



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIFUNGICA DEL QUITOSAN
PROVENIENTE DEL HONGO *Mucor rouxii* Y DE CAMARON CONTRA
EL HONGO *Fusarium moniliforme* QUE AFECTA AL MAIZ.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

LETICIA DOMINGUEZ GOMEZ

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.

ÍNDICE

Introducción.....	6
-------------------	---

CAPÍTULO I: Antecedentes

1.1 GENERALIDADES DEL MAÍZ.....	8
1.1.1 Definición del maíz.....	8
1.1.2 Composición química del maíz.....	8
1.1.3 Estructura y morfología.....	9
1.1.4 Organismos que afectan al maíz.....	10
1.2 HONGO <i>Fusarium moniliforme</i>	14
1.2.1 Características del hongo.....	14
1.2.2 Taxonomía de <i>F. moniliforme</i>	14
1.2.3 Estructura del <i>Fusarium moniliforme</i>	15
1.2.4 <i>Fusarium moniliforme</i> en el maíz.....	16
1.3 HONGO <i>Mucor rouxii</i>	17
1.3.1 Taxonomía del <i>Mucor rouxii</i>	17
1.3.2 Estructura del <i>Mucor rouxii</i>	18
1.4 QUITOSÁN.....	19
1.4.1 Quitina y quitosán.....	19
1.4.2 Método de obtención de quitosán.....	23
1.4.3 Actividad antimicrobiana de quitosán.....	24
1.4.4 Usos y aplicaciones.....	26

CAPÍTULO II: Metodología

2.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	28
2.3.1 Cuadro metodológico.....	29
2.3.2 Descripción de actividades.....	30

CAPÍTULO III: Resultados

3.1 RESULTADOS.....	37
3.2 DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	51
ANEXO 1. TÉCNICA DE MICROCULTIVO.....	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del maíz (Belitz H.D. y col., 1997).....	8
Cuadro 2. Tipos de insectos que dañan al grano de maíz (Dendy D.A.V., 2001)...	11
Cuadro 3. Enfermedades fungosas en el maíz (González N.N., 1978).....	12
Cuadro 4. Tipos de roedores y pájaros que atacan al maíz (González N.N.1978)	13
Cuadro 5. Clasificación del hongo <i>Fusarium moniliforme</i> (Velluti A., 2000).....	14
Cuadro 6. Clasificación del hongo <i>Mucor rouxii</i> (White S. y col., 1979).....	17
Cuadro 7. Composición de la pared celular de los hongos (Rinaudo M., 2006)...	24
Cuadro 8. Comparación del <i>Fusarium moniliforme</i> bibliográfico y experimental.....	31
Cuadro 9. Registro del crecimiento radial del <i>Fusarium moniliforme</i>	36
Cuadro 10. <i>Fusarium moniliforme</i> bibliográfica y experimental.....	37
Cuadro 11. Diámetro de crecimiento radial del <i>F. moniliforme</i> en medio de cultivo quitosán camarón.....	44
Cuadro 12. Diámetro de crecimiento radial del <i>F. moniliforme</i> en medio de cultivo con quitosán de hongo <i>Mucor rouxii</i>	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del grano de maíz (González N.N., 1978).....	9
Figura2. Características microscópicas de <i>Fusarium moniliforme</i> (Booth C., 1971).....	16
Figura 3. Características microscópicas de <i>Mucor rouxii</i> (Ruiz J., 2003).....	18
Figura 4. Estructura química de quitina (Lárez V.C., 2006).....	21
Figura 5. Estructura química de quitosán (Lárez V.C., 2006).....	22
Figura 6. Proceso de obtención de quitina – quitosán (Lárez V.C., 2006).....	23
Figura 7. Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos a partir del desarrollo de aplicaciones de subproductos de quitina y quitosán.....	26
Figura 8. <i>Fusarium moniliforme</i> en PDA 9 días de cultivo.....	37
Figura 9. Cultivo de <i>Fusarium moniliforme</i> en PDA 9 días	37
Figura 10. <i>Fusarium moniliforme</i> en agar maíz amarillo 8 días.....	39
Figura 11. <i>Fusarium moniliforme</i> en agar maíz blanco 8 días.....	39
Figura 12. <i>Fusarium moniliforme</i> en agar maíz negro 8 días.....	39
Figura 13. Microcultivo de <i>Fusarium moniliforme</i> (Baird P. y col., 2001).....	40
Figura 14. Microcultivo de <i>Fusarium moniliforme</i> en agar PDA.....	41
Figura15. Microcultivo de <i>Fusarium moniliforme</i> en agar maíz amarillo.....	41
Figura 16. Microcultivo de <i>Fusarium moniliforme</i> en agar maíz blanco.....	41
Figura 17. Microcultivo de <i>Fusarium moniliforme</i> en agar maíz negro.....	41
Figura 18. Gráfica de cinética de crecimiento del hongo <i>M. rouxii</i>	43
Figura19. Crecimiento radial del <i>Fusarium moniliforme</i> en un medio de cultivo quitosán camarón.....	45
Figura20. Crecimiento radial del <i>Fusarium moniliforme</i> en un medio de cultivo quitosán hongo.....	47

Introducción

La producción de crustáceos (camarón, cangrejo, langosta etc.), se ha incrementado enormemente en los últimos años. México ocupa el séptimo lugar como país camaronero a nivel mundial, con una producción de 80 mil toneladas de camarón de las cuales, el 30% están conformadas por los desechos de caparazón (Miranda, 2000).

De los caparazones desechados durante la pesca de crustáceos se obtienen grandes cantidades de “quitina”, sustancia con propiedades antimicrobianas (Rinaudo, 2006).

El nombre de la quitina se deriva del griego kitos que significa cavidad o bóveda y es el lugar donde se localiza el caparazón.

La quitina es sintetizada por un enorme número de organismos en general todos los artrópodos, se considera el segundo polímero más abundante después de la celulosa (Rinaudo, 2006).

El quitosán es el derivado más importante de la quitina ya que ésta no se disuelve en ácido; también el quitosán es la quitina parcial o totalmente desacetilada y se usa en la alimentación, cosméticos, medicina y farmacia. (Rinaudo, 2006).

Se estima que el gran desarrollo y la rapidez con que se extiende el quitosán como complemento alimentario, hará pronto de él un aditivo muy valioso en la dieta diaria.

El quitosán es un elemento importante para la mayoría de las industrias ya que es utilizado como antimicrobiano y como envoltura biodegradable. Se han realizado investigaciones en donde el quitosán se ha empleado como recubrimiento en jitomates, aguacates, mangos y cereales obteniéndose buenos resultados para la inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico (Salvador y col., 1999).

El uso de este material en el control de hongos post-cosecha en frutos es de gran importancia, ya que estos presentan resistencia a fungicidas provocando que se vuelvan tolerantes. El quitosán reduce el crecimiento de un amplio rango de hongos y bacterias, su uso sería una alternativa de método de conservación.

El quitosán así como sus derivados ha presentado excelentes propiedades física y químicas para desarrollar un amplio número de productos con características sumamente interesantes para diversos sectores como son: agricultura, medicina y cosmetología (Lárez, 2006).

El aumento de 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 en los granos.

Los granos de maíz y de frijol, son atacados por hongos en el campo, en el transporte y en el almacenamiento. Como consecuencia uno de los factores que afectan la calidad de la tortilla, es la contaminación por hongos de diversas especies, como el *Fusarium moniliforme*, comúnmente encontrado en los granos del maíz antes, después de la cosecha, durante el almacenamiento, e inclusive después de la nixtamalización (Dendy, 2001).

CAPÍTULO I

1.1 GENERALIDADES DEL MAÍZ

1.1.1 Definición de maíz

Es una **planta** herbácea anual, de dos o cuatro metros de altura de la familia de las gramíneas, de raíz fasciculada. El tallo es cilíndrico y no ramificado (Belitz y col.1997).

Se encuentran presentes en la mayoría de los países a nivel mundial y se ha constituido como la base de la alimentación de los pobladores de las regiones donde crecen. Su importancia estriba en:

- Son fáciles de almacenar
- Fáciles de transportar
- Se conservan por mucho tiempo
- Se transportan con facilidad en otros alimentos (Charley, 1987).

Para el consumo humano el maíz es el principal grano en México, Sudamérica y Estados Unidos (Charley, 1987).

1.1.2 Composición química

En el cuadro 1, se puede observar la composición química principal del grano de maíz.

Compuesto	% Peso
Agua	12.5
Proteína	9.2
Lípidos	3.8
Almidón	62.6
Minerales	2.2
Fibra Cruda	1.3

Cuadro 1. Composición química del maíz (Belitz y col., 1997)

1.1.3 Estructura y morfología

El grano de maíz es un germen reproductivo de la planta y está compuesto de 4 partes principales:

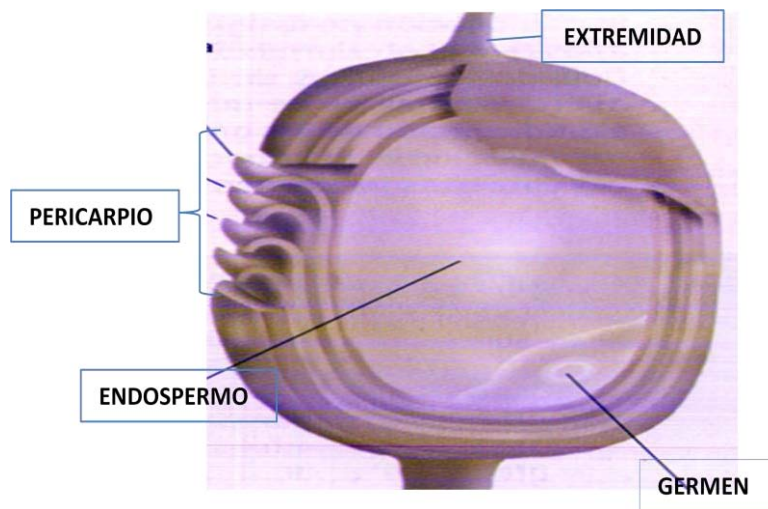


Figura 1. Estructura del grano de maíz (González, 1978).

El germen contiene todas las enzimas esenciales, nutrientes y material genético para producir la planta del maíz (González, 1978).

El endospermo está constituido por endospermo duro y suave; ambos constan de una matriz proteica que tienen gránulos encapsulados de almidón.

El pericarpio está compuesto de células muertas, que contienen alto contenido de celulosa y hemicelulosa que a su vez forma una capa gruesa que es la pared.

La extremidad o punta del grano es el punto de unión entre el movimiento de los nutrientes y el desarrollo del grano, provee protección contra invasiones de insectos y microorganismos (González, 1978).

1.1.3 Organismos que afectan al maíz

Insectos

Algunos cultivos son más susceptibles de ser atacados por insectos, los cuales pueden desarrollarse durante el almacenamiento. Se pueden clasificar a los insectos que destruyen al maíz como primarios y secundarios (Faroni, 1993).

