

## ESTUDIO VISCOSIMÉTRICO DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE QUITOSANO

Cristóbal Lárez Velásquez<sup>a</sup>, Dimas Medina<sup>a</sup>, Enrique Millán Barrios<sup>b</sup>

### RESUMEN

Se estudió la despolimerización enzimática de quitosano (grado de acetilación y masa molar promedio viscoso ( $M_v$ ) de 0,85 y 310 kDa, respectivamente), usando bromelina comercial. La disminución del grado de polimerización promedio viscoso ( $X_v$ ) fue seguida en una solución reguladora de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) a 25 °C. Bajo estas condiciones experimentales es posible correlacionar la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  instantánea con  $M_v$  a través de la ecuación de Mark-Houwink-Saturada. La ecuación de Sano, la cual permite obtener valores de viscosidad intrínseca con una sola medida de la viscosidad relativa y/o de la viscosidad específica, fue usada para obtener valores instantáneos de  $[\eta]$ , los cuales también fueron obtenidos con propósitos comparativos mediante un proceso iterativo utilizando la ecuación de Huggins. La velocidad inicial de despolimerización ( $v_o$ ) fue obtenida a partir de soluciones con diferentes concentraciones de quitosano y una concentración fija de bromelina. La constante de Michaelis-Menten ( $k_M$ ) y la máxima velocidad ( $V_m$ ) se obtuvieron usando la representación de Lineweaver-Burk de la ecuación de Michaelis-Menten para cada conjunto de valores de  $[\eta]$  calculados empleando los procedimientos mencionados. Los mejores parámetros cinéticos para la despolimerización del quitosano ( $k_M = 3,92 \times 10^{-7}$  mol.dL<sup>-1</sup>;  $V_m = 9,09 \times 10^{-8}$  mol.dL<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) se obtuvieron usando la ecuación de Sano.

**Palabras clave:** bromelina; estudios de degradación; quitosano; despolimerización; despolimerización enzimática.

## VISCOSIMETRIC STUDY OF THE ENZYMIC DEPOLYMERIZATION OF CHITOSAN

### ABSTRACT

Enzymatic depolymerization of chitosan (acetylation degree and average viscosimetric molecular weight ( $M_v$ ) of 0,85 and 310 kDa, respectively) was studied using commercial bromelain. Decrease of the average viscosimetric polymerization degree ( $X_v$ ) was followed in a buffer solution of acetic acid (0,3 M)/sodium acetate (0,2 M) at 25 °C. Under these experimental conditions it is possible to relate the instantaneous intrinsic viscosity  $[\eta]$  with  $M_v$  through the Mark-Houwink-Sakurada equation. Equations of Sano, which allow to compute values of intrinsic viscosity with a single measurement of relative and/or specific viscosity, was employed to obtain instantaneous values of  $[\eta]$ , which were also obtained for comparative purpose through an iterative process using Huggins equation. Initial velocity of depolymerization ( $v_o$ ) was obtained from different concentration of chitosan solutions and a

<sup>a</sup> Grupo de Polímeros, Departamento de Química. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101. Venezuela (clarez@ula.ve)

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

fixed bromelain concentration. Michaelis-Menten constant ( $k_M$ ) and maximum velocity ( $V_m$ ) were obtained using the Lineweaver-Burk representation of the Michaelis-Menten equation for each set of  $[\eta]$  calculated employing the procedures mentioned. Best kinetics parameters for chitosan depolymerization ( $k_M = 3,92 \times 10^{-7} \text{ mol.dL}^{-1}$ ;  $V_m = 9,09 \times 10^{-8} \text{ mol.dL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) were obtained when Sano's equation was employed to calculate  $[\eta]$  values.

