

QUITOSANO N-ACILADO CON CINAMALDEHÍDO: UN POTENCIAL BIOPLAGUICIDA CONTRA AGENTES PATÓGENOS EN EL CAMPO AGRÍCOLA

Gina Porras¹, Marco Calvo¹, Marianelly Esquivel², María Sibaja², Sergio Madrigal-Carballo^{2*}

1) Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnologías Químicas (LIDETEQ)

2) Laboratorio de Investigación de Polímeros (POLIUNA), Escuela de Química, Universidad Nacional, 86-3000 Heredia, Costa Rica. smadriga@una.ac.cr

Recibido: Enero 2008; Aceptado: Abril 2009

RESUMEN

El quitosano y algunos de sus derivados han presentado muchas ventajas en el campo agrícola, especialmente en el manejo y control de plagas, debido a su elevada actividad antibacteriana, amplio espectro de actividad, altas tasas de mortalidad y baja toxicidad. Este trabajo plantea la síntesis de un derivado de quitosano N-acilado con potenciales propiedades antimicrobianas y biodegradables; utilizando un aldehído aromático de origen natural (cinnamaldehído) como agente acilante sobre una matriz también natural como es el caso del quitosano. La presencia de grupos amino de tipo primario con un par de electrones libres en el quitosano, le confiere características de poderoso nucleófilo, permitiéndole reaccionar en forma efectiva con la mayoría de aldehídos, por medio de un mecanismo de base de Schiff. Debido a lo anterior, es posible lograr la unión del quitosano con el cinnamaldehído, dando como resultado la formación de un compuesto derivado del quitosano del tipo N-acilado.

El análisis de los resultados se realizó por medio de una comparación entre los espectros FTIR y ¹H-NMR de las muestras de quitosano modificadas con cinnamaldehído, con el objetivo de dar seguimiento a la banda correspondiente a la formación del grupo imina (N=C) y señales atribuibles a estructuras aromáticas, respectivamente. Asimismo, la técnica de ¹H-NMR permitió determinar el grado de sustitución del derivado obtenido en el proceso de reacción. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los derivados de quitosano N-acilados con cinnamaldehído, se llevó a cabo utilizando el método de difusión en un disco. Para el desarrollo de estos ensayos se seleccionaron dos especies de hongos: *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, así como las bacterias: *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas spp.* Los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana aplicadas al derivado de quitosano N-acilado con cinnamaldehído, mostraron un importante efecto inhibitorio del crecimiento de los microorganismos estudiados.

Palabras clave: Bases de Schiff, derivados de quitosano, cinnamaldehído, patógenos en agricultura.

ABSTRACT

Chitosan and its derivatives have several advantages over other types of plague control agents because of their higher antibacterial activity, broader spectrum of activity, a higher killing rate and lower toxicity. This investigation arises like an alternative that allows to obtain an N-acylated derivative of chitosan, showing potential antimicrobial and biodegradable properties; when using a natural aromatic aldehyde (cinnamaldehyde) to obtain the modification of an, also natural, matrix as the chitosan one. The presence of primary amino groups on the chitosan main chain, with a free pair of electrons, provides powerful nucleophilic properties to chitosan, allowing it to react in an effective way most carbonyl (C=O) group of aldehydes, by means of a Schiff base mechanism. According to that, it is possible to obtain a bonding between chitosan and cinnamaldehyde, resulting in a new macro-molecular structure derived from chitosan of the N-acylated type. The reaction rate was followed by spectroscopic analysis FTIR and ¹H-NMR by comparison between the spectrums of the cinnamaldehyde modified samples and the chitosan one, following the appearing of the typical imine group (N=C) on the Schiff base derivatives and also the appearing of some aromatic related peaks, respectively. Also, by the ¹H-NMR technique was possible to calculate the degree of substitution of the derivative obtained in the reaction process. The antibacterial assessments of the cinnamaldehyde N-acylated chitosan derivative were performed by the disc diffusion susceptibility assay on two fungi cultures of *Fusarium oxysporum*

and *Botrytis cinerea*, as well as in two bacterial cultures of *Erwinia carotovora* and *Xanthomonas spp.* The antimicrobial assays applied to the cinnamaldehyde N-acylated chitosan derivative showed an important antimicrobial effect against the microrganisms studied.

