. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease (1988). *Human Toxicology*, (1), 7, 7-13.
- Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Löliger y O.I. Aruoma. The characterization of antioxidants (1995). *Food and Chemical Toxicology*, (7), 33, 601-617.
- Hancock, S. Cell surface analysis (1991). 23.
- Harding, S.E., K.M. Varum, B.T. Stokke, y O. Smidsrod, O. Molar mass determination of polysaccharides (1991). *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1, 63-144.
- Harding, S.E. On the hydrodynamic analysis of macromolecular conformation (1995). *Biophys. Chem*, (1-2), 55, 69-93.
- Harding, S.E. Challenges for the modern analytical ultracentrifuge analysis of polysaccharides (2005). *Carbohydr. Res*, (5), 340, 811-826.
- Harish Prashanth, K.V., F.S. Kittur y R.N. Tharanathan. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions (2002). *Carbohydr. Polym*, (1), 50, 27-33.
- Harish Prashanth, K.V. Y R.N. Tharanathan. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview (2007). *Trends Food Sci. Technol*, (3), 18, 117-131.
- Hattori, M. Numamoto, K. Kobayashi y K. Takahashi. Functional Changes in  $\beta$ -lactoglobulin by Conjugation with Cationic Saccharides (2000). *J. Agric. Food Chem*, 48, 2050-2056.
- Hattori, M., A. Ogino, H. Nakai y K. Takahashi. Functional Improvement of  $\beta$ -Lactoglobulin by Conjugating with Alginate Lyase-Lysate (1997). *J.Agric. Food Chem*, (3), 45, 703-708.
- Helander, I.M., E. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades y S. Roller. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria (2001). *Int. J. Food Microbiol*, (2-3), 71, 235-244.
- Henle, T. Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods (2005). *Amino Acids*. 29, (4), 313-322.
- Hernández-Ledesma, B., I. Recio, y L. Amigo.  $\beta$ -Lactoglobulin as source of bioactive peptide (2008). *Amino Acids*, 35, (2), 257-265.

- Heyns, K. y K.H. Meinecke . The formation and preparation of D-glucosamine from fructose and ammonia (1953) . *Chemische Berichte*, 86, 1453-1562.
- Hidalgo, F.J. Y R. Zamora. Non-enzymatic Browning and Fluorescence Development in a (E)-4,5-Epoxy-(E)-2-heptenal/Lysine Model System (1993). *J. Food Sci.*(3), 58, 667-670.
- Hill, S., J.R. Mitchell y H.J. Armstrong. The production of heat stable gels at low protein concentrations by the use of the Maillard reaction (1992), 6, 471-478.
- Hiller, Beatey P.C. Lorenzen. Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation (2010). *Food Res. Int.*, (4), 43,1155-1166.
- Hodge, J.E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems (1953). *J.Agric. Food Chem.*, (15),1, 928-943.
- Hoffmann, Marion A.M. Y P.J.J.M van Mil. Heat-Induced Aggregation of  $\beta$ -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds (1997). *J.Agric. Food Chem.*, (8), 45, 2942-2948.
- Hofmann, T . Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde - chemical characterisation of a red coloured domaine (1998). *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, (4), 206, 251-258.
- Hokputsa, S., K. Jumel, C. Alexander y S.E. Harding. Hydrodynamic characterisation of chemically degraded hyaluronic acid (2003). *Carbohydr. Polym.*, (2), 52, 111-117.
- Holme, K.R. Y A.S. Perlin. Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte (1997). *Carbohydr. Res.* (1-2). 302.7-12.
- Holme, H.K., H. Foros, H. Pettersen, M. Dornish y O. Smidsrod. Thermal depolymerization of chitosan chloride (2001). *Carbohydrate Polymers*, (3), 46, 287-294.
- Hong, Y-H. y D.J. McClements. Formation of Hydrogel Particles by Thermal Treatment of  $\beta$ -Lactoglobulina-Chitosan Complexes (2007). *J.Agric. Food Chem.*, (14), 55, 5653-5660.
- Hosono, A., H. Kitazawa, H. y T. Yamaguchi. Antimutagenic and antitumour activities of lactic acid bacteria (1997). 89-132.
- Hsiao, Y-C., Y-W. Lin, C-K. Su y B-H. Chiang. High degree polymerized chitooligosaccharides synthesis by chitosanase in the bulk aqueous system and reversed micellar microreactors (2008). *Process Biochemistry*,(1), 43,76-82.
- Hu, Y., Y. Du, J. Yang, Y. Tang, J. Li y X. Wang. Self-aggregation and antibacterial activity of N-acylated chitosan (2007). *Polymer*, (11), 48, 3098-3106.

- Huang, R., N. Rajapakse y S-K. Kim. Structural factors affecting radical scavenging activity of chitoooligosaccharides (COS) and its derivatives (2006). *Carbohydr. Polym.*(1), 63, 122-129.
- Huggins, M.L. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration (1942). *J.Am. Chem. Soc.*, (11), 64, 2716-2718.
- Hunter, R.S. Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters (1942). *NMB. Circular C24. Department of Commerce.*
- Hurrell, R.F. Reactions of food proteins during processing and storage and their nutritional consequences (1984). 213-244.
- Hwang, J-Y., Y-S. Shue y H-M.Chang. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels (2001). *Food Res. Int.*(7), 34, 639-647.
- Ikeda, T., S. Tazuke y Y. Suzuki. Biologically active polycations, 4. Synthesis and antimicrobial activity of poly(trialkylvinylbenzylammonium chlorides) (1984). *Die Makromolekulare Chemie*, (5), 185, 869-876.
- Ishiguro, K., N. Yoshie, M. Sakurai y Y. Inoue. A <sup>1</sup>H NMR study of a fragment of partially N-deacetylated chitin produced by lysozyme degradation (1992). *Carbohydr. Res*, 237, 333-338.
- Isolauri, E., S. Salminen y A.C. Ouwehand. Probiotics (2004). *Best Practice and Research in Clinical*. 18, 299-313.
- Izume, M., S. Nagae, H. Kawagishi, M. Mitsutomi y A. Ohtakara. Action Pattern of Bacillus sp. No. 7-M Chitosanase on Partially N-Acetylated Chitosan (1992). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 448-453.
- Jayathilakan, K. Y G.K. Sharma. Role of sugar–amino acid interaction products (MRPs) as antioxidants in a methyl linoleate model system (2006). *Food Chem*, (4), 95, 620-626.
- Je, J-Y., P-J. Park y S-K. Kim. Free radical scavenging properties of hetero-chitoooligosaccharides using an ESR spectroscopy (2004). *Food and Chemical Toxicology*, (3), 42, 381-387.
- Jeon, Y-J., F. Shahidi y S-K. Kim. Preparation of chitin and chitosan oligomers and applications in physiological functional foods (2000). *Food Rev. Int*, (2), 16, 159.
- Jeon, Y-J., P-J. Park y S-K Kim. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor (2001) *Carbohydr. Polym*, (1), 44, 71-76.
- Ji, X., Z. Zhong, X. Chen, R. Xing, S. Liu, L. Wang y P. Li. Preparation of 1,3,5-thiadiazine-2-thione derivatives of chitosan and their potential antioxidant activity in vitro (2007). *Bioorg. Med. Chem. Lett*, (15), 17, 4275-4279.

