



Estudio preliminar de la obtención de compuestos híbridos de quitosano y polifenoles derivados de lignina a partir de subproductos agropecuarios y pesquería de camarón

Preliminary study of the production of hybrid compounds of chitosan and polyphenols derived from lignin from agroindustry and shrimp fishery

Mary Lopretti Correa¹, Marianelly Esquivel Alfaro², Sergio Madrigal Carballo², Yendry Corrales Ureña³, José Vega-Baudrit^{2,3}

¹Facultad de Ciencias, Universidad de la República y Bioprocesos LATU, Uruguay

²Laboratorio de Polímeros, Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica

³Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC-CeNAT-CONARE, Costa Rica.
jvegab@gmail.com

Recibido: 23 de febrero 2017 Aceptado: 26 de mayo 2017

DOI: <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v27i1.74>

Licencia: CC-BY 4.0

Resumen

En este estudio se prepararon y caracterizaron microcápsulas híbridas del conjugado de polifenoles derivados de la lignina proveniente de la cáscara de piña, y el quitosano obtenido a partir de la quitina de la cáscara del camarón; ambos materiales fueron obtenidos como residuos de la industria agropecuaria y pesquería de camarón de Costa Rica. Con el objetivo de preparar compuestos fenólicos derivados de la lignina, y utilizarlos en la síntesis de las microcápsulas, se realizó la hidrólisis enzimática de la misma en un reactor a presión atmosférica a un pH de 6.8, en buffer de citrato 1 M, durante 6 h a 37°C. Las enzimas utilizadas fueron extraídas de los cultivos de hongos de *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill y *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. Para la obtención del quitosano se realizó la desacetilación alcalina a partir de exoesqueletos del camarón *Heterocarpus vicarius* Fazon. Para la preparación de las microcápsulas se empleó una disolución de quitosano en ácido acético, el cual fue mezclado con una disolución acuosa del producto obtenido de la hidrólisis de la lignina y luego añadido a una disolución de vaselina para microemulsionar. Posteriormente, se agregó el glutaraldehído como agente entrecruzante. Se obtuvieron microcápsulas con tamaños entre 5 y 10 μm . Estas microcápsulas son un material promisorio ya que, mediante la formación del complejo, se puede aumentar la solubilidad del quitosano y estabilizar los polifenoles, manteniendo así sus propiedades antioxidantes. Los resultados preliminares obtenidos en esta investigación, muestran el potencial de este material para el encapsulamiento de fármacos y pesticidas.

Palabras clave: conjugados, lignina, quitosano, polifenoles, microcápsulas.

Abstract

Hybrid microcapsules of the conjugate of polyphenols derived from lignin were prepared and characterized. They were obtained from pineapple peel and chitin from shrimp shell from agroindustry or shrimp fishery of Costa Rica. The phenolic compounds were obtained by hydrolysis of lignin, using the enzyme derivatives from the fungus culture of *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill and *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. The reaction was carried out in a reactor with atmospheric pressure, pH 6.8, with a citrate buffer of 1M, for 6 hours at 37°C. The chitosan was obtained by alkaline deacetylation of the *Heterocarpus vicarious* Fazon, shrimp exoskeletons. Microcapsules were prepared mixing a solution of chitosan dissolved in acetic acid and a solution of polyphenol derivatives from lignin. Afterwards, they were added to a vaseline aqueous solution for the microemulsion formation and glutaraldehyde was added as a crosslinking agent. Microcapsules with sizes between 5 to 10 µm were obtained. These microcapsules are a promising material to increase chitosan solubility and for preventing the oxidation of polyphenols. The preliminary results obtained in this research show the potential of this material for the encapsulation of drugs and pesticides.

Keywords: conjugates, lignin, chitosan, protein, microcapsules.

Introducción

El uso creciente de biopolímeros en diferentes aplicaciones industriales posiciona a la lignina (material de origen natural) como uno de las macromoléculas polifuncionales de mayor aplicación y de gran interés industrial. Este potencial es altamente dependiente de las posibles modificaciones que se puedan realizar en la estructura química del polímero. Algunas aplicaciones industriales pueden ser implementadas mediante biopolímeros asociados utilizados en materiales compuestos híbridos. Recientemente compuestos de biopolímeros derivados de la lignina, celulosa, quitina y quitosano se han aplicado en áreas como la medicina y agroindustria, entre otros. En la figura 1 se muestran algunos productos potenciales que se derivan de la lignina (Chávez-Sifontes & Domine, 2013; Lopretti & Gandini, 2012).