**Key words:** bromelain; degradation studies; chitosan depolymerization; enzymatic depolymerization

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un uso creciente del biopolímero quitosano en actividades relacionadas con la preservación del medio ambiente y con el cuidado de la salud humana. En este sentido, el quitosano ha sido usado en procesos de tratamiento de aguas (agente floculante, agente coagulante, quelante para metales pesados, recuperación de aceites y proteínas, etc.), preservación de alimentos (películas digeribles para protección de comida rápida, frutas) y en la agricultura (películas para protección de semillas, inductor de resistencia, estimulante del crecimiento, matriz para liberación de agroquímicos, etc.).

En lo que se refiere a las aplicaciones del quitosano, para aprovechar su efecto biocida, se conoce desde hace un buen tiempo que dicho efecto está fuertemente relacionado, entre otros factores, con su masa molar<sup>1,2</sup>, siendo más fuerte por lo general cuando ésta disminuye. Por esta razón, la búsqueda de sistemas sencillos para controlar su despolimerización se ha vuelto un área importante de investigación, que intenta la obtención, a bajo costo, de oligoquitosanos con propiedades adecuadas para su aplicación directa.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos durante los estudios de despolimerización de una muestra de quitosano comercial, usando una enzima de fácil acceso, como la bromelina. Los experimentos se realizaron en condiciones que permitieron seguir la cinética de la reacción y determinar algunos parámetros de importancia en procesos enzimáticos, como la constante de Michaelis-Menten ( $k_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_m$ ).

## PARTE EXPERIMENTAL

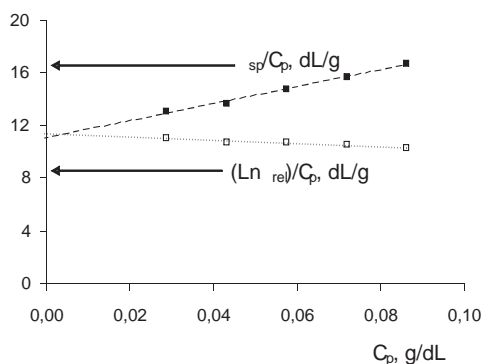
**Reactivos:** el quitosano (Fluka BioChemika, HMW) fue purificado por disolución en ácido acético y su posterior precipitación por neutralización con NaOH (pH 7); luego el biopolímero es filtrado y lavado extensivamente con agua desionizada (Millipore) y secado a 50 °C; la bromelina (Sigma Chemical Co.) fue usada como una solución  $1,01 \times 10^{-5} \text{ g/dL}$  en EDTA (sal disódica dihidratada, JT Baker) 0,0128 M.

**Caracterización del quitosano:** se determinó su  $M_v$  a partir de mediciones viscosimétricas en una solución reguladora de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) usando un viscosímetro tipo Ubbelohde (Canon). La temperatura se mantuvo a 25,0 ± 0,1 °C usando un baño de agua termostatazada (Gallenkamp). El análisis espectroscópico por <sup>1</sup>H-nmr (espectrofotómetro Bruker modelo DRX de 400 MHz; solvente D<sub>2</sub>O/ácido trifluoroacético) arrojó un grado de acetilación de 0,162.

**Estudios cinéticos por viscosimetría capilar:** una cantidad variable de la solución estándar de quitosano (en la solución reguladora) y solución reguladora fresca se cargan en el viscosímetro (a 25°C y en las proporciones preestablecidas); después de la estabilización térmica un volumen fijo de la solución con la enzima (20  $\mu$ l) es introducido en el sistema; se agita e inmediatamente se comienzan a realizar las mediciones viscosimétricas consecutivas a lo largo del tiempo.

