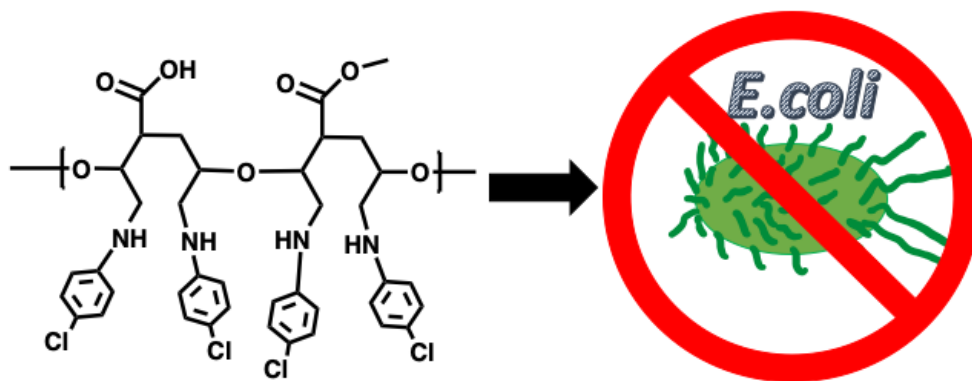


Modificación de pectina con 4-cloroanilina para otorgarle propiedades antibacteriales

Pectin modification with 4-chloroaniline to grant it antibacterial properties



Fuente: Elaboración propia.

Andrea Rivera Álvarez del Castillo^a, Gerardo de Jesús Sosa Santillán^a, Nancy Verónica Pérez Aguilar^a, Marco Antonio García Lobato^a, Juan Carlos Contreras Esquivel^a, Ernesto Oyervides Muñoz^{a*}

^a Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas. Boulevard Venustiano Carranza y José Cárdenas Valdez. Saltillo, Coahuila, C.P. 25280, México.

Correspondencia para autor: Ernesto Oyervides Muñoz
Universidad Autónoma de Coahuila
Correo electrónico: ernesto.oyervides@uadec.edu.mx
<https://orcid.org/0000-0003-2182-4343>

Resumen

El objetivo de este trabajo fue funcionalizar pectina con 4-cloroanilina para otorgarle propiedades antibacteriales. En la primera etapa, se realizó la oxidación de los grupos -OH presentes en la pectina utilizando peryodato de sodio (NaIO_4) para obtener grupos aldehído a lo largo de las cadenas poliméricas de pectina. Posteriormente, se realizó el injerto químico de 4-cloroanilina a través de una reacción “base de Schiff” entre el grupo NH_2 de la 4-cloroanilina y los grupos aldehído de la pectina oxidada. Este nuevo derivado de la pectina (Pec-CA) se caracterizó mediante espectroscopía infrarroja y se midió la concentración mínima inhibitoria contra una cepa de *E. coli* para confirmar sus propiedades antibacteriales.

Palabras clave: 4-Cloroanilina, pectina, antibacterial, *E. coli*.

Abstract

The aim of this work was to modify pectin with 4-chloroaniline to grant it antibacterial properties. In a first stage, the -OH groups of pectin were oxidated with sodium periodate (NaIO_4) obtaining aldehyde groups along the backbone of the macromolecules of pectin. Then, 4-chloroaniline was chemically grafted through a Schiff-Base reaction between the NH_2 of 4-chloroaniline and the aldehyde groups pectin. This new pectin derivative was characterized by infrared spectroscopy and its minimum inhibitory concentration against an *E. coli* strain was measured to confirm its antibacterial properties.

Keywords: 4-Chloroaniline, pectin, antibacterial biopolymer, *E. coli*.

Introducción

En los últimos meses, los materiales antisépticos han recibido una mayor atención debido a la actual pandemia por el COVID-19 y es imprescindible intensificar investigaciones para encontrar nuevos materiales antivirales y antibacteriales de bajo costo (Sun y Ostrikov, 2020). Por otro lado, la pectina es un polisacárido de alto peso molecular compuesta por residuos injertados de ácido α -D-galacturónico (Hileuskaya y col., 2020), es biocompatible, soluble en agua, higroscópica, no tóxica, es extraída de las paredes celulares de algunas plantas (Zouambia y col., 2009) y de la cáscara de la naranja (Jridi y col., 2020). La pectina posee buenas propiedades de biodegradabilidad, es utilizada en la industria farmacéutica, de alimentos y forma parte de la dieta del ser humano (Cinkmanis y col., 2020; Zhang y col., 2020; Nisar y col., 2018). También se ha utilizado como acarreador de