Los insectos primarios son aquellos que inician el ataque al grano y pueden afectar directamente al embrión y endospermo de los cuales se encuentran los insectos secundarios pueden vivir asociados con los primarios aprovechando las condiciones establecidas por éstos (Faroni, 1993).

Existen dos tipos de daños causados por insectos:

Daño Directo

- ❖ Pérdida de peso: Es el resultado de que los insectos consuman el grano.
- ❖ Pérdida de valor alimenticio: Al ser atacado el grano presenta oxidación de carotenos, pérdida de carbohidratos y del germen.
- ❖ Contaminación con olor: Algunos insectos y ácaros producen sustancias químicas que dejan un olor desagradable en el grano y sus productos (Dendy, 2001).

Daño Indirecto

- ❖ Incremento de impurezas en el grano almacenado.
- ❖ Distribución de esporas de hongos de almacenamiento.
- ❖ Transmisión de enfermedades a humanos.
- ❖ Calentamiento del grano seco.
- ❖ Contaminación con fragmentos de insectos (Dendy, 2001).

Algunos de los insectos más frecuentes que pueden dañar el grano se observan en el cuadro 2.

Insectos	Características
Mosca de la semilla	Al nacer las larvas, amarillentas penetran por la zona germinal de la semilla, destruyen o deterioran el embrión.
Gusano Blanco	Las larvas se alimentan de las semillas recién sembradas o cuando éstas comienzan a germinar.
Hormiga negra	Son las que se dedican a cortar los vegetales en trozos pequeños fáciles de llevar.
Gorgojo	Ataca al grano alimentándose de éste.

Cuadro 2. Tipos de Insectos que dañan al grano del maíz (Dendy, 2001).

Hongos

La contaminación fungal causa la reducción del grano y daña la calidad, provocando en la producción grandes pérdidas, es importante mencionar que también causan problemas de toxicidad por las micotoxinas que producen los hongos (Carrillo, 2003).

Los hongos de campo pueden causar considerables daños en los granos. Los principales efectos son las decoloraciones, que degradan la calidad, y la producción de micotoxinas. La aparición de manchas rosadas o negras en el maíz son el resultado de la actuación de los géneros *Fusarium* y *Alternaria* respectivamente (Baird y col. 2001).

El valor nutritivo de los granos también se reduce pero aún se pueden utilizar en la fabricación de piensos de bajos índices para animales.

Los hongos de almacén dañan los granos también de diversas maneras, incluyendo la pérdida de capacidad de germinación, decoloraciones, olores anormales, pérdida de materia seca, crecimiento visible y cambios químicos y nutritivos (Baird y col. 2001).

Alrededor de 25 diferentes especies de hongos que se conocen pueden infectar al grano en el almacenamiento, estos se denominan hongos de almacén y hongos de granos. El *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Penicillium* son los más comunes (González, 1978).

En el cuadro 3 se muestran los síntomas más comunes de las enfermedades causadas por el hongo en el maíz.

Enfermedad	Síntoma
Pudrición de mazorca por <i>Penicillium</i>	Un polvo de color azul-verdoso muy conspicuo crece entre los granos y sobre la superficie del olote (raquis).
Pudrición de mazorca	Los granos adquieren un color rosado, rojizo o café oscuro.
Carbón común	Unas agallas blancas cerradas muy conspicuas sustituyen a los granos individuales. Con el tiempo las agallas se rompen y liberan masas negras de esporas que infectarán las plantas de maíz del siguiente ciclo de cultivo.
Pudrición de mazorca por <i>F. moniliforme</i>	Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso o rayas blancas en el pericarpio y germinan estando aún en el olote.

Cuadro 3. Enfermedades fungosas en el maíz (González, 1978)

La forma tradicional de evitar el crecimiento microbiano en los granos consisten en desecarlos y mantenerlos secos. A una ventilación adecuada durante el almacenamiento elimina la humedad, previene las condensaciones reduce y equilibra la temperatura y la mantiene baja. Los registros continuos de las temperaturas del grano durante el almacenamiento permiten tener un sistema efectivo del control de riesgos. La utilización de termopares va distancias no superiores a 2 metros entre ellos es un procedimiento muy eficaz para detectar puntos calientes (Baird y col. 2001).

Los sistemas más modernos de almacenamiento de los granos se basan en la fumigación y el cierre hermético en atmósferas controladas. Las sustancias fumigantes son vapores altamente tóxicos que se les añaden a los granos para matar específicamente a los insectos (Baird y col. 2001).

El empleo de atmósferas controladas consiste en la aplicación continua de bajos niveles de oxígeno y altas concentraciones de bióxido de carbono.

La fumigación y las atmósferas controladas pueden contribuir a evitar el desarrollo fúngico en los granos por destrucción directa de las esporas, por inhibición del crecimiento o simplemente a destruir los insectos que producen daños en las cutículas de los granos (Baird y col. 2001).

Estos son métodos importantes para reducir el desarrollo microbiano en el grano de maíz; más adelante se muestra una investigación de quitosán de camarón y quitosán proveniente del hongo *M. rouxii* que es un compuesto que ayuda a reducir el crecimiento microbiano y que por lo tanto se convierte en un método de conservación actual.

Roedores y pájaros

Estos animales son muy importantes en la conservación del grano ya que lo contaminan con sus excrementos, plumas, pelos y residuos de nidos. En el cuadro 4 se presentan los tipos de roedores y pájaros que dañan el grano de maíz y al almacén (González, 1978).

Animal	Daños
Rata de noruega	Contaminación con excremento, pelos y orina.
Rata de los tejados	Roer materiales no comestibles como cables eléctricos
Ratón casero	Contaminación con excremento, pelo y orina. Los excrementos son pequeños.
Pájaro común	El ácido de sus residuos causa permanente oxidación y corrosión en las partes metálicas de las edificaciones.

Cuadro 4. Tipos de roedores y pájaros que atacan al maíz (González, 1978).

1.2 HONGO *Fusarium moniliforme*

1.2.1 Características del hongo

Fusarium moniliforme es un hongo fitopatógeno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, asociado principalmente al maíz. Este hongo produce infecciones en tallo y pudrición de mazorca y grano; además es productor de una gran variedad de micotoxinas como la moniliformina, fusarinas, tricotecénos, ácido fusárico y fumonisinas cuya presencia reduce el valor del grano para su uso en alimentos de consumo animal y humano (Velluti. 2000).

Las fumonisinas son moléculas con estructura una hidrofílica (afinidad por el agua) y otra hidrofóbica (rechazo del agua) que se descubrieron en 1988 y forman una familia de compuestos con distintos grupos sustituyentes. Entre estos compuestos, la fumonisina B1 es el metabolito más abundante y su consumo en maíz contaminado se ha asociado con algunas enfermedades graves en equinos y porcinos (Velluti. 2000).

1.2.2 Taxonomía del *Fusarium*

División	Ascomycota
Clase	Euascmycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especies	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>F. dimerum</i> , <i>F. chlamydosporum</i> , etc.

Cuadro 5 .Clasificación del hongo *Fusarium* (Velluti. 2000).

Muchas especies requieren condiciones específicas para desarrollarse adecuadamente y otras sufren mutaciones rápidamente. Esto explica la cantidad de clasificaciones y especies que hay. Actualmente, la mayoría de estas clasificaciones se basan en las características macro y microscópicas del cultivo. Se consideran un género anamórfico dentro de los Ascomycetos. Se puede observar en el cuadro 5 la clasificación del hongo (Velluti. 2000).

1.2.3 Estructura de *Fusarium moniliforme*

En medios habituales las colonias presentan un crecimiento rápido, que suele ocupar toda la placa (8-9 cm de Ø en 1 semana). El color que desarrollan es blanquecino, rosa, púrpura, etc. El color al reverso varía de crema a lila, vino tinto o púrpura. Estas coloraciones también pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso (Booth, 1971).

La velocidad de crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia son datos importantes para la identificación. La temperatura habitual de incubación de estos hongos es entre 25 y 28 °C (Booth, 1971).

Las microconidias son ovoides o en forma de maza con base truncada. Su tamaño es de 7-10 x 2,5-3,2 µm y pueden tener uno o dos tabiques. En algunos medios forma cadenas que pueden observarse en la placa de cultivo con objetivos de bajo aumento. La presencia de abundantes microconidias condiciona el aspecto polveralento de la colonia. Los conidióforos nacen lateralmente de la hifa y son escasamente ramificados. Las células conidiógenas son monofiálides, habitualmente delgadas y largas, pero menos que la de *F. solani* (20-30 x 2,3 µm) (Booth, 1971).

Las macroconidias no se forman en todas las cepas. Cuando existen son ligeramente fusiformes, casi rectas, con superficies dorsal y ventral casi paralelas, de pared fina y delicada. Las células basal y apical son alargadas y ligeramente curvadas. Pueden tener entre tres y siete tabiques y su tamaño es de 31-58 x 2,7-3-6 µm. No forma clamidosporas. Puede presentar esclerotia azul oscura lo que

produce un cultivo de tono azulado. La esporodocia se forma raramente. No se han comunicado datos sobre su sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos (Booth, 1971).

En la figura 2 se presentan las diferentes estructuras del *F. moniliforme*.

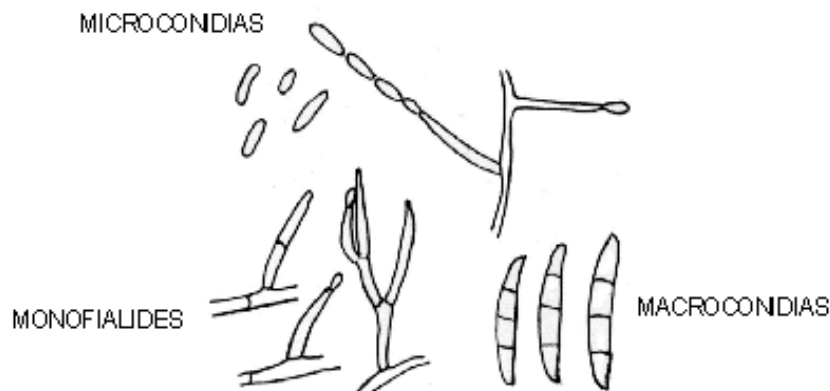


Figura 2. Características microscópicas de *F. moniliforme* (Booth, 1971).

1.2.4 *Fusarium moniliforme* en el maíz

Debido a que el consumo de maíz en México es alto, comparado con el de otros países, es importante la incidencia que hay de microorganismos toxigénicos en alimentos y en materias primas destinadas para la producción de alimentos. *Fusarium moniliforme* es un hongo ubicuo en maíz y tiene una capacidad variable de producir micotoxinas, como la fumonisina B1 que se encuentra en niveles considerables en maíz y que persiste en alimentos procesados (Plascencia y col., 2003).

Es un patógeno que habita en el suelo y se ha encontrado en el maíz cultivado en todas las regiones del mundo. Los principales defectos son las decoloraciones, olores desagradables y manchas de colores en el grano de maíz, provocando una disminución en la calidad y perjudicando la producción (Baird y col, 2001).