Keywords: Schiff's Bases, Chitosan Derivatives, Cinnamaldehyde, Agricultural pathogens.

1. INTRODUCCIÓN

El quitosano es un copolímero de β -(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosa y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosa. Consiste en un biopolímero policationico que se obtiene generalmente por desacetilación alcalina de la quitina, que es principal componente del exoesqueleto de crustáceos como el camarón y el cangrejo [1,2].

Este compuesto se caracteriza por la presencia de grupos amino en la cadena polimérica, que han hecho al quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, debido a la posibilidad que posee de desarrollar una amplia variedad de modificaciones, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, entre otras; de las cuales es posible obtener materiales para diversas aplicaciones [1-4].

Por otra parte, el cinnamaldehído se caracteriza por ser el principal componente del aceite esencial obtenido de la corteza del árbol de canela, encontrándose en una proporción de 60-70%. Este aldehído posee una estructura del tipo $C_6H_5CH=CHCHO$, caracterizada por la presencia de un anillo bencénico monosustituido, un grupo funcional aldehído y un enlace doble conjugado, que es el responsable de proporcionarle al compuesto una geometría plana [5,6].

Una de las reacciones típicas de los aldehídos es la adición nucleofílica. Este es el caso que se presenta en el cinnamaldehído donde la presencia del grupo carbonilo ($C=O$), le proporciona al mismo un sitio reactivo para que se produzca este tipo de adición, debido principalmente a la capacidad que posee el oxígeno para aceptar una carga negativa. Es de esta manera como este tipo de compuestos son más susceptibles al ataque por reactivos nucleofílicos ricos en electrones, como es el caso del quitosano, que debido a la presencia de grupos amino de tipo primario con un par de electrones libres, permiten la formación de un enlace con el carbono carbonílico deficiente en electrones (electrofílico) [5,7].

Debido a lo anterior, es posible lograr la unión del quitosano con aldehídos aromáticos como el cinnamaldehído, dando como resultado la formación de compuestos derivados del quitosano del tipo N-aciado, de la siguiente manera:

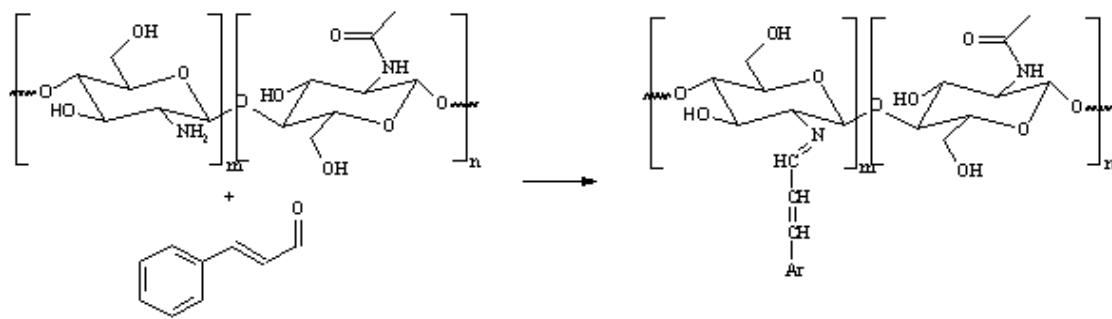


Figura 1. Formación de base de Schiff entre quitosano y cinamaldehído.

El quitosano y sus derivados presentan varias ventajas en comparación con otros tipos de plaguicidas, debido a que poseen una mayor actividad antimicrobiana, un espectro de actividad más amplio y con su uso se logra alcanzar una mayor tasa de muerte. La actividad antimicrobiana de quitosano se ha estudiado en una amplia variedad de microorganismos incluyendo hongos, algas y bacterias [8-10].