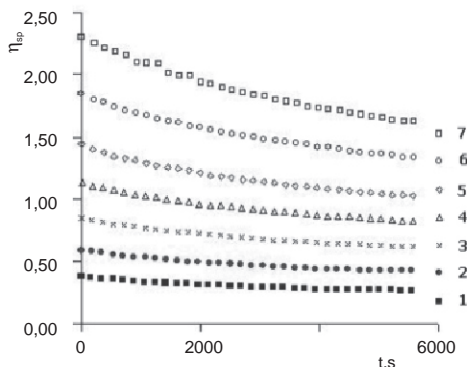
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización del quitosano de partida:** La figura 1 muestra los valores obtenidos para la viscosidad intrínseca del quitosano de partida usando las ecuaciones de Huggins ( $\eta_{sp}/C_p$  vs  $C_p$ ) y de Kraemer ( $(\ln \eta_{rel})/C_p$  vs  $C_p$ ) para evaluar los datos viscosimétricos obtenidos. Debido a que la recta obtenida con la ecuación de Huggins produce un mejor coeficiente de correlación ( $R = 0,9926$ ) se utilizó el valor de  $[\eta]$  obtenido con ésta para el cálculo de la masa molar con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada ( $[\eta] = kM_v^{\alpha}$ ). El valor de  $M_v$  obtenido de esta manera ( $M_v = 310$  kDa) concuerda perfectamente con el encontrado en estudios similares con quitosano de la misma procedencia<sup>3</sup>. El valor de la constante de Huggins, obtenida del mismo gráfico ( $k_H = 0,53$ ), indicó que la muestra no estaba afectada apreciablemente por procesos de agregación.



**Figura 1.** Determinación de la viscosidad intrínseca de la muestra de partida del quitosano estudiado mediante la ecuación de Huggins ( $\eta_{sp}/C_p$  vs  $C_p$ ) y la ecuación de Kraemer ( $(\ln \eta_{rel})/C_p$  vs  $C_p$ ).

**Seguimiento cinético:** En la figura 2 se puede observar la disminución de  $\eta_{sp}$  en el tiempo para soluciones con distintas concentraciones de quitosano (tabla 1) y la misma concentración de bromelina ( $9,48 \times 10^{-6}$  g/dL), en el medio tamponado ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) a 25°C.



**Figura 2.** Variación de la viscosidad específica para soluciones con distintas concentraciones de quitosano y la misma concentración de bromelina en medio tamponado de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) a 25 °C.

Los datos obtenidos en las etapas iniciales de la degradación de cada una de las soluciones fueron utilizados para determinar el valor de la velocidad inicial ( $v_0$ ) de la despolimerización, usando la ecuación de Huggins y el siguiente procedimiento para calcular el valor de la viscosidad intrínseca:

- a) Se coloca la ecuación de Huggins de la forma:

$$[\eta] = \eta_{sp}/c_p - k_H [\eta]^2 c_p \quad (1)$$

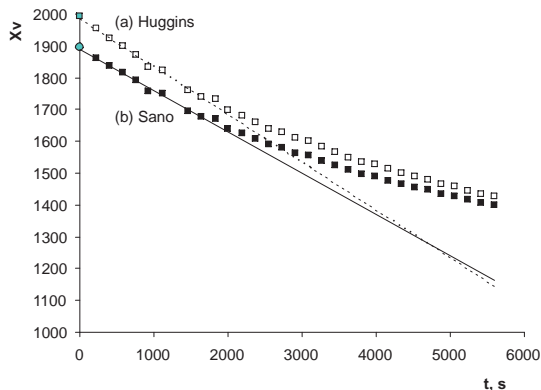
y se trabaja con los valores obtenidos experimentalmente para  $\eta_{sp}/c_p$  y  $k_H$

- b) Se prueban valores de  $[\eta]$  en el lado derecho de la ecuación 1 hasta que se obtenga un valor de  $[\eta]$  en el lado izquierdo igual al introducido como prueba.
- c) Se toma dicho valor como el valor que corresponde a la  $[\eta]$  para la muestra estudiada al tiempo estudiado.

