



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

Implementación de un nuevo
método que involucra el uso de
ondas de choque para la
extracción de quitina a partir
de micelio de *Aspergillus niger*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

PRESENTA
EDUARDO ORTIZ OLAN

DIRECTORA DE TESIS
DRA. BLANCA EDITH MILLÁN CHIU



C F A T A

Juriquilla, Querétaro

Septiembre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

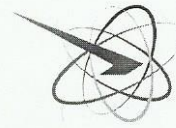
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.



**CENTRO DE FÍSICA
APLICADA
Y TECNOLOGÍA AVANZADA C F A T A
LICENCIATURA EN
TECNOLOGÍA**



Votos Aprobatorios

**COMITÉ ACADÉMICO DE LA
LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA
Presente.**

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis de título **“Implementación de un nuevo método que involucra el uso de ondas de choque para la extracción de quitina a partir de micelio de *Aspergillus niger*”** que realizó el pasante **Eduardo Ortiz Olan** con número de cuenta **417088141** bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

CARGO	NOMBRE	NOMBRAMIENTO	FECHA	FIRMA
Presidente	Dr. Josué David Mota Morales	Investigador Asociado C CFATA	22 Ago 22	
Vocal	Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza	Profesor Titular B de TC UMDI-Facultad de Ciencias	30 Ago - 22	
Secretario	Dr. Gonzalo Ramírez García	Investigador Asociado C CFATA	17 Ago 2022	
Suplente	Dra. Blanca Edith Millán Chiu	Catedrático CONACYT CFATA	22/ago/2022	
Suplente	M.C. Francisco Fernández Escobar	Técnico Académico Titular C CFATA	22/Ago/2022	

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

UNAM, Campus Juriquilla, Qro. a 30 de agosto de 2022 .



Dedicatoria

*La presente tesis está dedicada a mi padre Eduardo Ortiz Carrillo
quien no pudo verme titulado pero que siempre estuvo conmigo
apoyándome en todo a pesar de las dificultades, motivándome a ser
curioso, a hacerme preguntas y a hacer uso de mi razón.
Sin ti nada de esto hubiera sido posible. Esto es tuyo.*

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada y a mis profesores por la formación académica, profesional y personal durante mi etapa universitaria.

Un especial agradecimiento a mi tutora la Dra. Blanca Edith Millán Chiu, por creer en mí, guiándome en mis primeros pasos de mi vida académica. Gracias por la confianza, sabiduría y disciplina académica que me proporcionó.

Al Dr. Achim Max Loske Mehling por el apoyo y enseñanzas en mi trayectoria académica.

Al M. en C. Francisco Fernández Escobar por el apoyo técnico y conocimientos otorgados para la realización de este trabajo, incluyendo su revisión minuciosa a la redacción de esta tesis y sus sugerencias que la enriquecieron.

A la laboratorista Paula Bernardino Peláez por el apoyo técnico, así como al resto del equipo del laboratorio de ondas de choque.

Al Laboratorio de Ondas de Choque por todos los elementos requeridos que fueron suministrados para la realización de esta actividad científica.

Al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales, en especial al Laboratorio de Microscopía y a Manuel Aguilar Franco por su ayuda en la observación de las biopelículas generadas. Al igual que al Laboratorio de Espectroscopía Óptica por la medición de espectros IR usados en este estudio.

Al Sr. René Preza Cortés por su ayuda en la elaboración de utensilios empleados en esta investigación.

Al CONACYT por el apoyo en concepto de beca de licenciatura en el periodo septiembre 2021 a junio 2022 en el marco del proyecto A1-S-21130 de Ciencia Básica (2018-2019); así como por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto de tesis.

A mi hermana Melina y a mis amigos Chucho, Dani, Sebas Millán, Vane, Ale, Ana, Toño, Ariel, Sebas Michel por estar ahí para mí incondicionalmente con su apoyo, motivación y cariño.

INDICE

Resumen.....	1
I. Marco teórico.....	2
1.1 Quitina	2
1.2 Tipos de quitina.....	2
1.3 Fuentes de materia prima para la extracción de quitina.....	4
1.4 Quitina en hongos.....	4
1.5 Importancia biotecnológica de la quitina	5
1.6 Extracción de quitina.....	6
1.7 Quitina a partir de hongos o crustáceos: ventajas y desventajas	6
1.8. Extracción verde de productos naturales	7
1.9 Fenómenos ondulatorios.....	8
1.9.1 Ondas de choque	10
1.9.2 Ondas de choque en tándem	12
1.10 <i>Aspergillus niger</i>	13
1.11 Estructura celular fúngica.....	15
II. Antecedentes.....	17
III. Justificación.....	20
IV. Objetivo general	21
V. Objetivos particulares	21
VI. Materiales, métodos y desarrollo	22
6.1 Cultivo de <i>A. niger</i>	22
6.2 Procesamiento de la masa fúngica	22
6.3 Preparación de muestras para evaluación del disolvente	22
6.4 Incubación en NaOH.....	23
6.5 Aplicación de ondas de choque	24
6.6 Tratamiento con calor.....	24
6.7 Neutralización de especímenes.....	25
6.8 Obtención del producto final	25
6.9 Método colorimétrico con lugol para detección de quitosano.....	25
6.10 Evaluación de porcentajes de proteína en las extracciones	26
6.11 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	28