Es el hongo que está ligado más con el grano de maíz. Con frecuencia produce infecciones asintomáticas en los maizales, pero también puede infectar el grano y se ha detectado en todo el mundo en los alimentos. A menudo no se distingue la presencia del hongo en los granos es decir no parecen infectados, aunque tampoco resalta extraño encontrar lotes de maíz cuya mazorca tiene un 100% de sus granos infectados (Baird y col, 2001).

Su presencia en el maíz, es un grave problema de la microbiología y seguridad alimentarias debido a la gran difusión de la contaminación con sus metabolitos tóxicos, especialmente fumisinidas (Baird y col, 2001).

La principal enfermedad humana atribuida al *F. moniliforme* es el cáncer de esófago ya que el maíz es el principal componente de la dieta humana en la región de África del Sur. Donde se ha encontrado esta enfermedad en los pobladores, en estudios que se les han realizado presenta cáncer de esófago por las micotoxinas que contiene el maíz (Baird y col, 2001).

1.3 HONGO *Mucor rouxii*

1.3.1 Taxonomía del *Mucor rouxii*

Reino	<u>Fungi</u>
División	<u>Zygomycota</u>
Clase	<u>Zygomycetes</u>
Orden	<u>Mucorales</u>
Familia	<u>Mucoraceae</u>
Género	<i>Mucor</i>
Especie	<i>Mucor rouxii</i>

Cuadro 6. Clasificación del hongo *M. rouxii* (White y col., 1979).

Mucor es un género de alrededor de 40 especies de hongos que se encuentran comúnmente en el suelo y sobre la superficie de las plantas (White y col.,1979).

En el cuadro 6 se presenta la clasificación taxonómica del hongo.

1.3.2 Estructura del *Mucor rouxii*

Las colonias de este género de hongos son típicamente de color blanco a beige o gris, amarillo marrón pálido y de rápido crecimiento en pocos días (90 mm en una semana). Las colonias en medio de cultivo pueden crecer varios centímetros de altura (alcanza la tapa de la placa de petri). Consiste en penachos cortos y vellosos, aterciopelados. Al reverso de la caja es incoloro (Whithe y col., 1979).

Las características del esporangióforo, presentan los tallos largos sin ramificar y tallos cortos ramificados de forma simpodial que en ocasiones se curvan hacia abajo; los esporangios miden entre 0-80 μm con las paredes con finas incrustaciones, de pared lisa y elipsoidales hasta 7 x 5 μm (Ruiz, 2003).

Estado sexual: Se encuentra rara vez; cuando se produce se visualizan zigosporas marrón-rojizas o marrón oscuras, en forma de globo, con espinas y hasta 100 μm de diámetro. Pero *M. circinelloides* tiene esporangióforos curvados y ramificados; se distingue de *Absidia*, *Rhizopus* y *Rhizomucor spp.* Por la ausencia de rizoides y el escaso crecimiento a 37°C (Ruiz, 2003). En la figura 3 se observan las diferentes estructuras del *M. rouxii*.

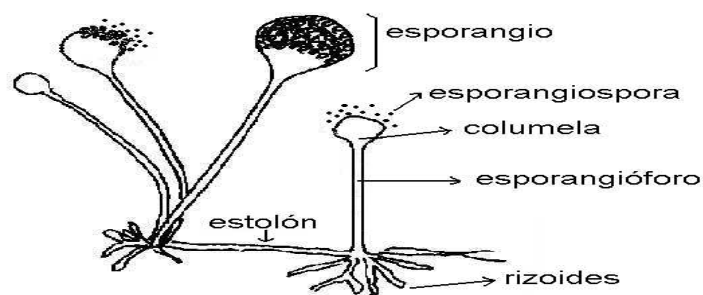


Figura 3. Características microscópicas de *Mucor rouxii* (Ruiz, 2003).

El hongo *M. rouxii* con respecto a su composición química presenta quitosán que es un biopolímero importante para la inhibir el crecimiento del *Fusarium moniliforme* en base a esto, se realizó la investigación del quitosán proveniente el hongo *M. rouxii* y quitosán proveniente del camarón y así comparar el mejor inhibidor microbiano.

1.4 QUITOSÁN

1.4.1 Quitina y quitosán

La producción de crustáceos (camarón, cangrejo, langosta, entre otros), se ha incrementado enormemente en los últimos años. México ocupa el séptimo lugar como país camaronero a nivel mundial, con una producción de 80 mil toneladas de camarón de las cuales, el 30% están conformadas por los desechos de caparazón (Miranda, 2000).

De los caparazones desechados durante la pesca de crustáceos se obtienen grandes cantidades de “quitina”, sustancia con propiedades antimicrobianas (Miranda, 2000).

La quitina es un polímero natural que se clasifica dentro del tipo polisacárido, considerado a menudo como un derivado de la celulosa por sus características, pero con ciertas diferencias en su estructura molecular. El quitosán es el derivado de la quitina, éste es un polímero con propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, etc. Además posee ciertas características químicas y físicas de gran interés industrial (Lárez, 2006).

La quitina y quitosán, son polímeros naturales muy antiguos en lo que se refiere a su aparición en la tierra pero muy actuales en cuanto a sus posibilidades de aplicación. Algunos ejemplos claros son: agricultura (protección de semillas, fungicidas), tratamiento de aguas (floculantes, coagulantes, pesticidas), medicina (producción de glucosamina, cremas cicatrizantes), cosméticos (adegazantes, agente hidratante, champúes entre otros) (Lárez, 2006).

Sin embargo, esta importante producción de desechos no se aprovecha adecuadamente debido a la falta de vinculación y comunicación entre las industrias como la farmacéutica, agrícola y alimentaria (Miranda, 2000).

En este proyecto se evalúa una de las ventajas de utilizar el quitosán en la agricultura, más en específico, la evaluación de la actividad del quitosán proveniente del caparazón del camarón y del hongo *Mucor rouxii* contra el hongo *Fusarium moniliforme* que afecta al maíz.

Por lo cual es importante conocer algunos aspectos de los polímeros (quitina y quitosán).

Quitina (del griego *tunic*, envoltura) se encuentra distribuida en la naturaleza y, después de la celulosa, es el segundo polisacárido en abundancia. Sus fuentes principales el exoesqueleto (caparazón), de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos y cucarachas), paredes celulares de hongos, algas (Shahidi y col., 1999).

La quitina es blanca, dura, inelástica y es la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas cercanas al mar. Se conoce como 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa con uniones $\beta(1-4)$, como se presenta en la siguiente figura 4 (Shahidi y col., 1999).

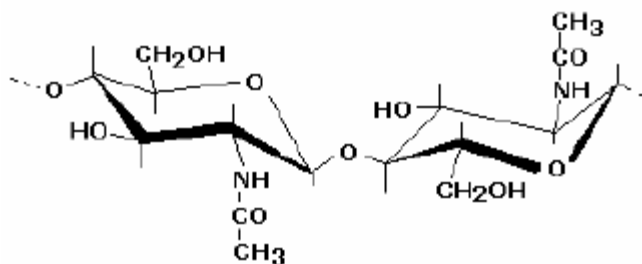


Figura 4. Estructura química de quitina (Larez, 2006)

En este biopolímero los grupos aminos se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amida de ácido acético. Este aminopolisacárido es de tipo lineal, llegando a formar cadenas de miles de unidades de N-acetilglucosamina. Es capaz de sufrir modificaciones químicas, obteniéndose un gran número de derivados que presentan diferentes propiedades físicas y químicas con diversas aplicaciones (Shahidi y col., 1999).

El quitosán es un derivado de la quitina mediante un proceso de desacetilación química o enzimática extraída de exoesqueletos de camarón. Además es un polímero con propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad prácticamente nula (Lárez, 2006).

Es un sólido blanco amorfo, insoluble en agua, soluble en ácidos. Químicamente es un poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina), como se observa en la figura 5. Debido a que hay una desacetilación a partir de la quitina en la que los grupos acetilo han sido eliminados, por consiguiente en el quitosán el grupo amino se encuentra libre como amina primaria (Lárez, 2006).

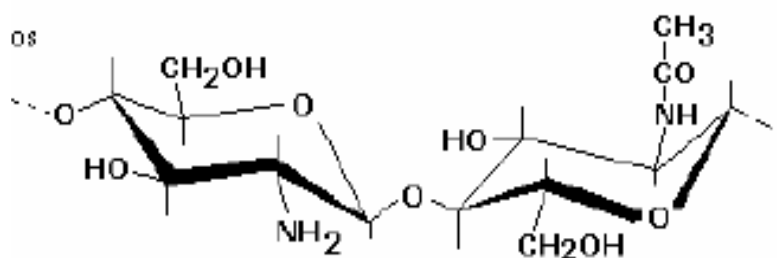


Figura 5. Estructura química de quitosán (Lárez, 2006).

El quitosán es un polielectrolito a pH ácido, presenta una alta densidad de carga por unidad de glucosamina, interactúa fuertemente con muchos materiales que portan cargas negativas como: proteínas, polisacáridos aniónicos, ácidos nucleicos. Por lo tanto una de las propiedades es que tienen una mejor actividad antimicrobiana que la quitina, debido a la carga positiva en el C-2 del monómero de la glucosamina (Lárez, 2006).

1.4.2 Método de obtención de quitina y quitosán

La producción industrial de quitina y quitosán se realiza a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, desechados de las industrias pesqueras y en la figura 6 se observa el procedimiento para obtener quitosán.

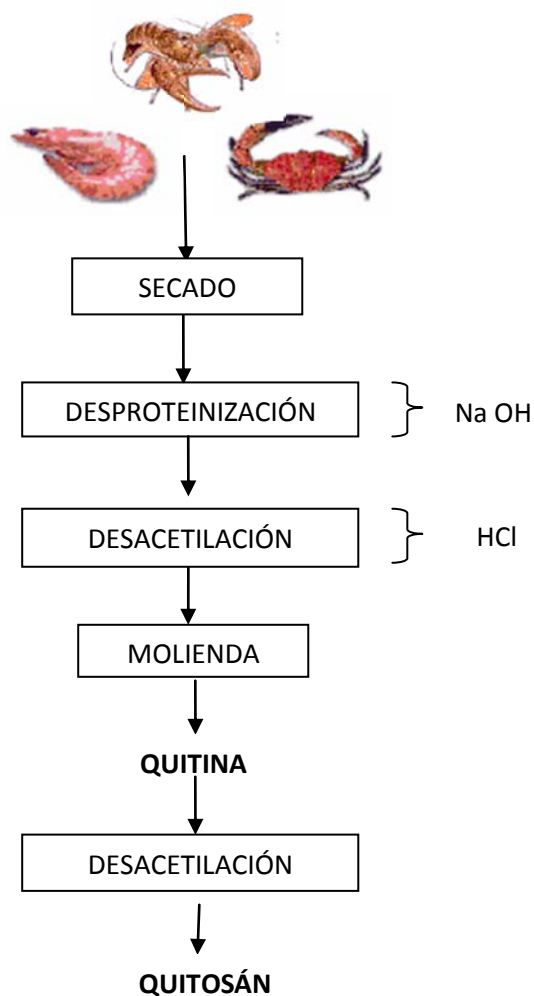


Figura 6. Proceso de obtención de quitina – quitosán (Lárez, 2006).