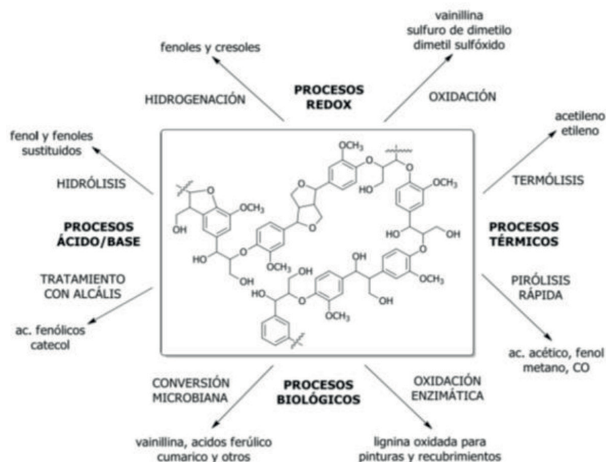


Figura 1. Esquema representativo de diferentes procesos de transformación de la lignina (Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

La lignina es un compuesto polifuncional fenólico que forma un complejo lignina-celulosa en madera y plantas. La extracción y las modificaciones de su estructura se pueden dar por vía química, tal como se realizan en procesos industriales, además la modificación

por vía microbiológica o enzimática, las cuales son ampliamente estudiadas en proyectos de investigación y con menor desarrollo industrial.

Desde hace algunas décadas, químicos y bioquímicos han estudiado la biodegradación de ligninas. Se han empleado especies como la *Coriolus versicolor*, la *Phanerochaete chrisosporium* y la *Phlebia radiata*, y sus enzimas han sido estudiadas con mayor detalle. Las investigaciones se refieren a dos aspectos principalmente, al estudio analítico de los cambios producidos en las ligninas tratadas y a la búsqueda de un mecanismo común de acción para todas estas enzimas. Desde el punto de vista químico, la lignina es un biopolímero muy resistente a la hidrólisis enzimática en comparación con otros biopolímeros. La incubación de ligninas con enzimas, muestra un incremento menor en los pesos moleculares de los oligómeros que los que se encuentran en las fermentaciones con microorganismos, posiblemente porque los pequeños fragmentos son eficientemente metabolizados y desaparecen quedando un sustrato remanente de gran peso molecular (Lopretti, Carlomagno, Gervacio, & Gandomenico, 2004; Lopretti, Santos, López, & Gonzáles, 2004).

Una de las modificaciones químicas que se pueden realizar en la macromolécula de la lignina es la de la relación O2/C9 (unidades de fenil propano), la cual ofrece cambios muy significativos, y está asociado a procesos oxidativos (Jellison, Connoly, Goodell, & Doyle, 1997). Se pueden citar algunas modificaciones y rupturas de enlaces por los sistemas enzimáticos conocidos, estando muy lejos aún de conocer con exactitud el mecanismo real (Agosin et al., 1990).

En general se observa que los grupos metoxilos, así como las subestructuras beta-O-4 disminuyen marcadamente mientras

que el contenido de oxígeno y grupos carboxilos aromáticos y alifáticos aumenta significativamente (Gandini, 2002).

Se sugieren al menos tres modelos de degradación ocasionada por hongos basidiomicetes. En otros grupos de hongos como los pardos, no se conoce exactamente el mecanismo de degradación. Estos procesos son la ruptura oxidativa de la cadena propilo lateral entre carbonos alfa y beta para la formación de ácido benzoico; la ruptura del enlace aril éter y modificación de la cadena lateral, y la degradación del núcleo aromático por una apertura oxidativa del anillo (Enoki, Itakura, & Tanaka, 1997). Otros estudios evaluaron algunos de los posibles mecanismos en enzimas de hongos de pudrición blanca, como la lignina peroxidasa y la lacasa. Los estudios se realizaron con compuestos modelo de distinto tipo. En la figura 2 se muestran los principales enlaces presentes en la macromolécula de la lignina y sus posibles tipos de ruptura de potencial interés comercial (Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