medicamentos en el tracto intestinal, como matriz de tabletas o cubierta de medicamentos (Liu y col., 2007): sin embargo, al llegar al tracto intestinal, la pectina pasa por una biodegradación provocada por las enzimas de las bacterias que conforman la flora colónica originando gases y ácidos grasos de cadena corta (Marti y col., 2003). Además, la pectina exhibe un amplio rango de propiedades biológicas, tales como antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria (Douglas y col., 2019). Su modificación química puede dar como resultado nuevas propiedades físicas y químicas (Moslemi, 2020); algunas modificaciones que se le han hecho han sido el injerto de sales de amonio cuaternario para incrementar sus propiedades antibacteriales (Fan y col., 2012), sin embargo, son pocos los estudios donde se incrementan las propiedades antibacteriales mediante la modificación química, ya que la mayor parte de estos estudios se enfocan en mezclar la pectina con nanopartículas hechas a base de zinc (Zn), oro (Au), plata (Ag), titanio (Ti) y/o cobre (Cu), las cuales llegan a subir el costo y tiempo de producción de estos materiales (Pallavicini y col., 2017; Yu y col., 2019; Yu y col., 2019; Kumar y col., 2020). Debido a esto, es interesante estudiar distintas formas de modificar químicamente la pectina para otorgarle propiedades antibacteriales a este biopolímero utilizando 4-cloroanilina la cual, es un compuesto aromático clorado utilizado en la producción de tintes, pigmentos, en productos farmacéuticos, cosméticos y como herbicida (Vangnai y Petchkroh, 2007). En este trabajo, se pretende modificar pectina con 4-cloroanilina para otorgarle propiedades antibacteriales manteniendo la biodegradabilidad y biocompatibilidad intrínsecas de la pectina.

Materiales y métodos

Materiales

La pectina (PM= 60 000-130 000 g mol⁻¹) y todos los demás reactivos fueron comprados a Sigma-Aldrich, México, con alto contenido de pureza (>99%). La cepa de *Escherichia coli* empleada en este estudio se obtuvo de la ATCC (*American Type Culture Collection*).

Oxidación de la pectina

En un frasco obscuro se diluyó 1 g de pectina en 50 mL de agua y se dejó en agitación por 24 h hasta que se volvió una solución viscosa. Por otra parte, se diluyeron 0.33 g (1.4 mmol) de peryodato de sodio (NaIO₄) en 10 mL de agua y se adicionaron lentamente a la solución de pectina y se dejó reaccionar por 24 h con agitación a temperatura ambiente. Para terminar la reacción, se añadieron 0.33 mL

(86 mmol) de etilenglicol y se dejó agitando por 30 min. Posteriormente, el producto se precipitó en etanol, se filtró y se secó al vacío a 40 °C.

Modificación de la pectina con 4-cloroanilina

Se diluyeron 0.7 g de pectina oxidada en 50 mL de agua y se dejó en fuerte agitación por 1 h. Por otra parte, se diluyó 0.5 g (3.9 mmol) de 4-cloroanilina en 5 mL de etanol, posteriormente se adicionaron 100 mL de agua a esta solución y se añadió gota a gota a la solución de pectina oxidada y se dejó por 5 h a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de reacción, se diluyeron 0.05 g de borohidruro de sodio (NaBH_4) en 2 mL de agua, se agregaron gota a gota al sistema con la pectina y se dejó reaccionar por 2 horas más. El producto se precipitó en etanol, se secó al vacío por 24 h a 40 °C, se purificó en un equipo soxhlet con etanol por 24 h y finalmente se secó al vacío por 72 h a 40 °C para obtener la llamada Pec-CA.

Caracterización

Los espectros de infrarrojo se realizaron con un espectrómetro infrarrojo Frontier con transformada de Fourier (Perkin-Elmer®) en modo de reflexión y equipado con un accesorio ATR universal (FTIR-ATR). Los espectros fueron recolectados a una resolución de 4 cm^{-1} y 128 escaneos por corrida.