La actividad antifúngica del quitosano y sus derivados han sido estudiados contra de diferentes organismos, entre los que destacan: *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium oxysporum*; obteniéndose resultados prometedores [2,3,11]. Asimismo, se han realizado estudios relacionados con las propiedades insecticidas de estos biopolímeros, mostrando actividad principalmente en lepidópteros, tales como: *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera* y *Plutella xylostella*, así como en otras especies como: *Aphis Gossyoii*, *Metopolophium dirhodum*, *Hyalopterus pruni*, *Rhopalosiphum padi L*, *Sitobium avenae* y *Myzus persicae* [11-14].

Actualmente, la obtención de nuevos derivados de quitosano con propiedades antimicrobianas, representa una buena alternativa en sustitución de una amplia gama de plaguicidas de alta persistencia, promoviendo de esta forma el uso de compuestos totalmente biodegradables y no tóxicos para los seres humanos y los vertebrados [12, 15-17].

Dadas las conocidas características antimicrobianas individuales de las materias primas utilizadas en esta investigación (quitosano y cinamaldehído); así como la factibilidad en su reactividad teórica, sumado al hecho de que ambas sustancias se obtienen a partir de fuentes naturales asequibles, de bajo costo y por medio de procesos optimizados; se tiene como propósito obtener una matriz compuesta con efecto potenciado, que incorpore las propiedades que caracterizan a cada componente. Esto permitirá desarrollar un bioplaguicida que pueda ser aplicado en cultivos para su protección contra distintos organismos, que no produzca efectos perjudiciales a la salud humana y sea amigable con el ambiente [16,17].

2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1. Materiales. En el desarrollo de esta investigación se hizo uso de quitosano grado industrial con un 70% de grado de desacetilación, determinado por técnicas termogravimétricas (TGA) y potenciométricas; el mismo fue suministrado por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional a partir de una fuente nativa de camarón Camellito (*Heretocarpus vicarius*). Se utilizó cinamaldehído comercial de *Merck* que fue purificado siguiendo los procedimientos estándares.

2.2. Obtención de quitosano N-acilado. Los derivados N-acilados de quitosano fueron sintetizados siguiendo el procedimiento descrito por *Tirkistani* en 1998 [11], variando parámetros como las concentraciones de reactivos, tiempos de reacción y manteniendo constante la temperatura.

Se utilizaron 7,16 g de quitosano y 5 mL de cinamaldehído para obtener una relación equimolar (1:1) de las materias primas. A la mezcla resultante se le adicionaron 120 mL de ácido acético glacial y se sometió a un proceso de agitación constante a temperatura ambiente durante 150 minutos. Luego de transcurrido este período, el ácido acético fue removido por destilación y el producto de reacción fue lavado con éter dietílico y etanol para remover cualquier exceso de cinamaldehído. El producto sólido fue secado en una estufa a 60°C por espacio de algunos minutos.

El proceso de reacción se repitió manteniendo el tiempo de contacto constante, pero variando la cantidad de cinamaldehído adicionada para obtener relaciones 1:0.5, 1:1 y 1:2. Por otra parte, en posteriores repeticiones se mantuvo constante la relación molar (1:1) y se fue modificando los espacios de tiempo para el desarrollo de la reacción, usando intervalos de 30, 60, 120 y 150 minutos.

2.3. Caracterización espectroscópica

2.3.1. Análisis infrarrojo (FTIR). Los productos obtenidos en la reacción fueron estudiados por medio del método de Infrarrojo con Transformada de *Fourier* (FTIR), utilizando un espectrómetro *Perkin Elmer Paragon 1000 PC* y la técnica de pastillas de KBr.

2.3.2. Análisis por $^1\text{H-NMR}$.

2.3.2.1. Preparación de la muestra. A cada muestra de análisis (5 g) se le adicionó 250 mL de HCl 7 M en un recipiente de vidrio de un volumen de 500 mL. La mezcla fue calentada durante 1 hora, utilizando un baño a temperatura constante de 70°C y un sistema de reflujo. Los productos de reacción se filtraron al vacío y se liofilizaron por un período de 4 días hasta obtener un sólido amarillento soluble en agua.