Posteriormente, con los valores instantáneos de  $[\eta]$  obtenidos de la manera descrita en la parte anterior, se calculan los valores del grado de polimerización promedio en número ( $X_n$ ) usando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada para obtener  $M_v$  y dividiendo este valor entre la masa molar promedio de la unidad repetitiva ( $\sim 167,1$  Da). El gráfico de  $X_n$  en función del tiempo de reacción permite obtener el valor de  $v_0$  para cada una de las concentraciones estudiadas utilizando la parte lineal que se obtiene en los estadios iniciales de la reacción.

En la curva (a) de la figura 3 se muestran los resultados obtenidos cuando se analizaron los resultados del seguimiento viscosimétrico para la despolimerización de la solución 1 (tabla 1) utilizando el procedimiento anterior. La pendiente inicial de dicha curva (recta punteada) permite obtener el valor de  $v_0$  de esta solución; los valores de  $v_0$  obtenidos con todas

las soluciones estudiadas, usando el proceso iterativo basado en la ecuación de Huggins, se muestran en la tabla 1.



**Figura 3.** Curvas de  $X_v$  en función del tiempo de reacción para la despolimerización enzimática de una solución de quitosano 0,1149 g/dL con bromelina ( $9,48 \times 10^{-6}$  g/dL) en medio tamponado de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) a 25 °C. Los valores de  $X_v$  se obtuvieron mediante el uso de (a) la ecuación de Huggins y (b) la ecuación de Sano.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos durante la degradación de soluciones de diferente concentración de quitosano y una concentración fija de bromelina ( $9,48 \times 10^{-6}$  g/dL) en el medio regulado de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) a 25 °C. Los valores de  $X_v$  se obtuvieron usando valores de  $[\eta]$  calculados con la ecuación de Huggins (método iterativo)

Muestra	$V_{\text{sol quit est}}$ (ml)	$V_{\text{tampón}}$ (ml)	$C_{\text{po.}}$ ( $\text{mol}_{\text{quit}} \text{dL}^{-1}$ )	$X_v$ inicial	$v_{\text{om}}$ ( $\text{mol}_{\text{ur.}} \text{mol}_{\text{quit}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$v_o$ ( $\text{mol}_{\text{ur.}} \text{dL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$R^2$
1	3,0	9,0	$9,180 \times 10^{-8}$	1875	0,1863	$1,710 \times 10^{-8}$	0,9976
2	4,5	7,5	$1,417 \times 10^{-7}$	1822	0,1655	$2,345 \times 10^{-8}$	0,9889
3	6,0	6,0	$1,863 \times 10^{-7}$	1848	0,1528	$2,846 \times 10^{-8}$	0,9987
4	7,5	4,5	$2,325 \times 10^{-7}$	1851	0,1388	$3,217 \times 10^{-8}$	0,9935
5	9,0	3,0	$2,782 \times 10^{-7}$	1856	0,1480	$4,118 \times 10^{-8}$	0,9906
6	10,5	1,5	$3,123 \times 10^{-7}$	1929	0,1396	$4,360 \times 10^{-8}$	0,9943
7	12,0	0,0	$3,451 \times 10^{-7}$	1995	0,1415	$4,883 \times 10^{-8}$	0,9921

$V_{\text{bromelina inic}} = 20 \text{ L}$ ;  $C_{\text{sol quitosano est}} = 0,1149 \text{ g/dL}$ .

Por otro lado, también es posible analizar los datos viscosimétricos obtenidos usando algunas de las ecuaciones empíricas que se han propuesto para obtener valores de  $[\eta]$  realizando una sola medición viscosimétrica<sup>4-7</sup>, y siguiendo luego el mismo procedimiento anterior, y obtener así los valores de  $X_v$ . En ese sentido, la curva (b) de la figura 3 corresponde

al gráfico de  $X_v$  en función del tiempo para los datos obtenidos durante los estudios de despolimerización de la solución 1 (tabla 2), usando la ecuación 2, propuesta por Sano<sup>4</sup>, para obtener valores instantáneos de  $[\eta]$ .

