

# **SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE QUITOSANO-G-GMA Y (QUITOSANO-G-GMA)-XANTANA POR *BEAUVERIA BASSIANA* E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR LIZOSIMA.**

**D. Zárate-Triviño<sup>1</sup>, A. Mauricio-Sánchez<sup>1</sup>,  
F. Villaseñor-Ortega<sup>2</sup>, C. Pérez-Pérez<sup>2</sup>, A. Mendoza-Galván<sup>1</sup>  
Nicholas Peppas<sup>3</sup>, G. Luna-Bárcenas<sup>1,\*</sup>**

**<sup>1</sup>Cinvestav Querétaro, Querétaro, Qro. 76230**

**<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, IT-Celaya, Gto., 38010**

**<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, University of Texas, Austin, TX 78712**

## **Introducción**

El National Institute of Neurological Disorders and Stroke reportó que en Estados Unidos entre 10.000 a 12.000 personas sufren de heridas en médula espinal, entre 183.000 y 230.000 personas en viven con una herida o lesión en la médula, El 38,5% de todas las lesiones de la médula espinal ocurre durante accidentes automovilísticos, un 24,5% es causada por lesiones relacionadas con actos de violencia, que, a menudo, involucran armas de fuego y cuchillos. El resto se debe a accidentes deportivos, caídas y accidentes laborales. El 55 % de accidentes de este tipo ocurren en personas jóvenes entre los 16 y los 30 años de edad y la mayoría de las víctimas de las lesiones de la médula espinal son hombres (81.6%). Teniendo en cuenta que este en este país los niveles de seguridad se encuentran muy por encima de los países tercermundistas se puede hacer una perspectiva de la gran cantidad de personas que sufren de traumatismos ya sea cuádrupleja o paraplejia en el mundo, es por esta razón que se hace necesario incursionar en campos nuevos de investigación que permitan desarrollar materiales para la rehabilitación de estas personas.

El laboratorio de Fluidos Súper- Críticos y Biopolímeros de CINVESTAV Querétaro ha desarrollado un copolímero de origen biológico, que ha demostrado poseer buenas propiedades físicas y químicas, este material ha sido probado por el Instituto Nacional de rehabilitación de la Ciudad de México como soporte en la rehabilitación de lesiones de medula espinal realizadas a ratas tipo Wistar, obteniendo crecimiento y recuperación de la movilidad; por esta razón este material se ha postulado como un biomaterial que puede ser una buena posibilidad en el futuro, sin embargo profundizar en otros aspectos como la biodegradabilidad del material fuera del cuerpo y la probabilidad de hidrólisis por sustancias orgánicas, es necesario ya que estos puntos son parte fundamental de las condiciones establecidas para el campo de los materiales de uso biológico.

La contribución de este estudio es conocer si este material puede ser degradado por microorganismos y de esta manera no ser un contaminante recalcitrante, y además comprobar cual es el grado de hidrólisis que puede presentar a causa de fluidos de origen biológico en este caso lisozima.

## **Materiales y métodos**

### **Microorganismo**

Para este estudio se utilizó una cepa de *Beauveria bassiana* 882510 donada y caracterizada por el centro de biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de México Unidad Iztapalapa. La cepa se mantuvo en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 28° C por 7 días, posteriormente se conservó en glicerol al (99% v/v) a -20° C.

### **Medio de Cultivo**

Las pruebas de biodegradación se realizaron en medio líquido 5XM9 modificado con 1 g/l de glucosa como fuente de carbono inicial después de 2 días se reemplazo por 2 g/l de quitosano-g-metacrilato de glicidilo (CTS-GMA) y quitosano-g-GMA-xantana (CTS-GMA-X) haciendo las pruebas con cada biopolímero por separado. Tanto el CTS-GMA como el CTS-GMA-X se esterilizaron por medio de Microsyn.<sup>R</sup>