Actividad antibacterial

Para evaluar el efecto antibacteriano, se determinaron los valores de concentración mínima inhibitoria CMI de la pectina y la pectina modificada *E. coli*. Para realizar esta prueba, se cultivó la bacteria *E. coli* en caldo Müller-Hinton (MH) a 31 °C durante 24 h. La CIM se determinó mediante un método de dilución estándar según un procedimiento de la Sociedad Americana de Microbiología. En resumen, las CMI se determinaron con un inóculo de 108 UFC en 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de caldo MH que contenía diluciones seriadas al doble de cada muestra. La CMI se definió como la concentración más baja que inhibió completamente el crecimiento visible después de la incubación durante 24 ha 37 °C.

Resultados y discusión

Oxidación de la pectina

Se realizó la oxidación de los grupos -OH de la pectina utilizando NaIO_4 , la Figura 1 muestra el esquema de la oxidación de la pectina, la cual se llevó a cabo mediante una escisión oxidativa de Malaprade entre el peryodato de sodio y los dioles

vecinales presentes en las cadenas poliméricas de la pectina, para esto el NaIO_4 se disocia en agua y forma ácido peryódico, posteriormente se forma un éster ortoyódico el cual se elimina con la ruptura de los enlaces que tienen los carbonos entre los grupos hidroxilo y oxidando a estos grupos OH en un grado, para formar aldehídos.

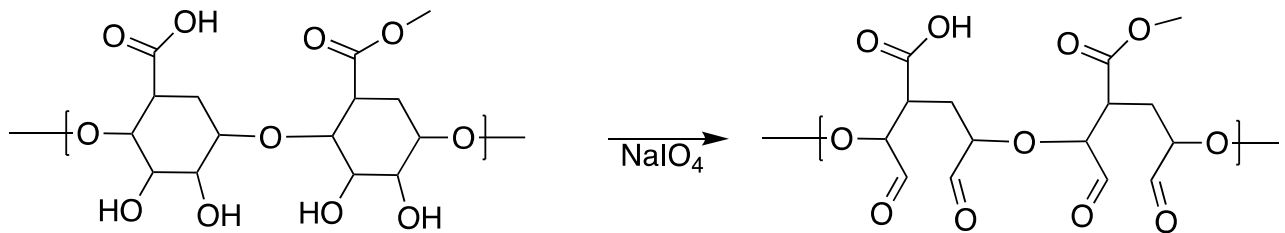


Figura 1. Esquema de la oxidación de la pectina.

Fuente: Elaboración propia.

La pectina oxidada se obtuvo como un polvo color amarillo, diferente a la pectina sin oxidar, la cual mostraba un color anaranjado, este cambio se debe a la oxidación de los grupos hidroxilo. Para confirmar la oxidación, se realizó un espectro infrarrojo (Figura 2) el cual muestra las siguientes señales: la banda intensa y amplia de 3200 a 3600 cm^{-1} es debida a los estiramientos de hidrógeno-oxígeno de los grupos $-\text{OH}$ la cuál al compararla con la de la pectina, es posible apreciar que ha decrecido en intensidad debido a la oxidación de los grupos $-\text{OH}$. Se observa una señal intensa a 1737 cm^{-1} debida a el estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de los grupos COOH , en 1229 cm^{-1} aparecen las vibraciones de los grupos carboxilato. Además, la aparición de dos señales en 1100 y 950 cm^{-1} indican la aparición de grupos aldehído, así como una amplia señal que se traslapa en 1700 cm^{-1} , con lo que se confirma la oxidación de los grupos funcionales de la pectina.