1.4.3 Actividad antimicrobiana del quitosán

La pared celular de los hongos posee diferentes constituyentes químicos como ser polisacáridos, proteínas, lípidos y otras sustancias. La constitución varía entre las diferentes especies. También varía con la edad del hongo, ya que sustancias que pueden estar presentes en las hifas jóvenes, desaparecen en las más viejas o depositar otros materiales y enmascarar la presencia de constituyentes iniciales, también la composición del medio, el pH y la temperatura, influyen en la composición de las paredes de los hongos (Rinaudo, 2006).

La actividad antimicrobiana del quitosán es mejor en hongos y algas que en bacterias, en el cuadro 7 se observa la composición de la pared celular de algunos hongos.

Tipo de pared celular	Géneros representativos
Celulosa-glucogéno	<i>Polysphondylium</i> , <i>Dictyostelium</i>
Celulosa- β -Glucana	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Saprolegnia</i>
Celulosa – quitina	<i>Rhizidiomyces</i>
Quitina – Quitosana	<i>Mucor</i> , <i>Phycomyces</i> , <i>Migorthynchus</i>
Quitina- β -Glucana	<i>Aspergillus</i> , <i>Schizophyllum</i> , <i>Polyporus</i> .
Quitina-Glucana	Sporobolomyces, Rhodotorula

Cuadro 7. Composición de la pared celular de los hongos (Rinaudo, 2006).

Hay dos tipos de mecanismos propuestos para la inhibición del crecimiento bacteriano.

- ❖ Mecanismo bacteriano: La naturaleza policatiónica del quitosán interfiere con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas en superficie celular de las bacterias. El quitosán y otras poliaminas interactúan con la membrana celular alterando la permeabilidad de la célula, por ejemplo la levadura es inhibida por ciertos cationes como acetato de uranilo, sulfato de aluminio, anila y D-glucosamina, los cuales actúan sobre la superficie celular de la levadura previniendo la entrada de glucosa.

- ❖ Mecanismo antifúngico: Involucra la unión de quitosán con la molécula de ADN para inhibir síntesis de ARNm. Se ha propuesto que cuando el quitosán es liberado de la pared celular de los hongos patógenos por las enzimas hidrolíticas de planta hospedadora, el quitosán penetra el núcleo de los hongos e interfieren con la síntesis de ARNm y las proteínas (Rinaudo, 2006).

Los oligómeros de quitosán consistentes en siete unidades de azúcares se ha comprobado que han sido los que poseen mayor actividad antifúngica. La actividad antimicrobiana se mide *in vitro* para determinar su potencia y sensibilidad de microorganismos (Lárez, 2006).

1.4.4 Usos y aplicaciones del quitosán

El quitosán como sus derivados han presentado excelentes propiedades físicas y químicas para diversos sectores industriales, como se presenta en la siguiente figura 7.

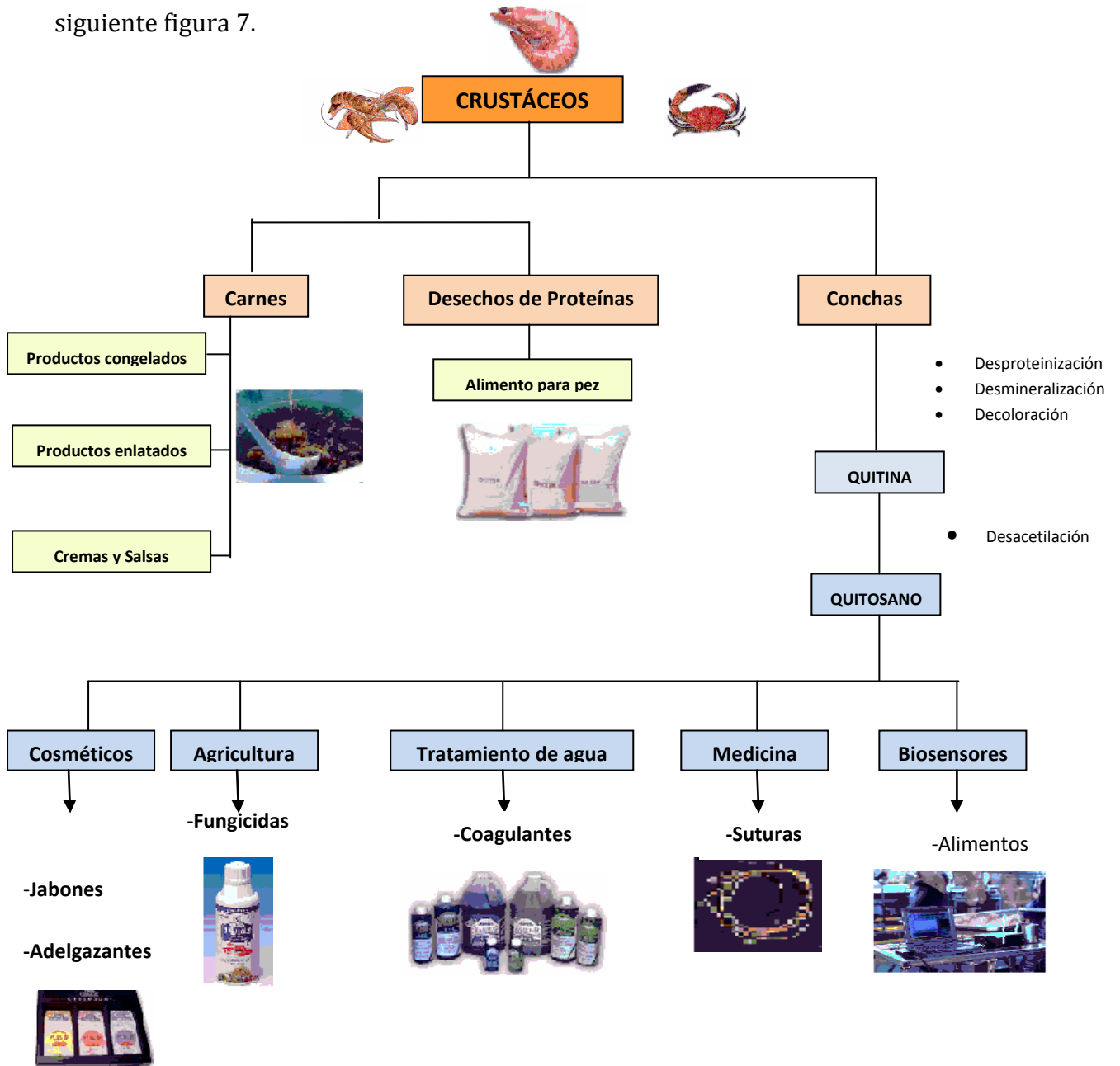


Figura 7. Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos a partir del desarrollo de aplicaciones de subproductos de quitina y quitosán (Lárez, 2006).

CAPÍTULO II

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica del quitosán proveniente del caparazón del camarón y del hongo *Mucor rouxii* para inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium moniliforme* que afecta al maíz.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Objetivo 1

Aislar e identificar el hongo *Fusarium moniliforme* para enfrentarlo contra los diferentes tipos de quitosán.

Objetivo 2

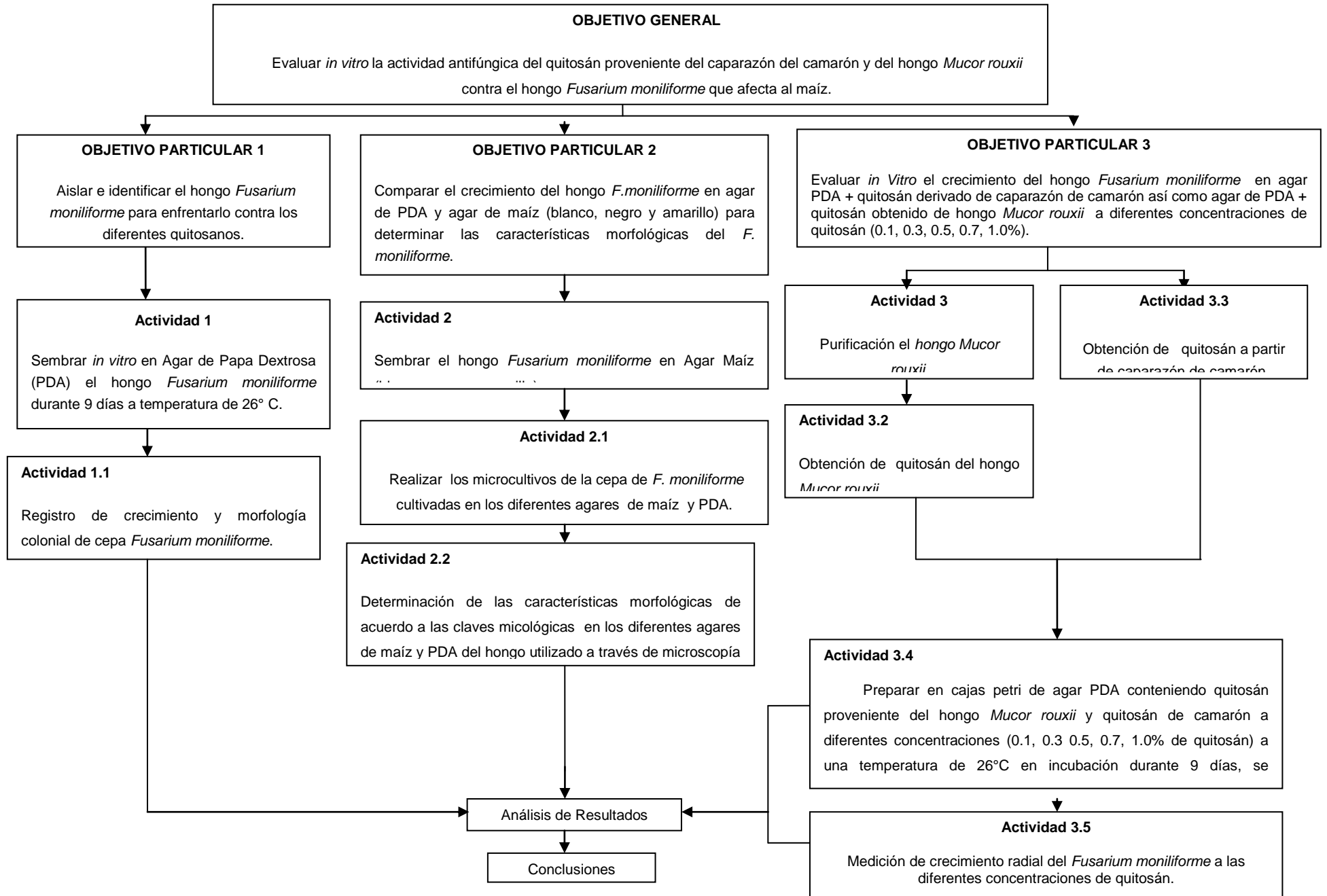
Comparar el crecimiento *in vitro* del hongo *Fusarium moniliforme* en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y agar de maíz (blanco, negro y amarillo) para determinar las características morfológicas del *F. moniliforme*.