2.3.2.2. Condiciones de ensayo. Los espectros de ^1H -NMN fueron obtenidos utilizando un espectrómetro *Bruker DRX400* y se siguieron las condiciones propuestas por *Estrela dos Santos et al.* [12].

Las muestras analizadas (~ 10 mg) fueron colocadas dentro de recipientes plásticos *Eppendorff* de 1 mL y se procedió a disolverlas en 500 μL de agua deuterada, manteniéndolas en un baño ultrasónico por 5 minutos. Luego, se tomó una alícuota de la disolución y se adicionó en un tubo de cuarzo de 5 mm de diámetro.

2.4. Evaluación de actividad antimicrobiana. Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana llevados a cabo en organismos patógenos proveen información aplicable al control de plagas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de una sustancia en particular respecto a un organismo específico, puede determinarse cuantitativamente *in vitro* mediante los ensayos de susceptibilidad, siendo las técnicas más utilizadas con este propósito, las de difusión en disco y cultivo en disolución de agar. Estos ensayos han sido estandarizados por el *National Committee of Clinical Laboratory Standards* de los Estados Unidos (NCCLS, por sus siglas en inglés) proveyendo guías para la realización de este tipo de ensayos [16,17].

En el ensayo de susceptibilidad por difusión en disco, un inoculo estandarizado del microorganismo es dispersado sobre la superficie de agar de un plato de *Muller-Hinton*, luego se colocan sobre el medio discos de papel filtro impregnados con los agentes antimicrobianos. Luego de un proceso de incubación durante la noche a 35°C, se procede a determinar geométricamente el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano desarrollada alrededor del disco. El tamaño de la zona de inhibición será inversamente proporcional a la CMI del organismo. Basado en el tamaño de las zonas de inhibición se realiza un reporte cualitativo del efecto antimicrobiano como “susceptible”, “intermedio” o “resistente”. Todos los ensayos de difusión en disco se realizaron simultáneamente con el mismo inóculo [16,17].

La selección de los microorganismos para el desarrollo de estos ensayos se realizó tomando en cuenta el tipo de plantaciones que dañan, así como la abundancia e importancia de las mismas, para el desarrollo de la agricultura del país. Con base en lo anterior, se seleccionaron dos especies de hongos: *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, así como las bacterias: *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas spp.* La evaluación de la actividad antimicrobiana fue desarrollada utilizando el método de difusión en un disco de acuerdo a los parámetros propuestos por *Lui et al.* [8]; *Pranoto et al.* [13] y *Wang et al.* [5].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización física. El proceso de reacción entre el quitosano y el cinamaldehído condujo a la obtención de productos sólidos amarillos (Figura 2), estables a temperatura ambiente e insolubles en agua y en disolventes orgánicos comunes.



Figura 2. Muestras de quitosano N-aciladas: A) Producto 1:0,5; B) Producto 1:1; C) Producto 1:2.

3.2. Estudio infrarrojo con transformada de Fourier. Los espectros FTIR realizados a estos productos permitieron observar importantes variaciones con respecto al espectro de una muestra de quitosano analizada bajo las mismas condiciones (Figura 3).