Jiménez-Castaño, L., R. Lopez-Fandino, A. Olano y M. Villamiel. Study on [beta]-lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability **(2005a)**. *Food Chemistry*,(4), 93, 689-695.

Jiménez-Castaño, L., M. Villamiel, P.J. Martin-Alvarez, A. Olano y R. Lopez-Fandino. Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of [beta]-lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction **(2005b)**. *Food Hydrocolloids*, (5), 19, 831-837.

Jiménez-Castaño, L., M. Villamiel y R. Lopez-Fandino. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass **(2007)**. *Food Hydrocolloids*, (3), 21, 433-443.

Jing, H. Y D.D. Kitts. Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products **(2002)**. *Food and Chemical Toxicology*, (7), 40, 1007-1015.

Kamil, J.Y.V.A., Y-J. Jeon y F. Shahidi. Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*) **(2002)**. *Food Chemistry*, (1), 79, 69-77.

Kanatt, S.R., R. Chander y A. Sharma. Chitosan glucose complex – A novel food preservative **(2008)**. *Food Chem*, (2), 106, 521-528.

Kasaai, Mohammad R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy **(2008)**. *Carbohydrate Polymers*, (4),71, 497-508.

Katayama, S., J. Shima y H. Saeki. Solubility Improvement of Shellfish Muscle Proteins by Reaction with Glucose and Its Soluble State in Low-Ionic-Strength Medium **(2002)**. *J.Agric. Food Chem*, (15), 50, 4327-4332.

Kato, Y., T. Matsuda, N. Kato, K. Watanabe y R. Nakamura. Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses **(1986)**. *J.Agric. Food Chem*, (2), 34, 351-355.

Kato, H., F. Hayase, D.B Shin, M. Oimomi, y S. Baba. 3-Deoxyglucosone, an intermediate product of the Maillard reaction **(1989)**. *Progress in clinical and biological research*, 304, 69–84.

Kato, A.R. Mifuru. N. Matsudomi, K. y Kobayashi, K. Functional Casein-Polysaccharide Conjugates Prepared By Controlled Dry Heating **(1992)**. *Biosci. Biotech. Biochem*, (4), 56, 567-571.

Kato, A. Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates **(2002)**. *Food Sci. Technol. Res*,(3), 8, 193-199.

KFDA. Korea Food and Drug Administration **(1995)**. *Additive Code*.

Khare, A.R. y Peppas N.A. Proton magnetic resonance imaging in hydrogels:Volume phase transition in poly (N-isopropylacrylamide) **(1993)**. *Polymer*, 34, 4736-4739.

- Kim, Se-Kwon y N. Rajapakse. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review (2005). *Carbohydr. Polym*, (4), 62, 357-368.
- Kim, Kyung W. y R.L. Thomas. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights (2007). *Food Chemistry*, (1),101, 308-313.
- Kim, Kyung W., B.J. Min, Y-T Kim, R.M. Kimmel, K. Cooksey y S.I. Park. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights (2011). *LWT - Food Science and Technology*, (2), 44, 565-569.
- Kinsella, J.E. Y C.V. Morr. Milk proteins: Physicochemical and functional properties (1984). *CRC Crit. Rev. Food Sci Nutr*, (3), 21, 197-262.
- Kittur, F.S., A.B.V. Kumar, L.R. Gowda y R.N. Tharanathan. Chitosan analysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger*-A non-specific activity ( 2003a). *Carbohydrate Polymers*, (2), 53, 191-196.
- Kittur, F.S., A.B.V. Kumar y R.N. Tharanathan. Low molecular weight chitosans-preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization (2003b). *Carbohydrate Research*, (12), 338, 1283-1290.
- Kittur, F.S., A.B.V. Kumar, M.C. Varadaraj y R.N. Tharanathan. Chitoooligosaccharides-preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity (2005). *Carbohydrate Research*, (6), 340, 1239-1245.
- Knaul, J.Z., S.M. Hudson y K.A.M. Creber. Improved mechanical properties of chitosan fibers (1999). *J Appl Polym Sci*, (13), 72, 1721-1732.
- Kong, M., X.G. Chen, C.S. Liu, C.G. Liu, X.H. Meng y J. Yu Le. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli* (2008). *SURF B*, (2), 65, 197-202.
- Kong, M., X.G. Chen, K. Xing y H.J. Park. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review (2010). *Int. J. Food Microbiol*, (1), 144, 51-63.
- Kowalczyk, J., J. Tritt-Goc y N. Pislewski. The swelling properties of hydroxypropyl methyl cellulose loaded with tetracycline hydrochloride: magnetic resonance imaging study (2004). *Solid State Nucl. Magn. Reson*, (1-3), 25, 35-41.
- Kuo, T.M., J.F. Vanmiddlesworth y W.J. Wolf. Content of raffinoseoligosaccharides and sucrose in various plant seeds (1988). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 32-36.
- Kurita, K., T. Sannan y Y. Iwakura. Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses (1977). *Die Makromolekulare Chemie*, (12), 178, 3197-3202.