Objetivo 3

Evaluar *in vitro* el crecimiento del hongo *Fusarium moniliforme* en agar PDA + quitosán derivado de caparazón de camarón así como agar de PDA + quitosán obtenido de hongo *Mucor rouxii* a diferentes concentraciones 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0% de quitosán.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

CUADRO METODOLOGICO



2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.3.2 Descripción de actividades

Objetivo particular 1

Actividad 1

Sembrar *in vitro* en Agar de Papa Dextrosa (PDA) el hongo *Fusarium moniliforme* durante 10 días a temperatura de 26° C.

Se partió de la cepa del hongo *F. moniliforme* proporcionada por la Maestra en Ciencias Carolina Moreno del Cepario de UNIGRAS-FESC-UNAM.

Se tomó una muestra de la cepa con la ayuda de un asa estéril y se sembró en PDA, posteriormente en la incubadora (Blue M.) se mantuvo a una temperatura de 26° C durante 9 días.

Para la purificación del hongo se realizaron varias resiembras en PDA hasta obtener la cepa pura.

Actividad 1.1

Registro de crecimiento y morfología colonial de cepa *Fusarium moniliforme*.

Diariamente se registró el crecimiento del hongo *F. moniliforme* en relación a sus características morfológicas como:

- ❖ **Color de la colonia:** Si es uniforme o en zonas específicas, mosaico o si es rosa, blanco y gris.
- ❖ **Forma:** Es circular y amorfa.
- ❖ **Textura:** Pulverulenta, vellosa, algodonosa, filamentosa y gelatinosa

Los resultados que se obtengan de las características morfológicas del hongo *Fusarium moniliforme* se registraran en un cuadro 8.

Bibliografía	Características de la colonia
<i>F. moniliforme</i> en PDA 9 días de cultivo	<p>Textura</p> <p>Color</p> <p>Reverso</p> <p>Forma</p>
Experimental	Crecimiento
Cultivo de <i>F. moniliforme</i> en PDA 9 días	<p>Textura</p> <p>Color</p> <p>Reverso</p> <p>Forma</p> <p>Crecimiento</p>

Cuadro 8. Comparación del *Fusarium moniliforme* bibliográfico y experimental.

Objetivo particular 2

Actividad 2

Siembra del hongo *Fusarium moniliforme* en Agar Maíz (blanco, negro y amarillo).

Del hongo *F. moniliforme* que se tenía ya cultivado en forma pura se tomó una pequeña muestra micelial con un asa previamente flameada y se sembró en las cajas de PDA y Agar maíz a un pH de 5.5. Las muestras ya cultivadas en las cajas de agar de PDA y agar maíz (blanco, negro, amarillo) se incubaron a una temperatura de 26°C durante un periodo de 8 días. Se llevó un registro de las características morfológicas observadas a través del tiempo y se hizo un seguimiento fotográfico.

Actividad 2.1

Se realizaron los microcultivos de la cepa de *F. moniliforme* cultivadas en los diferentes agares de maíz y PDA (Ver anexo 1. Técnica de microcultivo).

Actividad 2.2

Determinación de las características morfológicas de acuerdo a las claves micológicas en los diferentes agares de maíz y PDA del hongo utilizado a través de microscopía de luz.

A partir del microcultivo del hongo *F. moniliforme* ya desarrollado se tiñó con azul algodón y se observó al microscopio de luz con un aumento de 100 X. Se observó microscópicamente la morfología del hongo, se realizó un seguimiento fotográfico para observar los cambios dependiendo del medio de cultivo.

Objetivo particular 3

Actividad 3

Purificación el *hongo Mucor rouxii*.

El hongo *Mucor rouxii* con el que se trabajó fue proporcionado por el Dr. Tonathiu A. Cruz Sánchez de el cepario particular del laboratorio 6, UNI, FES Cuautitlán.

Se tomó una pequeña porción del hongo con un asa estéril y se inoculó en el centro de una caja de petri con Agar-Papa-Dextrosa a un pH de 5.5 después se incubó a una temperatura de 26°C durante 8 días.

Para obtener un hongo puro se realizaron varias resiembras en PDA.

Actividad 3.1

Elaboración de la cinética de crecimiento del hongo *Mucor rouxii* en medio líquido de PDA.

Procedimiento

1.- Con la ayuda de un sacabocado metálico estéril se tomaron porciones iguales del hongo *Mucor rouxii* ya desarrollado en agar PDA por 9 días y se colocaron las porciones del hongo en cada uno de los matraces Erlenmeyer que contenían el medio líquido de PDA. Los matraces se colocaron en una incubadora con agitación (New Brunswick) por 5 días a la temperatura de 26°C y 150 rpm.

2.- La curva de la cinética del hongo se construyó en el peso seco del hongo contra el tiempo.

Actividad 3.2

Obtención de quitosán del hongo *Mucor rouxii*.

Para la obtención de quitosán a partir del hongo *Mucor rouxii*, se tomó como referencia el artículo de (White 1979) y se hicieron algunas modificaciones, que se describen a continuación:

Se preparó PDA líquido y se esterilizó durante 15 minutos a una temperatura de 121°C. Posteriormente se sembró una pequeña porción del hongo *Mucor rouxii* de 9 días de desarrollo. Los matraces sembrados se incubaron en agitación durante 17 días a una temperatura de 26°C y 150 rpm.

Transcurridos los 17 días, el caldo de cultivo se filtró y la masa celular del hongo se secó en la estufa (Quncy Labinc) durante 24hrs a una temperatura de 45°C.

Una vez obtenida la biomasa seca, a ésta se le agregó una solución de hidróxido de sodio 50% y se reflujo durante 1 hora a ebullición para eliminar las proteínas. Posteriormente la masa que quedó de esa hidrólisis se lavó con agua destilada hasta que el pH del agua fuera neutro y los sólidos obtenidos se secaron a una temperatura de 50°C durante 24 hrs.

Para verificar la obtención del quitosán a partir del hongo *M. rouxii* bajo esta metodología, el residuo seco se disolvió en ácido acético al 1 %.

Actividad 3.3

Obtención de quitosán a partir de caparazón de camarón.

La obtención del quitosán proveniente de caparazón de camarón se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada en el laboratorio de Biotecnología FES Cuautitlán (Patente en trámite IMPI, No expediente 005444, 31Mayo 2000 No de Folio 1175930-5).

Actividad 3.4

Se prepararon en cajas petri de agar PDA conteniendo quitosán proveniente del hongo *Mucor rouxii* y quitosán de camarón a diferentes concentraciones (0.1, 0.3 0.5, 0.7, 1.0% de quitosán) a una temperatura de 26°C en incubación durante 9 días, se registraron los cambios y se realizó un seguimiento fotográfico.

Procedimiento

Se prepararon cajas de petri conteniendo agar PDA y quitosán proveniente de hongo y de camarón a diferentes concentraciones (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0). El quitosán fue previamente disuelto en una solución de agua-ácido acético al 1% y adicionado al volumen total del medio. Finalmente se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó el medio en autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

Se sembró el hongo *Fusarium moniliforme* con la ayuda de un sacabocado metálico estéril. Se tomaron porciones iguales del hongo ya desarrollado en agar PDA por 9 días y se colocaron las porciones del hongo en cada una de las cajas en los diferentes agares conteniendo las concentraciones de quitosán de (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 % de quitosán). Se incubaron las cajas a una temperatura de 26°C durante 9 días. Se midió el crecimiento radial del hongo con un vernier.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento para el control del crecimiento del *Fusarium moniliforme*, pero la siembra fue solamente en agar PDA sin quitosán.

De acuerdo al cuadro 9 se llevó el registro de crecimiento radial del hongo *Fusarium moniliforme* en las cajas de agar conteniendo quitosán de camarón y quitosán de hongo. También se realizó un registro fotográfico.

Diámetro de crecimiento radial (mm)								
% QN	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día	7 día	8 día	9 día
0.1								
0.3								
0.5								
0.7								
1.0								
Control								

Cuadro 9. Registro del crecimiento radial del *Fusarium moniliforme*.


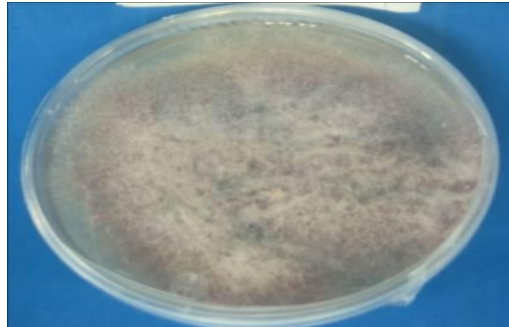
CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS

Actividad 1.2

Registro de crecimiento y morfología colonial de cepa *Fusarium moniliforme*.

De acuerdo a la metodología descrita, en el cuadro 10 se muestran las características coloniales obtenidas experimentalmente así como de la bibliografía (Baird y col., 2001).

Bibliografía	Características de la colonia
 <p>Figura 8. <i>F. moniliforme</i> en PDA 9 días de cultivo (Baird y col., 2001).</p>	<p>Textura: Algodonosa y vellosa seca, se adhiere a las paredes de la caja.</p> <p>Color: En un inicio (1-3 días) es blanca posteriormente tonalidades violeta – lila.</p> <p>Reverso: Crema pálido y violeta.</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Crecimiento: Moderadamente rápido (Baird y col., 2001).</p>
Experimental	
 <p>Figura 9. Cultivo de <i>F. moniliforme</i> en PDA 9 días</p>	<p>Textura: Algodonosa y vellosa</p> <p>Color: Los primeros 2 días presenta un color blanco posteriormente cambia a un rosa pálido.</p> <p>Reverso: Es color blanco con tonos rosa</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Crecimiento: Rápido</p>

Cuadro 10. *Fusarium moniliforme* bibliográfica y experimental.

En cuadro 10 se muestran las características de la colonia. En la figura 8, se observa que el micelio es algodonoso y veloso de color blanco con tonalidades lila, si se compara con la figura 9, se manejan las mismas características morfológicas, sin embargo como la figura 8 fue tomada de internet, al parecer usaron filtros por lo que se ve de tonos rosados, mientras que la figura 9 que es experimental se cultivó en un medio de PDA durante 9 días y no se usaron filtros para la fotografía.

El *Fusarium moniliforme* que se utiliza en la experimentación maneja las mismas características que la bibliografía, por lo tanto corresponden a la misma especie.

Actividad 2

Siembra del hongo *Fusarium moniliforme* agar maíz (blanco, negro y amarillo).

En las figuras 10, 11 y 12 se pueden observar las características coloniales de los hongos *Fusarium moniliforme* cultivados en los diferentes tipos de agar maíz usados en la experimentación (amarillo, blanco y negro).



Figura 10. *F. moniliforme* en agar maíz amarillo 8 días.



Figura 11. *F. moniliforme* en agar maíz blanco 8 días.



Figura 12. *F. moniliforme* en agar maíz negro 8 días.