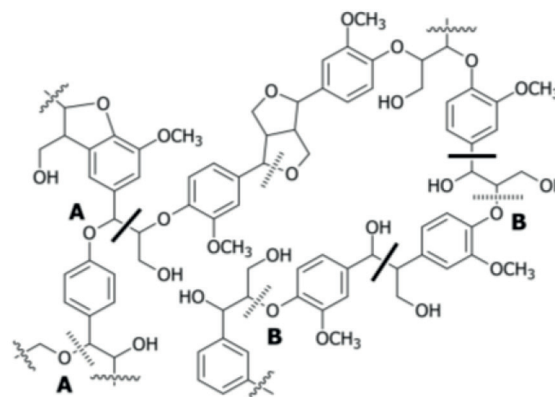


Figura 2. Principales enlaces presentes en la macromolécula de lignina, los posibles tipos de enlace C-O α aril éter (A) y β aril éter (B) y los posibles tipos de ruptura C-C (barra oscura) y C-O (barra punteada) (Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

Por otra parte, la quitina es un polisacárido natural encontrado en el exoesqueleto de crustáceos, artrópodos y hongos. El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina con naturaleza policatiónica que promueve la formación de polielectrolitos similares a polianiones. En la figura 3 se muestran las estructuras de la quitina y quitosano (Akkus & Nursevin, 2003; Alvarado, Solera, & Vega-Baudrit, 2014; Dhawan, Kumar, & Ranjan, 2004; Dini, Alexandridou, & Kiparissides, 2003; Meléndez, Vega-Baudrit, Sibaja, Madrigal, & Camacho, 2013; Yoshinori, Hiraku, & Yoshiharu, 2003).

La capacidad de la lignina como polielectrolito permite unir por enlace y no por atrapamiento de moléculas proteicas con diferentes funcionalidades, función de estructura o actividad enzimática. La aplicación en biomedicina, biotecnología e industria de alimentos no se ha optimizado todavía, siendo uno de los temas de estudio ya que permite una liberación controlada, termoestabilidad, protección a la desnaturalización y recuperación para un uso seriado (Desai & Park, 2005; Lopretti & Gandini, 2010). Otros beneficios asociados incluyen el control operacional, la flexibilidad en el diseño de reactores y la fácil recuperación del producto.

El quitosano es un material inerte, hidrofílico, biocompatible, y por lo tanto atractivo en su aplicación. Este sirve como transportador para enzimas y proteínas. Con los polifenoles el quitosano forma conjugados estables en agua lo que lo hace atractivo en industria de alimentos y biomedicina. En general la formación del conjugado se ha atribuido tanto a enlaces covalentes entre los grupos OH de la lignina y amino del quitosano cuando se coloca un catalizador y por interacciones de Van der Waals y enlaces de hidrógeno (Lee, Kim, Jang, Jung, & Yun, 2007). Los polifenoles se

pueden asociar con el quitosano en un sistema de microsferas que da mayor estabilidad y cambios en la solubilidad de las moléculas (Chetan, Patel, Vilar, & Gaikar, 2004).

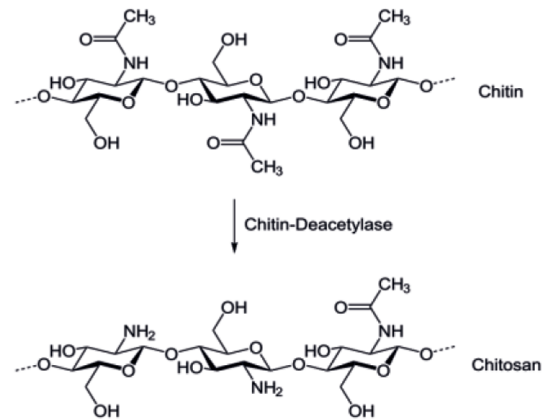


FIGURA 3. Estructura de quitina y quitosano (Dini, Alexandridou, & Kiparissides, 2003).