### **Prueba de Biodegradación**

El medio liquido se inoculo con una solución de esporas de *Beauveria bassiana* removidas con tween 80 al 0.1 % con un orden de  $60 \times 10^7$  esporas por mililitro, la prueba se realizó por quince días incubando las muestras en un agitador mecánico a 28° C y 100 rpm<sup>5</sup>

### **Determinación de actividad enzimática para *Beauveria bassiana***

La actividad enzimática se midió tanto en el extracto enzimático (extracelular) como en la biomasa del microorganismo (intracelular), la separación se realizo por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos y se realizo de forma indirecta determinando proteínas totales por el método de Bradford<sup>6</sup>, usando albúmina de suero bovino como estándar.

### **Prueba de hidrólisis por lizosima**

Tanto al CTS-GMA como al CTS-GMA-X se les adiciono lisozima de huevo comercial (Sigma Chemical co), esta prueba se realizo a 37 ° C y con agitación constante a 180 rpm. Los grupos N-acetyl-B- D glucosamina liberados fueron determinados usando p-nitrofenol N-acetyl-B-D-glucosaminida (Sigma Chemical Co), las concentraciones obtenidas del p-nitrofenol fueron calculadas usando una curva de calibración a 400 mn.<sup>5</sup>

### **Determinación de azúcares liberados**

La hidrólisis se determino por medio de métodos indirectos, la liberación de azúcares reductores se determinó por el método del 3,5 ácido dinitrosalicílico, utilizando glucosa como estándar<sup>1</sup>, el KIT GAGO- 20<sup>R</sup> se utilizo para determinar las cantidades de glucosa liberadas, los azúcares no reductores fueron medidos por el método de Felhing<sup>6</sup>

## Resultados y Discusión

### Prueba de biodegradación

**Tabla 1. Determinación de proteína Extracelular**

MUESTRAS	NUMERACIÓN	BLANCO	ABS1	ABS2	PROMEDIO	ug/ml
Sin esporas-Sin polímero	1.1	S.S.	*	*	*	*
Sin esporas-Sin polímero	1.2		*	*	*	*
Sin esporas-Sin polímero	1.3		*	*	*	*
Esporas-Sin polímero	2.1		0.1567	0.15202	0.15436	*
Esporas-Sin polímero	2.2		0.19065	0.18721	0.18893	*
Esporas-Sin polímero	2.3		0.19039	0.17315	0.18177	*
Esporas + polímero	3.1		0.49521	0.4241	0.459655	2.92311047
Esporas + polímero	3.2		0.34879	0.31375	0.33127	*
Esporas + polímero	3.3		0.43834	0.39688	0.41761	1.70087209
Esporas + polímero	3.4		0.36969	0.33363	0.35166	*
Medio + polímero	4.1		0.31866	0.31786	0.31826	*

\*muestras en las que no fue detectada proteína

**Tabla 2. Determinación de proteína Intracelular**

MUESTRAS	NUMERACIÓN	BLANCO	ABS1	ABS2	ABS3	PROMEDIO	ug/ml
Esporas-Sin polímero	2.1	S.S.	*	0.11064	0.11906	0.11485	
Esporas-Sin polímero	2.3		0.10604	*	*	0.10604	
Esporas + polímero	3.1		0.36332	0.35756	0.36721	0.36269667	0.36269667
Esporas + polímero	3.3		0.3291	0.33103	0.3396	0.33324333	0.33324333
Medio+ polímero	4.1		0.20602	0.19374	0.18051	0.19342333	0.19342333

\*muestras en las que no fue detectada proteína

En el desarrollo de esta prueba la esterilización del CTS-GMA pudo ser un factor determinante en los resultados, ya que el material no se pudo esterilizar por calor debido a que bajo condiciones de autoclave el material puede modificarse, por lo que se determino que para esta prueba el material podía esterilizarse utilizando un agente antimicrobiano Mycosin<sup>R</sup> y luego retirar con agua destilada estéril, sin embargo este agente pudo inhibir en parte el crecimiento del hongo y de igual manera la producción enzimática.