Las figuras 10, 11 y 12 presentan características de colonia como son la apariencia algodonosa y vellosa que se adhiere a las paredes de la caja, además presentan un color blanco y un rosa pálido, al anverso de la caja se observó un color rosa predominante.

De acuerdo a Castañeda, (2002) el micelio se desarrolla con rapidez es delgado y aterciopelado en principio es blanco, y posteriormente son tonalidades rosas y lilas. Como se ve reflejado en las figuras anteriores no existen cambios morfológicos de la colonia de *Fusarium moniliforme* crecido en diversos agares de maíz, lo que se destaca en la experimentación es que el micelio fue abundante y creció rápidamente, en 8 días la caja se encontraba cubierta totalmente por el hongo.

Actividad 2.2

Determinación de las características morfológicas en los diferentes agares de maíz y PDA del hongo utilizado a través de microscopía.

En las figuras 13,14,15,16 y 17; se pueden observar las características morfológicas del hongo *Fusarium moniliforme* en el microscopio de luz a 100 X cultivadas en agar PDA y agar de los diferentes tipos de maíz y se compararon con la bibliografía (Baird y col., 2001).

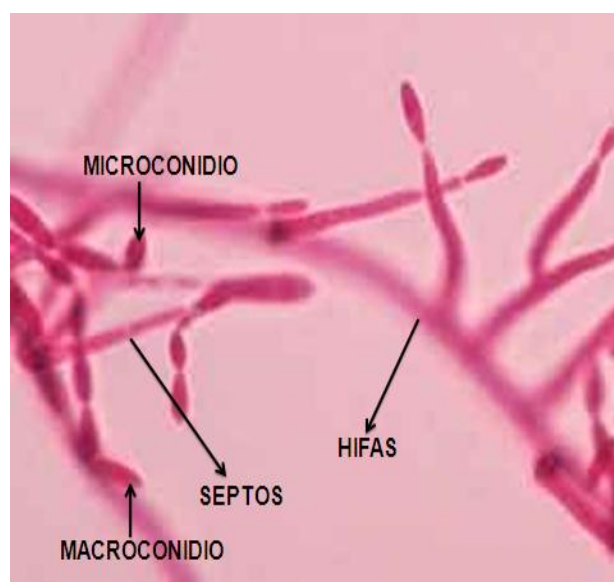


Figura 13. Microcultivo de *Fusarium moniliforme*, tomado de (Baird y col., 2001).

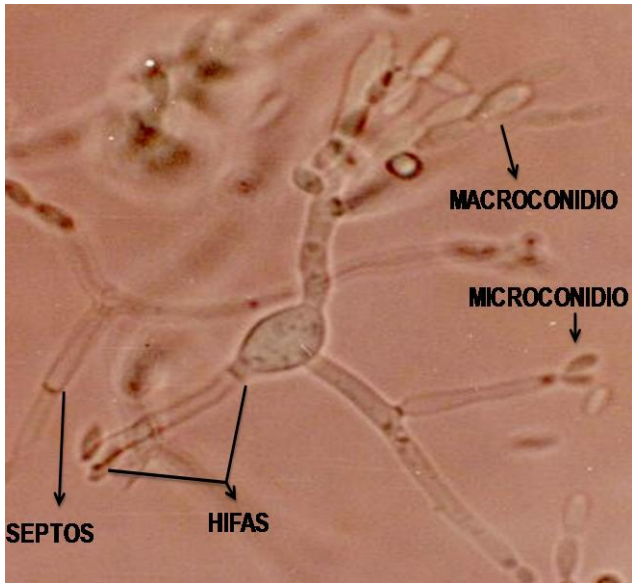


Figura 14. Microcultivo *Fusarium moniliforme* en agar PDA.

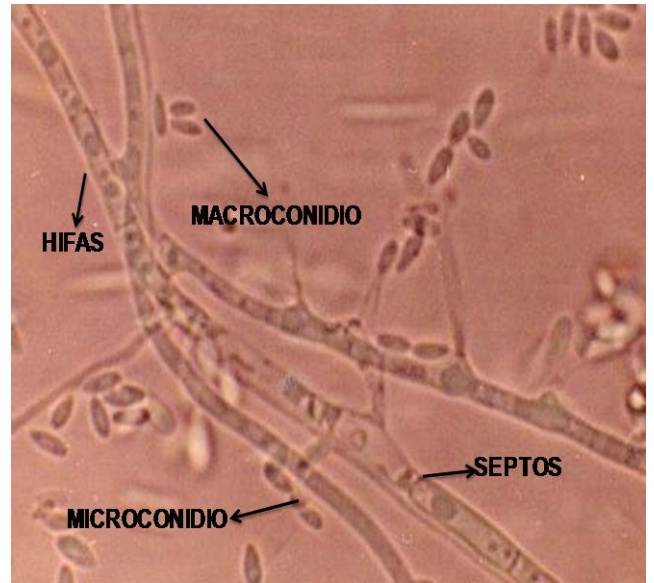


Figura 15. Microcultivo *Fusarium moniliforme* en agar maíz amarillo

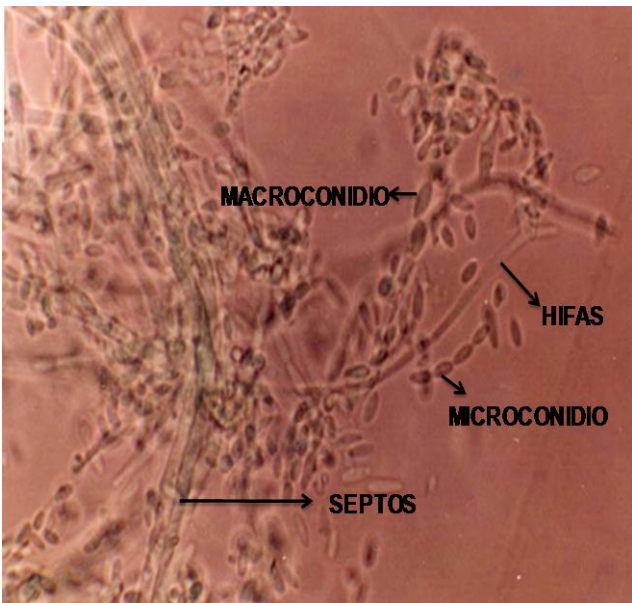


Figura 16. Microcultivo *Fusarium moniliforme* en agar maíz blanco

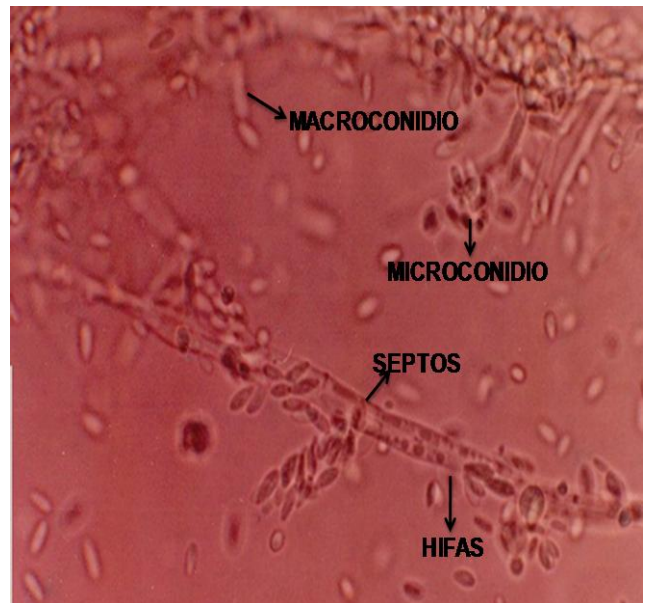


Figura 17. Microcultivo *Fusarium moniliforme* en agar maíz negro.

Comparando las estructuras principales del micelio como son los microconidios y macroconidios estos son óvalos delgados y lisos y se pueden observar en las figuras 14, 15,16 y 17; los que presentan las mismas características de acuerdo a la bibliografía de la figura 13.

De acuerdo a Carrillo, (2003), los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie como se observa en las figuras 14, 15,16 y 17. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios como también se observa en las figuras anteriores.

Se observan en las figuras 15, 16 y 17; el micelio, como un conjunto de filamentos y un trozo del mismo denominado hifa. Las hifas presentan septos y el micelio está tabicado. Se notan septos primarios son los formados cuando hay división nuclear y adventicios los otros como se ve en las figuras 13, 14, 15 y 16. Si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo se puede observar en la figura 17.

Comparando la bibliografía (figura 13) y el *Fusarium moniliforme* en medio de agar PDA (figura 14) se observa que contienen las mismas estructuras, por lo tanto en todos los casos se trata del mismo hongo.

Los microcultivos desarrollados en el agar de maíz (amarillo, blanco y negro); figura 15,16 y 17; manejan las mismas estructuras que la figura 13 y 14, por lo tanto no hay cambios en cuanto a los cultivos de los diferentes agares de maíz y el hongo que se trabajo en la experimentación corresponde a *Fusarium moniliforme*.

Actividad 3.1

Elaboración de la cinética de crecimiento del Hongo *Mucor rouxii* en medio líquido de PDA.

En la figura 18 se puede observar la gráfica de crecimiento del hongo *Mucor rouxii* en medio líquido PDA.

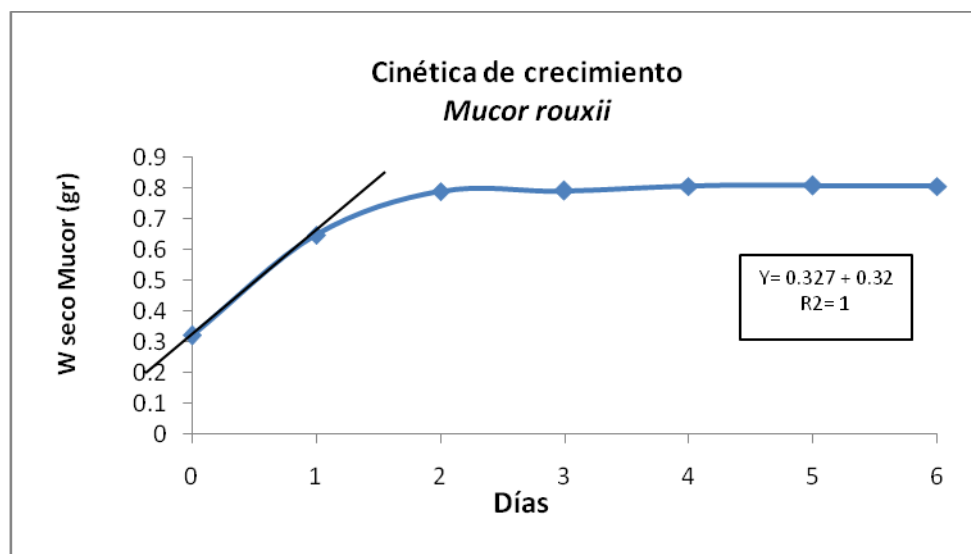


Figura 18. Cinética de crecimiento del hongo *M. rouxii*.