6.12 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	28
VII. Resultados y discusión	29
7.1 Selección del medio de cultivo	29
7.2 Parámetros de las ondas de choque	30
7.3 Selección de disolvente.....	31
7.4 Disparidad en los procedimientos de neutralización.....	33
7.5 Tiempo en el disolvente.....	34
7.6 Consecuencias de la aplicación de calor.....	37
7.7 Efecto de las ondas de choque y del NaOH 1M sobre el micelio fúngico	39
7.8 Evaluación de quitosano por método colorimétrico con lugol.....	40
7.9 Estimación de porcentajes de proteína residual.....	41
7.10 Tratamiento convencional de extracción de quitina	44
7.11 Caracterización por FT-IR.....	45
7.12 Visualización mediante SEM	47
VIII. Conclusiones	48
IX. Apéndice	50
X. Bibliografía.....	58

Resumen

Se investigó un proceso biotecnológico novedoso para la obtención de quitina a partir de micelio de *A. niger* mediante ondas de choque. Se evaluaron varias combinaciones de condiciones experimentales siguiendo criterios como la formación de una biopelícula como producto final, una cantidad baja de proteína residual determinada con ácido bicinconínico y ausencia de quitosano en el aislado cualificado por un método colorimétrico con lugol. Para la obtención del micelio se seleccionó medio de cultivo de dextrosa y papa, ya que éste mostró eficiencia en la metodología al no inducir pigmentación en el hongo. Para la desproteínización de la masa fúngica, se probó el hidróxido de sodio (NaOH) en varias molaridades como disolvente. El NaOH 1 M cumplió con los criterios establecidos además de representar un menor deterioro ambiental, que concentraciones de 2 M, 3 M, 4 M, 5 M y 6 M. La neutralización del disolvente resultó ventajosa a través de lavados con agua desionizada estéril garantizando la formación de la película. Los resultados muestran que un período de incubación en el disolvente de 1 hora antes y 24 horas después del tratamiento con ondas de choque, conjuntamente a un tratamiento con calor durante 3 horas a 65°C, tienen un impacto notable en la desnaturalización de proteínas en el micelio. El NaOH provoca desacetilación en la quitina originando quitosano. Para su detección, además del análisis con lugol, también se llevó a cabo una caracterización por FT-IR, en la que los datos obtenidos señalan la existencia de los picos característicos de quitina y no de quitosano. Con la visualización tanto por microscopía electrónica de barrido (SEM) como con microscopio óptico, se especula que las ondas de choque están disgregando el micelio suscitando el efecto desproteínizante del disolvente al ingresar abiertamente en las hifas. La formación de biopelículas fue inesperada al igual que las propiedades triboeléctricas presentes en ellas, abriendo paso a otras investigaciones y aplicaciones. Este trabajo demostró el potencial de las ondas de choque como uno de los métodos de extracción verde, los cuales están ganando cada vez más popularidad por su respeto al medio ambiente.

I. Marco teórico

1.1 Quitina

La palabra quitina, proviene del término griego $\chi\iota\tau\acute{o}\nu$ (chitón: túnica). Se descubrió en 1811 como una sustancia que se encuentra en los hongos, entre otros organismos.

Es un polímero de cadena lineal, compuesto por monómeros de N-acetilglucosamina (también llamada GlcNAc o NAG, ver Figura 1a) que se unen entre sí por enlaces 1,4- β -glucosídicos, según se muestra en la Figura 1b [Tsurkan *et al.*, 2021].

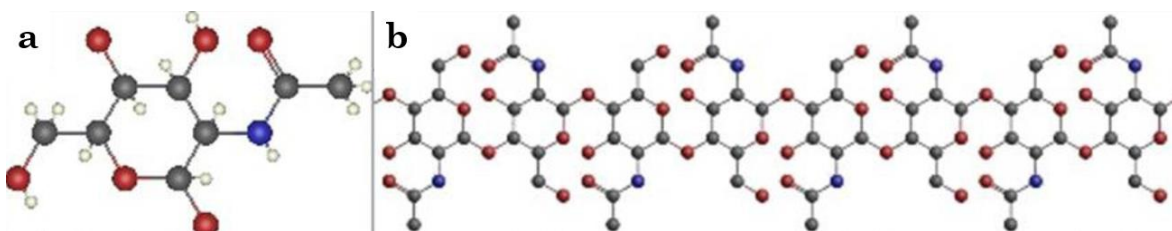


Figura 1. Estructura de la quitina. (a) Modelo de bola y palo del monómero GlcNAc donde el rojo es oxígeno, el azul nitrógeno y el gris carbono; (b) Modelo de bola y palo de la columna vertebral de quitina. [Modificado de Tsurkan *et al.*, 2021]

