



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Evaluación del efecto de oligómeros de quitosán
obtenidos por radiación gamma, para determinar su
acción fungicida y/o fungistática en *Aspergillus flavus*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ESMERALDA MIRANDA RIVAS

ASESORA: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.
2007

Agradecimientos

- A mi familia y amigos

Por el apoyo incondicional que me brindan,, por estar conmigo a pesar de muchas adversidades. Son parte de lo que soy y agradezco infinitamente haber crecido con personas con tanta calidad humana.

- A mis profesores y en especial a la

Dra. Susana

Patricia Miranda

Por permitirme trabajar con ella y brindarme todo su apoyo durante la realización de esta tesis.

- A el profesor Juan Serrano

El cual forma parte del equipo de trabajo del ININ, y fue participante en la primera parte de la experimentación

ÍNDICE	Pág
	.
1. Introducción	3
2. Quitina y quitosán	6
2.1 Estructura química	7
2.2 Propiedades fisicoquímicas	10
2.3 Fuentes de obtención	15
2.4 Obtención de quitina y quitosán	17
3. Obtención de oligómeros de quitosán	21
3.1 Métodos Químicos	21
3.2 Métodos Enzimáticos	22
3.3 Utilización de UV	23
3.4 Por radiación gamma	23
4. Usos y aplicaciones del quitosán	24
4.1 Industria de alimentos	26
4.1.1 Actividad Funguicida y Fungistática	28
5. Irradiación gamma	30
1 Propiedades de la radiación gamma	30
2 Repercusiones de la irradiación gamma	32
3 Aplicaciones de la irradiación gamma	32
4 Quitosán irradiado	33
6. Hongos	38
6.1 Características de <i>Aspergillus flavus</i>	38
6.1.1 Estructura	38
6.1.2 Condiciones de crecimiento y toxicidad	40

6.1.3 <i>Aspergillus flavus</i> en maíz	43
7. Objetivo general y particulares	45
7.1 Objetivo General	45
	ÍNDICE
<hr/>	
7.2 Objetivos particulares	45
8. Cuadro metodológico	46
9. Metodología	47
9.1 Obtención del quitosán	47
9.2 Caracterización fisicoquímica del quitosán	47
9.2.1 Determinación del peso molecular del quitosán y del quitosán irradiado	47
9.2.2 Determinación del grado de desacetilación del quitosán	48
9.3 Evaluación in Vitro del crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i>	49
9.3.1 Preparación de la solución de esporas de <i>Aspergillus flavus</i>	49
9.3.2 Evaluación in Vitro de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra <i>Aspergillus flavus</i> en sólido	50
9.3.3 Evaluación in Vitro de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra <i>Aspergillus flavus</i> en líquido.	50
9.4 Evaluación in Vivo del crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> sobre granos de maíz cubiertos con quitosán	51
10 Resultados y discusión	53
10.1 Caracterización fisicoquímica del quitosán	53
10.1.1 Determinación del peso molecular del quitosán y del quitosán irradiado	53
10.1.2 Determinación del grado de desacetilación del quitosán	55
<hr/>	

2	Evaluación <i>in Vitro</i> del crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i>	57
---	---	----

10.2.1	Preparación de la solución de esporas de <i>Aspergillus flavus</i>	57
--------	--	----

ÍNDICE

10.2.2	Evaluación <i>in Vitro</i> de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra <i>Aspergillus flavus</i> en sólido	58
--------	---	----

10.2.3	Evaluación <i>in Vitro</i> de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra <i>Aspergillus flavus</i> en líquido	62
--------	--	----

10.3	Evaluación <i>in Vivo</i> del crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> sobre granos de maíz cubiertos con quitosán	64
------	--	----

11.	Conclusiones	67
-----	--------------	----

12.	Bibliografía	68
-----	--------------	----

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	Pàg
	.
Figura 1. Posible estructura química de la quitina (Wanjun T., y col.,2005).	
Figura 2. Posible estructura química del quitosán (Wanjun T., y col.,2005).	13
Figura 3. Unidad de Glucosamina, estructura repetitiva en el quitosán (Shahidi F., y col., 1999).	13
Figura 4. Curva de Titulación con el método de Broussignac (Jiang X., y col., 2003)	16
Figura 5. Proceso de obtención quitina (Muzzarelli R., 1977)	23
Figura 6. Reacción química (Parada L. G., y col., 2004)	24
Figura 7. Diagrama simplificado para la preparación de oligómeros de quitina y quitosán (Shahidi F., y col., 1999)	26
Figura 8. Preparación de productos (Shahidi F., y col., 1999).	28
Figura 9. Degradación por UV (Andrady A. L., 1996)	29
Figura 10. Algunas de las aplicaciones del quitosán en diversas áreas.	31

Figura 11. Espectro de quitosán en estado sólido a dosis de (a) 0 kGy, (b) 80 kGy, y (c) 160 kGy (Lim L. Y., y col., 1998).	41
Figura 12. Esquema de la irradiación del quitosán (Yoksan R., y col., 2004)	42
Figura 13. Conidióforos de <i>Aspergillus</i> (Carrillo L., 2003)	46
Figura 14. Efecto del pH y Temperatura sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus flavus</i> (Carrillo L. 2003)	48
Figura 15. Muestras de maíz cubiertas con quitosán a), y sin quitosán b)	61

ÍNDICE

Figura 16. Muestras de maíz utilizadas en la tercera etapa experimental	61
Figura 17. Efecto de la radiación gamma en el peso molecular del quitosán	62
Figura 18. Valoración de tres muestras de quitosán irradiado a 25 kGy	64
Figura 19. Diámetro promedio del crecimiento radial de <i>Aspergillus flavus</i> en agar malta-sal (control) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días	67
Figura 20. Incubación de esporas en caldo mata sal (izquierda) y en caldo malta sal con quitosán (derecha).	71
Figura 21. a) Maíz inoculado con una concentración de esporas de 2.8×10^5 esporas/ml en condiciones de humedad de 83% a 29°C , b) maíz contaminado a los 20 días.	73
Figura 22. Muestras cubiertas con quitosán irradiado (izquierda) y muestras control (derecha)	74

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	Pàg.
Cuadro 1. Constantes para la determinación del peso molecular (Kasaai M. R., y col., 2006)	19
Cuadro 2. Distribución y características químicas de diversos organismos (Muzzarelli R., 1977)	20
Cuadro 3. Aplicación en del quitosán en alimentos	32
Cuadro 4. Mínima concentración inhibitoria (MIC) de quitosán contra algunos hongos y bacterias (Rabea E. I., y col., 2003)	34
Cuadro 5. Características de los grupos /secciones de <i>Aspergillus</i> (Klich., y col., 1992)	47
Cuadro 6. Grado de desacetilación (GD) del quitosán irradiado a 25 kGy	65

Cuadro 7. Concentraciones de soluciones de esporas	66
Cuadro 8. Crecimiento radial de <i>Aspergillus flavus</i> en agar malta-sal (control)	68
Cuadro 9. Diámetro promedio del crecimiento radial (cm) de <i>Aspergillus flavus</i> en medio sólido	69

Introducción

1. Introducción

El quitosán es la forma desacetilada de la quitina, el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza, después de la celulosa (Rabea E. I., y col., 2003; Shahidi F., y col., 1999). Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas (Muzzarelli R., 1977).

En los últimos 20 años el quitosán ha sido de gran interés para la investigación debido a que es una fuente renovable y no tóxica (Roller S., y col., 1999).

El aumento del consumo de productos de calidad, que contengan sólo ingredientes naturales, han sido algunos factores por lo cual la biotecnología ha buscado alternativas de bajo costo y viables a la solución de problemas, como la contaminación por hongos de campo y almacén de granos.

Los granos de maíz y de frijol, son atacados por hongos en campo, en el transporte y en almacenamiento. Como consecuencia uno de los factores que afectan la calidad de la tortilla, es la contaminación por hongos de diversas especies, como el *Aspergillus flavus*, comúnmente encontrado en los granos de maíz antes, después de la cosecha, durante el almacenamiento, e inclusive después de la nixtamalización. *Aspergillus flavus* es el responsable de la producción de sustancias tóxicas, llamadas aflatoxinas (Mendez-Albores J.A. y col., 2002).

El uso de sustancias bioactivas tales como el quitosán en el control de hongos post-cosecha ha atraído mucha atención debido a los inminentes problemas asociados con los agentes químicos ya que los hongos desarrollan resistencia al fungicida, incrementando el número de hongos patógenos tolerantes a éste. El quitosán reduce el crecimiento de un amplio rango de hongos y bacterias.

Introducción

Su uso podría ser una alternativa viable a los métodos de conservación, debido a sus características de biocompatibilidad, biofuncionalidad y no toxicidad (Roller S., y col., 1999).

Sin embargo, la funcionalidad y actividad del quitosán depende de sus características fisicoquímicas, como el peso molecular y el grado de desacetilación. Los oligómeros del quitosán (pentámeros y heptámeros) tienen mejor efecto antimicótico que las unidades largas. (Rabea E. I., y col., 2003; Kofuji K., y col., 2005).

Muchos métodos han sido estudiados para preparar quitosán con bajo peso molecular u oligoquitosán, algunos muestran ventajas, pero también desventajas. El tratamiento químico es una forma fácil a bajo costo pero los desechos químicos y la reproducibilidad son los principales problemas. La hidrólisis enzimática es una forma efectiva, sin embargo, se requiere de múltiples pasos particularmente la preparación enzimática y la purificación del producto (Matsushashi S., Kume T., 1997; Yoksan R., y col., 2004)

Una alternativa es el tratamiento de polímeros por radiación gamma la cual permite producir nuevos materiales con mejores propiedades que los obtenidos por los métodos químicos.

El proceso de radiación puede modificar el peso molecular, hidrofobicidad y propiedades mecánicas de los polímeros, por radiación directa o por inserción de segmentos poliméricos en su estructura sin usar algún iniciador o producto tóxico para producir compuestos de bajo peso molecular (Lim L. Y., y col., 1998; Hai L., y col., 2003).

Introducción

La radiación puede producir un acortamiento de la cadena, formar copolimerizaciones o generar entrecruzamiento entre las diferentes cadenas, además de ésta manera los materiales producidos quedan esterilizados, facilitando su aplicación en alimentos (Chmielewski A. G., y col., 2005).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es “Evaluar el efecto de oligómeros de quitosán obtenidos por radiación gamma, para determinar su acción fungicida y/o fungistática en *Aspergillus flavus*”.

2. Quitina y quitosán

La producción mundial de crustáceos (cangrejo, camarón, langosta, etc.) se ha incrementado enormemente en los últimos años. En general, solamente una pequeña porción, 20 a 30 %, del peso vivo de estas especies de crustáceos es utilizada para alimentación humana; el resto son vísceras y exoesqueleto, los cuales son considerados como desechos.

La biotecnología propone procedimientos alternativos para la extracción de productos de alto valor agregado a partir de dichos desechos. Los desechos están constituidos de compuestos de valor comercial como quitina, proteínas, pigmentos y minerales. Estos compuestos se encuentran asociados y por métodos tradicionales se utilizan altas concentraciones de químicos para separarlos, lo cual ocasiona destrucción de proteínas y depolimerización de la quitina (Shirai K., y col., 1996).

El quitosán proviene de la quitina, y en recientes años ha atraído mucha atención debido a sus diversas aplicaciones en alimentos, medicina, cosmetología, entre otras. Las formas en la que se puede obtener son diversas, las cuales presentan ventajas y desventajas.

En este proyecto se evalúa una de las ventajas de la utilización del quitosán irradiado por rayos gamma aplicándolo en alimentos, en cereales en específico. Por lo cual es importante conocer algunos aspectos generales de este biopolímero como su estructura química, propiedades fisicoquímicas, aplicaciones, etc., las cuales se describen a continuación.

2.1 Estructura química

La quitina es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza, después de la celulosa; el término “quitina” se deriva del griego “quiton”, que significa cota de malla, su primera utilización fue hecha por Bradconnot en 1811 (Shahidi F., y col., 1999). Es la mayor fuente de contaminación superficial en las áreas costeras (Rabea E. I., y col., 2003).

Algunas de las características de la quitina son:

- Blancura
- Dureza
- Inelasticidad

Sistemáticamente se conoce como 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa, con uniones $\beta(1-4)$ (Shahidi F., y col., 1999). Su estructura es similar a la de la celulosa, a diferencia de los grupos aminos en la posición de C-2 (ver Figura 1), en la cual se unen unidades repetidas de cadenas principales.

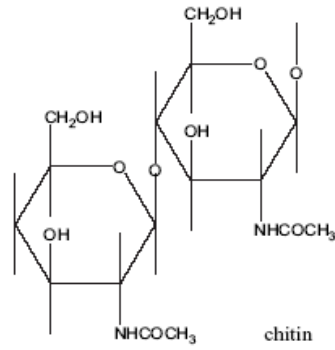


Figura 1. Estructura química de la quitina (Wanjun T., y col., 2005).

Quitina y quitosán

La Quitina, como en el caso de la celulosa y otros biopolisacáridos, tienen alto peso molecular y poseen una cadena de enlaces de hidrógeno inter e intramolecular, esta estructura resulta con poca solubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos, lo que la hace químicamente inerte para su derivatización (Yoksan R., y col., 2004) .La quitina puede formar cuatro tipos diferentes de puentes hidrógeno, éstos son:

- a) Entre dos grupos hidroxilo (HO–HO)
- b) Entre el hidrógeno del grupo amida y los oxígenos de los grupos hidroxilo (HO–HN)
- c) Entre los hidrógenos de los hidroxilo y el grupo carbonilo (C=O–HO)

d) Entre el hidrógeno sobre el nitrógeno de la amida y el grupo carbonilo (C=O—N)

La energía del enlace de C-O-C es más pequeña a comparación con el enlace C-C, por lo que es más probable que la descomposición de quitina comience con el corte del enlace de C-O-C (Wanjun T., y col., 2005). El grupo acetilo de la quitina puede presentar un impedimento estérico para la formación de puentes de hidrógeno, en los que intervenga el grupo hidroxilo vecino o el hidrógeno amínico, lo que resulta también en una desventaja relacionada a la compatibilidad y miscibilidad con otros polímeros (González G., V., y col., 2002).