$$[\eta] = 8[(\eta_{rel})^{1/8} - 1]/c_p \quad (2)$$

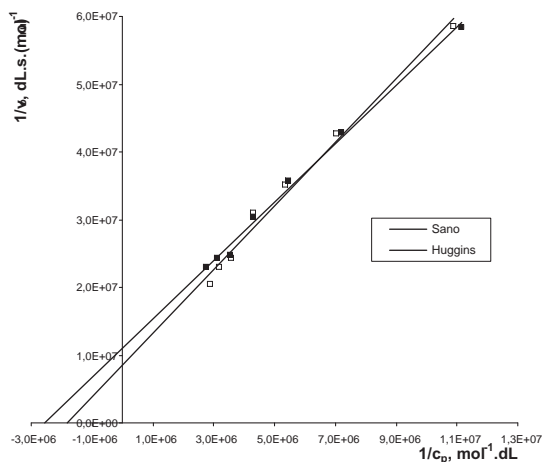
Similarmente al caso anterior la pendiente inicial de dicha curva (recta continua) permite obtener el valor de  $v_o$  de esta solución; los valores de  $v_o$  obtenidos con todas las soluciones estudiadas, usando la ecuación de Sano para calcular valores instantáneos de  $[\eta]$ , se muestran en la tabla 2

**Tabla 2.** Resultados obtenidos durante la degradación de soluciones de diferente concentración de quitosano y una concentración fija de bromelina ( $9.48 \times 10^{-6}$  g/dL) en el medio regulado de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2 M) a 25°C. Los valores de  $X_v$  se obtuvieron con valores de  $[\eta]$  calculados con la ecuación de Sano.

Muestra	V <sub>sol quit est</sub> (ml)	V <sub>tampón</sub> (ml)	C <sub>po.</sub> (mol <sub>quit</sub> dL <sup>-1</sup> )	X <sub>v</sub> inicial	V <sub>om</sub> (mol <sub>ur.</sub> mol <sub>quit</sub> <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	v <sub>o</sub> (mol <sub>ur.</sub> dL <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
1	3,0	9,0	$8,968 \times 10^{-8}$	1916	0,1909	$1,712 \times 10^{-8}$	0,9976
2	4,5	7,5	$1,387 \times 10^{-7}$	1859	0,1684	$2,335 \times 10^{-8}$	0,9924
3	6,0	6,0	$1,836 \times 10^{-7}$	1872	0,1526	$2,801 \times 10^{-8}$	0,9983
4	7,5	4,5	$2,316 \times 10^{-7}$	1855	0,1421	$3,291 \times 10^{-8}$	0,9947
5	9,0	3,0	$2,808 \times 10^{-7}$	1836	0,1442	$4,049 \times 10^{-8}$	0,9920
6	10,5	1,5	$3,211 \times 10^{-7}$	1873	0,1285	$4,126 \times 10^{-8}$	0,9931
7	12,0	0,0	$3,621 \times 10^{-7}$	1898	0,1206	$4,367 \times 10^{-8}$	0,9933

V<sub>bromelina inic</sub> = 20 L; C<sub>sol quitosano stan</sub> = 0,1149 g/dL.

**Determinación de los parámetros cinéticos:** Los valores de  $v_o$  fueron analizados utilizando la ecuación de Michaelis-Menten para obtener los valores de la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_m$ ) de despolimerización. Estos valores se obtuvieron graficando los valores de  $v_o$  derivados de los dos procedimientos empleados mediante la representación de Lineweaver-Burk ( $1/v_o$  vs  $1/C_p$ ), obteniéndose  $V_{max}$  del intercepto (intercepto =  $1/V_{max}$ ) y  $K_M$  de la pendiente  $V_{max}$  (pendiente =  $K_M/V_{max}$ ). La recta punteada de la figura 4 corresponde a los resultados obtenidos usando los valores de  $v_o$  calculados con el método iterativo que emplea la ecuación de Huggins para obtener  $[\eta]$  mientras que la recta (b) corresponde a los resultados derivados del cálculo de  $[\eta]$  usando la ecuación de Sano. En la tabla 3 se muestra un resumen de los datos obtenidos.