La quitina que se presenta en la naturaleza como macrofibrillas ordenadas tiene presencia en una gran cantidad de organismos. Se considera el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa. En animales, es el componente estructural de exoesqueletos de los crustáceos, cangrejos y camarones. En hongos se encuentra como componente principal en las paredes celulares [Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2016]. También puede producirse por algunas especies de protozoos [Tharanathan & Kittur, 2003].

1.2 Tipos de quitina

Fuentes diversas han descrito la existencia de dos o hasta tres alomorfos de quitina, las llamadas formas α , β y γ , las cuales difieren en la orientación de las microfibrillas y pueden ser distinguidas y caracterizadas por técnicas como espectroscopía de RMN de estado sólido y por espectroscopía infrarroja en conjunto con difracción de rayos X.

La biosíntesis de este polímero se lleva a cabo por la acción catalizadora de la enzima quitina sintetasa, presente en todos los organismos sintetizadores de quitina [Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2016]. La quitina sintetasa permanece unida a la cadena del polímero en crecimiento por polimerización secuencial de unidades individuales de GlcNAc, al extremo no reductor de la cadena que está siendo extendida. Durante el proceso, los polímeros lineales de quitina son los que se obtienen primero; posteriormente se ensamblan en microfibrillas de diámetro y longitud variables. Después de la síntesis del polímero, las fibrillas completas se transportan al espacio extracelular [Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2016].

Actualmente se sabe que los procesos de biosíntesis de quitina en hongos difieren considerablemente de los ocurridos en crustáceos. Sin embargo, tienen pasos biosintéticos similares, así como una regulación catalítica de la maquinaria enzimática parecida [Tharanathan & Kittur, 2003].

La forma α es la más común, su celda unitaria está compuesta por dos unidades de N,N'-diacetilquitobiosa que forman dos cadenas en disposición antiparalela. La forma β es menos frecuente, su celda unitaria es una unidad de N,N'-diacetilquitobiosa en disposición paralela, lo que da un polímero estabilizado permitiendo una mayor flexibilidad que la disposición antiparalela encontrada en la α -quitina. La γ -quitina posee cadenas con orientaciones paralelas y antiparalelas mixtas. Este alomorfo se ha reportado en hongos [Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2016]. Las variaciones polimórficas de la quitina se ilustran en la Figura 2.

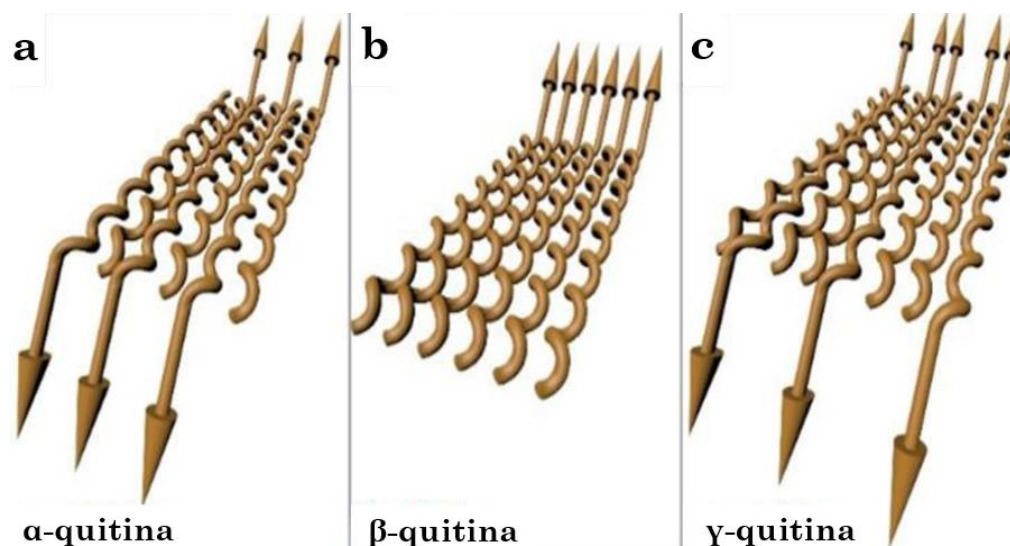


Figura 2. Formas polimórficas de la quitina. (a) Configuración polimórfica de la alfa-quitina. (b) Configuración polimórfica de la beta-quitina. (c) Configuración polimórfica de la gamma-quitina. [Modificado de Tsurkan *et al.*, 2021].