- Kurita, K., M. Kamiya y S-I. Nishimura. Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial N-Acetylation of chitosan to develop solubility (1991). *Carbohydr. Polym.*(1), 16, 83-92.
- Kurita, K. Chemistry and application of chitin and chitosan (1998). *Polymer Degradation and Stability Biodegradable Polymers and Macromolecules*, (1-3), 59,117-120.
- Kurita, K., Y. Kaji, T. Mori y Y. Nishiyama. Enzymatic degradation of  $\alpha$ -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation (2000). *Carbohydr. Polym.* (1), 42, 19-21.
- Kuroiwa, T., Y. Noguchi, M. Nakajima, S. Sato, S. Mukataka y S. Ichikawa. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles (2008). *Process Biochemistry*, (1), 43, 62-69.
- Kuroiwa, T., H. Izuta, H. Nabetani, M. Nakajima, S. Sato, S. Mukataka y S. Ichikawa. Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor (2009). *Process Biochemistry*, (3), 44, 283-287.
- Labuza, T.P. Properties of water as related to the keeping quality of foods (1970). *Proceedings of the Third International Congress of Food Science and Technology*, 618-635.
- Labuza, T.P. y M. Saltmarch. Kinetics of Browning and Protein Quality Loss in Whey Powders During Steady State and Nonsteady State Storage Conditions (1982). *J. Food Sci.*(1), 47, 92-96.
- Labuza, T.P. y Baisier, W.M. The kinetics of nonenzymatic browning (1992). 595-689.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, (1970). *Nature*, 227, 680-685.
- Lamarque, G., J-M. Lucas, C. Viton y A. Domard. Physicochemical Behavior of Homogeneous Series of Acetylated Chitosans in Aqueous Solution: Role of Various Structural Parameters (2005). *Biomacromolecules*,(1), 6, 131-142.
- Ledl, Franzy E. Schleicher. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body, (1990). *Angewandte Chemie International Edition in English*, (6), 29, 565-594.
- Lee, H-W., Y-S. Park, J-S. Jung y W-S. Shin. Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus sp. (2002). *Anaerobe*, (6), 8, 319-324.
- Lerici, C.R., D. Barbanti, M. Manzano y S. Cherubin. Early indicators of chemical changes in foods due to enzymic or nonenzymic browning reactions. 1: study on heat treated model systems (1990). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23, 289-294.

- Lertittikul, W., S. Benjakul y M. Tanaka. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH (2007). *Food Chem*,(2), 100, 669-677.
- Li, C.P., H. Enomoto, S. Ohki, H. Ohtomo, y T. Aoki, T. Improvement of Functional Properties of Whey Protein Isolate Through Glycation and Phosphorylation by Dry Heating (2005). *J. Dairy Sci.*88, (12), 4137-4145.
- Li, J., Y. Du y H. Liang. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme (2007). *Polym. Degrad. Stab*, (3), 92, 515-524.
- Li, Y., F. Lu, C. Luo, Z. Chen, J. Mao, C. Shoemaker y F. Zhong. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar (2009). *Food Chemistry*, (1), 117, 69-74.
- Li, X-F, X-Q Feng, S. Yang, G-Q Fu, T-P Wang y Z-X Su. Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism (2010). *Carbohydr. Polym*, (3),79, 493-499.
- Lim, L.Y., E. Khor, y C.E. Lin. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan (1999). *J. Biomed. Mater. Res. (Appl Biomater)*,(2), 48, 111-116.
- Lim, S-H. y S.M. Hudson. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group (2004). *Carbohydr. Res*, (2), 339, 313-319.
- Lin, Shih-Bin, Y-C. Lin y H-H. Chen. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity (2009a). *Food Chem*, (1), 116, 47-53.
- Lin, Yu-Wei, Y-C. Hsiao y B-H. Chiang. Production of high degree polymerized chitooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from *Bacillus cereus* (2009b). *Food Res. Int*, (9), 42, 1355-1361.
- Liu, H.C., W.L. Chen y S.J.T. Mao. Antioxidant Nature of Bovine Milk - Lactoglobulin (2007). *J. Dairy Sci*, 90, (2), 547-555.
- Liu, J., J. Zhang y W. Xia. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo (2008). *Food Chemistry*, (1), 107, 419-425.
- MacFarlane, S., MacFarlane, G.T. Food and the large intestine (2003). 24-51.
- Macfarlane, G.T., H. Steed y S. Macfarlane. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics (2008). *J.Appl. Microbiol*, (2), 104, 305-344.
- Maillard, L-C. Action des acides amines sur les sucres. Formation des melanoidins par voie methodiqué (1912). *Compt. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci*, 154, 66-68.

- Maillard, M., C. Billaud, Y. Chow, C. Ordonaud y J. Nicolas. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems (2007). *LWT - Food Science and Technology* (8), 40, 1434-1444.
- Manzocco, L., S. Calligaris, D. Mastrocola, M.C. Nicoli y C.R. Lerici. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods (2000). *Trends Food Sci. Technol.* (9-10), 11, 340-346.
- Marcil, V., E. Delvin, E. Seidman, L. Poitras, M. Zoltowska, C. Garofalo y E. Levy. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate (2002). *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, (2), 283, G340-G346.
- Mariette, F. Investigations of food colloids by NMR and MRI (2009). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (3), 14, 203-211.
- Martins, S.I.F.S. Y A.J.S. Martinus van Boekel. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction (2003). *Food Chem*, (1), 83, 135-142.
- Matemu, A.O., H. Kayahara, H. Murasawa y S. Nakamura. Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey (2009). *Food Chem*, (4), 114, 1328-1334.
- Matsuda, T., Y. Kato y R. Nakamura. Lysine loss and polymerization of bovine - lactoglobulin by amino carbonyl reaction with lactulose (4-O-.beta.-D-galactopyranosyl-D-fructose) (1991). *J.Agric. Food Chem*, (7), 39, 1201-1204.
- Matsudomi, N., K. Nakano, A. Soma y A. Ochi. Improvement of Gel Properties of Dried Egg White by Modification with Galactomannan through the Maillard Reaction (2002). *J. Agric. Food Chem*, 50, 4113-4118.
- Mazeau, K., S. Pérez y M. Rinaudo. Predicted Influence of N-Acetyl Group Content on the Conformational Extension of Chitin and Chitosan Chains (2000). *J. Carbohydr. Chem*, (9), 19,1269.
- Mengíbar, M., M. Ganan, B. Miralles, A.V. Carrascosa, A. J. Martínez-Rodríguez, M. G. Peter y A. Heras. Antibacterial activity of products of depolymerization of chitosans with lysozyme and chitosanase against *Campylobacter jejuni* (2011). *Carbohydr. Polym*, (2), 84, 844-848.
- Miralles, B., A. Martínez-Rodríguez, A. Santiago, J. van de Lagemaat y A. Heras. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between [beta]-lactoglobulin and chitosan (2007). *Food Chemistry*, (3), 100, 1071-1075.
- Miralles, B., M. Mengíbar, R. Harris y A. Heras. Suitability of a colorimetric method for the selective determination of chitosan in dietary supplements (2011). *Food Chem* (4), 126, 1836-1839.