El quitosán es la forma desacetilada de la quitina principalmente de fuentes de camarón y conchas de cangrejo, se obtiene por métodos de desacetilación alcalina (NaOH, 40-50%), la mayoría de los quitosanos comerciales tienen un grado de desacetilación mayor que al 70% y un peso molecular entre 1×10^5 y 1.2 millones de Da (Matsushashi S., y col., 1997), está compuesto de 2-Amino-2-Deoxy- β -D- glucosa (ver Figura 2), tiene tres grupos funcionales. Las modificaciones químicas de estos grupos proveen diferentes aplicaciones.

Quitina y quitosán

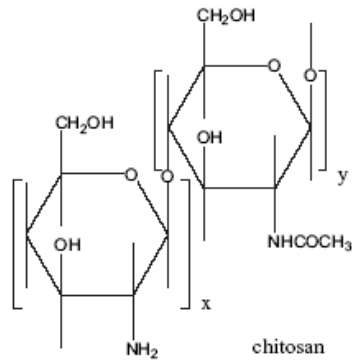


Figura 2. Estructura química del quitosán (Wanjun T., y col.,2005).

Contiene mas de 5000 unidades de glucosamina (ver Figura 3), tres tipos de grupos funcionales, un grupo amino, un grupo primario hidroxil y un grupo secundario hidroxil en las posiciones C-2, C-3 y C-6, respectivamente. Las modificaciones químicas de estos grupos proveen numerosas aplicaciones.

Otra de las características que posee es ser un polímero policatiónico con una estructura lineal que presenta grupos aminos libres con una alta densidad de cargas positivas (Shirai K., y col., 1996; Plascencia J. y col., 2003) y propiedades específicas, una de ellas es tener una mejor actividad antimicrobiana que la quitina, debido a la carga positiva en el carbono C-2 del monómero de la glucosamina, haciendo la estructura más soluble que en pH menor de 6 (Shahidi F., y col., 1999). Es insoluble en la mayoría de los solventes sin embargo es soluble en ácidos orgánicos diluidos como el ácido acético, fórmico, succínico, láctico y málico (Rabea E. I., y col., 2003). El uso del quitosán es limitado debido a su insolubilidad en agua, alta viscosidad y tendencia a coagular con proteínas a altos pH.

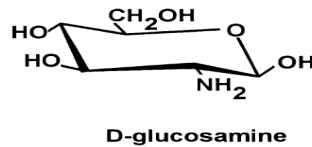


Figura 3. Unidad de Glucosamina, estructura repetitiva en el quitosán (Shahidi F., y col., 1999).

Quitina y quitosán

El quitosán, como otros polímeros celulosos, muestra poliformismo cristalino debido a las diferentes formas en que los grupos OH de la cadena polimérica pueden participar en los enlaces H y el número de moléculas de agua atrapadas dentro de cada unidad de la molécula. (Lim L. Y., y col., 1998).

El quitosán cuenta con numerosas variaciones ya que se obtiene a partir de diferentes especies de quitina y a diferentes condiciones de desacetilación. Variando las características fisicoquímicas como peso molecular, grado de desacetilación y distribución de grupos acetamino; las cuales influyen las funciones del quitosán. Existe una disminución del peso molecular durante el proceso de desacetilación (Kofuji K., y col., 2005). La viscosidad de soluciones de quitosán es afectada por el grado de desacetilación, el peso molecular, la concentración, fuerza iónica, el pH y la temperatura. Generalmente un incremento en la temperatura causa una disminución en la viscosidad. El efecto del pH en la viscosidad depende del ácido usado. El quitosán nativo es soluble en ácidos orgánicos cuando el pH es <6. (Rabea E. I., y col., 2003).

2.2 Propiedades fisicoquímicas

Una de las diferencias más importantes entre la quitina y el quitosán, es su solubilidad, ya que como anteriormente se dijo la estructura de la quitina no permite que existan enlaces de puente de hidrógeno, por lo que hace difícil esta propiedad, mientras que el quitosán es soluble en soluciones ácidas diluidas.

El quitosán es obtenido por la desacetilación parcial de la quitina y consiste en unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. El parámetro más importante para la caracterización del quitosán es el grado de desacetilación, el cual refleja el balance entre los dos residuos monoméricos y es definido como:

Quitina y quitosán

Donde $D\text{-GlcN}$ y $D\text{-GlcNAc}$ representan el peso molecular de unidades de D-GlcN y D-GlcNAc, respectivamente, sin la macromolécula (Balázs N., y col., 2007).

El grado de desacetilación influencia las propiedades físicas, químicas y biológicas, como son:

- Características electrostáticas ácido-base
- Biodegradabilidad
- Propiedades de absorción
- Habilidad para quelar iones metálicos.

La mayoría de las muestras comerciales tienen un grado de desacetilación de 70-80%, siempre menor que el 90%.

Existen muchos métodos han sido desarrollados para la determinación del grado de desacetilación, entre los cuales están:

- Espectroscopía UV
- Espectroscopía IR
- Espectroscopía de masa
- Titulación potenciométrica o pHmétrica

Quitina y quitosán

La titulación potenciométrica, fue propuesta por Broussignac, durante el procedimiento el biopolímero es disuelto en un ácido conocido HCl, convirtiendo al quitosán en polielectrólito (Jiang X., y col., 2003) y la solución es titulada con NaOH, donde se obtiene como resultado una curva de titulación, (ver Figura 4), con dos puntos de inflexión: el primer punto corresponde al exceso de HCl, mientras que el segundo corresponde al quitosán protonado. La diferencia entre los dos puntos de inflexión a lo largo de la abcisa, da como resultado la cantidad en moles de H^+ requeridos para la protonación de los grupos amino libres (desacetilado) y corresponde a la cantidad de D-GlcN en la solución titulada. Asumiendo que el

resto de la muestra es D-GlcNAc, el valor del grado de desacetilación puede ser obtenido.

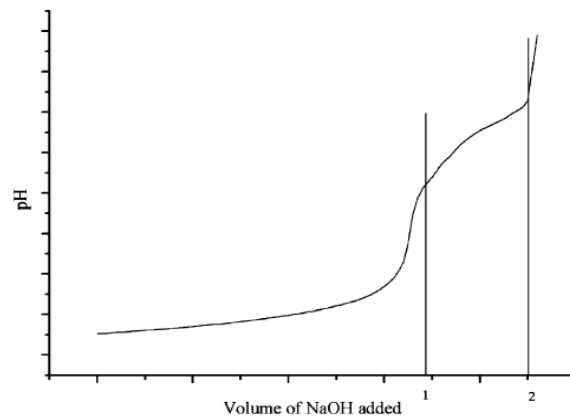


Fig. 1. Titration curve in Broussignac's method.

Figura 4. Curva de Titulación con el método de Broussignac (Jiang X., y col., 2003)

La reacción de equilibrio que describe el estado ionizante del quitosán como resultado de la protonación de los grupos amino en solución ácida es:

Mientras que la constante de disociación del quitosán según Wang Q. Z., 2006, es definida como:

Quitina y quitosán

La desventaja de utilizar el método de titulación potenciométrica, implica que la muestra del quitosán tiene que ser purificada y secada previamente para obtener un resultado preciso. Añadiendo los posibles errores que se pueden cometer durante la determinación como: el peso de la muestra y errores causados por la precipitación del polímero, estos últimos reducen la concentración de la solución causando un error en la función lineal (Balázs N., y col., 2007).

El peso molecular es otra de las características que identifica los diferentes tipos de quitosanos, ya que pueden existir con diversos valores, comercialmente existen en un rango de 1×10^5 y 1.2 millones de Da (Matsushashi S. y col., 1997.) Las diversas formas de obtener quitosán son: enzimáticas, químicas, por radiaciones y ultrasónicas (algunas de ellas se detallaran más adelante).

Se ha reportado que algunos de estos métodos de degradación cambian el grado de desacetilación de la muestra original, sin embargo existen métodos como la degradación ultrasónica (Chen R. H. y col., 1996) y la degradación mediante la radiación gamma (Lim L. Y., y col., 1998; Hai L., y col., 2003), no modifican esta propiedad.

La determinación del peso molecular por medio de la viscosidad intrínseca, es un método relativamente rápido en el cual la viscosidad intrínseca de una solución de polímero esta relacionada al peso molecular de acuerdo con la Ecuación Mark-Houwink-Sakurada

Donde K y a son constantes que dependen del solvente y el polímero y M es el peso molecular del polímero. (Kasaai M. R., y col., 2000)

Los solventes en los cuales se puede disolver el quitosán son:

- Ácido fórmico + agua
- Ácido acético + agua
- Ácido láctico + agua
- Ácido glutámico + agua

Algunos de estos son relativamente seguros para consumirse, el solvente más estudiado es el ácido acético, en el cual el quitosán es disuelto en una mezcla de 80 partes de agua y 20 partes de ácido (Miranda C. S. P., 2000).

Para la determinación del peso molecular se han realizado estudios utilizando una solución buffer de acetato de sodio (NaAc) y ácido acético (HAc), calculando las constantes a y k (Cuadro 1), para conocer el valor de M en la ecuación antes descrita.

Cuadro 1 Constantes para la determinación del peso molecular

SOLVENTE	T (°C)	DA (%)	pH	A	K x 10 ⁵ (dLg ⁻¹)	RANGO DE PESO MOLECULAR (kDA)
0.5 M HAc/0.5 M NaAc	25	29.5	4.7	0.59	199.0	115-1590
0.3 M HAc/0.2 M NaAc	25	10.5	4.6	0.76	76.0	100-600
0.25 M HAc/0.25 M	25	21-26	4.7	0.79	15.7	35-2220

NaAc						
0.2 M HAc/0.1 M NaAc	30	0	4.4	0.81	16.8	194-937
0.2 M HAc/0.2M NaAc	25	58	4.3	1.14	—	1.6-15

- T= temperatura, DA= grado de desacetilación

Fuente: Kasai M. R. 2006.

Quitina y quitosán

2.3 Fuentes de obtención

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas, en el Cuadro 2, se muestran algunos ejemplos de la distribución quitina en diversos organismos.

Cuadro 2. Distribución de quitina en diversos organismos

ORGANISMO		ESTRUCTURA	QUITINA
Hongos			
Ascomiceta	<i>Aspergillus flavus, fumigatus, níger, Penicillium notatum, Neurospora crassa</i>	Pared celular y membrana estructural de micelio y esporas	En pequeñas cantidades a 45%
Basidiomiceto	<i>Agaricus campestris, Armillaria mellea, Boletus edulis, Schizophyllum commune.</i>		

Phycomyceta	<i>Blastocladiella emersonii</i> , <i>Mucor rouxii</i> , <i>Mortierella vinacea</i> , <i>Phycomyces Blakesleanus</i> , <i>Rhizopus rhizopodiformis</i> , <i>Apoaachlya</i>		
Algas			
Chlorophyceae	<i>Ulva lactuca</i> , <i>Valonia ventricosa</i>		Abundante
Aschelminthes			
Nematodo	<i>Ascaris lombricoides</i>	Membrana media del huevo	16%

Fuente : Muzzarelli R., 1977

Quitina y quitosán

Continuación Cuadro 2

Annelida			
Polychaeta	<i>Aphrodite</i> , <i>Amphinome</i>		20-388%
Oligochaeta	Lombrices terrestres	Membrana peritrópica	Abundante
Mollusca			
Polyplacophora	<i>Quiton</i>	Placa de carapacho	12%
Gastropoda	<i>Helix pomatia</i>	Perla	3-7%
Cephalopoda	<i>Sepia officinalis</i> , <i>Nautilus pompilius</i> , <i>Loligo paelei</i> , <i>Octopus vulgaris</i> , <i>Omnatostrephes</i>	Cáscara calcificada	3-26%

	<i>sagittatus</i>		
Artrópodo			
Crustácea	<i>Palinurus vulgaris, Homarus vulgaris, Cancer magíster, Pagurus, Carcinus maenas, Astacus fluviatilis, Euphausia superba</i>	Cutícula calcificada	58-85%
Insecta	<i>Drosophila melanogaster, Locusta migratoria, Periplaneta americana, Bómbix mori, Callíphora sp. Sarcophaga bullata, Tenebrio monitor, Schistocerca gregaria</i>	Cutícula endurecida y no endurecida	20-60%
Arácnida y Chilopoda	<i>Galeodes, Scolopendra, Musca domestica</i>	Membrana peritrópica	4-22%

Fuente : Muzzarelli R., 1977

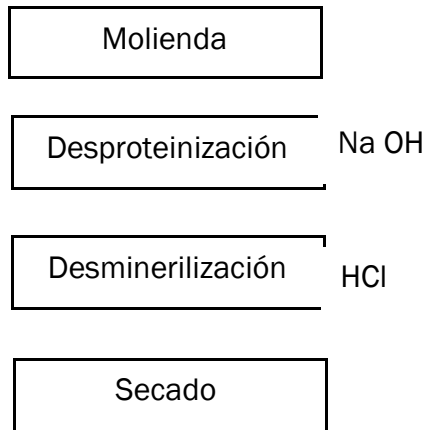
Quitina y quitosán

En la naturaleza existen diversos organismos de los que se extrae quitina, una vez obtenida se hidroliza de diversas formas para obtener el quitosán, recientes avances en la tecnología de fermentación proponen la cultivación de hongos (*Aspergillus niger*) como una alternativa a la fuente de obtención del quitosán (Rabea E. I., y col., 2003; Cai J., y col., 2006).