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio preliminar con el fin de obtener fragmentos de diferentes ligninas por vía enzimática, obteniendo unidades bien definidas, por medio de un control efectivo del mecanismo de biodegradación. Esto permitiría sintetizar, en un futuro cercano, cantidades significativas de monómeros y oligómeros fenólicos obtenidos a partir de recursos renovables. Asimismo, se permitiría utilizar residuos de la industria de la celulosa, con lo cual se aumenta el valor agregado de los mismos en potenciales aplicaciones biomédicas y agronómicas de gran interés a nivel mundial. Mediante la conjugación con el quitosano se busca aumentar la solubilidad del mismo en otros medios que no sean ácidos y la estabilidad de los polifenoles derivados de la lignina.

Materiales y métodos

Los polifenoles y el quitosano utilizados para la formación de las microcápsulas híbridas se obtuvieron por procesos separados empleando los residuos de la agroindustria. Primero se prepararon los polifenoles, a partir del cultivo de los hongos, de los cuales se extrajeron las enzimas, la cuales fueron las encargadas de hidrolizar la lignina, con el fin de obtener las fracciones de los polifenoles que la componen. Para esto, se realiza el análisis de la actividad enzimática antes de ser expuestas a la lignina. Para corroborar la obtención de los polifenoles se realiza el análisis de concentración de polifenoles por espectroscopia de UV y por la técnica de la reacción de Folin. A continuación, se detallan los procedimientos empleados.

Crecimiento de los hongos *G. trabeum* and *P. chrysosporium*. El crecimiento se realizó en un medio líquido compuesto por 40g/ L de maltosa, 10g/ L de extracto de levadura y 1 mL de sales de Kirk en 250 mL de medio de cultivo. Se inoculó el medio y fueron mantenidos los cultivos durante seis días a 30°C, sin agitación. El medio de conservación fue preparado por duplicado en papa, almidón-dextrosa-agar y en agar-malta, ambos mantenidos durante siete días a 25°C y posteriormente guardados a 4°C.

Producción de enzimas. Se prepararon 150 mL de medio con 10g/ L de glucosa, 0.2 g/ L de extracto de levadura, 0.5g/ L de tartrato de amonio y 1 mL de sales de Kirk, a pH 5. El medio fue esterilizado durante 15 min a 121°C e inoculado con 5 mL del medio de crecimiento con cada hongo. Cada cultivo se mantuvo a 37°C durante seis días y el sobrenadante fue analizado con respecto a la actividad enzimática.

Análisis de la actividad enzimática. En el sobrenadante donde se concentran las enzimas necesarias para la hidrólisis de la lignina del

cultivo se realizaron los siguientes ensayos de actividad enzimática. Las muestras fueron analizadas por triplicado y se reportaron los valores promedio con su respectiva desviación estándar. El equipo empleado fue un espectrofotómetro de la marca Shimadzu, modelo UV-1800.

Lignina peroxidasa. Esta actividad fue determinada por el Método de Tien y Kirk. Se utilizó alcohol veratrílico 0.01 M como sustrato en buffer de tartrato de sodio (0.1 M, pH 3.0). La reacción fue iniciada agregando 0.5 mL de 4 mM de H₂O₂ y monitorizada midiendo el incremento de absorbancia a 310 nm ($e_{\text{max}}=9300 \text{ L/M.cm}$) (Tien & Kirk, 1988).

Lacasa. Esta actividad se determinó midiendo la oxidación de ABTS en buffer glicina- HCl (pH 3.0) a 420 nm ($e_{\text{max}}=36000 \text{ L/M.cm}$), 2 mL de solución de ABTS (50 mg de ABTS en el buffer mencionado) a pH 3 se incubaron con 0.1 mL del sobrenadante del cultivo durante 1 h a 35°C (Srinivasan, Souza, Boominathan, & Reddy, 1995).

Demetilasa. Se aplicó el método de medidas sobre un compuesto modelo metoxilado. La reacción se siguió por medidas espectrofotométricas y la determinación del cambio en el espectro. Se tomaron 2 mL de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído (Aldrich) 0.1 M, pH 4, y se incubó con 0.1 mL del sobrenadante del crecimiento fúngico a 30°C. Se midió la disminución del sustrato por espectrofotometría UV.