- Mishra, S., B. Mann, V.K. Joshi. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin (2001). *Food Hydrocoll*, 15, 9-15.
- Monteiro J., A.C. Oyrton y C. Airoidi. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system (1999). *Int. J. Biol. Macromol*, (2-3), 26, 119-128.
- Montembault, A., C. Viton y A. Domard. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium (2005). *Biomat*, (8), 26, 933-943.
- Morales, F.J. Y S. Jiménez-Pérez. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence (2001). *Food Chem*, (1), 72, 119-125.
- Moreaux, V.B., A. Biorlouez. Degradation of tryptophan in heated  $\beta$ -lactoglobulin-lactose mixtures is associated with intense Maillard reaction (1997). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1905-1910.
- Moreno, F.J., R. López-Fandiño y A. Olano. Characterization and Functional Properties of Lactosyl Caseinomacropetide Conjugates (2002). *J. Agric. Food Chem*, (18), 50, 5179-5184.
- Morgan, F., A. Vénien, S. Bouhallab, D. Mollé, J. Léonil, G. Peltre y D. Leveieux. Modification of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin by Glycation in a Powdered State or in an Aqueous Solution: Immunochemical Characterization (1999a). *J. Agric. Food Chem*, (11), 47, 4543-4548.
- Morgan, F., D. Mollé, G. Henry, A. Vénien, J. Léonil, G. Peltre, D. Leveieux, J-L. Maubois y S. Bouhallab. Glycation of bovine  $\beta$ -Lactoglobulin: effect on the protein structure (1999b). *Int. J. Food Sci. Tech*, (5-6), 34, 429-435.
- Morris, G.A., I.M. Sims, A.J. Robertson y R.H. Furneaux. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glyco-conjugates (2004). *Food Hydrocolloids*, (6), 18, 1007-1014.
- Morris, G.A., J. Castile, A. Smith, G.G. Adams y S.E. Harding. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach (2009). *Carbohydr. Polym* .(4), 76, 616-621.
- Mounsey, J.S., B.T. O'Kennedy, M.A. Fenelon y A. Brodkorb. The effect of heating on  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength (2008). *Food Hydrocolloids*, (1), 22, 63-73.
- Murakami, M., A. Shigeeda, K. Danjo, T. Yamaguchi, H. Takamura y T. Matoba. Radical-Scavenging Activity and Brightly Colored Pigments in the Early Stage of the Maillard Reaction (2002). *J. Food Sci.* (1), 67, 93-96.
- Muzzarelli, R.A.A., W. Xia, M. Tomasetti y P. Ilari. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation (1995). *Enzyme Microb. Technol.* (6), 17, 541-545.

- Muzzarelli, R.A., R. Rocchetti, V. Stanic y Weckx, M. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan (1997).
- Muzzarelli, R.A.A. Colorimetric determination of chitosan (1998). *Analytical Biochemistry*, 260, 255-257.
- Nacka, F., J-M. Chobert, T. Burova, J. Léonil, y T. Haertlé. Induction of New Physicochemical and Functional Properties by the Glycosylation of Whey Proteins (1998). *Journal of Protein Chemistry*, 17, (5), 495-503.
- Nagasawa, K., K. Takahashi y M. Hattori. Improved emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran (1996). *Food Hydrocoll*, (1), 10, 63-67.
- Nakamura, S., A. Kato y K. Kobayashi. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate (1991). *J.Agric. Food Chem*, (4), 39, 647-650.
- Nakamura, S., A. Kato y K. Kobayashi. Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides (1992). *J.Agric. Food Chem*, (11), 40, 2033-2037.
- Nakamura, S. y A. Kato. Multi-functional biopolymer prepared by covalent attachment of galactomannan to egg-white proteins through naturally occurring Maillard reaction (2000). *Nahrung*, 44, 201-206.
- Neiryck, N., P. Van der Meeren, S. Bayarri Gorbe, S. Dierckx y K. Dewettinck. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins (2004). *Food Hydrocoll*, (6), 18, 949-957.
- Nguyen, S., S. Hisiger, M. Jolicoeur, F.M. Winnik y M.D. Buschmann. Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and  $^1\text{H-NMR}$  after semi-preparative SEC (2009). *Carbohydr. Polym*, (4), 75, 636-645.
- No, H.K., N.Y. Park, S.H. Lee y S.P. Meyers. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights (2002). *Int.J. Food Microbiol*, (1-2), 74, 65-72.
- Nordtveit, R.J., K.M. Vårum y O. Smidsrød. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme (1994). *Carbohydr. Polym*, (4), 23, 253-260.
- O'Regan, J. y D.M. Mulvihill. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate hydrolysates: Preparation, characterisation and some functional properties (2010). *Food Chem*, (1), 123, 21-31.
- Ogawa, K. Effect of heating and aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs (1991). *Agric. Biol. Chem*, 55, 2375-2379.
- Ohtakara, A. Chitosanase from *Streptomyces griseus* (1988). *Methods in Enzimology*, 161, 505-510.