2.4 Obtención de quitina y quitosán

La quitina es fácil de obtener del exoesqueleto de camarones o cangrejos, para ello se requiere un tratamiento químico con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas a ella (Parada L. G., y col., 2004).

Exoesqueletos de cangrejo



Quitina

Figura 5. Proceso de obtención quitina (Muzzarelli R., 1977).

Quitina y quitosán

En la Figura 5 se muestran los pasos claves para la extracción de quitina a partir de crustáceos. Como anteriormente se mencionó las proteínas deben ser removidas del caparazón con un tratamiento con hidróxido de sodio. Los minerales como carbonato de calcio y fosfato de calcio son extraídos con ácido

hidroclorhídrico, posteriormente se enjuaga y seca como si fuera un material escamoso (Gudmund S. B., y col., 1989).

La obtención de quitosán se realiza por medio de un tratamiento con álcali caliente concentrado; (ver Figura 6), con el fin de retirar la mayor cantidad de unidades aceto de la estructura del polímero; el polímero que se obtiene posee un comportamiento marcadamente básico debido al grupo amino libre en su estructura, lo cual además le proporciona ciertas características físico químicas de gran interés industrial.

La ecuación química correspondiente al proceso es la siguiente:

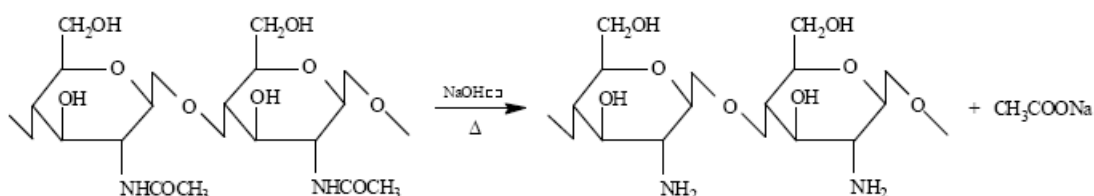


Figura 6. Reacción química de obtención de quitosán (Parada L. G., y col., 2004).

La producción industrial de quitina y quitosán se realiza por lo general a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, desechados de las industrias pesqueras y alimentaria. Para producir 1 kg de quitosán con grado de desacetilación del 70% se requiere de 6,3 kg de HCl y de 1,8 kg de NaOH, 0,5 Ton de agua de proceso y 0,9 Ton de agua para enfriamiento (Parada L. G., y col., 2004).

La quitina y el quitosán son producidos comercialmente en India, Japón, Polonia, Noruega y Australia. El precio del quitosán en pequeñas cantidades es de 7,5 USD por 10 g (Parada L. G., y col., 2004).

El quitosán puede ser obtenido por la hidrólisis parcial de la quitina (ver Figura 7); existen diversos métodos, en consecuencia se reducen las concentraciones de los reactantes para separar los compuestos de interés, ya que las asociaciones proteína-quitina-pigmentos minerales están parcialmente rotas. Esto facilita la purificación de la quitina, además de obtenerse proteínas parcialmente hidrolizadas y pigmentos. Estos hidrolizados presentan un adecuado valor nutricional para alimentación animal como sustitutos de harina de pescado y como atrayentes en dietas con baja aceptabilidad.

Las enzimas quitinolíticas juegan un papel importante en reacciones fisiológicas, procesos de bioconversión de desechos, desmineralización de quitina en suelos y ambientes marinos, así como en protección vegetal en contra de hongos parásitos. Se ha mostrado que la producción de quitinasas utilizando desechos ricos en quitina, se incrementa notablemente cuando el microorganismo productor asimila quitina como fuente de carbono y nitrógeno. Lo anterior reduce costos además de que mediante el control de condiciones tales como pH, aireación, actividad de agua, edad del inóculo es posible obtener preparaciones enzimáticas activas y estables (Quijano G.G., y col., 2004).

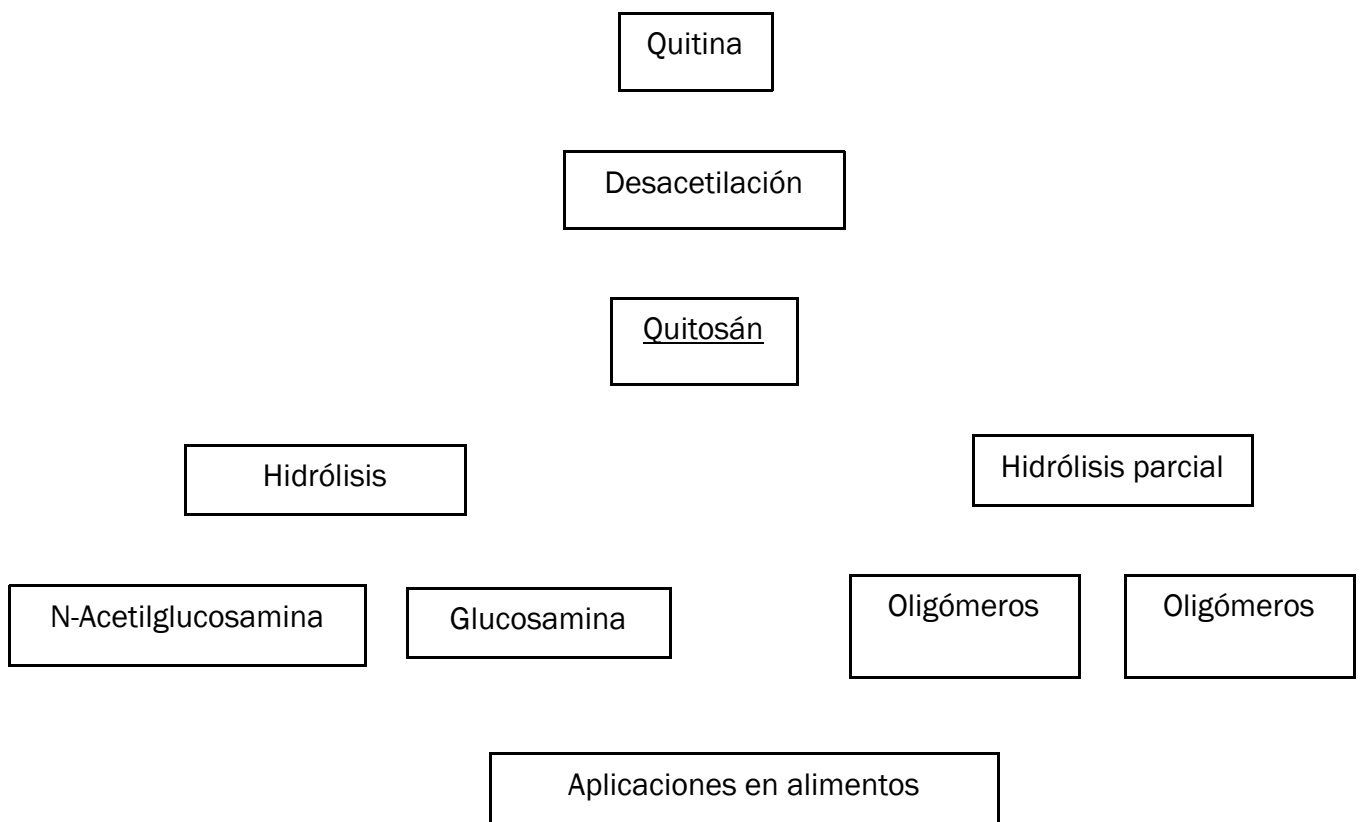


Figura 7. Diagrama simplificado para la preparación de oligómeros de quitina y quitosán (Shahidi F., y col., 1999).

3. Obtención de oligómeros de quitosán

Como se mencionó antes, el quitosán, se desacetila parcialmente de la quitina. Los productos depolimerizados (quitosán de bajo peso molecular), homo-hetéreo- quitoolisacáridos, así como la glucosamina/ N- acetil-glucosamina, son de especial interés en la agricultura y medicina, ya que poseen propiedades que ayudan al mecanismo de defensa de las plantas, actuando como antibacteriales (Kittur. F. S., y col., 2005; Xu J., y col., 2007).

Los oligómeros son la forma degradada o hidrolizada del quitosán, se ha encontrado que son solubles en soluciones ácidas y son más efectivos en el mecanismo de defensa de las plantas (Xu J., y col., 2007). Los quitosanos de bajo peso molecular y/o oligoquitosanos han atraído mucha atención como una alternativa debido a su bioactividad y otras novedosas propiedades biológicas, la forma de degradación puede ser por vía enzimática, hidrólisis ácida, sonodegradación, radiación gamma, y degradación ultravioleta (Wasikiewicz J. M., y col., 2005; (Yoksan R., y col., 2004)

3.1 Métodos Químicos

El tratamiento químico (la hidrólisis ácida o básica) es una forma fácil (ver Figura 8) a bajo costo, efectivo, pero el grado de desacetilación cambia, la cantidad de desechos químicos producidos, y la reproducibilidad son desventajas del proceso (Yoksan R., y col., 2004; Hai L., y col., 2003).

Obtención de oligómeros de quitosán

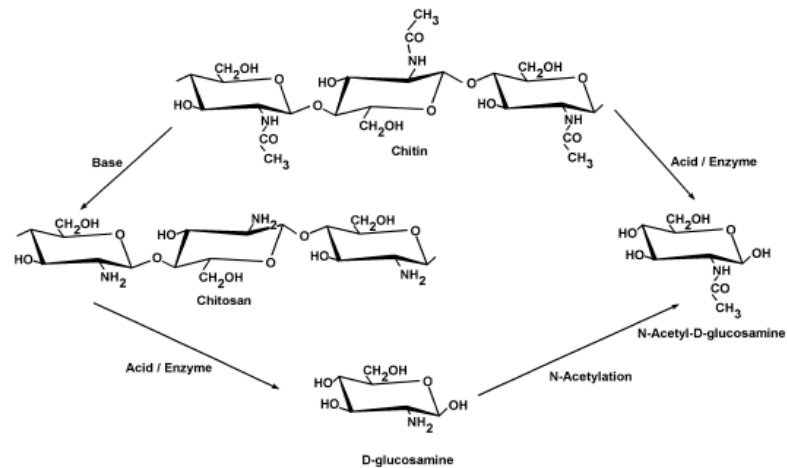


Figura 8. Preparación de productos (Shahidi F., y col., 1999).

3.2 Métodos Enzimáticos

La degradación o hidrólisis enzimática es una efectiva alternativa para producir oligoquitosanos ya que se somete a un desdoblamiento específico bajo condiciones poco rigurosas; sin embargo, se requiere de múltiples pasos, particularmente para la preparación de la enzima y la purificación del producto, los cuales son algunos de los inconvenientes para la producción a gran escala (Yoksan R., y col., 2004; Hai L., y col., 2003).

Muchos métodos han sido estudiados para preparar quitosán con bajo peso molecular o oligoquitosán, los cuales muestran ventajas, pero también desventajas.

La producción de oligómeros de quitosán por irradiación gamma es una alternativa para mejorar su aplicación mediante la modificación de sus propiedades químicas, como es el peso molecular, este tema se ampliará más adelante.

4. Usos y aplicaciones del quitosán

La mayoría de los polímeros son materiales sintéticos, su biocompatibilidad y biodegradabilidad es más limitada que aquellos que provienen de forma natural como la celulosa, dextrosa, quitina, quitosán y sus derivados, sin embargo estos también están limitados en su reactividad y procesamiento, debido a su insolubilidad en agua, alta viscosidad y tendencia a coagular con proteínas a alto pH; en el caso del quitosán.

La quitina y el quitosán son de interés comercial, debido a su alto contenido de nitrógeno (6.89%) comparado con el sustituto sintético de celulosa (1.25%). Lo anterior hace que el quitosán sea un agente quelante (Rabea E. I., y col., 2003).

Estos productos atraen la atención debido a la viabilidad económica para producirlos, además que adicionalmente se extraen pigmentos y proteínas, a partir de los desechos del camarón y cangrejo (ver Figura 10) se muestran algunas de las aplicaciones del quitosán en diversas áreas de interés.