Determinación de la concentración de compuestos fenólicos. La determinación de proteínas se realizó por el método de la reacción de Folin. Los compuestos fenólicos fueron preparados con ion cobre en solución alcalina, y luego los aminoácidos aromáticos presentes en la muestra redujeron al ácido fosfomolibdato fosfotúngstico presente en el reactivo de Folin. Se desarrolló un color azul,

el cual fue cuantificado por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 750 nm (Chetan, et al., 2004). Las muestras fueron analizadas por triplicado y se reportaron los valores promedio con su respectiva desviación estándar. El equipo empleado fue un espectrofotómetro de la marca Shimadzu, modelo UV-1800.

Producción de “unidades fenólicas” de lignina: La producción de las unidades fenólicas se llevó a cabo en un sistema de hidrólisis enzimática, en reactor de 5 L con una solución de lignina Kraft al 1% m/v, pH 6.8 en buffer citrato 1 M. Esta reacción se realizó durante 6 h a 37°C con las enzimas del cultivo descrito anteriormente. Las enzimas fueron Lignina peroxidasa 20 UE/ mL; Lacasa 10 UE/ mL y demetilasa 5 UE/ mL. Para el ensayo se utilizaron 100 UE de Lig-peroxidasa 100 UE de Lacasa y 50 UE de demetilasa. Luego de las 6 h de acción enzimática, se centrifugó y se analizó el sobrenadante por espectrofotometría UV determinando las unidades fenólicas y derivados. Las muestras fueron analizadas por triplicado y se reportaron los valores promedio con su respectiva desviación estándar. El equipo empleado fue un espectrofotómetro de la marca Shimadzu, modelo UV-1800.

Evaluación de la producción de fenoles. Se realizaron barridos espectrofotométricos entre 230 a 600 nm determinando los cambios en las lecturas por las oxidaciones producidas y se realizó una determinación de fenoles, utilizando una curva estándar de fenol. Las muestras fueron analizadas por triplicado y se reportaron los valores promedio con su respectiva desviación estándar. El equipo empleado fue un espectrofotómetro de la marca Shimadzu, modelo UV-1800 (Lowry, Rosehrough, Farr, & Randall, 1951).

Para la fase dispersa se utilizó quitosano obtenido a través de la desacetilación alcalina

a partir de exoesqueletos del camarón *H. vicarius* usando el protocolo ya establecido en la literatura (Sánchez, Sibaja, Vega-Baudrit, & Madrigal, 2007). Brevemente, se hizo un descarnado del langostino. Se desmineralizó con HCl 10% m/v. Se purificó el material y se colocó en un reactor usando una relación 1:10 de quitina técnica e hidróxido de sodio 50% m/v. Se calentó a 120°C por 1 h con agitación y luego se purificó.

Preparación del conjugado de polifenoles derivados de la lignina y el quitosano. se prepararon 500 mL de una solución 1% de oligómeros de lignina y 1% polifenoles., en buffer citrato (1 M) y pH 4.2 Se agregó 0.1 mL de H₂SO₄ 0.1 M, como catalizador. Para la fase dispersa se utilizó el quitosano obtenido. Se preparó una solución de quitosano 1% (w/v) en ácido acético al 5% y se mezcló con una solución acuosa al 1 % de los polifenoles derivados de la lignina. Para la fase continua se usó vaselina con 0.1 % (m/v) de Spam 80. La mezcla de polifenoles derivados de la lignina y el quitosano fueron incorporados lentamente por goteo dentro de la suspensión de vaselina para formar las microcápsulas. La solución fue mantenida bajo agitación a 500 rpm por 1 h. Posteriormente se adicionó 20 ml de glutaraldehído 10 % (v/v) y permaneció bajo agitación (500 rpm) hasta que las microcápsulas fueran decantadas.

Para el lavado y recolección de las microesferas, se empleó un sistema de filtración con bomba de vacío. Se utilizó un kitasato de vidrio y embudo Büchner de porcelana con filtro de 0.75 µm (Whatman). Se descartó el sobrenadante y se realizaron sucesivos lavados con éter de petróleo. Luego se realizaron lavados con agua bidestilada Milli-Q para retirar restos del glutaraldehído, finalizando nuevamente con éter de petróleo. Las esferas se dejaron secar a temperatura ambiente, se colocaron en el

portamuestras del microscopio de barrido y se recubrieron con un filme de oro de 10 nm aproximadamente. Las micrografías fueron tomadas empleando un equipo JEOL JSM 6390 LV, voltaje de aceleración de 5 kV.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la actividad enzimática obtenida en el sistema líquido de la muestra de *G. trabeum* y *P. chrysosporium*.