- Oliver, C.M., L.D. Melton y R.A. Stanley. Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review (2006). *Critical Reviews in Food Science & Nutrition Critical Reviews in Food Science & Nutrition J1 - Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, (4), 46, 337-350.
- Ostro, M.J. Liposomes (1983).
- Ottøy, M.H., K.M. Vårum, B.E. Christensen, M.W. Anthonsen y O. Smidsrød. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans (1996). *Carbohydr. Polym*, (4), 31, 253-261.
- Painter, T.J. Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs (1998). *Carbohydr. Polym*, (4), 36, 335-347.
- Palacios, L.,P. Lupiola , E. Del Nero y A. Pardo. Primeros resultados del estudio de *Salmonella* en la zona no saturada. Estudios de la Zona No Saturada del Suelo (1999).
- Papineau, A.M., D.G. Hoover, D. Knorr y D.F. Farkas. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure (1991). *Food Biotechnol*, (1), 5, 45-57.
- Park, J.K., K. Shimono, N. Ochiai, K. Shigeru, M. Kurita, Y. Ohta, K. Tanaka, H. Matsuda y M. Kawamukai. Purification, Characterization, and Gene Analysis of a Chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001 (1999). *J. Bacteriol*, (21), 181, 6642-6649.
- Park, S.Y., K.S. Marsh y J.W. Rhim. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents (2002). *Journal of Food*, 64, 194-197.
- Park, P., J. Je y S. Kim. Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Hetero-Chitoooligosaccharides Prepared from Partially Different Deacetylated Chitosans (2003a). *J. Agric. Food Chem*,(17), 51, 4930-4934.
- Park, P., J.Je y S. Kim. Free Radical Scavenging Activity of Chitoooligosaccharides by Electron Spin Resonance Spectrometry (2003b). *J. Agric. Food Chem*, (16), 51, 4624-4627.
- Park, P-J., J-Y. Je y S-K. Kim. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer (2004a). *Carbohydrate Polymers*, (1), 55, 17-22.
- Park, S.I., M.A. Daeschely Y. Zhao. Functional properties of antimicrobial lysozyme chitosan composite films (2004b). *Journal of Food Science*, 69, 215-221.
- Pellegrino, L., I. De Noni y P. Resmini. Coupling of lactulose and furosine indices for quality evaluation of sterilized milk (1995). *Int. Dairy J*, (7), 5, 647-659.

- Peng, C., Y. Wang y Y. Tang. Synthesis of crosslinked chitosan-crown ethers and evaluation of these products as adsorbents for metal ions (1998). *J Appl Polym Sci*, (3), 70, 501-506.
- Peppas, N.A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals.(1986).1.
- Pérez, O.E., V. Wargon y A.M.R. Pilosof. Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures (2006). *Food Hydrocoll*, (7), 20, 966-974.
- Petriella, C., S.L. Resnik, R.D. Lozano y J. Chirife. Kinetics of Deteriorative Reactions in Model Food Systems of High Water Activity: Color Changes Due to Nonenzymatic Browning (1985). *J. Food Sci*, (3), 50, 622-626.
- Phillips, L.G., D.M. Whitehead y J.E. Kinsella. Functional properties of proteins (1994). 107-169.
- Pierce, K.N. y J.E. Kinsella. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique (1978). *J. Agric. Food Chem*, 26, 716.
- Pulido, R., L. Bravo y F. Saura-Calixto. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay (2000). *J. Agric. Food Chem*, (8), 48, 3396-3402.
- Qu, X., A. Wirsén y A-C.Albertsson. Structural change and swelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid (1999). *J Appl Polym Sci*, (13), 74, 3186-3192.
- Raafat, D., K. von Bargaen, A. Haas y H-G. Sahl. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound (2008). *Appl. Environ. Microbiol*, (12), 74, 3764-3773.
- Rabiu, B.A., A.J. Jay, G.R. Gibson y R.A. Rastall. Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by {beta}-Galactosidases from Bifidobacterium Species (2001). *Appl. Environ. Microbiol*, (6), 67, 2526-2530.
- Rafique\*, R., A.H.V. Schapira y J.M. Cooper. Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Ageing; Influence of Vitamin E Deficiency (2004). *Free Radic. Res*, (2), 38, 157-165.
- Reddy, I.M., N.K. D. Kella y J.E. Kinsella. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion (1988). *J.Agric. Food Chem*, (4), 36, 737-741.
- Renard, D., J. Lefebvre, M.C.A Griffffin, W.G. Griffin W.G. Effects of pH salt environment on the association of  $\beta$ - lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies (1998). *Biological Macromolecules*, 22, 41-49.

- Rinaudo, M., M. Milas y P.L. Dung. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion(1993). *Int. J.Biol. Macromol*, (5), 15, 281-285.
- Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications (2006). *Progress in Polymer Science*, (7), 31, 603-632.
- Rizzi, George P. Chemical structure of colored maillard reaction products (1997). *Food Rev. Int*, (1), 13, 1-28.
- Roberfroid ,Marcel B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients (2007). *The Journal of Nutrition*, (11), 137, 2493S-2502S.
- Roberts, G.A.F. The Formation of Gels by Reaction of Chitosan with Gluteraldehyde (1989), 190, 951-960.
- Roberts, G.A.F y Julian G. Domszy. Determination of the viscometric constants for chitosan (1982). *Int. J.Biol. Macromol*, (6), 4, 374-377.
- Rodríguez, M.S., L.E. Albertengo y E. Agulló. Emulsification capacity and hypolipidemic effect of chitosan (2000). *Libro: Chitosan per os: from dietary supplement to drug carrier*. Editor: R.A.A. Muzzarelli. Atec, Grottamare. 77-93.
- Rodríguez, M.S., L.A. Albertengo, I. Vitale y E. Agullo. Relationship Between Astringency and Chitosan-Saliva Solutions Turbidity at Different pH (2003). *Journal of Food Science*, (2), 68, 665-667.
- Rodríguez, R., A. Jiménez, J. Fernández-Bolaños, R. Guillén y A. Heredia. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients (2006). *Trends Food Sci. Technol*, (1), 17, 3-15.
- Roncal, T., A. Oviedo, I.L. de Armentia, L. Fernández y M. C. Villarán. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan (2007). *Carbohydr. Res*, (18), 342, 2750-2756.
- Rufian-Henares, J.A., E. Guerra-Hernández y B. García-Villanova. Maillard reaction in enteral formula processing: furosine, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, and fluorescence (2002). *Food Res. Int*, (6), 35, 527-533.
- Rufian-Henares, J.A., B. García-Villanova y E. Guerra-Hernández. Generation of Furosine and Color in Infant/Enteral Formula-Resembling Systems (2004). *J.Agric. Food Chem*, (17), 52, 5354-5358.
- Rupérez, P. Oligosacáridos bifidogénicos (1998). *Food Science and Technology International*, (4), 4, 237-243.
- Saeki, H. y K. Inoue. Improved Solubility of Carp Myofibrillar Proteins in Low Ionic Strength Medium by Glycosylation (1997). *J.Agric. Food Chem*.(9), 45, 3419-3422.