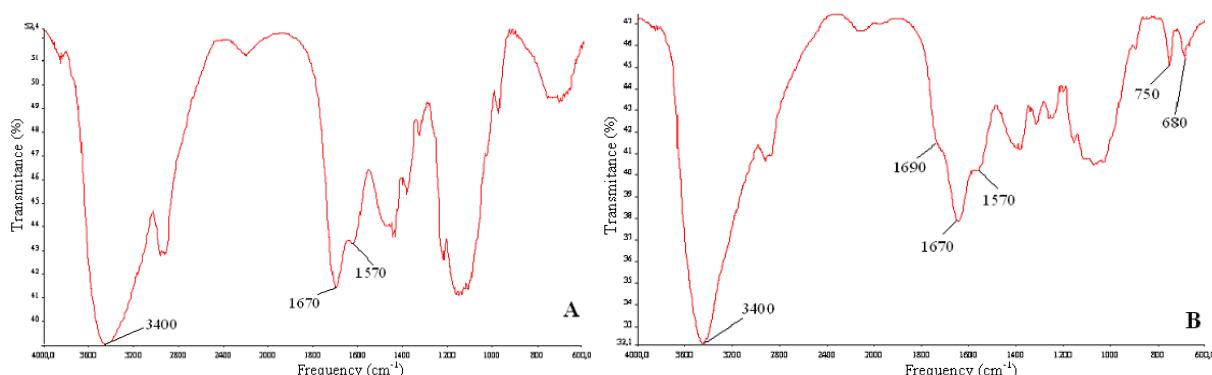


Figura 3. A) FTIR muestra quitosano de *Heterocarpus vicarius*. B) FTIR muestra de quitosano N acilado producto 1:1.

Los cambios más importantes observados en estos espectros, se evidencian en las bandas que aparecen entre 3.300-3.500 cm^{-1} que corresponden al movimiento de estiramiento de los grupos O-H y N-H. Estas bandas tienden a tomar una forma más aguda en el espectro originado por el producto de la reacción S 1:1; lo que permite determinar que la cantidad de grupos amino presentes en el quitosano ha sufrido una disminución o modificación importante. También se muestran cambios relevantes en la región próxima a 1.650-1.670 cm^{-1} que corresponde a la banda generada por la presencia de amidas (C=O), donde en el espectro del producto 1:1 se observa una disminución en su intensidad. Otra banda que sufre una

modificación apreciable es la ubicada en 1.570 cm^{-1} , que corresponde a la deformación angular del grupo N-H que conforma a las aminas presentes en el compuesto. Además, en el espectro de la figura 3B se observa la formación de una nueva banda poco intensa en la región comprendida entre $1.690\text{-}1.670\text{ cm}^{-1}$ característica de la unión C=N común en las bases de Schiff, la cual por lo general es difícil de observar debido a su reducida intensidad o a que aparece solapada por otra banda de mayor tamaño [12,18].

Por otra parte, el espectro B presenta dos bandas muy comunes en compuestos aromáticos, que aparecen en la región entre $800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, mismas que contribuyen a demostrar la presencia de anillos aromáticos en el producto obtenido del proceso de reacción [12, 18].

Resultados muy similares a los mencionados anteriormente se obtuvieron cuando se variaron las relaciones molares y los tiempos de reacción.

3.3. Espectroscopia por $^1\text{H-NMR}$. Los espectros obtenidos al analizar una muestra de quitosano y su derivado N-acilado, se muestran en la Figura 4. En esta figura es posible observar señales características de este tipo de polímero; como es el caso de las observadas en la región de 2 ppm, atribuida a los núcleos de hidrógeno del metilo que conforma el grupo acetamida; la señal ubicada en 3,1 ppm, generada por los núcleos de hidrógeno que se encuentran en la posición 2 del anillo de glucosamina; las señales en la región de 3,7 ppm, corresponden a los núcleos de hidrógeno ubicados en las posiciones 5 y 6'; mientras que la señal localizada en 3,9 ppm, es generada por los hidrógenos que acompañan a los átomos de carbono situados en las posiciones 3,4 y 6 [12].