Tabla 1. Actividad enzimática obtenida en Sistema líquido de *G. trabeum* y *P. chrysosporium*

Actividad enzimática	<i>G. trabeum</i> y <i>P. chrysosporium</i>	UE/mL(DS)
Lignina peroxidasa	+	20 (3)
Lacasa	+	10 (3)
Demetilasa	+	5 (1)

En la tabla 2, se muestran las absorbancias de las muestras de las ligninas sin el tratamiento y solubilizadas por tratamiento enzimático

aplicado con 100 UE de lignina-peroxidasa 100 UE de lacasa y 50 UE de demetilasa.

Tabla 2. Absorbancia de ligninas sin tratamiento y solubilizadas por tratamiento enzimático con 100 UE de lignina-peroxidasa, 100 UE de lacasa y 50 UE de demetilasa.

Muestra	Absorbancia (± .05)*			
	280nm	310nm	353 nm	375 nm
Lignina sin tratamiento	600.00	0.80		
(SD)	(7.64)	(0.03)		
Lignina con tratamiento	280.00	320.00	260.00	110.00
(SD)	(5.77)	(2.90)	(2.90)	(2.90)

Nota:*Valor obtenido del promedio de 3 medidas (SD).

La figura 4 muestra la micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de polifenoles obtenidos a

partir de la lignina y el quitosano. Se observan tamaños que van de los 5 a los 10 µm de forma casi esférica.

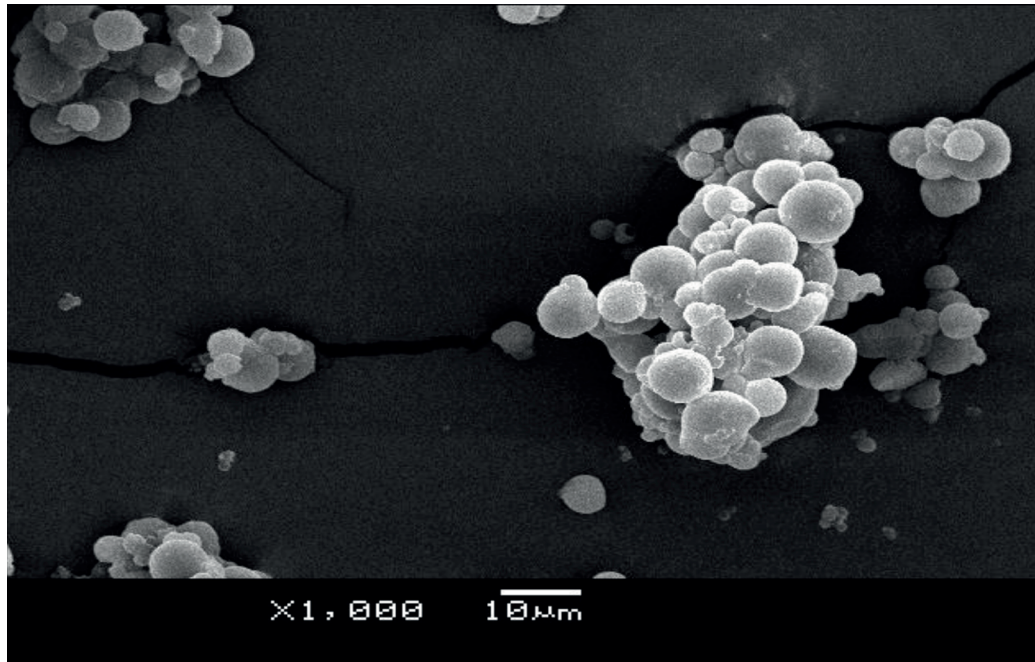


Figura 4. Micrografía SEM de microcápsulas de polifenoles derivados de lignina y quitosano.