La gráfica fue realizada para determinar el crecimiento del hongo *Mucor rouxii* en medio PDA líquido. Como se puede observar, a partir de los 2 primeros días hay un crecimiento, el día 2 al 6 no hay un aumento considerable. La velocidad de crecimiento del *Fusarium moniliforme* es de 0.327 g/día.

Actividad 3.5

Evaluación de crecimiento radial del *Fusarium moniliforme* a las diferentes concentraciones de quitosán.

De acuerdo a la metodología, en la cuadro 11 se observan los resultados de medición radial del *Fusarium moniliforme* en medio de cultivo PDA con quitosán de camarón a las diferentes concentraciones (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1.0%) durante un período de 9 días.

Diámetro de crecimiento radial (mm)								
% Quitosán	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día	7 día	8 día	9 día
0.1	13	14	17	18	20	24	29	35
0.3	11	11	17	17	18	20	20	22
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	17	28	33	35	43	66	75	81

Cuadro 11. Diámetro de crecimiento radial del *F. moniliforme* en medio de cultivo quitosán camarón

En la figura 19 se puede observar el *Fusarium moniliforme* en medio de cultivo PDA con 0.3% quitosán de camarón durante 9 días.

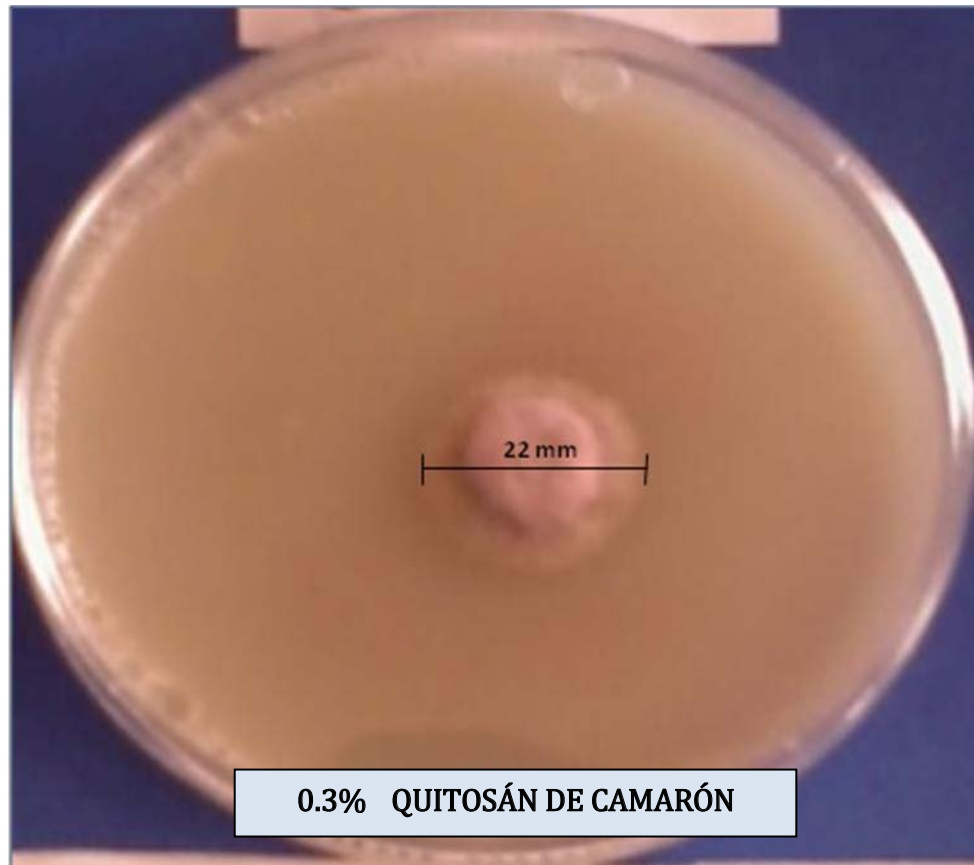


Figura 19. Crecimiento radial del *F. moniliforme* en un medio de cultivo quitosán de camarón.

La figura 19 muestra que el *Fusarium moniliforme* tuvo un crecimiento radial de 22 mm durante 9 días en un medio de PDA con 0.3% quitosán de camarón, lo que significa que hasta esta concentración de quitosán se desarrolló el hongo *F. moniliforme*; y en las siguientes concentraciones: 0.5, 0.7 y 1.0% no creció la cepa.

Como se observa en el cuadro 12 el hongo *F. moniliforme* tiene un crecimiento en las concentraciones 0.1 y 0.3%. En 0.5, 0.7, 1.0 no hay crecimiento. Además se tiene un control sin quitosán que permite observar que el *Fusarium moniliforme* se desarrolla rápidamente alcanzando un diámetro radial de 84 mm en el día 9.

Diámetro del crecimiento radial (mm)								
% Quitosán	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día	7 día	8 día	9 día
0.1	12	15	19	24	25	46	67	73
0.3	10	13	15	17	19	39	64	70
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	15	24	34	37	41	63	75	84

Cuadro 12. Diámetro de crecimiento radial del *F. moniliforme* en medio de cultivo con quitosán de hongo *Mucor rouxii*.

En la figura 20 se observa el *Fusarium moniliforme* en medio de cultivo PDA con 0.3% quitosán de hongo durante 9 días.

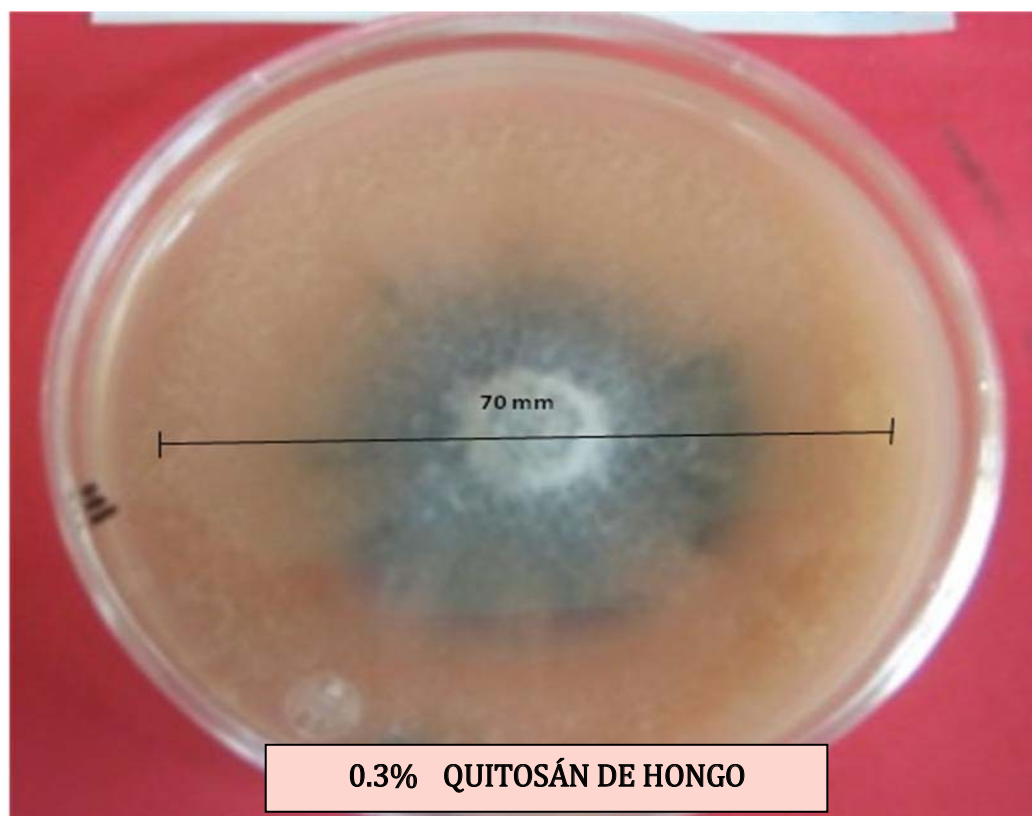


Figura 20. Crecimiento radial del *F. moniliforme* en un medio de cultivo quitosán de hongo.

En figura 20 se puede observar que en la concentración 0.3% de quitosán de *Mucor rouxii* hay un crecimiento considerable del diámetro radial de 70 mm del *F. moniliforme* en comparación con la figura 19 que es de 22 mm a la concentración de 0.3% de quitosán de camarón. En el cuadro 12 se observa que en las concentraciones de 0.5, 0.7, 1.0% no hay crecimiento del hongo. En el control se ve que la cepa se desarrolló muy rápido hasta alcanzar en el noveno día un diámetro de 84 mm.

3.2 DISCUSIÓN

El quitosán es un elemento importante para la mayoría de las industrias ya que es utilizado como antimicrobiano y como envoltura biodegradable. Se han realizado investigaciones en donde el quitosán se ha empleado como recubrimiento de jitomates, aguacates, mangos y cereales obteniéndose buenos resultados para la inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico (Miranda, 2007).

Hay diversas investigaciones en donde el tema principal de la discusión es la inhibición del hongo, en el cual se han elaborado productos químicos eficaces para el almacenamiento, sin embargo el problema existe desde el campo ya que el hongo está atacando directamente a la agricultura por eso se considera como una opción añadir y emplear el quitosán encargado de inhibir la producción de toxinas y el crecimiento microbiano, y alargar así la vida de almacenamiento de frutos, granos y semillas (Miranda, 2007).

Las enfermedades postcosecha se han controlado con el empleo de fungicidas químicos, sin embargo el estudio de alternativas naturales como el quitosán, es una opción importante. Existe la investigación de la actividad antifúngica del quitosán a diferentes concentraciones sobre el desarrollo de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor ssp* donde ambos presentaron inhibición de la germinación de sus esporas (Hernández y col., 2007), de esta manera se ha demostrado que el quitosán es una alternativa de protección durante el almacenamiento para frutos, verduras y cereales.

Para White y col., (1979) el procedimiento que utilizo para obtener quitosán del hongo *Mucor rouxii* fue más complicado y costoso en el equipo que se utilizó. En la investigación se obtuvo el quitosán del hongo con base en el procedimiento que se utilizo para obtener quitosán de camarón que fue más sencillo, la diferencia es que hay que realizar muchas siembras *del Mucor rouxii* para obtener la mayor cantidad de masa de hongo.

Se realizo esta investigación con la intención de determinar que el quitosán es el más eficiente como método de conservación y así poder alargar la vida de almacén, según estudios de Salvador y col., (1999)empleando en el recubrimiento de quitosán en el aguacate; también nos menciona que el quitosán de camarón sirve como inhibidor y otros estudios Miranda,(2007) sobre el quitosán como agente fungicida en *Aspergillus flavus* en el maíz; nos mencionan que el quitosán a concentraciones muy bajas actúa como antimicrobiano y efectivamente inhibe el crecimiento del microorganismo.