**Figura 4.** Representación doble recíproca (Lineweaver-Burk) para la despolimerización de soluciones de quitosano con bromelina en medio tamponado de ácido acético (0,30 M)/acetato de sodio (0,20 M) a 25 °C.

**Tabla 3.** Valores de  $K_M$  and  $V_{max}$  obtenidos durante la despolimerización enzimática con bromelina de soluciones de quitosano en el medio acuoso regulado de ácido acético (0,30 M)/acetato de sodio (0,20 M) a 25°C.

Ecuación usada para calcular $[\eta]$	$K_M$ (mol.dL <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ (mol.dL <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$R^2$
Sano	$3,92 \times 10^{-7}$	$9,09 \times 10^{-8}$	0,9942
Huggins	$5,50 \times 10^{-7}$	$1,17 \times 10^{-7}$	0,9872

Como puede apreciarse de la tabla 3, los valores obtenidos usando la ecuación de Sano para calcular los valores instantáneos de  $[\eta]$ , producen una mejor correlación lineal al ser analizados mediante la representación de Lineweaver-Burk de la ecuación de Michaelis-Menten, lo cual pareciera favorecer su uso en este tipo de estudios a pesar de que el uso de este tipo de ecuaciones empíricas ha sido criticado<sup>8</sup>. Sin embargo, en esta comparación con el proceso iterativo usando la ecuación de Huggins para obtener valores de  $[\eta]$ , la ecuación de Sano parece tomar ventaja del hecho que no depende de considerar otros parámetros; en el caso del procedimiento que hemos empleado con la ecuación de Huggins se considera que el valor de  $k_H$  permanece constante durante la despolimerización, lo cual es una suposición.

## CONCLUSIONES

Se ha estudiado la reacción de despolimerización enzimática de soluciones de quitosano en un medio tamponado, lográndose obtener los principales parámetros cinéticos del sistema cuando los resultados se analizan mediante la ecuación de Michaelis-Menten. La utilización de la ecuación de Sano para el cálculo de los valores instantáneos de la viscosidad intrínseca durante la despolimerización produce resultados menos dispersos que el procedimiento iterativo usando la ecuación de Huggins. Los parámetros cinéticos obtenidos usando la ecuación de Sano fueron  $K_M = 0,12 \text{ g.dl}^{-1}$  y  $V_{\max} = 4,22 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ .

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento del *Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico* de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, a través del Proyecto **C-1307-05-08-B**.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Allan C, Hadwiger H. "The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition". *Exp. Mycol.*, 3, 285-287 (1979).
2. Seo H, Mitsuhashi K, Tanibe H. "Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan". In *Advances in Chitin and Chitosan*. C.J. Brine, P.A. Sandford, J.P. Zikakis *et al.* Eds. Elsevier Science Publ. Ltd, London, 34-40 (1992).
3. Signini R, Campana S. "On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride". *Polymer Bulletin*, 42, 159-166 (1999).
4. Sano, Y. "Viscometric method for determination of Michaelis constant of hyaluronidase on chondroitin sulfate" *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.*, 1, 53-62 (1985).
5. Solomon O, Ciutâ I. "Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité". *J. Appl. Polym. Sci.*, 6(24), 683-686 (1962).
6. Deb P, Chatterjee R. "On polynomial expansion of log relative viscosity" *Die Makromol. Chem.*, 125, 283 (1969).
7. Rao M, Yaseen M. "Determination of intrinsic viscosity by single specific viscosity measurement". *J. Appl. Polym. Sci.*, 31(8), 2501-2508 (1986).
8. Chee K. "A critical evaluation of the single-point determination of intrinsic viscosity". *J. Appl. Polym. Sci.*, 34 (3), 891-899 (1987).