Usos y aplicaciones del quitosán

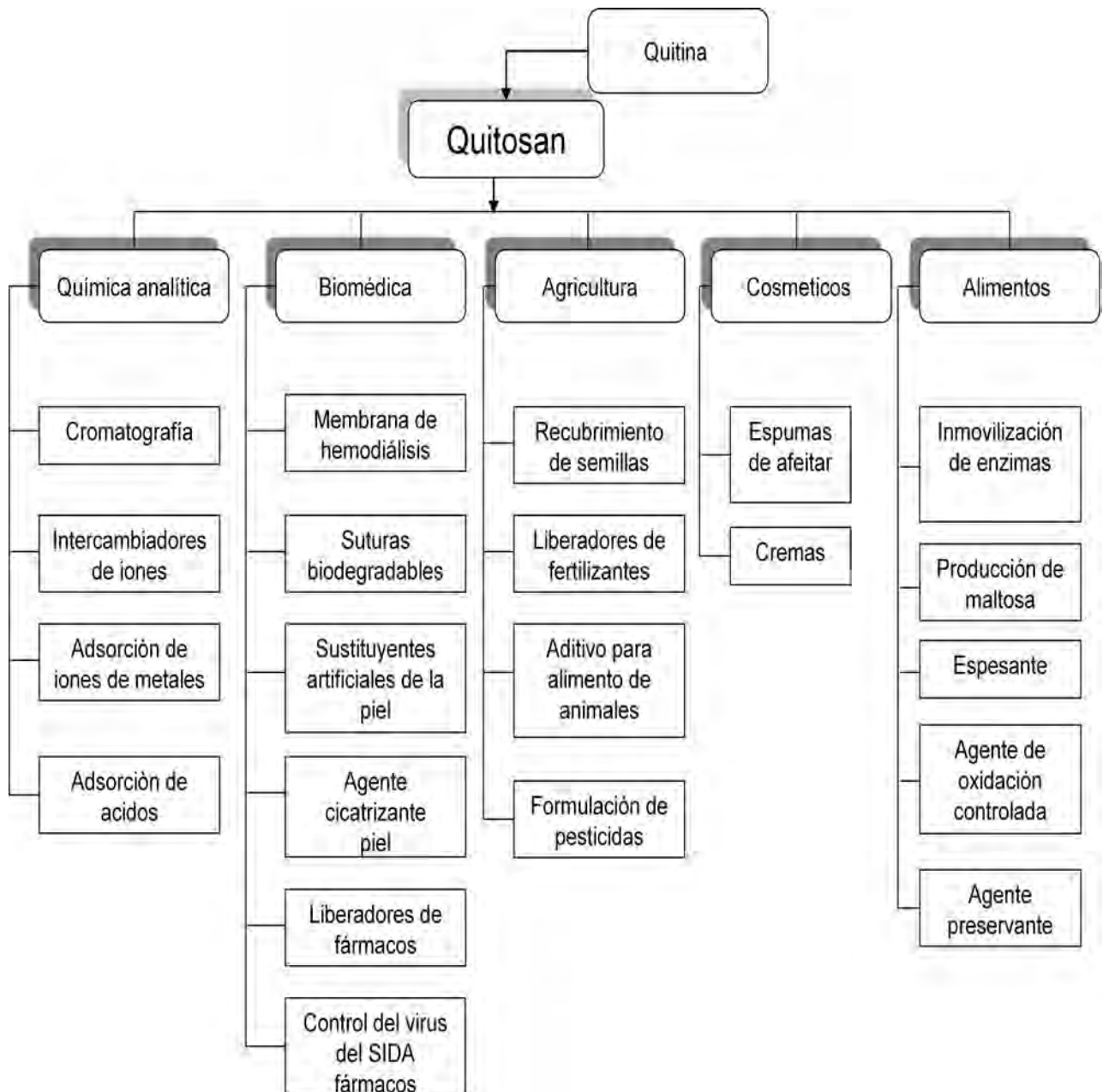


Figura 10. Algunas de las aplicaciones del quitosán en diversas áreas.

Usos y aplicaciones del quitosán

4.1 Industria de alimentos

Como se mencionó anteriormente los usos del quitosán y sus derivados son extensos, en las últimas décadas se ha puesto mayor atención en las diversas aplicaciones en alimentos, incluyendo la bioconversión de productos alimenticios de valor agregado, prevención de deterioro microbiológico en alimentos, elaboración de películas biodegradables, tratamiento de materiales de desechos en la producción de alimentos, purificación del agua, clarificación y desacidificación de jugos de fruta, en el Cuadro 3 se muestran algunos ejemplos de su aplicación en alimentos (Shahidi F., y col., 1999).

Cuadro 3 Aplicación en del quitosán en alimentos.

APLICACIÓN	EJEMPLOS
Agente antimicrobial	<ul style="list-style-type: none">• Bactericida• Fungicida• Medición en la contaminación de moho en la agricultura
Películas comestibles	<ul style="list-style-type: none">• Controla la transferencia de humedad entre el

	<p>alimento y el ambiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Controla la liberación de sustancias antimicrobianas • Controla la liberación de antioxidantes • Controla la liberación de nutrientes y sabores • Reduce la presión parcial de oxígeno • Controla la respiración • Controla la temperatura • Controla el pardeamiento enzimático en frutos
--	--

Fuente: Shahidi F., y col., 1999.

Usos y aplicaciones del quitosán

Continuación Cuadro 3

Aditivo	<ul style="list-style-type: none"> • Clarificación y desacidificación de frutas y bebidas • Amplia el sabor natural • Controla la textura • Agente emulsificante • Agente Espesante y estabilizante • Estabilizador de color
Calidad nutricional	<ul style="list-style-type: none"> • Fuente de fibra • Reducción de la absorción de lípidos • Agente antigástrico
Recubrimiento de desechos sólidos	<ul style="list-style-type: none"> • Afinidad a la floculación
Purificación de agua	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperación de iones metálicos , pesticidas y

	fenoles <ul style="list-style-type: none"> • Remoción del color
Otras	<ul style="list-style-type: none"> • Encapsulación de nutraceuticos

Fuente: Shahidi F., y col., 1999.

La mayoría de las aplicaciones del quitosán se basan en su naturaleza polielectrolítica. En soluciones ácidas, los grupos amino del quitosán se protonan a NH_3^+ (Park S. Y., y col., 2002; Roller S, C., 1999).

Usos y aplicaciones del quitosán

4.1.1 Actividad Funguicida y Fungistática

La actividad antimicrobiana del quitosán y sus derivados sobre diferentes grupos de microorganismos, como bacterias, algas y hongos, ha recibido mayor atención en años recientes. Sin embargo, la acción antimicrobiana es influenciada por los factores intrínsecos como el tipo de quitosán, el grado de polimerización, el grado de desacetilación, el nutriente natural, la composición química de los sustratos, y las condiciones del ambiente (la actividad de agua o contenido de humedad del sustrato).

Los oligómeros de quitosán tienen mejor efecto contra hongos que las unidades largas del polímero. La actividad antimicrobiana del quitosán es mejor en hongos y algas que en bacterias, ha sido probado contra diversos hongos y en algunas bacterias los cuales se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Mínima concentración inhibitoria (MIC) de quitosán contra algunos hongos y bacterias.

HONGOS	MIC (ppm)	BACTERIAS	MIC (ppm)
<i>Botrytis cinerea</i>	10	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	100	<i>Bacillus cereus</i>	1000
<i>Drechstera sorokiana</i>	10	<i>Corinebacterium michiganence</i>	10
<i>Micronectriella nivalis</i>	10	<i>Erwinia sp.</i>	500
<i>Piricularia oryzae</i>	5000	<i>Erwinia carovora Subs.</i>	200
<i>Rhizoctonia solana</i>	1000	<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Trichophyton equinum</i>	2500	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700
		<i>Micrococcus fluorescens</i>	20
		<i>Staphylococcus aureus</i>	20

Fuente: Rabea E. I., y col., 2003.

Usos y aplicaciones del quitosán

La mínima concentración de inhibición reportada en algunos organismos específicos está entre el rango de 0.0018 a 1.0%, influenciada por múltiples factores como lo son el pH del medio de crecimiento, el grado de polimerización del quitosán, y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas.

En estudios recientes, el efecto inhibitorio del quitosán fue más alto a pH 6.0 (pK_a valor del quitosán 6.2) que a pH 7.5, cuando la mayoría de los grupos amino están en forma de base libre (Wang Q. Z., y col., 2006).

Los hongos fitopatógenos como *Fusarium solana* y *Colletotrichum lindemuthianum* fueron inhibidos por el quitosán. La concentración utilizada en diversos hongos para reducir su crecimiento, es de 1 mg/ml con excepción del *Zygomycetes*, el cual contiene quitosán como mayor componente en su pared celular (Rabea E. I., y col., 2003)

5. Antecedentes de irradiación gamma

El uso más común del término radiación, tanto científica como popularmente, se refiere a las ondas o rayos en el espectro electromagnético. Este espectro presenta la totalidad del rango de frecuencias o longitudes de onda de la radiación electromagnética. Muchas de las regiones del espectro son conocidas; microondas, infrarrojo, ultravioleta, y rayos X. Debido a esto, la irradiación se refiere a la exposición o iluminación por rayos u ondas de todo tipo (Satin M., 1996).

1 Propiedades de la radiación gamma

Los rayos gamma son producidos a partir de radioisótopos de cobalto-60 (1,17 y 1,33 MeV) y de cesio-137 (0,662 MeV). Ambos emiten rayos gamma con alto poder de penetración, los cuales se pueden utilizar para tratar alimentos a granel o en su envasado final. El cobalto-60 es el radioisótopo más común para la radiación gamma en alimentos ya que es una fuente fácilmente disponible; tiene potencias de penetración más grandes que las del cesio-137. (Molins R. A., y Col., 2004; Chmielewski A.G., y col., 2005).

Durante el proceso de irradiación, los alimentos son expuestos a una fuente de energía de ionización. El periodo de tiempo de exposición de los alimentos a la fuente y los niveles de energía utilizados determinan la dosis de irradiación. Las dosis utilizadas para la irradiación de alimentos no provocan que los alimentos se vuelvan radioactivos (Satin M., 1996).

Cuando la radiación ionizante pasa a través de la materia, tal como un alimento pierde energía. En otras palabras, la energía es absorbida, y es esta energía absorbida o dosis absorbida, la que conduce a la ionización o excitación de los átomos y moléculas de la materia, que a su vez, da como resultado cambios químicos conocidos que ocurren cuando el alimento es irradiado (Chmielewski A.G., y col.,2005).

El proceso por el que un átomo o una molécula neutros se llegan a cargar se denomina “ionización” y a la entidad resultante se la conoce como un “ion”. Así que el ion que se forma por pérdida o capturado de un electrón contiene un “radical libre”

Como los radicales libres tienen un electrón desapareado, normalmente son altamente reactivos. El electrón expulsado puede, a su vez, ionizar otros átomos o moléculas.

El paso de una partícula cargada con alta energía a través de los átomos también puede impartir energía a los electrones atómicos sin realmente expulsarlos mediante un proceso denominado “excitación”.

Las interacciones de las partículas cargadas con alta energía con los electrones en la materia absorbente generalmente implican un gran número de átomos o moléculas, distribuidos a lo largo del camino de la partícula, elevándolos

a estados excitados. Si estos estados están por encima del potencial de ionización de los átomos o moléculas, se forman iones, y la carga positiva se puede distribuir sobre una parte de la molécula o estar localizada en un cierto átomo o grupo de átomos. Sin embargo, si los estados excitados están por debajo del potencial de ionización, se producen átomos o moléculas excitados (Molins R. A., y Col., 2004).

Irradiación gamma

2 Repercusiones de la irradiación gamma

La irradiación de alimentos es un método físico para preservar los alimentos mediante el uso de cierto tipo de energía de radiación. Es una de varias técnicas que pueden utilizar los productores de alimentos para proteger la calidad del alimento antes de llegar al consumidor final.

La radiación ionizante también rompe algunos enlaces químicos dentro de los alimentos. Los cambios químicos en los alimentos tienen efectos diversos, algunos son beneficiosos, otros no (Molins R. A., y Col., 2004).

Es cierto que la combinación de diversos procesos puede causar una disminución en ciertos nutrientes, lo anterior se aplica a todo tipo de proceso, incluyendo la radiación. Sin embargo, aunque parezca contradictorio, se puede presentar un efecto benéfico al mejorar el valor nutrimental del alimento. (Satin M., 1996).

3 Aplicaciones de la irradiación gamma en alimentos

Las aplicaciones de la irradiación de alimentos pertenecen a cualquiera de los dos tipos básicos:

- Prevención de las pérdidas de los alimentos.
- Descontaminación microbiológica de los productos alimentarios o la inactivación de los parásitos humanos soportados en alimentos.

El primer grupo de aplicaciones da lugar a la preservación de la seguridad del suministro del alimento frente a las pérdidas inducidas por los procesos fisiológicos tales como la germinación de bulbos y tubérculos, o la protección de los alimentos frente al daño por bacterias, de deterioro o las plagas de insectos durante el

Irradiación gamma

almacenamiento. Como resultado, estas aplicaciones son relevantes en el incremento de la seguridad de los alimentos. Por otra parte, el segundo grupo incumbe a la calidad higiénica de los alimentos y contribuyen a la eliminación o minimización de los peligros biológicos soportados por los alimentos; por consiguiente, están relacionados con la seguridad de los alimentos. Estos incluyen la “pasteurización fría” de los alimentos sólidos y semisólidos”, y la esterilización por radiación de los alimentos. (Molins, R. A., 2004)

4 Quitosán irradiado

Algunos productos de quitosán necesitan esterilizarse antes de ser usados, los métodos comunes de esterilización involucran la exposición de los productos a calor seco, vapor, óxido de etileno o radiación gamma. Los primeros dos requieren calentamiento a altas temperaturas, lo cual reduce la eficacia del quitosán debido a la reacción de Maillard en los grupos amino primario.

Los residuos tóxicos después de la esterilización con óxido de etileno afectan a la biocompatibilidad del quitosán.

Se ha estudiado la radiación del quitosán bajo diversas condiciones para asegurar que se mantenga su estructura química (Lim L. Y., y col., 1998) Cuando la dosis de radiación gamma aumenta, el quitosán en presencia de aire, muestra un aumento en el grupo hidroxilo y un decremento en el enlace C-O-C , esto como resultado de la determinación de la intensidad de los radios de I_{3485} (hidroxil)/ I_{1653} (amida) y $I_{1028}(\text{C-O-C})/ I_{1653}$, respectivamente.

Para identificar la unidad aminosacárida de todos los productos después de la radiación gamma, se han usado rayos infrarrojos (ver Figura 11), encontrando, que el mayor pico para el quitosán en estado sólido a 895, 1087, 1598, 1653 y 3439 cm^{-1} pertenecen al anillo de piranosa, glucosídico, amino, acetamida y grupos hidroxilos,

Irradiación gamma

respectivamente y estos mismos resultados se presentaron inclusive cuando la dosis fue incrementada a 160 kGy, por lo que se afirma que la estructura del quitosán irradiado se mantuvo.