- Sagoo, S.K., R. Board y S. Roller. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts (2002). *Lett. Appl. Microbiol*, (3), 34, 168-172.
- Saitô, H., T. Mamizuka, R. Tabetay S. Hirano. High resolution  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of chitin oligomers in aqueous solution (1981). *Chemical Letters*, 118, 1483-1484.
- Sannan, T., K. Kurita y Y. Iwakura. Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting (1975). *Die Makromolekulare Chemie*, (4), 176, 1191-1195.
- Sannan, T., K. Kurita y Y. Iwakura. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility (1976). *Die Makromolekulare Chemie*, (12), 177, 3589-3600.
- Sanz, M.L., G.L. Côté, G.R. Gibson y R.A. Rastall. Influence Of Glycosidic Linkages and Molecular Weight On The Fermentation Of Maltose-Based Oligosaccharides By Gut Bacteria (2006). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9779-9784.
- Sashiwa, H., H. Saimoto, Y. Shigemasa, R. Ogawa y S. Tokura. Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin (1990). *Int. J. Biol. Macromol*, (5), 12, 295-296.
- Sato, R., T. Sawabe, H. Kishimura, K. Hayashi y H. Saeki. Preparation of Neoglycoprotein from Carp Myofibrillar Protein and Alginate Oligosaccharide: Improved Solubility in Low Ionic Strength Medium (2000). *J. Agric. Food Chem*, (1), 48, 17-21.
- Sattar K.M.A., E. Babiker, H. Azakami y A. Kato, A. Molecular Mechanism of the Excellent Emulsifying Properties of Phosvitin-Galactomannan Conjugate (1999). *J. Agric. Food Chem*, 47, 2262-2266.
- Schaller, B. Retracted: Prospects for the future: the role of free radicals in the treatment of stroke (2005). *Free Radical Biology and Medicine*, (4), 38, 411-425.
- Schatz, C., P. Sorlier, C. Viton y A. Domard. Relation Between the Cationicity of Glucosamine Residues and the Interactions Involving Chitin and Chitosan (2003). *Chem Inform*, (39), 34.
- Schieber, A., F.C. Stintzing y R. Carle. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments (2001). *Trends Food Sci. Technol*, (11), 12, 401-413.
- Schmitt, C., da S. Palma, C. Bovay, S. Rami-Shojaei, P. Frossard, E. Kolodziejczyk y M.E. Leser. Effect of Time on the Interfacial and Foaming Properties of - Lactoglobulin/Acacia Gum Electrostatic Complexes and Coacervates at pH 4.2 (2005) *Langmuir*, (17), 21, 7786-7795.
- Schulz, P.C., M.S. Rodríguez, L.F. Del Blanco, M. Pistonesi y E. Agulló. Emulsification properties of chitosan (1998). *Colloid & Polymer Science*, (12), 276, 1159-1165.

- Segall, K.I. y H.D. Goff. Determination of protein surface concentration for emulsions containing a partially crystalline dispersed phase (1999). *Food Hydrocoll*, (4), 13, 291-297.
- Seki, K. y David A. Tirrell. pH-Dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes (1984). *Macromolecules*, (9), 17, 1692-1698.
- Shahidi, F., J.K.V. Arachchi y Y-J. Jeon. Food applications of chitin and chitosans (1999). *Trends in Food Science & Technology*, (2), 10, 37-51.
- Sharp, J.S., J.M. Becker y R.L. Hettich. Analysis of Protein Solvent Accessible Surfaces by Photochemical Oxidation and Mass Spectrometry (2004). *Anal. Chem*, (3), 76, 672-683.
- Shen, S-C., K-C. Tseng y J.S. Wu. An analysis of Maillard reaction products in ethanolic glucose-glycine solution (2007). *Food Chem*, (1), 102, 281-287.
- Shigemasa, Y., K. Saito, H. Sashiwa y H. Saimoto. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins (1994). *Int. J. Biol. Macromol*, (1), 16, 43-49.
- Shimosaka, M., M. Nogawa, X. Wang, M. Kumehara y M. Okazaki. Production of Two Chitosanases from a Chitosan-Assimilating Bacterium, *Acinetobacter* sp. Strain CHB101 (1995). *Appl. Environ. Microbiol*, (2), 61, 438-442.
- Shon, D.H. Chitosan oligosaccharides for functional foods and microbial enrichment of chitosan oligosaccharides in soy-paste (2001). *Proceedings of the International Workshop on Bioactive Natural Products. The Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED) and the Science Council of Japan*, 56-66.
- Silvan, J.M., J. van de Lagemaat, A. Olano y M.D. del Castillo. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods (2006). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Nutraceuticals Analysis*, (5), 41, 1543-1551.
- Smidsrød, O. y A. Haug. Estimation of the relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths (1971). *Biopolymers*, (7), 10, 1213-1227.
- Soergel, K.H. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications (1994). *Journal of Molecular Medicine*, 72, (10), 742-748.
- Somoza, V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update (2005). *Molecular Nutrition & Food Research*, (7), 49, 663-672.
- Song, Y., E.E. Babiker, M. Usui, A. Saito y A. Kato. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates (2002). *Food Research International*, (5), 35, 459-466.