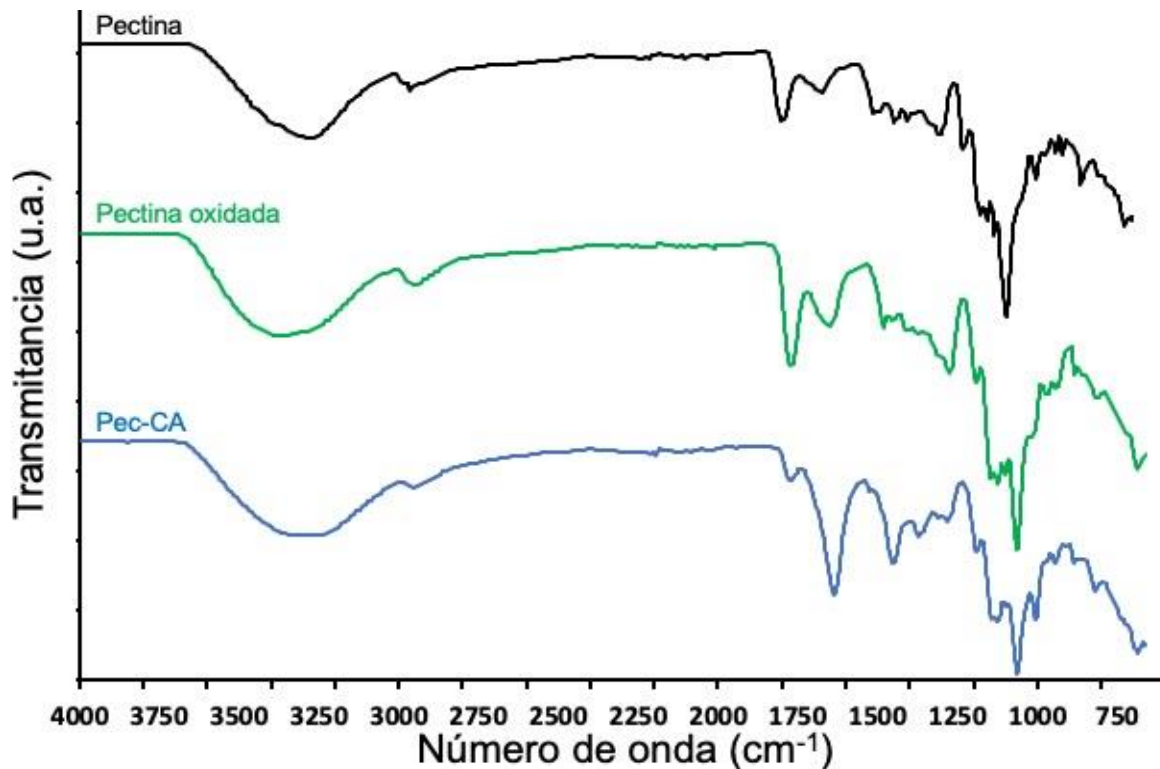


Figura 2. FT-IR de la pectina, pectina oxidada y pectina modificada con 4-cloroanilina.

Fuente: Elaboración propia.

Modificación de la pectina con 4-cloroanilina

La modificación de la pectina con 4-cloroanilida dio como resultado un polvo café claro el cuál, a diferencia de la pectina, ya no se hinchaba en agua, esto debido al injerto de la 4-cloroanilina a lo largo de las cadenas poliméricas de la pectina. En la Figura 3 se presenta el esquema propuesto de la modificación química de la pectina oxidada con la 4-cloroanilina, en la primera parte del esquema de reacción, los grupos aldeído son muy reactivos, por lo que la amina de la 4-cloroanilina reacciona con estos aldeídos de la pectina oxidada formando una imina. Posteriormente se utiliza el borohidruro de sodio para reducir la imina a amina. En este esquema, no se propone que la amina de la 4-cloroanilina reaccione con el ácido carboxílico de la pectina debido a que para esto, sería necesario un agente que active los grupos carboxilo para que puedan reaccionar con la amina primaria de la 4-cloroanilina, como se realizó en un trabajo previo (Oyervides-Muñoz y col., 2019).