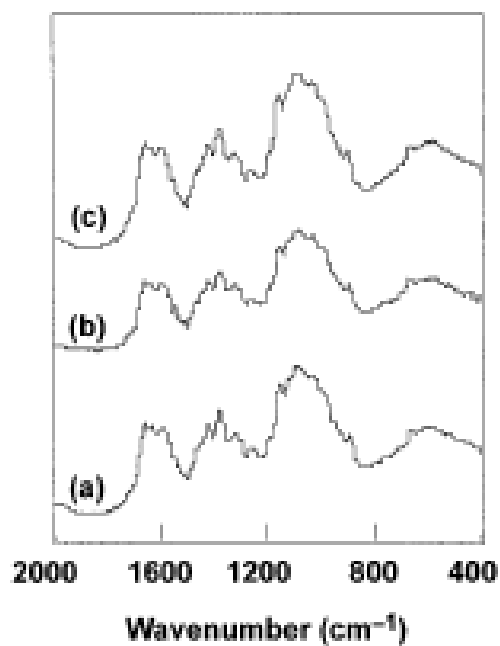


Figura 11. Espectro de quitosán en estado sólido a dosis de (a) 0 kGy, (b) 80 kGy, y (c) 160 kGy (Lim L. Y., y col., 1998).

El quitosán obtenido después de la irradiación indica que el ambiente alrededor de C4 cambia, se inducen grupos hidroxilos, como anteriormente se explicó, el peso molecular disminuye y los radicales libres inducen al corte de la cadena a cualquiera de los enlaces C1-O o C4-O rompiendo el enlace C-O-C en la principal cadena (ver Figura 12) (Yoksan R., y col., 2004).

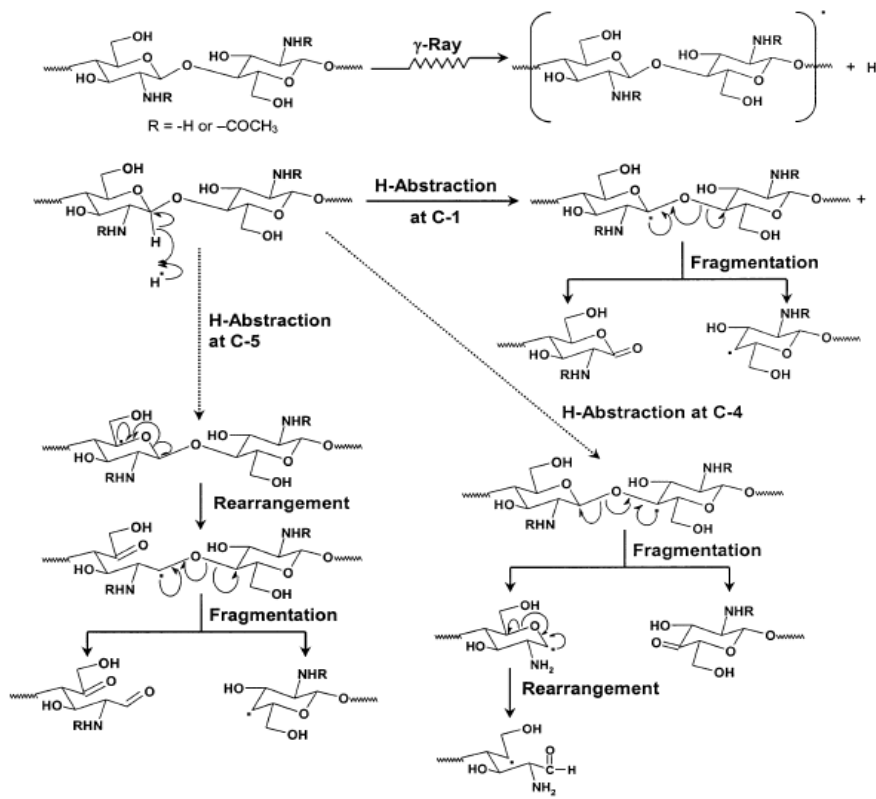
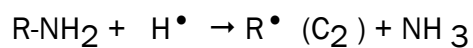
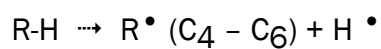


Figura 12. Esquema de la irradiación con rayos gamma del quitosán (Yoksan R., y col., 2004).

El peso molecular disminuye y los grupos carbonilo y carboxilo se forman cuando se incrementa la dosis de radiación y el quitosán irradiado en estado sólido es degradado (Yoksan R., y col., 2004).

Irradiación gamma

Un mecanismo propuesto para la degradación del quitosán irradiado en estado sólido:



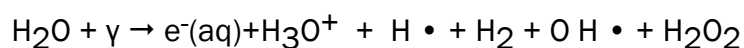
Donde :

R-H y R- NH₂ son macromoléculas, R• (C_n) es un macro radical de quitosán localizado en C_n átomo de carbono, F•₁ + F₂ son fragmentos de la principal cadena después del corte (Hai L., 2003).

Se sabe que en estado sólido, la radiación gamma produce la abstracción de un átomo de H. Este radical captura un átomo de hidrógeno de los carbonos C (1) ó C (4) ó C (5) de los fragmentos glucosídicos provocando la escisión de las cadenas y disminuyendo el peso molecular del quitosán. Este proceso es lento y requiere de dosis relativamente altas, por encima de los 30 kGy, para que los cambios sean observables (Hai L., y col., 2003).

En el caso de soluciones, el quitosán se encuentra en su forma protonada, con cargas positivas sobre los grupos amino. Bajo estas condiciones, la presencia de H₃O⁺ y/o agua, el proceso inicial es la radiólisis del agua por ser la especie más abundante, produciendo radicales H• y OH• según la ecuación:

Irradiación gamma



Ambos radicales pueden provocar la degradación del quitosán de manera similar al descrito para el estado sólido. Este proceso es mucho más rápido y requiere de dosis bajas debido a la facilidad con que se produce la radiólisis del agua (Carhuapoma B. W., y col., 2005).

6. Los hongos

Los hongos son agrupados de acuerdo a diversos criterios que convergen en la taxonomía; se puede considerar sus interrelaciones fisiológicas o morfológicas.

6.1 Características de *Aspergillus flavus*

El género *Aspergillus* causa el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, enmohecido, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas (Carrillo L. 2003).

6.1.1 Estructura

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscópio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (ver Figura 13) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Carrillo L. 2003).

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte.

Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.

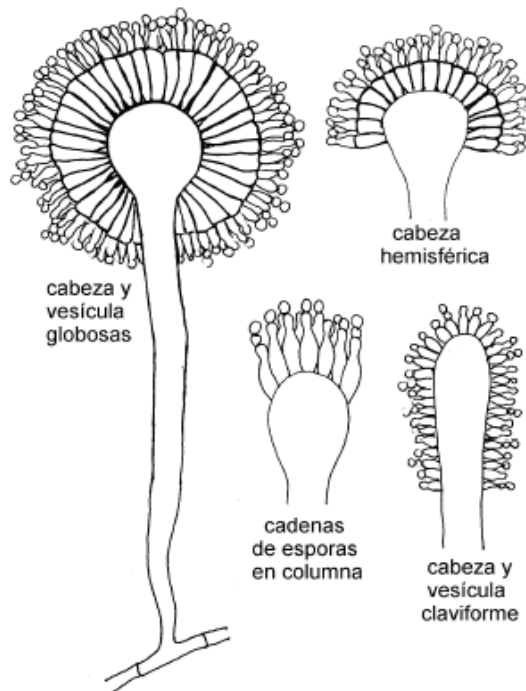


Figura 13. Conidióforos de *Aspergillus* (Carrillo L., 2003).

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o

grupos como se indica en el Cuadro 5. Los teleomorfos poseen meiosporos en sacos que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático (Michael C. J., y col., 2001).

Hongos

Cuadro 5. Características de los grupos /secciones de *Aspergillus*.

SECCIÓN	GRUPO	CONIDIOS	VESICULA	CONIDIÓFORO	OTRO
<i>Aspergilli</i>	<i>A. glaucus</i>	Verde, rugoso	Globosa a espatulada	Liso	Cleistotecio amarillo o anaranjado, osmófilo
<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	Blanco	Globosa	Liso	Esclerocio
<i>Cervini</i>	<i>A. cervinus</i>	anaranjado	Globosa	Liso	---
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	Amarillo	Globosa	liso o rugosa	Esclerocio amarillo
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	Verde claro	claviforme	Liso	---
<i>Cremeri</i>	<i>A. cremeoflavus</i>	Verde, pardo	Globosa	Liso	Cleistotecio crema, osmófilo
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	Pálido, canela	Espatulada	liso, pardo	Células de Hülle
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Verde, pardo	Globosa	Rugoso	Esclerocio
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	Verde	Espatulada	Liso	--

		azulado		
--	--	---------	--	--

Fuente: Carrillo L. 2003.

Hongos

6.1.2 Condiciones de crecimiento y toxicidad

La contaminación de los granos durante el almacenamiento, por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva arriba del 70%, sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación. Si unos granos con un contenido de humedad del 15% no fueron afectados por los aspergilos durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C (Michael C. J., y col., 2001). La Figura 14 muestra el efecto del pH del medio y la temperatura de incubación sobre la velocidad de crecimiento radial de la colonia de *A. flavus* (Carrillo L., 2003).

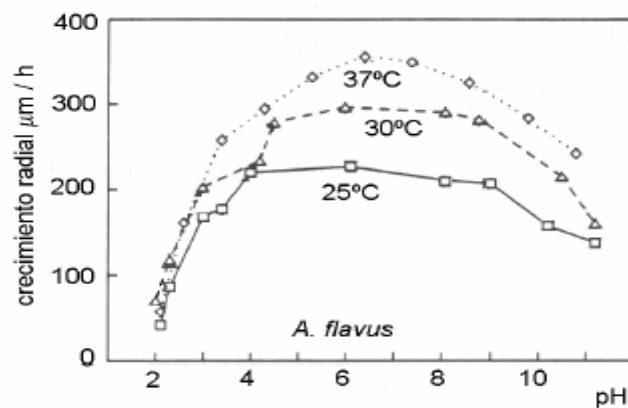


Figura 4.2. Efecto del pH y temperatura sobre la velocidad de crecimiento radial.

Figura 14. Efecto del pH y Temperatura sobre el crecimiento radial de *Aspergillus flavus* (Carrillo L., 2003).

Son varios los metabolitos secundarios de los aspergilos que son considerados micotoxinas: aflatoxinas, esterigmatocistina y otros, algunos de los cuales también son producidos por especies de penicilios.

Hongos

Es común que las condiciones óptimas para el crecimiento de las especies toxinógenas no coincidan con las que facilitan la producción de micotoxinas. Así, mientras el desarrollo óptimo de *A. flavus* ocurre a 36°C con una actividad del agua

de 0,95, la producción de aflatoxinas es favorecida por una temperatura de 33°C a una actividad de 0,99, aunque pueda ser formada aún a 15°C con una actividad del agua de 0,95 (White J.P., y col., 2003).

Tanto en el campo como en el almacenamiento los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir que habiendo un desarrollo fúngico apreciable, no se encuentre la cantidad de micotoxina esperada (Sánchez E., y col., 2005). Debido a su estabilidad las micotoxinas pueden persistir aún cuando hayan muerto las esporas. Además, influyen los requerimientos nutricionales de la especie particular. Por ejemplo una escasa disponibilidad de Zn, elemento necesario para biosíntesis de aflatoxinas, puede determinar la baja incidencia de este metabolito en algunos substratos. En general, el aumento de los metabolitos secundarios es una respuesta al "stress". Si éste es causado por un biocida en concentración subletal, provocando un aumento de la biosíntesis de micotoxinas (Carrillo. L.,2003)

Las aflatoxinas se consideran cancerígenos hepáticos humanos. La más potente es la toxina B1 y mientras que la M1 tiene una potencia diez veces menor (Sánchez. E., y col., 2005) . Las aflatoxinas tienen acción sinérgica con el virus de la hepatitis B, por lo que la reducción de la ingesta de estas toxinas disminuye la tasa de cáncer de hígado en individuos portadores del virus (Carrillo L., 2003).

La descontaminación de granos enteros de maíz con una humedad del 16%, mediante amoníaco al 2% durante una hora a 55 atmósferas de presión y 40-45°C destruye hasta el 93% de las toxinas

El tratamiento de un sustrato contaminado con hipoclorito de sodio al 0,5-1% a pH 4 degrada las aflatoxinas B1 y G1 a todas las temperaturas, mientras que la cantidad de B2 y G2 decrece al calentar, desapareciendo ambas a 100°C. El tratamiento con bisulfito de sodio al 1% tiene poco efecto sobre aflatoxina B1 a 20°C pero solamente persiste el 10% a 100°C. Igual cantidad residual se observa luego del tratamiento a 20°C con persulfato de amonio al 0,1%, y a 60°C con agua oxigenada al 0,1% (Michael C. J., 2001).

La molienda húmeda reduce la concentración de toxinas en el almidón de maíz a 1% del valor que tenía en los granos y la seca a 10%. El tostado de los maníes disminuye el contenido de aflatoxinas en un 50-80% (Méndez-Albores J.A., 2002).

6.1.3 *Aspergillus flavus* en maíz

La asociación entre los hongos del grupo *A. flavus* y la planta de maíz en el campo no termina con la cosecha pues se encuentran aflatoxinas en los rastrojos, además de esclerocios. La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus* se debe a la invasión del hongo saprobio oportunista sin capacidad patogénica, así las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha a semillas de algodón, maníes o granos de maíz en crecimiento.

El almacenamiento de cereales, como en el caso del maíz, se puede dar una disminución notable de la calidad nutritiva y, lo que es peor, volver al grano inservible para su consumo humano o animal y para las aplicaciones industriales

El daño por los insectos, puede ser una de las causas principales de las pérdidas alimentarias post-recolección, seguido por otras causas tales como el deterioro por germinación de bulbos y tubérculos (Molins, R. A., 2004).

Otra de las causas son las pérdidas por contaminación de hongos, reduciendo la calidad del grano a través de la pérdida de materia seca, decoloración, calentamiento, formación de pulpa y contaminación por micotoxinas. (ONU, 1993) El maíz es el segundo cereal más importante alrededor del mundo y frecuentemente se ve invadido por los hongos antes mencionados (Sánchez, E., 2005).