- Sorlier, P., C. Viton y A. Domard. Relation between Solution Properties and Degree of Acetylation of Chitosan: Role of Aging (2002). *Biomacromolecules*, (6), 3, 1336-1342.
- Stadtman, E.R. Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions (1993). *Annu. Rev. Biochem*, (1), 62, 797-821.
- Stranda, S.P., T. Nordengenb, K. Otgaard. Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria (2002). *Water Research*, 36, 4745-4752.
- Sudarshan, N.R., D.G. Hoover y D. Knorr. Antibacterial action of chitosan (1992). *Food Biotechnol*, (3), 6, 257-272.
- Suh, J., B-Z. Zhu y B. Frei. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide (2003). *Free Radical Biology and Medicine*, (10), 34, 1306-1314.
- Sun, Y., S. Hayakawa, S. Puangmanee y K. Izumori. Chemical properties and antioxidative activity of glycated [ $\alpha$ ]-lactalbumin with a rare sugar, d-allose, by Maillard reaction (2006). *Food Chemistry*, (3), 95, 509-517.
- Sun, T., Q. Yao, D. Zhou y F. Mao. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides (2008). *Bioorg. Med. Chem. Lett*, (21), 18, 5774-5776.
- Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki y M. Suzuki. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose (1986). *Carbohydr. Res*, 151, 403-408.
- Takahashia, T., M. Imaia, I. Suzukia y J. Sawai. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated by the deacetylation degree (2008). *Biochemical Engineering Journal*, 40, 485-491.
- Tanabe, M. y H. Saeki. Effect of Maillard Reaction with Glucose and Ribose on Solubility at Low Ionic Strength and Filament-Forming Ability of Fish Myosin (2001). *J. Agric. Food Chem*, (7), 49, 3403-3407.
- Tanabe T., M. Kazuko, F. Tamo y M. Masaru. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity (2003). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, (2), 67, 354-364.
- Tang, H., P. Zhang, T.L. Kieft, S.J. Ryan, S.M. Baker, W.P. Wiesmann y S. Rogelj. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria (2010). *Acta Biomaterialia*, (7), 6, 2562-2571.
- Tenorio MD., I. Espinosa-Martos, G. Préstamo y P. Rupérez. Soybean whey enhances mineral balance and caecal fermentation in rats (2010). *European Journal of Nutrition*, 49, 155-163.
- Tharanathan, R.N. Y F.S. Kittur. Chitin-The Undisputed Biomolecule of Great Potential (2003). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (1), 43.61-87.

- Thomas, M.E.C., J. Shcer, S. Desobry-Banon y S. Desobry. Milk powders aging: Effect on physical and functional properties (2004), 44, 297-322.
- Thornalley, P.J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy (1996). *General Pharmacology: The Vascular System*, (4), 27, 565-573.
- Tikhonov, V.E., L.A. Radigina y Y.A. Yamskov. Metal-chelating chitin derivatives via reaction of chitosan with nitrilotriacetic acid (1996). *Carbohydr. Res*, (1), 290, 33-41.
- Toffey, A., G. Samaranayake, C.E. Frazier y W.G. Glasser, W.G. Chitin derivatives. I. Kinetics of the heat-induced conversion of chitosan to chitin (1996). *Journal of Applied Polymer Science*, (1), 60, 7585.
- Tokura, S., K. Ueno, S. Miyazaki y N. Nishi. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan (1997). *Macromolecular Symposia*, 120, 1-9.
- Tolaimate, A., J. Desbrières, M. Rhazi, A. Alagui, M. Vincendon y P. Vottero. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin (2000). *Polymer*, (7), 41, 2463-2469.
- Tombs, M.P. y S.E. Harding. Polysaccharide biotechnology (1998). 144-151.
- Tommeraaas, K., K.M. Varum, B.E. Christensen y O. Smidsrod. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans (2001). *Carbohydrate Research*, (2), 333, 137-144.
- Tressl, R., C. Nittka, E. Kersten y D. Rewicki. Formation of Isoleucine-Specific Maillard Products from [1-13C]-D-Glucose and [1-13C]-D-Fructose (1995). *J. Agric. Food Chem*, (5), 43, 1163-1169.
- Tressl, R., G.T. Wondrak, L. Garbe, R. Kruger y D. Rewicki. Pentoses and Hexoses as Sources of New Melanoidin-like Maillard Polymers (1998). *J. Agric. Food Chem*, (5), 46, 1765-1776.
- Tritt-Goc, J. y N. Pislewski. Magnetic resonance imaging study of the swelling kinetics of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in water (2002). *J. Controlled Release*, (1-3), 80, 79-86.
- Tsai, G-J., W-H. Su, H-C. Chen y C-L. Pan. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation (2002). *Fisheries Science*, (1), 68, 170-177.
- Tsai, G-J. y S-P Hwang. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria (2004). *Fisheries Science* (4) 70 675-681.
- Tsaih, M.L. Y R.H. Chen. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan (2003). *J Appl Polym Sci*, (13), 88, 2917-2923.

- Tsukada, K., T. Matsumoto, K. Aizawa, A. Tokoro, R-S Naruse, S. Suzuki y M. Suzuki. Antimetastatic and Growth-inhibitory Effects of N-Acetylchitohexaose in Mice Bearing Lewis Lung Carcinoma, (1990). *Cancer Science*, (3), 81, 259-265.
- Uchida, Y., M. Izume y A. Ohtakara. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application (1989). 372-382.
- Ueno, K., T. Yamaguchi, N. Sakairi, N. Nishi y S. Tokura (1997). *Advances in chitin science*. 156.
- Umemura, K. y S. Kawai. Modification of chitosan by the Maillard reaction using cellulose model compounds (2007). *Carbohydrate Polymers*, (2), 68, 242-248.
- Usui, T., H. Matsui y K. Isobe. Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate (1990). *Carbohydr. Res*, (1), 203, 65-77.
- Usui, M., H. Tamura, K. Nakamura, T. Ogawa, M. Muroshita, H. Azakami, S. Kanuma, y A. Kato. Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation (2004). *Nahrung, Food*, 48, 69-72.
- Vachoud, L., N. Zydowicz y A. Domard. Sorption and desorption studies on chitin gels (2001). *Int. J. Biol. Macromol*, (2), 28, 93-101.
- Van Boekel, M.A.J.S. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review (2001). *Food / Nahrung*, (3), 45, 150-159.
- Vårum, K.M., M.W. Antohonsen, H. Grasdalen y O. Smidsrød. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy (1991). *Carbohydr. Res*, (1), 211, 17-23.
- Vårum, K.M., H.K. Holme, M. Izume, B. Torger Stokke y O. Smidsrød. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans (1996). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, (1), 1291, 5-15.
- Vårum, K.M., M.M. Myhr, R.J.N. Hjerde y O. Smidsrød. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum (1997). *Carbohydr. Res*, (1-2), 299, 99-101.
- Verheul, R.J., M. Amidi, M.J. van Steenberg, E. van Riet, W. Jiskoot y W.E. Hennink. Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and in vitro biological properties of trimethylated chitosans (2009). *Biomaterials*, (18), 30, 3129-3135.
- Vernazza, C.L., G.R. Gibson y R.A. Rastall. In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria (2005). *Carbohydr. Polym* (4) 60 539-545.