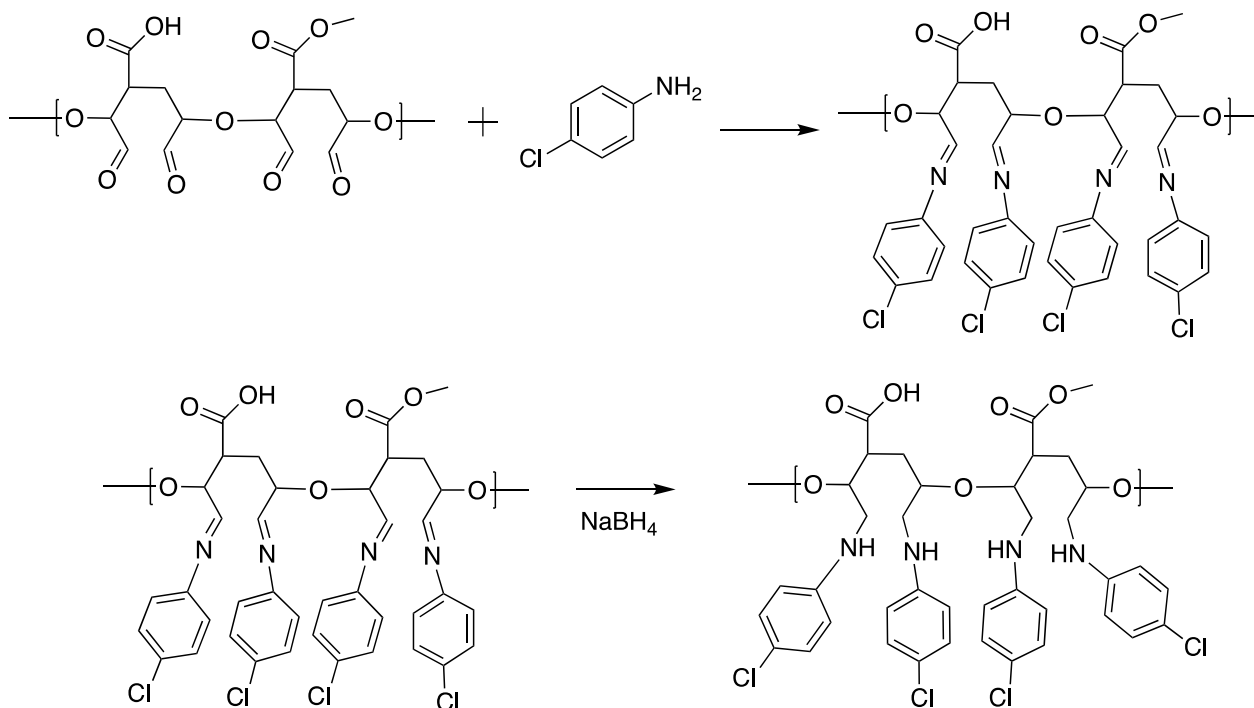


Figura 3. FT-IR Esquema de la modificación química de la pectina.

Fuente: Elaboración propia.

En el espectro infrarrojo de la Figura 2, es posible apreciar las señales de la pectina y de la 4-cloroanilina: La banda amplia entre 3200 a 3600 cm^{-1} es debida a los estiramientos de los grupos $-\text{OH}$ que no se oxidaron, al observar esta banda, se aprecia que su intensidad es menor que la pectina ya que desaparecen los grupos OH . Se observa una señal intensa a 1737 cm^{-1} debida a el estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de los grupos COOH , en 1229 cm^{-1} aparecen las vibraciones de los grupos carboxilato. Además, es posible apreciar una fuerte señal en 1605 cm^{-1} debida a la flexión de la amina secundaria debida a la unión de la pectina y la 4-cloroanilina, también en 1300 cm^{-1} se aprecia la aparición de una nueva señal debida a la tensión $\text{C}-\text{N}$ así como la aparición de señales en 918 y 833 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones $-\text{CH}$ del anillo aromático de la 4-cloroanilina, lo que confirma que fue posible injertar químicamente 4-cloroanilina a lo largo de las cadenas poliméricas de la pectina oxidada. Por otra parte, la extracción con etanol en el equipo soxhlet permitió diluir la 4-cloroanilina que no reaccionó con la pectina para purificar este nuevo derivado

de la pectina, mientras que la Pec-CA al no ser soluble en etanol es el único producto que permanece en el extractor.

Actividad antibacterial

Una vez que se obtuvo la Pec-CA, se probó contra una cepa de *E. coli* midiendo su concentración mínima inhibitoria. Los resultados mostrados en la Tabla 1 muestran que fue posible otorgar propiedades antibacteriales a la pectina gracias al injerto químico de 4-cloroanilina, mientras que la pectina no presentó propiedades antibacteriales contra la cepa *E. coli* en las concentraciones probadas.

Tabla 1. Resultados de la concentración mínima inhibitoria contra *E. coli*.

| Compuesto | <i>E. coli</i> CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|----------------|---|
| Pectina | -- |
| Pec-CA | 256 |

Conclusiones

Se logró con éxito la oxidación de los grupos -OH presentes en las cadenas poliméricas de la pectina, logrando obtener grupos aldehído, en los cuales fue posible injertar químicamente 4-cloroanilina lo que fue comprobado mediante espectrometría infrarroja. Este nuevo derivado de la pectina presentó buenas propiedades antibacteriales contra una cepa de *E. coli*. A pesar de que la pectina por si sola ya tiene propiedades antibacteriales, no fue posible inhibir el crecimiento de la cepa *E. coli* en las concentraciones utilizadas por lo que se demuestra que la Pec-CA posee mejores propiedades antibacteriales contra esta cepa. Esto es muy interesante ya que el *E. coli* es una bacteria que causa miles de muertes al año en todo el mundo y la obtención de este tipo de material (Pec-CA) es fácil de obtener y económico. Por último, debido a las propiedades que presenta este nuevo derivado de la pectina, es posible sugerir su uso como un material para empaquetamiento de alimentos y como recubrimiento antibacterial de superficies.