Discusión

El crecimiento de los hongos en ambos casos (medio líquido compuesto por maltosa, extracto de levadura y sales de Kirk) fue escaso. Esto se debe probablemente a que el medio líquido empleado para su crecimiento no es el mismo medio natural que hay presente en el ecosistema. Durante la evaluación de la actividad enzimática obtenida en los filtrados de las muestras durante la producción de enzimas por los cultivos mixtos de la *G. trabeum* y el *P. chrysosporium*, se obtuvieron concentraciones de proteína de 0.8 mg/mL. Las actividades enzimáticas obtenidas en el proceso se muestran en la tabla 1. En todos los casos se muestra actividad enzimática, siendo la mayor para la lignina peroxidasa con 20 UE/mL.

En el estudio espectrofotométrico, los resultados observados en la tabla 2 indicaron una extensa

oxidación en la lignina tratada, y debido a la aparición de señales de absorbancia a 310, 353, y 375 nm, se puede inferir la obtención de productos de la despolimerización y oxidación de la macromolécula de la lignina, que podrían tener un potencial uso industrial a futuro.

Por lo tanto, los procesos de despolimerización oxidativa que ocurren en este sistema sugieren que este proceso se inicia por la ruptura de los enlaces interaromáticos, dando como producto oligómeros tipo fenólicos, seguido por la apertura del anillo, que generan fragmentos alifáticos con un incremento de los grupos carboxilo.

Asimismo, las ligninas tratadas por este consorcio enzimático permiten obtener tres fracciones de lignina de bajo peso molecular que se han solubilizado. En todos los casos estudiados, se observa un incremento de la absorbancia en los productos de

despolimerización y una disminución en el polímero de mayor tamaño.

La formación de las microcápsulas se hizo en un pH cercano a 4.5 donde el quitosano es soluble y hay una menor tendencia a la oxidación de los fenoles. El quitosano tiene tres grupos funcionales en la matriz del polímero incluyendo uno amino/acetamido y grupos hidroxilo en las posiciones C-2, C-3 y C-6, respectivamente. El grupo más importante es el amino que se protona en medio ácido y hace este soluble. La vaselina fue adicionada al medio para lograr una adecuada emulsificación. El glutaraldehído fue utilizado como agente entrecruzante

En la figura 4 se muestra una micrografía de SEM de microcápsulas de polifenol-quitosano. Las microcápsulas presentan una forma casi esférica, con un tamaño variando entre 5 a 10 μm . Se muestran partículas esféricas individuales y aglomerados en la superficie del sustrato.

La formación de las microcápsulas se atribuye a los enlaces de hidrógeno generados por los grupos amino e hidroxilos de los biopolímeros. También no se puede descartar la presencia de enzimas oxidantes de compuestos fenólicos remanentes y las especies radicales resultantes que pueden producir un entrecruzamiento de los biopolímeros. En este estudio se denota la formación de compuestos estables que pueden ser usados en aplicaciones agroindustriales y en la industria biomédica.

Con los resultados obtenidos se puede inferir que es posible trabajar con sistemas biológicos menos contaminantes y más específicos como son los consorcios enzimáticos, con el fin de obtener potenciales materiales con aplicaciones industriales. Si bien la parte principal del trabajo fue la despolimerización, la posibilidad de demetoxilar permitiría la incorporación del

Fe contenido en péptidos y en hidrolasas, y la introducción de grupos carboxilo y otros.

Las microcápsulas obtenidas con los polímeros extraídos de la biomasa residual de la industria pesquera y agroindustria muestran como se le puede dar un valor agregado a estos residuos industriales.

Con los resultados obtenidos la preparación y empleo de un consorcio enzimático fue capaz de modificar, por despolimerización oxidativa, a la macromolécula de la lignina para la obtención de compuestos fenólicos.

Asimismo, se le utilizó en la preparación de microcápsulas de polifenoles y quitosano. Mediante la mezcla, en pH ácido, se logró un material conjugado que, al adicionarlo a una solución acuosa de vaselina y entrecruzarlo con glutaraldehído, permitió la formación de microcápsulas de 5 a 10 μm .

En futuros experimentos se pretende elucidar las estructuras de los compuestos obtenidos y la capacidad antioxidante de estas microcápsulas. Este puede ser un material promisorio para el encapsulamiento de varios compuestos activos usados en la industria como drogas y pesticidas.