- Vishu Kumar, A.B., M.C. Varadaraj, R.G. Lalitha y R.N. Tharanathan. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization (2004a). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, (2), 1670, 137-146.
- Vishu Kumar, A.B., L.R. Gowda y R.N. Tharanathan. Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products (2004b). *European Journal of Biochemistry*, (4), 271, 713-723.
- Vishu Kumar, A.B., M.C. Varadaraj, L.R. Gowda y R.N. Tharanathan. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* (2005). *Biochemistry Journal*, (2), 391, 167-175.
- Vishu Kumar, A.B., M.C. Varadaraj, L.R. Gowda y R.N. Tharanathan. Low molecular weight chitosans—Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* (2007). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, (4), 1770, 495-505.
- Walker, R.A., A.J. Lawson, E.A. Lindsay, L.R. Ward, E.J. Threlfall, P.A. Wright, E.J. Bolton, D.R.A. Wareing, J.D. Corkish y R.H. Davies. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 (2000). *Veterinary Record*, (14), 147, 395-396.
- Wang. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan (1992). *Journal of Food Protection*, 55, 916-919.
- Wang, J., B. Sun, Y. Cao y Y. Tian. Protein glycation inhibitory activity of wheat bran feruloyl oligosaccharides (2009). *Food Chem*, (2), 112, 350-353.
- Wang, T., M. Turhan y S. Gunasekaran. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan? poly(vinyl alcohol) hydrogel (2004). *Polym. Int*, (7), 53, 911-918.
- Wang, W., S. Bo, S. Li y W. Qin. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation (1991). *Int. J. Biol. Macromol*, (5), 13, 281-285.
- Wang, X., Y. Du y H. Liu. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex (2004). *Carbohydr. Polym*, (1), 56, 21-26.
- Weiner, M.L. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients (1992). 663-670.
- Wijewickreme, A.N. Y D.D. Kitts. Influence of Reaction Conditions on the Oxidative Behavior of Model Maillard Reaction Products (1997). *J. Agric. Food Chem*, (12), 45, 4571-4576.
- Wijewickreme, A.N., Z. Krejpcio y D.D. Kitts. Hydroxyl Scavenging Activity of Glucose, Fructose, and Ribose-Lysine Model Maillard Products (1999). *J. Food Sci*, (3), 64, 457-461.

- Wolever, T.M.S., J. Fernandes y A.V. Rao. Serum Acetate:Propionate Ratio Is Related to Serum Cholesterol in Men but Not Women (1996). *The Journal of Nutrition* (11), 126, 2790-2797.
- Wooster, T.J. Y M.A. Augustin. [beta]-Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability (2006) . *Journal of Colloid and Interface Science*, (2), 303, 564-572.
- Wyatt PJ. *Combined differential light scattering with various liquid chromatography separation techniques*, (1992). 35-38.
- Xia,W., P. Liu y J. Liu. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases (2008). *Bioresour. Technol*, (15), 99, 6751-6762.
- Xie, W., P. Xu y Q. Liu. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives (2001). *Bioorg. Med. Chem. Lett*, (13), 11, 1699-1701.
- Xie,Y., J. Hu, Y. Wei y X. Hong. Preparation of chitooligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan (2009). *Polym. Degrad. Stab*, (10), 94, 1895-1899.
- Xing, R., H. Yu, S. Liu, W. Zhang, Q. Zhang, Z. Li y P. Li. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro (2005). *Bioorg. Med. Chem*,(4), 13, 1387-1392.
- Yalpani, M. y L.D. Hall. Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. III. Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives (1984). *Macromolecules*, (3), 17, 272-281.
- Yaylayan, V.A. Y E. Kaminsky. Isolation and structural analysis of maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system (1998). *Food Chem*, (1), 63, 25-31.
- Yeboah, F.K., I. Alli y V.A. Yaylayan. Reactivities of d-glucose and d-fructose during Glycation of Bovine Serum Albumin (1999). *J.Agric. Food Chem*, (8), 47, 3164-3172.
- Yen, G., L. Tsai y J. Lii. Antimutagenic effect of Maillard Browning products obtained from amino acids and sugars (1992). *Food and Chemical Toxicology*, (2), 30, 127-132.
- Yen, G-C. y P-P. Hsieh. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine maillard reaction products (1995). *J.Sci. Food Agric*, (3), 67, 415-420.
- Yin, X.Q., Q. Lin, Q. Zhang, y L.C. Yang, L.C. O<sub>2</sub> scavenging activity of chitosan and its metal complexes (2002). *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 19, 325-328.
- Yoon, J.H. Enzymatic synthesis of chitooligosaccharides in organic cosolvents (2005). *Enzyme Microb. Technol*, (6), 37, 663-668.
- Yoshimura, Y., T. Iijima, T. Watanabe y H. Nakazawa. Antioxidative Effect of Maillard Reaction Products Using Glucosa-Glycine Model System (1997). *J.Agric. Food Chem*, (10), 45, 4106-4109.

Zeng, L., C. Qin, W. Chi, L. Wang, Z. Ku y W. Li. Browning of chitoooligomers and their optimum preservation (2007). *Carbohydrate Polymers*, (4), 67, 551-558.

Zhang, H. y S.H. Neau. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation (2001). *Biomaterials*, (12), 22, 1653-1658.

Zheng L-Y. J.-F. Zhu. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights (2003). *Carbohydr. Polym.*(4), 54, 527-530.

Zhong, Z., R. Xing, S. Liu, L. Wang, S. Cai y P. Li. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro (2008). *Carbohydr. Res*, (3), 343, 566-570.

Zhu, X.Y., J.M. Wu y Z.S. Jia. Superoxide anion radical scavenging ability of quaternary ammonium salt of chitosan (2004). *Chin. Chem. Lett*, (7), 15, 808-810.

Zivanovic, S., C.C. Basurto, S. Chi, P.M. Davidson y J. Weiss. Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions (2004). *Journal of Food Protection*, 67, 952-959.