Debido a estos problemas se han buscado productos para la inhibición de dichos hongos, hallando algunos productos químicos eficaces para la inhibición de los mismos, en condiciones de almacenamiento, sin embargo los hongos pueden desarrollar resistencia al fungicida, incrementando el número de hongos patógenos tolerantes a éste (Roller S., 1999).

El incremento de la demanda en productos sin conservadores y sin tratamientos químicos (Rabea E. I., 2003), a propiciado a considerar alternativas viables para el control de hongos en cereales y otros alimentos.

Se han realizado pruebas *in Vitro* , alrededor del mundo para solucionar este tipo de problemas en alimentos, buscando nuevos materiales anti fúngicos naturales para alimentos, como en granos, encontrando algunos que inhiben el crecimiento como :

El extracto de agave (Sánchez, E., 2005) , vainilla, timol, eugenol, carvacrol, (López M. A.,2002) y el quitosán.

7. Objetivo general y particulares

7.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de oligómeros de quitosán obtenidos por radiación gamma, para determinar su acción fungicida y/o fungistática en *Aspergillus flavus*, el cual afecta la calidad del maíz.

7.2 Objetivos particulares

- **Objetivo particular 1**

Evaluar el peso molecular medio y grado de desacetilación del quitosán original e irradiado mediante viscosimetría y titulación potenciométrica, respectivamente, para conocer la relación de dichos parámetros con el efecto biológico.

- **Objetivo particular 2**

Evaluar *in Vitro* la actividad fungicida y/o fungistática de oligómeros de quitosán obtenidos por radiación gamma sobre *Aspergillus flavus*

- **Objetivo particular 3**

Evaluar *in Vivo* la actividad fungicida y/o fungistática de oligómeros de quitosán obtenidos por radiación gamma sobre *Aspergillus flavus*

9. Metodología

9.1 Obtención del quitosán

El quitosán con el que se trabajó fue proporcionado por la Dra. Susana Patricia Miranda, el cual proviene de quitina desacetilada de camarón. (Patente en trámite).

Parte del quitosán fue irradiado en frascos de polietileno, dentro de un irradiador industrial en el Instituto Nacional de Investigación Nuclear (Edo. de México) a una dosis de 13.7 kGy h^{-1} , obteniendo cuatro diferentes muestras de quitosanos 25, 50, 75,100 kGy.

9.2. Caracterización fisicoquímica del quitosán

9.2.1 Determinación del peso molecular del quitosán y del quitosán irradiado

La determinación del peso molecular del quitosán y del quitosán irradiado, se basa en el rango de tiempo consumido de la solución en un viscosímetro capilar; es un método relativamente rápido en el cual la viscosidad intrínseca de una solución de polímero está relacionada al peso molecular de acuerdo con la Ecuación Mark-Houwink-Sakurada, la cual se describe en la pagina 18 (Kasaai M.R., y col.,2000) .

El tiempo consumido se determinó en un tubo Oswald para el quitosán irradiado y el quitosán original, los cuales fueron disueltos en 25ml de buffer de Acetato de Sodio 0.2 M y Ácido Acético 0.3 M ajustado previamente a pH 4.6. De cada solución de quitosán, se tomaron cuatro mililitros, se colocaron en el tubo

Oswald. Este se introdujo en un baño térmico con calentador y agitador digital marca Grant regulado previamente a una temperatura de 25 ± 0.1 °C, se corroboró la temperatura con un termómetro de mercurio.

Metodología

A partir de una regresión lineal en el gráfico de Concentración de quitosán Vs Viscosidad específica, se determinó la viscosidad intrínseca; siendo ésta la ordenada al origen. Se realizó un arreglo algebraico para despejar a M a partir de la ecuación Mark-Houwink-Sakurada, las constantes utilizadas en esta experimentación fueron $K=76 \text{dLg}^{-1}$, $a=0.76$ (Rinaudo y col., 1993), las cuales son constantes que dependen de la naturaleza del solvente y el polímero.

9.2.2 Determinación del grado de desacetilación del quitosán

El grado de desacetilación del quitosán influencia las propiedades químicas, físicas, y biológicas (Lim L. Y., y col., 1998), debido a esto, es importante tener un método adecuado y rápido para la determinación del grado de desacetilación.

En los últimos años, muchos métodos han sido propuestos, la titulación pHmétrica propuesta por Broussignac en 1968 (Jiang X., y col., 2003), es un método simple, el cual se basa en una titulación ácido-base de los grupos NH_3^+ de la muestra del polímero (quitosán) disuelta en un exceso de ácido conocido (HCl) 0.2 M y como base NaOH 0.1 M. Mediante un potenciómetro se determina el cambio de pH de la muestra a evaluar.

El método antes descrito se utilizó para determinar el grado de desacetilación de una muestra de quitosán, la cual fue irradiada a 25 kGy, se realizaron 3 repeticiones de la misma.

Para cada muestra se pesaron 0.30g de quitosán previamente secada a 105°C, y se disolvió en 45 ml de HCl 0.2 M.

Metodología

Se agregaron incrementos pequeños de base y se anotaron los valores de pH de cada volumen agregado, titulando hasta pH 11 de la muestra, estos fueron registrados con el potenciómetro, el cual fue calibrado previamente. Una vez obtenidos los datos de pH y volumen gastado se graficaron colocando los datos de volumen de base gastada en el eje de las ordenadas.

Con el grafico pH vs Vol. NaOH se determinaron los puntos de equivalencia y posteriormente se realizaron los cálculos para determinar el grado de desacetilación mediante la siguiente ecuación:

$$\%DA = \frac{203}{Meq + 42} * 100$$

Donde DA es el porcentaje de desacetilación, Meq es la masa en equivalentes, 203 y 42; son valores específicos para el quitosán, siendo estos el peso molecular de glucosamina y acetilo, respectivamente.

9.3 Evaluación *in Vitro* del crecimiento de *Aspergillus flavus*

9.3.1 Preparación del inóculo de *Aspergillus flavus*

El inóculo se preparó a partir de una cepa de *Aspergillus flavus* crecida en PDA durante ocho días, posteriormente se agregó una solución estéril de agua destilada, conteniendo 0.5% de Tween 80. Una vez humectada la cepa se raspó con una espátula estéril, hasta desprender el hongo del agar papa dextrosa.

Una vez separada la cepa del medio, ésta se filtró junto con la solución de Tween, y se adicionó la solución necesaria para desprender el hongo del papel filtro, recuperando el filtrado en una probeta estéril y se ajustó el volumen a 50 ml. El filtrado se mantuvo en agitación constante evitando que las esporas se sedimentaran.

Metodología

En una cámara de Neubauer (Gálvez V. M.C., 2001), se colocó una gota de la solución de esporas y se realizó un conteo de esporas con ayuda de un microscopio de luz (euromex). La muestra se diluyó hasta obtener una concentración determinada.

9.3.2 Evaluación *in Vitro* de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra *Aspergillus flavus* en sólido

La actividad biológica *in Vitro* se realizó en cajas petri malta sal agar-quitosán (debido a que se simula las condiciones de almacenamiento del grano). El quitosán fue preparado a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1 % para cada una de las dosis irradiadas y para el quitosán original. Como control se

prepararon cajas petri malta sal agar sin quitosán, en todos los casos el pH se ajustó a 5 ± 0.2 .

En cada una de las cajas se sembraron en el centro 3.1 μ l del inóculo preparado originalmente, cada caja contenía aproximadamente 2.5×10^3 esporas/ml.

Las cajas sembradas se introdujeron en una incubadora a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días, midiendo diariamente el crecimiento radial con la ayuda de un vernier.

3 Evaluación *in Vitro* de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra *Aspergillus flavus* en líquido.

Se preparó una solución de esporas con una concentración de 1.28×10^6 esporas/ml, se tomaron cinco alícuotas de 1 ml de la solución, se colocaron en 5 tubos con 10 ml de caldo malta sal agar con quitosán al 0.25% de la muestra irradiada a 25 kGy. Se incubó durante 23 días a una temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$.

Metodología

Posteriormente de cada uno de los tubos se sembraron 0.5 ml en cajas petri con quitosán, el cual fue preparado a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1 % para cada una de las dosis irradiadas y para el quitosán original. Como control se prepararon cajas petri malta sal agar sin quitosán, en todos los casos el pH se ajustó a 5 ± 2 . La prueba se realizó por triplicado.

Las cajas sembradas se introdujeron en la incubadora (new brunswick) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 días, se evaluó la presencia del moho.

9.4 Evaluación *in Vivo* del crecimiento de *Aspergillus flavus* sobre granos de maíz cubiertos con quitosán

Se seleccionaron 49 muestras conteniendo 10g de maíz comercial, utilizado en la elaboración de tortillas. A 5 muestras de dichos granos se les determinó la humedad.

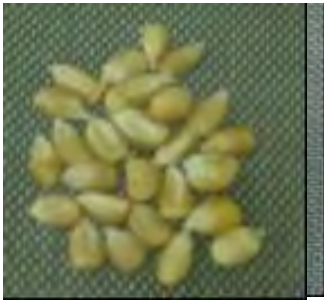
A otras 5 muestras de maíz seleccionadas fueron inoculadas con 0.6 ml de una solución de esporas, con aproximadamente 2.8×10^5 esporas/ml para tener un contenido de humedad de 18%. Las muestras inoculadas fueron introducidas en una cámara con una humedad relativa de 83%, la cual se realizó con una mezcla de soluciones salinas de KCl y K_2SO_4 (Romero C., 1994; Jowitt R., y col., 1989).

Los granos se mantuvieron en la cámara hasta su contaminación total con *Aspergillus flavus*, estos granos se utilizaron para inocular los granos que fueron cubiertos con las películas de quitosán y quitosán irradiado.

Metodología

Se cubrieron 36 muestras de maíz comercial con las soluciones de quitosán y quitosán irradiado, las cuales fueron preparadas a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1%, previamente ajustadas a pH 5 ± 0.2

Los granos fueron sumergidos en las soluciones de quitosán por 5 min, posteriormente se eliminó el exceso de quitosán y se secaron a temperatura ambiente (Figura 15).



a)

b)

Figura 15. Muestras de maíz cubiertas con quitosán a), y sin quitosán b)

De las 5 muestras de granos previamente contaminados, se tomó un grano contaminado y se colocó en cada una de las 36 muestras de granos cubiertos con quitosán y quitosán irradiado, y a 3 muestras control (sin cubrimiento de quitosán). Todas estas muestras se colocaron en una cámara con una humedad relativa de 83% ajustada previamente con KCl y K_2SO_4 (Romero C., 1994; Jowitt R., y col., 1989). Se mantuvieron en estas condiciones por 13 días, para evaluar semi cuantitativamente la presencia del hongo en los granos cubiertos con quitosán y quitosán irradiado.

10. Resultados y discusión

La experimentación se dividió en tres etapas: en la primera etapa se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del quitosán irradiado y sin irradiar, en la segunda etapa se evaluó la actividad biológica *in Vitro* de los quitosanos sobre *Aspergillus flavus*; esta segunda etapa se subdividió, evaluando la actividad *in Vitro*, en sólido y posteriormente en líquido. Finalmente la tercera parte experimental se realizó con muestras reales de maíz, las cuales fueron previamente cubiertas con los quitosanos de estudio.

10.1 Caracterización fisicoquímica del quitosán

10.1.1 Determinación del peso molecular del quitosán y del quitosán irradiado

De acuerdo a la metodología descrita los pesos moleculares medios para el quitosán y quitosán irradiado se muestran en la Figura 16

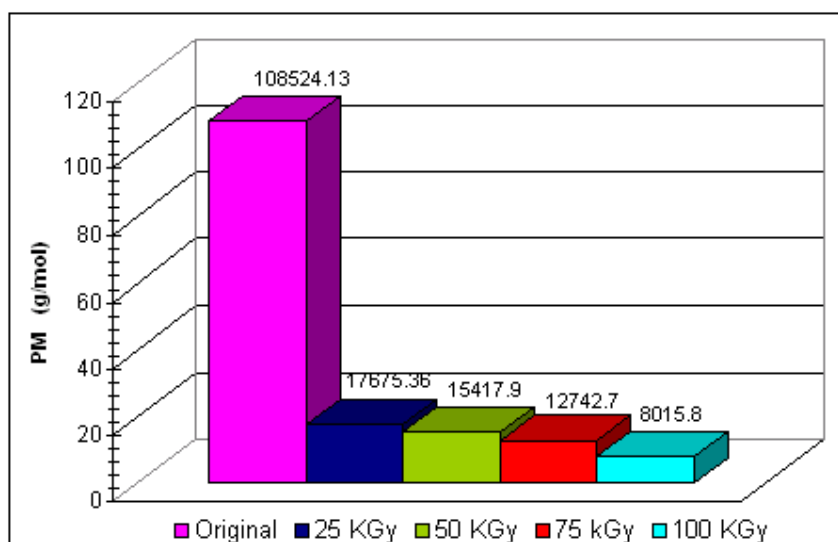


Figura 16. Efecto de la radiación gamma en el peso molecular del quitosán.

Resultados y discusión

La Figura 16 muestra los pesos moleculares del quitosán original e irradiado, el peso molecular del quitosán original fue de 1.0×10^5 g/mol, y para los quitosanos irradiados a 25, 50, 75, 100 KGy, estos fueron de 1.7×10^4 , 1.5×10^4 , 1.2×10^4 , 8.0×10^3 g/mol, respectivamente. La relación de reducción en el peso molecular de los quitosanos irradiados a 25, 50, 75, 100 KGy fueron de 6, 7, 8, 13 veces menor respectivamente; lo cual corresponde a un decremento de 84, 86, 88 y 92% del peso molecular inicial, siendo el valor más bajo para el quitosán irradiado a 100 kGy, lo que indica la degradación del polímero por la radiación gamma en todos los casos, lo anterior concuerda con el trabajo realizado por Yoksan R., 2004, en donde estudiaron el quitosán irradiado por rayos gamma bajo

diferentes condiciones, como fué en estado sólido, disperso en agua, disperso en soluciones acuosas de $K_2S_2O_8$, de H_2O_2 y en solución con ácido acético. La degradación por rayos gamma resultó ser más efectiva en la estructura amorfa que en la estructura cristalina obteniendo una degradación del 80% a una dosis de 50 kGy.