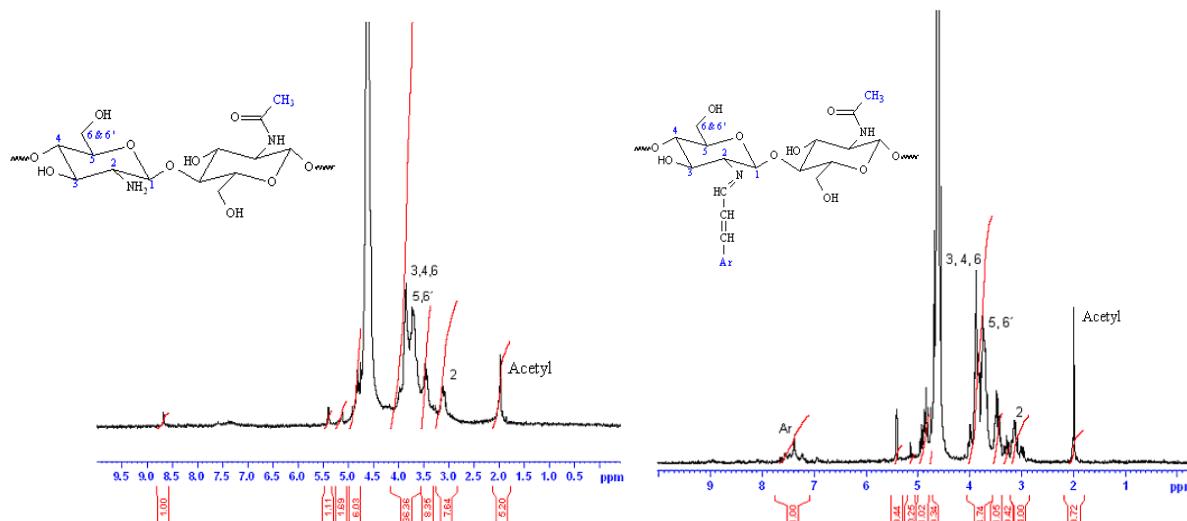


Figura 4. A) Espectro $^1\text{H-NMR}$ de quitosano de *H. vicarius*. B) Espectro $^1\text{H-NMR}$ de quitosano N acilado con cinnaldehído.

Asimismo, el espectro generado por el derivado de quitosano N-acilado con cinamaldehído, muestra la presencia de señales características del quitosano mencionadas anteriormente; sin embargo se observa una variación importante debido a la señal localizada en la región de 7,4 ppm; atribuida a los núcleos de hidrógeno del anillo aromático que conforma la estructura del cinamaldehído; confirmando de esta forma su presencia dentro de la constitución del derivado sintetizado.

3.4. Determinación del grado de sustitución por la técnica de $^1\text{H-NMR}$. El espectro obtenido para la muestra analizada permitió determinar el grado de sustitución de la cadena polimérica en estudio. Lo anterior fue posible estableciendo una relación entre el área de la señal localizada en 7,4 ppm, referente a los núcleos de hidrógeno aromáticos ($\text{A}_{\text{H-7}}$) y el área de la señal ubicada en 2 ppm, correspondiente a los núcleos de hidrógeno de las unidades desacetiladas ($\text{A}_{\text{H-2}}$); ésta relación se resume en la ecuación propuesta por *Estrela dos Santos et al.* [12] que se muestra a continuación:

$$\text{GS} = \left(\frac{\text{A}_{\text{H-7}}}{3 \text{A}_{\text{H-2}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

El grado de sustitución obtenido haciendo uso de esta ecuación fue de 46%.

3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los productos obtenidos por el método de reacción empleado, se realizó con el propósito de determinar si el efecto antimicrobiano del derivado de quitosano N-acilado presentaba diferencias respecto al de sus componentes por separado.

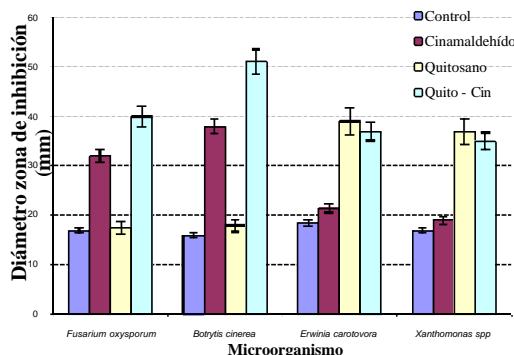


Figura 5. Comparación de los diámetros de la zona de inhibición de las muestras de cinamaldehído, quitosano y su derivado N-acilado.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (Figura 5), los derivados de quitosano N-acilados con cinamaldehído mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento superior (basándose en el diámetro de la zona de inhibición), en comparación al producido por los precursores individualmente.