Se realizó una investigación *in vitro* del crecimiento del hongo *Fusarium moniliforme* con los dos tipos de quitosán a diferentes concentraciones, pero se deben seguir realizando más experimentos para determinar si el quitosán no causa ningún efecto en el maíz ya como producto terminado así como otro tipo de estudios para determinar la calidad del producto y que no se vea afectado por el quitosán.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la investigación que se realizó con en base en los objetivos planteados se concluye que:

El *Fusarium moniliforme* crece rápidamente en los diferentes tipos de maíz (amarillo, blanco y negro), sin alterar las características coloniales del hongo.

Las estructuras microscópicas del hongo *Fusarium moniliforme* no cambian si se desarrollan en diferentes tipos de maíz (amarillo, blanco y negro).

La actividad biológica *in vitro* de los dos quitosán de estudio (quitosán proveniente de camarón y quitosán proveniente de *Mucor rouxii*) se evaluó mediante el crecimiento radial cuantitativo observándose la inhibición del *Fusarium moniliforme* a la misma concentración de 0.5 %.

El *Fusarium moniliforme* tuvo un crecimiento radial hasta la concentración del 0.3% en los dos tipos de quitosán utilizados, sin embargo la cepa de este hongo creció más en el quitosán obtenido del hongo *Mucor rouxii*.

Se concluye que el quitosán proveniente del camarón es más eficiente que el quitosán proveniente del hongo, ya que inhibe más el crecimiento del *Fusarium moniliforme*.

Se sugiere realizar estudios para determinar la calidad del maíz con los dos tipos de quitosán y como producto terminado, para determinar que no presenten cambios.

REFERENCIAS

Adejumo T.O., Hettwer U., Karlovsky P. (2007). Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigeria maize. *Food microbiology*, (116). 350-357.

Baird P., Buchanan R.L. (2001). *Microorganismos de los alimentos*. ICMSF. Acribia. España. Pp.296-476.

Belitz H.D., Grosh W. (1997). *Cereales y derivados. Química de los alimentos*. Acribia. España.

Booth C. (1971). The Genus *Fusarium*. CMI. Kew. UK. pp 19-31.

Carrillo L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Tesis Doctorado. Universidad Nacional de Salta. Argentina.

Charley H. (1987). *Tecnología de los alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de los alimentos*. Limusa. España.

Dendy D.A.V. (2001). *Cereales y productos derivados. Química y tecnología* Segunda Edición, Acribia España

Duvick, J. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental health perspectives* 109(2):337-342.

Edwards G. (2004). Influence agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain *Trichothecene* Mycotoxins. *Toxicology Letters*. 29-35.

Edwards S.G. (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106. 1005-1025.

Faroni A.D. (1993). Los granos y su calidad. Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. FAO. Chile.

Giorda, L.; Peiretti, D., (2006). Respuesta de germoplasma de maíz a infecciones por *Fusarium verticillioides* y contaminación con fumonisinas. *In:* Rubinstein, H.R. ed. Micotoxinas: Impacto en la producción y salud humana y animal. Cap. 5. Universidad Nacional de Córdoba. 125-138.

González G.V., Salazar G. (2002). Estructura química y compatibilidad de poliamidas con quitina y quitosán. *Ciencia UANL*. (5), 39-47.

González N.N. (1978). La ciencia de los alimentos. Edutex, México.

Hernández A. N., Hernández M., Velázquez M.G., Guerra M.G., Melo G.E. (2007). Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor ssp*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(002) ,109-113.

Kent N. L. (1971). Tecnología de cereales. Acribia, España.

Lárez V.C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*, 1(2), 15-21.

Lemus J.F., Martínez A.L., Navarro M.A., Posadas A.A. (2007). Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueletos de camarón. Proyecto de Investigación. Universidad Rafael Landívar. Guatemala. pp 1-13.

Levin, L.; Ridaio, A.; Castaño, F. (2003). Fusariosis de la espiga en el maíz. INTA: 20ª Jornada de actualización profesional en cultivos de verano. Mar del Plata, 19 de setiembre de 2003. 165.

Mejía, A.; Márquez, F.; Carballo, A. (1983). Cobertura de la mazorca de maíz: Heredabilidad y correlación con otros caracteres. *Agrociencia* 54:111-123.

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

Miranda R.E. (2007). Evaluación del efecto de oligómeros de quitosán obtenidos por radiación gamma para determinar su acción fúngica y/o fungistática en *Aspergillus flavus*. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México.

Miranda C.S.P. (2009). La basura un producto con valor. Boletín informativo DED 2009-03 Divulgación de la ciencia a distancia. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Muzzarelli R. A. Chitin (1974). Pergamon Press. 52-60.

Plascencia J. M., Viniegra G., Castillo M., Sharai K. (2003). Efecto of chitosan and temperatura on espore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10). 582-586.

Ramírez G. M. (1982). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Continental, México.

Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*. 31 (7) pp 603-632.

Ruiz J. (2003). El asombroso reino de los hongos. *Avance y perspectiva*, (20), 212-215.

Salvador L., Miranda S.P., Aragón N., Lara V. (1999). Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Journal of the Mexican*, 18-23.

Shahidi F., Vidana A. J., Leon Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food Science Technology*, 10, 37-51.

Seifert K., (2000). FusKey. Agriculture and Agri-Food Canada. (<http://res.agr.ca/brd/fusarium/>).

Shephard GS. (2008). Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants*; 25 .146–151

Velluti A. (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and on *fuminisin* B1 and *Zearalenone* formation. *Food microbiology*, (59), 59-66.

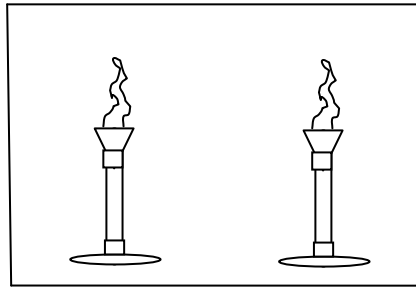
Yates, I. E.; Bacon, C. W.; Hinton, D. M. (1997). Effects of endophytic infection by *Fusarium verticillioides* on corn growth and cellular morphology. *Plant Disease* (81).723-728.

Yates, I., Jaworshi, A. J. (2000). Differential growth of *Fusarium verticillioides* relative to tissues from “Silver Queen”, a sweet maize. *Can. J. Bot.* 78(4):472-480.

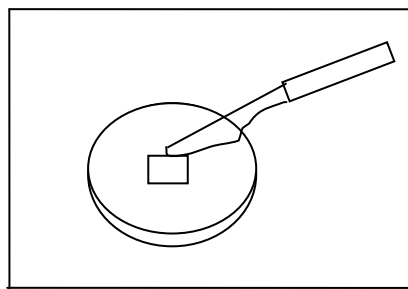
White S., Farina P. R., Fulton I. (1979). Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(2). pp.323-328.

ANEXO 1. TÉCNICA DE MICROCULTIVO

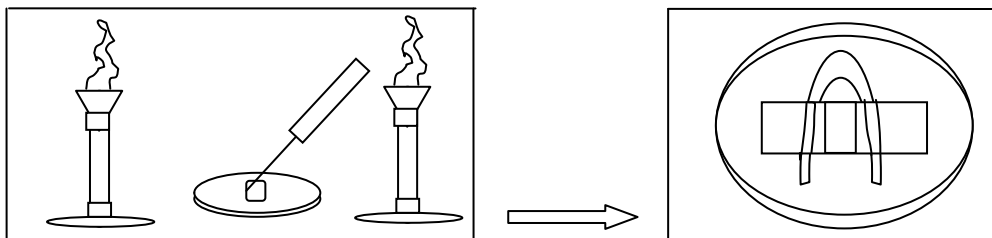
1.- Se esterilizó el lugar de trabajo y materiales a utilizar para el procedimiento.



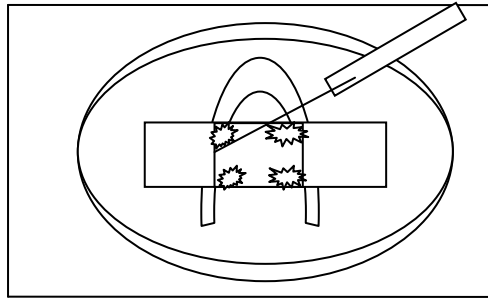
2.- Se cortó un cubo de Agar-Papa-Dextrosa y maíz blanco de 1 cm² con un bisturí estéril.



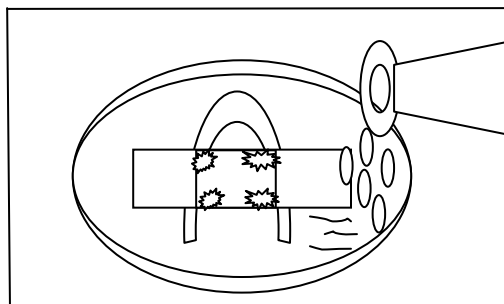
3.- Este cubo se colocó en la superficie de un porta objetos que a su vez se introdujo en una caja petri con un soporte de vidrio.



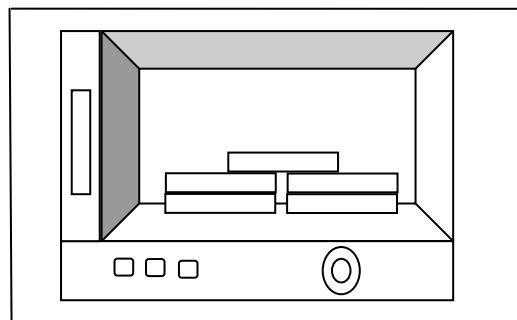
4.- En cada esquina del cubo se sembró una pequeña parte del hongo *Fusarium moniliforme* con la ayuda de un asa estéril; este procedimiento se realiza de manera muy cuidadosa.



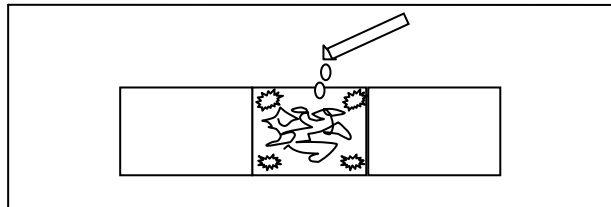
5.- Se le agregó 10 ml de agua destilada estéril a la caja petri procurando no tocar ni cubrir el porta objetos.



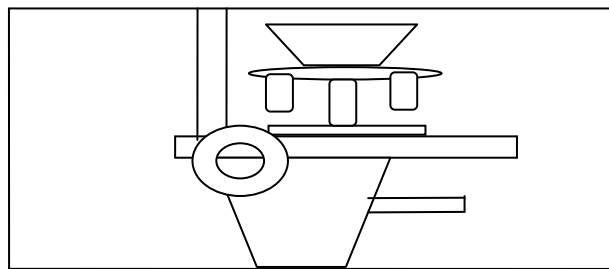
6.- Se tapó las cajas petri y se metió a la incubadora a una temperatura de 26°C durante 9 días para que se desarrollara el hongo.



7.- Se levantó el cubre objetos, en él se encuentra pegado el micelio del hongo y se le agregó de 1 a 2 gotas de colorante azul de algodón se le coloca un porta objetos.



8.- Se observó en el microscopio primero con un aumento (10X) y después con aumento de (100X).



9.- Se realizó el mismo procedimiento para el maíz negro y amarillo.