Agradecimientos

El autor agradece a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila por las facilidades otorgadas para la elaboración de este proyecto.

Bibliografía

- Cinkmanis, I., Muizniece-Brasava, S., Viluma, I., Vucane, S., Aboltins, A., & Keke, A. (2020). Extraction of pectin from apple pomace. *Engineering for Rural Development*, 19(March), 1934–1939. <https://doi.org/10.22616/ERDev.2020.19.TF549>
- Douglas, T. E. L., Dziadek, M., Schietse, J., Boone, M., Declercq, H. A., Coenye, T., Skirtach, A. G. (2019). Pectin-bioactive glass self-gelling, injectable composites with high antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 205(October 2018), 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.061>
- Fan, L., Cao, M., Gao, S., Wang, W., Peng, K., Tan, C., Xie, W. (2012). Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of pectin. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 707–712. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.021>
- Hileuskaya, K., Ladutska, A., Kulikouskaya, V., Kraskouski, A., Novik, G., Kozerozhets, I., Agabekov, V. (2020). ‘Green’ approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: Physico-chemical characterization and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 585(July 2019), 124141. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124141>
- Jridi, M., Abdelhedi, O., Salem, A., Kechaou, H., Nasri, M., & Menchari, Y. (2020). Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of fish gelatin-based edible films enriched with orange peel pectin: Wrapping application. *Food Hydrocolloids*, 103(July 2019), 105688. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105688>
- Kumar, M., Tomar, M., Saurabh, V., Mahajan, T., Punia, S., Contreras, M. del M., Kennedy, J. F. (2020). Emerging trends in pectin extraction and its anti-microbial functionalization using natural bioactives for application in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 105(September), 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.009>
- Liu, L. S., Fishman, M. L., & Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery - A review. *Cellulose*, 14(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10570-006-9095-7>
- Marti, A., Moreno, M., y Martínez, A. (2003). Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutricion Hospitalaria*, 18(4), 181–188.
- Moslemi, M. (2020). Reviewing the recent advances in application of pectin for technical and health promotion purposes: From laboratory to market. *Carbohydrate Polymers*, (24), 117324. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117324>
- Nisar, T., Wang, Z. C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., & Guo, Y. (2018). Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological*

- Macromolecules*, 106, 670–680. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.068>
- Oyervides-Muñoz, E., Avérous, L., Sosa-Santillán, G. de J., Pollet, E., Pérez-Aguilar, N. V., Rojas-Caldera, C. M., García-Astrain, C. (2019). EDC-Mediated Grafting of Quaternary Ammonium Salts onto Chitosan for Antibacterial and Thermal Properties Improvement. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220(8), 1–9. <https://doi.org/10.1002/macp.201800530>
- Pallavicini, P., Arciola, C. R., Bertoglio, F., Curtosi, S., Dacarro, G., D'Agostino, A., Visai, L. (2017). Silver nanoparticles synthesized and coated with pectin: An ideal compromise for anti-bacterial and anti-biofilm action combined with wound-healing properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 498, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.062>
- Sun, Z., & Ostrikov, K. (Ken). (2020). Future antiviral surfaces: Lessons from COVID-19 pandemic. *Sustainable Materials and Technologies*, 25, e00203. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00203>
- Vangnai, A. S., & Petchkroh, W. (2007). Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. *FEMS Microbiology Letters*, 268(2), 209–216. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00579.x>
- Yu, N., Peng, H., Qiu, L., Wang, R., Jiang, C., Cai, T., Xiong, H. (2019). New pectin-induced green fabrication of Ag and AgCl/ZnO nanocomposites for visible-light triggered antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.257>
- Yu, N., Wang, X., Ning, F., Jiang, C., Li, Y., Peng, H., & Xiong, H. (2019). Development of antibacterial pectin from *Akebia trifoliata* var. *australis* waste for accelerated wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 217(235), 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.071>
- Zhang, G., Zheng, C., Huang, B., & Fei, P. (2020). Preparation of acylated pectin with gallic acid through enzymatic method and their emulsifying properties, antioxidation activities and antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.195>
- Zouambia, Y., Moulai-Mostefa, N., y Krea, M. (2009). Structural characterization and surface activity of hydrophobically functionalized extracted pectins. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 841–846. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.007>