La actividad antimicrobiana observada en los cultivos obtenidos para las muestras de cinamaldehído, quitosano y su derivado N-acilado fue interpretada como susceptible, menos sensible y resistente, según se muestra en la Tabla 1. Los resultados obtenidos permiten observar una elevada actividad antibacteriana para la muestra de quitosano, así como una elevada actividad antifúngica en el caso de la muestra de cinamaldehído; mientras que el derivado de quitosano N-acilado con cinamaldehído presenta alta susceptibilidad contra todos los microorganismos estudiados, permitiendo clasificarlo como un bioplaguicida de amplio espectro con actividad potenciada para el control de ambas familias de agentes patógenos.

Tabla 1. Interpretación de los valores de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco de las muestras de cinamaldehído, quitosano y su derivado N-acilado.

Hongos	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Botrytis cinerea</i>		
	Cin	Quito	Quito-Cin	Cin	Quito	Quito-Cin
Susceptible	32,0		40,0	38,0		51,0
Menos sensitivo						
Resistente		17,5			18,0	

Bacterias	<i>Erwinia carotovora</i>			<i>Xanthomonas spp</i>		
	Cin	Quito	Quito-Cin	Cin	Quito	Quito-Cin
Susceptible		39,0	37,0		37,0	35,0
Menos sensitivo	21,5					
Resistente				19,0		

Criterio de interpretación para el ensayo de difusión en disco:
 $R < 20$, $LS = 20 - 30$, $S > 30$ (radio anular geométrico promedio, mm) [16,17].

4. CONCLUSIONES

La obtención de este tipo de matriz 100% natural, adquiere especial interés en el desarrollo de nuevos materiales, amigables con el ambiente y compuestos por sustancias con actividad antimicrobiana ampliamente reconocida.

Tomando en consideración los resultados alentadores obtenidos en esta investigación,

sería recomendable llevar a cabo nuevas evaluaciones que permitan ampliar el espectro de acción de los derivados N-acilados con cinamaldehído, tanto para aplicaciones en el campo agrícola a nivel *in vivo*, como un estudio más amplio que evalúe sus propiedades antimicrobianas frente a organismos patógenos en humanos.

REFERENCIAS

- [1] Mirzahed H, Yaghobi N, Amanpour S, Ahmadi H, Mohagheghi M, *Iranian Polymer J.*, **11 (1)**, 63 (2002)
- [2] Rinaudo M, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603- 632 (2006)
- [3] Singh D, Ray A, *Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C40(1)**, 69 (2000)
- [4] Li Q, Dunn ET, Grandmaison EW, Goosen MFA, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **7**, 370 (1992)
- [5] Wang S, Chen P, Chang S, *Bioresource Technology*, **96**, 813 (2005)
- [6] Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H, *Phytotherapy Research*, **20**, 58 (2006)
- [7] Guo Z, Chen R, Xing R, Liu S, Yu H, Wang P, Li C, Li P, *Carbohydrate Research*, **341**, 351 (2006)
- [8] Liu H, Du YM, Wang XH, Sun LP, *Intern. J. Food Microbiology*, **95**, 147 (2004)
- [9] Ouattara B, Simard RE, Piette G, Bégin A, Holley RA, *Intern. J. Food Microbiology*, **62**, 139 (2000)
- [10] Liu H, Du Y, Yang J, Zhu H, *Carbohydrate Polymers*, **55**, 291 (2004)
- [11] Tirkistani F, *Polymer Degradation and Stability*, **60**, 67 (1998)
- [12] Estrela dos Santos J, Dockal ER, Cavalheiro ET, *J. Thermal Analysis & Calorimetry*, **79**, 243 (2005)
- [13] Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM, *LWT*, **38**, 859 (2005)
- [14] Rabea E, Badawy M, Rogge T, Stevens C, *Pest Management Science*, **61**, 951 (2005)
- [15] Singh A, Singh RK, Bhunia AK, Singh N, *LWT*, **36**, 787 (2003)
- [16] Mendoza, M. T. 1998. *Phil J Microbiol Infect Dis.* 27(3):113-115
- [17] National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS document M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1998
- [18] Brugnerotto J, Lizarde J, Goycoolea F, *Polymer*, **42**, 3569 (2001)