*Beauveria bassiana* fue capaz de crecer en medio mínimo M9 modificado con 1 g/l de glucosa lo que indica que el crecimiento del microorganismo fue de tipo diauxico, como se observa en la Tabla 1, la cantidad mayor de proteína detectada para las muestras que contienen el microorganismo y polímero es de 2.92 µg/ml a nivel extracelular, lo que indica que el microorganismo en presencia de el CTS-GMA puede producir enzimas posiblemente de origen quitinolítico.

Como se puede observar en las tablas 1 y 2 al determinar la proteína de origen intracelular y extracelular se comprobó que la exoenzima fue producida en mayor cantidad, esto debido

a *Beauveria bassiana* requiere mayor cantidad de energía y por lo tanto una fuente de carbono sencilla para producir enzimas intracelulares,<sup>8</sup> el CTS-GMA utilizado en esta prueba, es una fuente de carbono compleja para el microorganismo y por lo tanto la producción enzimática sí debe ser en su mayoría extracelular, ya que el microorganismo en presencia de este material debe producir enzimas que puedan degradar las moléculas grandes y de esta manera obtener moléculas pequeñas para tomarlas como fuente de carbono, de esta manera *Beauveria bassiana* requiere menor cantidad de energía para metabolizar la fuente de carbono.

Actualmente se están realizando las pruebas de biodegradación de quitosano, CTS-GMA-X con *Beauveria bassiana* y la prueba de hidrólisis de los mismos materiales con lisozima de clara de huevo, se espera obtener la totalidad de los resultados en un periodo máximo de un mes.

## Conclusiones

- *Beauveria Bassiana* presento crecimiento diauxico al adicionar como fuente de carbono inicial 1 g/l de glucosa y posteriormente 0.2g/l de CTS-GMA
- El microorganismo puede desarrollarse en medio mínimo M9, ya que las cantidades de sales si pueden dar el mantenimiento mínimo de la cepa.
- Se determino proteína total por medio del método de Bradford obteniendo que *Beauveria Bassiana* produjo enzimas tanto intracelulares como extracelulares para la degradación del polímero en cuestión.
- Se comprobó que la cantidad de enzima intercelular fue menor que la cantidad de enzima extracelular.

## Agradecimientos

Al Cinvestav Querétaro y a el Instituto Tecnológico de Celaya por su apoyo económico, y logístico.

## Bibliografía

1. A. Pedroza, J. Arias y R. Poutou, Tecnología de las fermentaciones. Editorial CEJA. Bogotá, Colombia 1999.
2. E. A. Elizalde-Peña, G. Luna-Bárcenas, A. Martínez-Ruvalcaba, S. Nuño-Donlucas, N. Flores-Ramírez, S. Vásquez-García, A. A. Gutiérrez-López, J. González-Hernández, Synthesis and Characterization of Chitosan-GMA-Xanthan Hydrogel, (2005) *in press*
3. E. A. Elizalde-Peña (1), M. E. Ortega-De Santiago(1), G. Luna-Bárcenas(1), N. Flores-Ramírez(2), A. Gutiérrez-López(3), A. Nuño-Licona(3), J. González-Hernández(4), Behavior of Hybrids Materials Chitosan-Glycidyl Methacrylate-Xanthan in Live Organisms (2006), *submitted*.
4. En Internet: [http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat\\_Fak\\_IV](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV)
5. J. Barranco, R. Alatorre, M. Gutiérrez, G. Viniegra y G. Saucedo. *Enzyme and Microbial Thechnology*. 2002; 30: 910-915
6. M. Bradford. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-254.
7. N. Flores-Ramírez, E. A. Elizalde-Peña, S. R. Vásquez-García, J. González-Hernández, A. Martínez-Ruvalcaba, I. C. Sanchez, G. Luna-Bárcenas and R. B Gupta., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 16 (4), 473 (2005).
8. R. Smith y E. Grula, *Journal of Invertebrate Pathology*. 1983; 42: 319-326.