La radiación gamma causa cambios en las propiedades físico-químicas del quitosán, conforme aumenta la dosis irradiada se presenta una disminución del peso molecular medio, lo cual indica la degradación del polímero y por lo tanto se considera como un método útil para obtener oligómeros de bajo peso molecular, también se presentó un cambio en el color de los oligómeros obtenidos por irradiación gamma, donde al incrementar la dosis de radiación gamma el color café se intensificó en los quitosanos, esto concuerda con los resultados obtenidos por Choi W.S., y col., 2002

Wasikiewicz J. M., y col., 2005, investigaron el efecto de la irradiación en el cambio del color del alginato y concluyeron que el oscurecimiento del alginato durante la radiación fue debido a la formación de dobles enlaces por el corte de la cadena.

Resultados y discusión

10. 1. 2 Determinación del grado de desacetilación del quitosán

Como parte de la caracterización del quitosán se determinó el grado de desacetilación, el cual fue realizado en una sola muestra, para el quitosán

irradiado a dosis de 25 kGy, debido a que los COCH_3 son raramente producidos por la radiación y el grado de desacetilación se mantuvo al original. El proceso de radiación es un método atractivo comparado con el tratamiento químico y la hidrólisis enzimática, ya que en estos métodos se modifica esta propiedad. (Yoksan R., y col., 2004).

En la Figura 17, se observan los resultados obtenidos en la determinación del grado de desacetilación de la muestra del quitosán irradiada a 25 kGy.

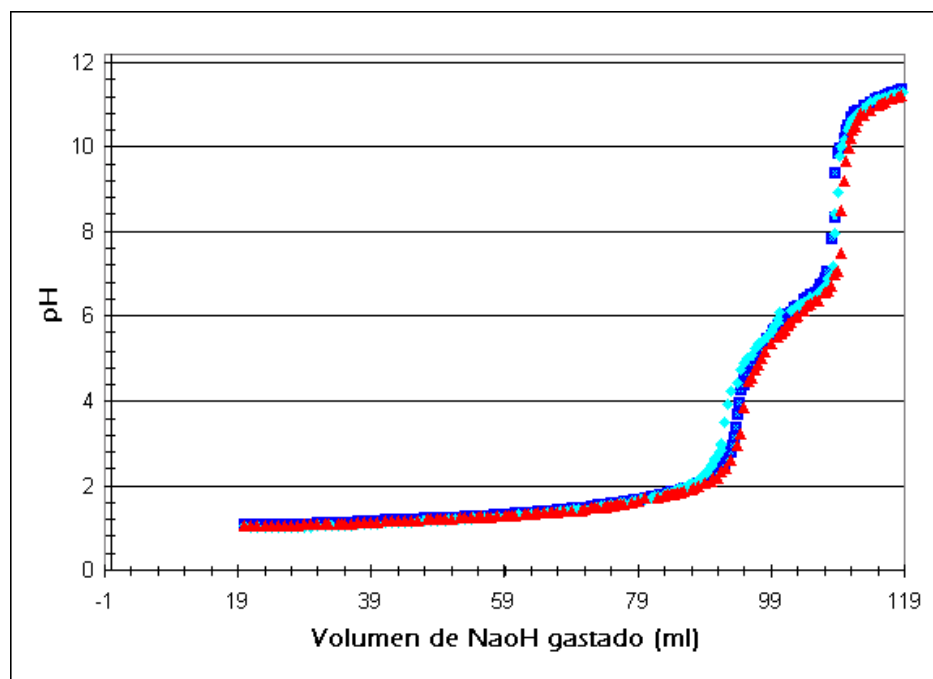


Figura 17. Valoración de tres muestras de quitosán irradiado a 25 kGy.

La Figura 17 muestra una curva de valoración potenciométrica típica. El comportamiento de las curvas son similares a la registrada por Broussignac en 1968, las curvas corresponden a las muestras de quitosán irradiada a 25 kGy, como se puede ver, las tres repeticiones se encuentran prácticamente superpuestas.

El comportamiento de la curva presenta dos puntos de inflexión: el primer punto corresponde al exceso de HCl, mientras que el segundo corresponde al quitosán protonado. La diferencia entre los dos puntos de inflexión a lo largo de la abcisa da como resultado la cantidad en moles de H^+ requeridos para la protonación de los grupos amino libres (desacetilado) y corresponde a la cantidad de D-GlcN en la solución titulada. Asumiendo que el resto de la muestra es D-GlcNAc, el valor del grado de desacetilación se puede obtener (Jiang X., y col., 2003).

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos del grado de desacetilación del quitosán irradiado a 25 kGy

Cuadro 6 Grado de desacetilación (GD) del quitosán irradiado a 25 kGy

	PUNTO DE INFLEXIÓN 1 (ml)	PUNTO DE INFLEXIÓN 2 (ml)	%GD
Muestra 1	76	108	85.61
Muestra 2	75	108	85.61
Muestra 3	76	108	85.61

En el cuadro 6 se muestran los resultados del grado de desacetilación determinado por triplicado del quitosán irradiado a 25 kGy. El porcentaje de desacetilación fue del 85.61 % en los tres casos

Resultados y discusión

10.2 Evaluación *in Vitro* del crecimiento de *Aspergillus flavus*

10.2.1 Preparación de la solución de esporas de *Aspergillus flavus*

Durante la experimentación se prepararon concentraciones de solución de esporas, las cuales se muestran en el Cuadro 7, utilizadas en cada una de las etapas experimentales correspondientes.

Cuadro 7. Concentraciones de soluciones de esporas

ETAPA EXPERIMENTAL	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS (esporas/ml)
<i>In Vitro</i> en sólido	8.2×10^5
<i>In Vitro</i> en líquido	1.28×10^6
<i>In vivo</i>	8.2×10^5

10.2.2 Evaluación *in Vitro* de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra *Aspergillus flavus* en sólido

En la Figura 18 se observa el comportamiento observado de *Aspergillus flavus* en malta sal agar.

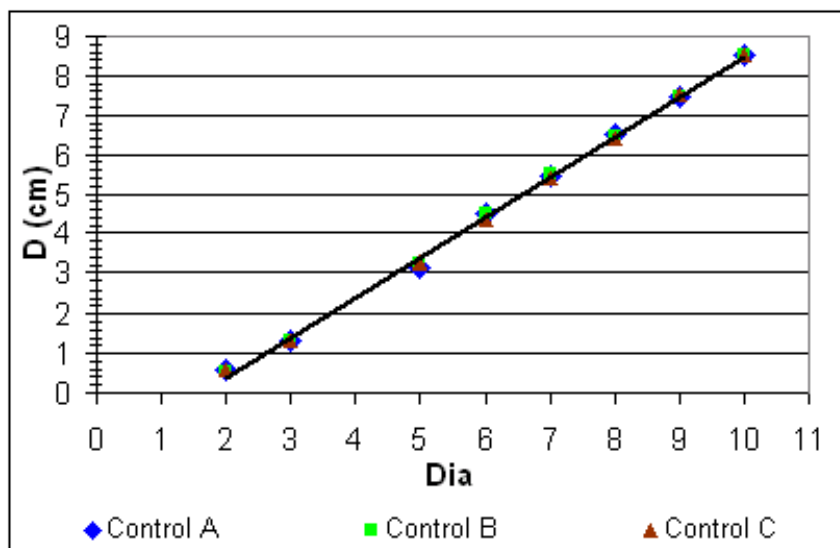
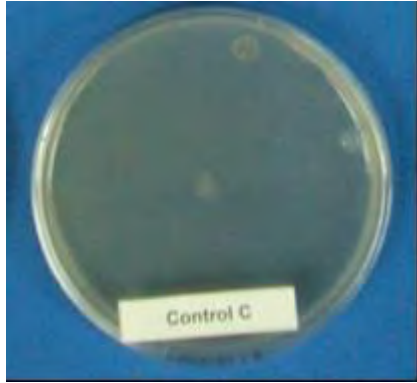
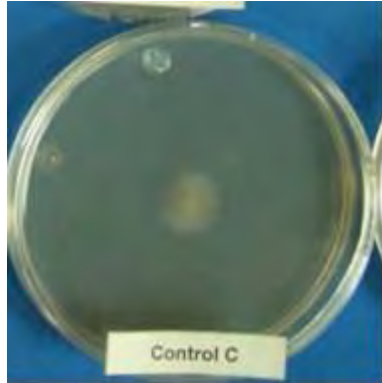
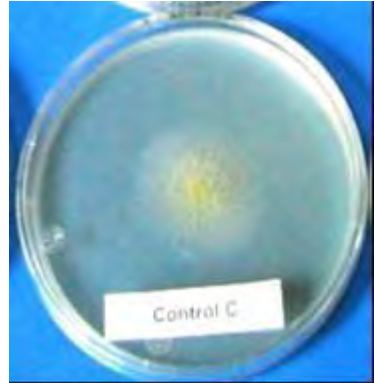
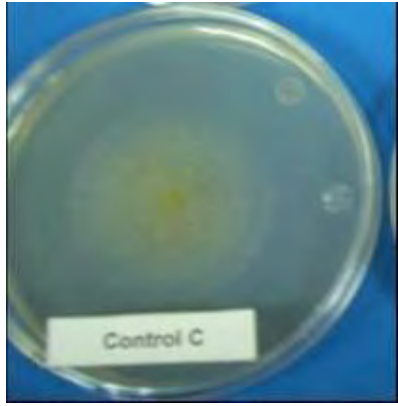
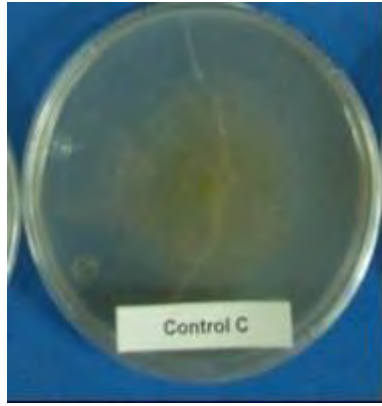
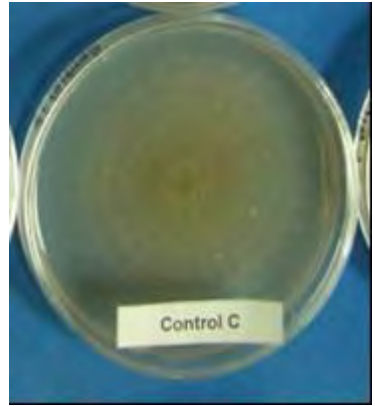
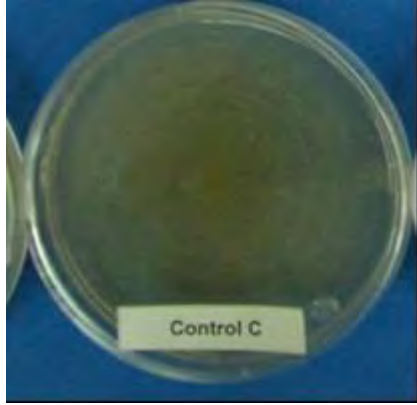
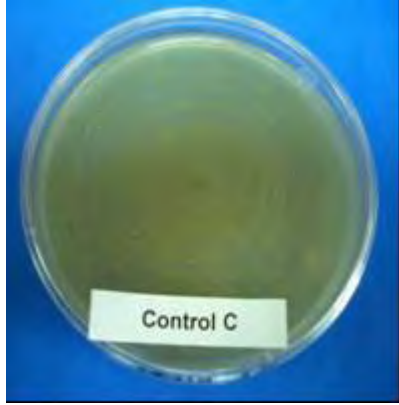


Figura 18. Diámetro promedio del crecimiento radial de *Aspergillus flavus* en malta sal agar (control) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días.

La Figura 18 posee un comportamiento lineal, en donde se observa la velocidad de crecimiento correspondiente a 1 cm por día, los datos presentados sirvieron para comparar el comportamiento del *Aspergillus flavus* en presencia de quitosán y oligómeros de quitosán a diferentes concentraciones. Lo anterior es constatado en el Cuadro 8, el cual muestra las fotografías del *Aspergillus flavus* durante su crecimiento en malta sal agar sin quitosán.

Cuadro 8. Crecimiento radial de *Aspergillus flavus* en malta sal agar (control)

		
a) 2° Día	b) 3° Día	c) 5° Día
		
d) 6° Día	e) 7° Día	f) 8° Día
		
g) 9° Día	h) 10° Día	

Los quitosanos irradiados con peso molecular medio de 1.76×10^4 a 8.01×10^3 y con un grado de desacetilación de 85.61 %, ver Figura 16 y Cuadro 6, fueron evaluados *in Vitro contra Aspergillus flavus*.

Los resultados obtenidos durante esta etapa experimental, fueron los que se muestran en el Cuadro 9

Cuadro 9 Diámetro promedio del crecimiento radial (cm) de *Aspergillus flavus* en medio sólido.