Referencias

- Agosin, E., Blanchette, R. A., Silva, H., Lapierre, C., Cease, K. R., Ibach, R. E., ... & Muga, P. (1990). Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 65-74. <https://doi.org/10.1128/aem.56.1.65-74.1990>
- Akkus, A. & Nursevin, H. (2003). Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 889-894. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00065-6)

- Alvarado, R., Solera, F., & Vega-Baudrit, J. (2014). Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(3), 134-148.
- Chávez-Sifontes, M. & Domine, M. (2013). Lignin, structure and applications: depolymerization methods for obtaining aromatic derivate of industrial interest. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 4(4), 15-46.
- Chetan, B., Patel, M., Vilar, G., & Gaikar, A. (2004). Adsorption and immobilization of penicillin acylase on chitosan beads. *Separation Science and Technology*, 39(11), 2655-2675. <https://doi.org/10.1081/SS-200026758>
- Dhawan, S., Kumar Singla, A., & Ranjan Sinha, V. (2004). Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech*, 5(4), 1-7. <https://doi.org/10.1208/pt050467>
- Desai, H. & Park, J. J. (2005). Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *Microencapsulation*, 22(4), 377-395. <https://doi.org/10.1080/02652040500100139>
- Dini, S., Alexandridou, C., & Kiparissides, J. (2003). Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. *Journal of Microencapsulation*, 20(3), 375 - 385. <https://doi.org/10.3109/02652040309178076>
- Enoki, A., Itakura, S., & Tanaka, H. (1997). La participación de las sustancias extracelulares para la reducción de oxígeno molecular a hierro férrico y radical hidroxilo a hierro ferroso en la degradación de la madera por hongos descomposición de la madera. *Journal of Biotechnology*, 53(2), 265-272. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01682-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01682-9)
- Gandini, A. (2002). Les Lignines et leur utilization dans les materiaux macromoléculaires. En: Initiation a la chemie et á la physicochimie macromoléculaires, (Vol. 13. pp. 159-195). Paris: Group Francais d' etudes et d'application des polymères.
- Jellison, J., Connoly, J., Goodell, B., & Doyie, B. (1997). The role of cations in the Biodegradation of Wood by the Brown Rot Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(2), 165-179. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00018-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00018-8)
- Lee, I., Kim, Y., Jang, Y., Jung, J., & Yun, B. (2007). New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom. *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(24), 6678-6681. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.072>
- Lopretti, M., Carlomagno, M., Gervacio, S., & Gandomenico, A. (2004). Enzymatic production of phenols from wastes of the paper Industry. *Biomass for Energy and Industry*, 1951-1954.

- Lopretti, M. & Gandini, A. (2012). Nuevos materiales poliméricos derivados de fuentes renovables. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay INNOTEC*, (7), 59-63. <https://doi.org/10.26461/07.10>
- Lopretti, M., Santos, R., López, G., & González, G. (2004). Technical and economic feasibility to produce modified phenols and polyphenols from lignocellulosic material, *Biomass for Energy and Industry*, 2026-2029.
- Lopretti, M., Gandini, A. (2010). Technical feasibility to produce modified phenols from lignocellulosic materials. 18th European biomass conference and exhibition, Lyon, 1519-1552.
- Lowry, O. Rosebrough, N.J., Farr, A., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Meléndez, A., Vega-Baudrit, J., Sibaja, M., Madrigal, S., & Camacho, M. (2013). Síntesis y caracterización de carboximetilquitina (CMQ) a partir de quitina de camarón de la especie “*Heterocarpus vicarius*”. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(5), 220-231.
- Sánchez, A., Sibaja, M., Vega-Baudrit J., & Madrigal, S. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 8(4), 242-269.
- Srinivasan, C., Souza, T., Boominathan, K., & Reddy, C. (1995). Demonstration of laccase in the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4274-4277. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4274-4277.1995>
- Tien, M. & Kirk, T. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161, 238-249. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61025-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61025-1)
- Yoshinori, K., Hiraku, O., & Yoshiharu, M. (2003). Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4(5), 303-309. <https://doi.org/10.2174/1389201033489748>

Copyright (c) 2017 Mary Lopretti Correa, Marianelly Esquivel Alfaro, Sergio Madrigal Carballo, Yendry Corrales Ureña,
y José Vega-Baudrit



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Textocompletodela licencia](#)