DIÁMETRO PROMEDIO DEL CRECIMIENTO RADIAL (cm)						
DIA	QN a	QN a	QN a	QN a	QN	CONTROL
S	25 kGy	50 kGy	75 kGy	100 kGy	Original	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0.6
3	0	0	0	0	0	1.3
5	0	0	0	0	0	3.2
6	0	0	0	0	0	4.5
7	0	0	0	0	0	5.5
8	0	0	0	0	0	6.5
9	0	0	0	0	0	7.5
10	0	0	0	0	0	8.5

Los resultados experimentales obtenidos correspondientes a la actividad biológica *in Vitro*, en sólido del quitosán y quitosán irradiado, fueron exitosos ya que el *Aspergillus flavus* fue completamente inhibido por el biopolímero en todos los casos, tanto en el quitosán original e irradiados a 25, 50,75, 100 kGy a

concentraciones de 0.25,0.5, 0.75, 1 % (Cuadro 9). Los resultados concuerdan con estudios realizados por Rabea E. I., y col., 2003; en maíz y cacahuate.

Resultados y discusión

La actividad antimicrobiana del quitosán fue estudiada contra una amplia variedad de microorganismos incluyendo hongos, algas y algunas bacterias. Sin embargo, la acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos, tales como el tipo de quitosán, el grado de polimerización, el huésped, los constituyentes nutricionales, la composición química de los sustratos y las condiciones ambientales (Rabea E. I., y col., 2003).

Los oligómeros del quitosán (pentámeros y heptámeros) tienen mejor efecto antimicótico que las unidades largas. (Rabea E. I., y col., 2003; Kofuji K., y col., 2005). Si se desea obtener mayoritariamente dímeros, tetrámeros, etc, se debe partir de un quitosán de menor peso molecular, de acuerdo con Choi W. S., 2002.

La inhibición de hongos con quitosán, principalmente en el tratamiento poscosecha de frutos, ha sido exitoso ya que los resultados muestran inhibición parcial e inclusive total en algunas especies, sin embargo su efecto en *Zygomycetes*, no es el esperado ya que en su pared celular contiene mayor cantidad de quitosán (Rabea E. I., y col., 2003).

10.2.3 Evaluación *in Vitro* de la actividad biológica del quitosán y oligómeros de quitosán contra *Aspergillus flavus* en líquido.

Se ha observado el efecto inhibitorio del quitosán en diferentes etapas de crecimiento en hongos, como en el crecimiento miceliar, en la esporulación, en las esporas y en la germinación, se ha reconocido que la actividad antifúngica del quitosán depende de su peso molecular, grado de desacetilación, pH de la solución y del organismo estudiado.

Las esporas son las estructuras de perpetuación de la especie, son las estructuras más resistentes, por ello se decidió realizar una solución de esporas e incubarlas durante 23 días para evaluar el efecto del quitosán en estas. Los resultados obtenidos fueron los que a continuación se describen.



Figura 19. Incubación de esporas en caldo malta sal (izquierda) y en caldo malta sal con quitosán (derecha).

El primer día de la inoculación de las esporas en medio líquido ambos tubos se observaban translucidos, sin embargo al siguiente día el tubo que contenía quitosán presentó una especie de turbidez y precipitación, mientras que los tubos testigo se mantuvieron translucidos (Figura 19).

Resultados y discusión

Después de 13 días de incubación en los tubos control presentaron crecimiento fúngico, mientras que los tubos con la solución de quitosán mantuvieron la misma apariencia, sin embargo como esta información no era suficiente para determinar la viabilidad en las esporas, por lo que se decidió después de transcurridos 23 días de incubación, tomar alícuotas del medio malta-sal quitosán conteniendo las esporas y sembrarlas en cajas malta sal y malta sal - quitosán (original e irradiado a las diferentes dosis).

Una vez sembradas e incubadas la cajas, después de tres días se observó crecimiento de *Aspergillus flavus* en las cajas malta sal, mientras que en las cajas malta-sal con quitosán fue nulo el crecimiento.

Lo anterior indica que el tratamiento del quitosán en líquido no tuvo efecto en la viabilidad de las esporas, sin embargo no se descarta la posibilidad que el quitosán haya entrado en las esporas y haya inducido algunos mecanismos de defensa como lo menciona Cuero R. G., y col., 1995, ya que en esta etapa de

experimentación la cantidad de esporas incubadas fue mayor que en la experimentación en estado sólido. Esto demuestra el comportamiento fungistático del quitosán, ya que retardó el crecimiento del hongo hasta el tercer día.

Resultados y discusión

10.3 Evaluación *in Vivo* del crecimiento de *Aspergillus flavus* sobre granos de maíz cubiertos con quitosán

Los resultados en la última etapa de experimentación fueron los siguientes:

El resultado de la determinación de humedad de los granos fue del 12%. Para inducir una contaminación con el hongo, se realizó un balance de materia para obtener una humedad del 18% en dichas muestras, por lo que se agregó 0.6 ml de la solución de esporas con una concentración de 2.8×10^5 esporas/ml en 5 muestras de maíz

Las 5 muestras (inóculo) de maíz presentaron una contaminación abundante a los 20 días (ver Figura 20), dichas muestras se utilizaron posteriormente en la inoculación con las muestra de maíz cubiertas con quitosán y oligómeros de quitosán.



a)

b)

Figura 20. a) Maíz inoculado con una concentración de esporas de 2.8×10^5 esporas/ml en condiciones de humedad de 83% a 29°C, b) maíz contaminado a los 20 días.

Resultados y discusión

Una vez que se pusieron en contacto las semillas contaminadas con las 36 muestras cubiertas con quitosán y quitosán irradiado, se observó (ver Figura 21) que el grano contaminado con el hongo (inóculo), mantuvo su color característico, cuando estuvo en contacto con los granos cubiertos con quitosán, sin embargo; en las muestras control hubo un crecimiento del hongo, expandiéndose en el resto de las muestras, en cambio en los frascos que contenían las muestras cubiertas con quitosán no se expandió la contaminación por *Aspergillus flavus*.



Figura 21. Muestras cubiertas con quitosán irradiado (izquierda) y muestras control (derecha).

Si las semillas fueran tratadas con quitosán antes de ser sembradas podrían despertar mecanismos de defensa contra el crecimiento y proliferación de los hongos, además, evitar la contaminación en almacenamiento.

Según Cuero R. G., 1995, las quitosanasas, una nueva clase de enzimas con propiedades antifúngicas pueden ser inducidas por *A. flavus* en la etapa de germinación de las semillas de maíz y cacahuate, mostrando una mayor actividad enzimática en las mismas semillas tratadas con quitosán proveniente de crustáceos.

Resultados y discusión

La mayoría de los investigadores ha centrado su labor en la inhibición de la propagación de los hongos, y ya se han hallado algunos productos químicos eficaces en condiciones de almacenamiento; esto sin embargo, no resuelve el problema de la contaminación en el campo producida por mohos, dado que las esporas aerotransportadas son muy abundantes en el medio ambiente. Las esporas pueden germinar en la panoja e infestar los tejidos internos en condiciones óptimas de temperatura y humedad.

El quitosán puede actuar como agente quelante, aglutinando selectivamente a metales, además de inhibir la producción de toxinas y el crecimiento microbial, por lo que resulta una alternativa en la prevención de la contaminación de granos de maíz (Plascencia J. M., y col., 2003).

11. Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados y con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

Por medio de viscosimetría intrínseca, se determinó el peso molecular de los quitosanos degradados por radiación gamma; el quitosán a 100 kGy, fue 92% menor al del quitosán original, el grado de desacetilación fue de 85.61%, una vez caracterizados los quitosanos se evaluó el efecto biológico en *Aspergillus flavus*

La actividad biológica *in vitro* de los quitosanos de estudio se evaluó mediante el crecimiento radial cuantitativo en sólido y semi cuantitativo en líquido, en ambos casos se observó la inhibición completa de *Aspergillus flavus*.

La actividad biológica *in vivo*, se evaluó utilizando muestras de maíz comercial cubiertas con quitosán, los resultados indican que el quitosán actuó como agente fungicida.

Por lo que se concluye que el quitosán irradiado obtenido de los desechos de camarón, inhibe el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

12. Bibliografía

Andrady A. L., Torikai A., Kobateke T. 1996. Spectral Sensitivity of Chitosan Photodegradation. *Journal of Applied Polymer Science* 62: 1465-1471.

Balázs N., Sipos P. 2007. Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydrate Research* 342: 124-130

Cai J., Yang J., Du Y., Fan L., Qiu Y., Li J., Kennedy J. F. 2006. Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydrate Polymers* 64 :151-157

Carhuapoma B. W., Santiago C., J., 2005. Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 6(4) : 333-344

Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. 44-60.

Chen R. H., Hwab H. D. 1996. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*. 29: 353-358

Chmielewski A. G., Haji-Saeid M., Ahmed S., 2005. Progress in radiation processing of polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236: 44-54

Choi W.S., Ann K. J., Lee D. W., Byun M. W., Park H. J. 2002. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polymer Degradation and Stability* 78: 533-538

Bibliografía

Cuero R.G., Osuji G. O. 1995. *Aspergillus flavus*-induced chitosanase in germinating corn and peanut seeds: A. flavus mechanism for growth dominance over associated fungi and concomitant aflatoxin production. *Food Contamination* 12(3): 479-483.

Gálvez V. M. C. 2001. El quitosán como agente de inhibición micótica en patógenos de pepino. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Edo de México, México.

González G. V. A., Guerrero Salazar C.A., Ortiz M. U. 2002. Estructura química y compatibilidad de poliamidas con quitina y quitosán. *Ciencia UANL*. (5) 1: 39-47.

Gudmund S. B., Anthonsen T., Sandford P. 1989. Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science. 51-69.

Hai L., Diep T. B., Nagasawa N., Yoshii F., Kume T., 2003. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics B* 208: 466-470.

Jiang X., Chen L., Zhong W. 2003. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers* 54 : 457–463.

Jowitt R., Wagsteffe P.J. 1989. The certification of water content of microcrystalline cellulose (MCC) at 10 water activities CMR, 302 BCR. Information Commission of the European Communities, Bruselles.

Bibliografía

Kasaai M.R., Charlet G., Arul J. 2000. Master curve for concentration dependence of semi-dilute solution viscosity of chitosan homologues: the Martin equation. *Food Research International* 33 : 63-67.

Kasaai M.R. 2006. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship and hydrodynamic volume for pullulan. *Journal of Applied Polymer Science*. 100: 4325-4332.

Kittur F. S., Vishu K. A. B., Varadaraj M. C., Tharanathan R. N. 2005. Chitooligosaccharides—preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research* 340: 1239–1245.

Kofuji K., Qian C. J., Nishimura M., Sugiyama I., Murata, Kawashima S., 2005. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Journal of European Polymer* 41: 2784-2791

Lim L. Y., Khor E., Koo O., 1998. Irradiation of chitosan. Journal of Biomedical Mater Research 43: 282-289

López M. A., Alzamora S. M., Palou E. 2002. *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. International Journal of Food Microbiology 73:213- 218

Matsushashi S., Kume T., 1997. Enhancement of Antimicrobial Activity of Chitosan by Irradiation. Journal of Science Food Agriculture 73: 237-241

Méndez-Albores J.A., Arámbula- Villa G., Loarca-Piña M.G., González-Hernández., Castaño-Tostado E., Moreno-Martínez E., 2002. Aflatoxins fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. Journal of Stored Products Research 40: 87-94

Bibliografía

Michael C. J., Sarah W. C., Graham G. W. 2001. The fungi. Academic press. 86-145

Miranda C. S.P. 2000. Evaluación de la actividad antibacteriana de quitosán, caracterización física y químicamente. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Edo de México, México.

Molins, R. A. 2004. Principios y aplicaciones, Irradiación de los Alimentos. Acribia. 10-30

Muzzarelli R. A., Chitin. 1977 Pergamon Press. 52-60.

Parada L. G., Crespín G. D., Miranda R., Katime I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. Revista Iberoamericana de Polímeros (1) 5: 1-16 .

Park S. Y., Marsh K., Rhim J., 2002 .Characteristics of Different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. J Food Science 67: 194-197.

Plascencia J. M., Viniestra G., Olayo R., Castillo M., Shirai K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecular Bioscience 3(10):582–586.

Quijano G. G., Paniagua N., Ramírez C. L., Larralde C. P., Shirai K. 2004. Advances in Chitin Science. Montreal. 222-225.

Rabea E. I., Mohamed E.T., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut., 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. American Chemistry Society 4, 6: 1457-1464.

Bibliografía

Rinaudo M., Milas M., Dung P. L. 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. International Journal of Biological Macromolecules. 15: 281–285.

Roller S., Covill N., 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. International Journal of Food Microbiology 47: 67–77

Romero C. 1994. Desarrollo y evaluación de una película biodegradable a base de zeína y de etilcelulosa: efecto de la hidratación en la eficiencia de la misma. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Sánchez E., Heredia N., García S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. International Journal of Food Microbiology 98 : 271– 279.

Satin M. 1996. Food Irradiation. Technomic. 156-176

Shahidi F., Vidana A. J. K., Jeon Y.J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology 10: 37-51

Shirai K. G., Hall G.M. 1996. Quitina: Ocurrencia, propiedades y aplicaciones. Ciencia 47(4):317-328.

Wang Q. Z., Chen X. G., Liu N., Wang S. X, Liu C. S., Meng X. H., Liu C. H. 2006. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. Carbohydrate Polymers 65:194–201

Wan Jun T., Cunxin W., Donghua C. 2005. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. Polymer Degradation and Stability 87: 389-394

Bibliografía

Wasikiewicz J. M., Yoshii F., Nagasawa N., Wach R. A., Mitomo H. 2005. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiation Physics and Chemistry* 73 :287–295.

White J. P., Jhonson L.A. 2003. Corn: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists. 126-135.

Xu J., Zhao X., Han X., Du Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87:220–228

Yoksan R., Akashi M., Miyata M., Chirachanchai S., 2004. Optimal γ - Ray Dose and Irradiation Conditions for Producing Low-Molecular- Weight Chitosan that Retains its Chemical Structure. *Radiation Research* 161: 471-478.