1.3 Fuentes de materia prima para la extracción de quitina

Entre las fuentes primordiales de quitina se encuentran las paredes celulares de hongos, las alas de insectos y el exoesqueleto (caparazón) de crustáceos. La simplicidad de encontrar la materia prima tiene un papel importante en la obtención de la quitina como bien de consumo. La producción industrial de este biomaterial prácticamente está basada en el tratamiento químico de los exoesqueletos de varios tipos de crustáceos como camarones, langostas, cangrejos y krill, que son desechos provenientes de plantas procesadoras de alimentos [Lárez V., 2006]. Dichos desechos de crustáceos, además de quitina, también incluyen proteínas, sales inorgánicas, pigmentos y lípidos entre los componentes estructurales principales. Por consiguiente, es más común el uso de la extracción química de quitina para aislar el producto puro [Abo-Elsoud & El-Kady, 2019].

Resulta interesante la diversidad de organismos tanto en el reino Animal como en el reino Fungi en los que la quitina tiene presencia. Cabe mencionar que el contenido de esta molécula no es una constante entre los organismos portadores, ya que puede variar según la especie y las condiciones ambientales. En crustáceos el contenido de quitina se encuentra entre el 14 y 75%, en insectos puede variar entre el 2 y 64%, en órganos de moluscos oscila entre el 6.1 y 41%; mientras que en el reino Fungi se halla en el rango de 2.9 en levaduras a 44.5% en hongos del género *Mucor* [Tharanathan & Kittur, 2003].

Las estructuras moleculares de la quitina procedente tanto de crustáceos como de hongos comparten similitud, además de que son químicamente parecidas a la celulosa, componente estructural de la pared celular primaria de las plantas verdes, oomicetos y algas. Su diferencia radica en la sustitución del grupo hidroxilo C2 de la celulosa por un grupo acetamida en la quitina, el cual tras desacetilarse se denomina quitosano [Jones *et al.*, 2020].

1.4 Quitina en hongos

La síntesis de quitina es una característica común que define a las especies incluidas en las tres clases taxonómicas de hongos: Ascomicetos, Basidiomicetos y Phycomicetos. Esta quitina fúngica es un elemento de las paredes celulares de hifas, micelio, conidios, esporas y tejidos en macromicetos. Las paredes de las células fúngicas comúnmente están constituidas por quitina, quitosano, polisacáridos neutros y glicoproteínas, además de cantidades menores de poliurónidos, polímeros de galactosamina, lípidos y melanina. La quitina se encuentra junto con moléculas de glucano formando microfibrillas en las esporas y las paredes celulares de las hifas.

Dichas microfibrillas están incrustadas en una matriz amorfa y proveen la estructura, morfología y rigidez de la pared celular, ayudando a mantener la fuerza e integridad de la estructura celular [Abo-Elsoud & El-Kady, 2019].

Por otro lado, el quitosano no se produce en fuentes animales; no obstante, se produce en especies de hongos de los géneros *Mucor*, *Absidia* y *Rhizopus* como uno de los componentes estructurales de su pared celular. Se especula que la quitina y el quitosano amplían la integridad y la fuerza de la pared celular y proveen protección contra agentes ambientales externos como inhibidores celulares y temperaturas mayores a las óptimas para el desarrollo de las células fúngicas [Abo-Elsoud & El-Kady, 2019].

1.5 Importancia biotecnológica de la quitina

La descripción de la quitina como un componente de paredes celulares fúngicas motivó el desarrollo de líneas de investigación para proponer aplicaciones biotecnológicas, debido a la ausencia de sustancias alergénicas y una menor producción de desechos [Abo-Elsoud & El-Kady, 2019].

Las aplicaciones de la quitina y el quitosano son variadas y tienen potencial en áreas como: agricultura, tratamiento de aguas, medicina, industria cosmética y biosensores, entre otras [Lárez V., 2006].

Actualmente se sabe que la quitina y el quitosano se emplean desde la antigüedad para acelerar la recuperación de heridas. Particularmente los coreanos hacían uso de la quitina para el tratamiento de abrasiones y era obtenida a partir de tejidos calcáreos de calamar. En el México prehispánico se tenía conocimiento en cuanto a la aceleración de la cicatrización de heridas usando quitosano, éste lo conseguían de las paredes celulares de algunos hongos [Lárez V., 2006].

En el área de tratamiento de aguas se buscan materiales que sean ambientalmente amigables e inofensivos para los seres humanos. Se sospecha que los derivados de aluminio empleados como agentes floculantes en el tratamiento de aguas para consumo humano, están relacionados con enfermedades como la de Alzheimer. El quitosano y la quitina han sido estudiados para estos fines, obteniendo resultados que se aplican hoy en día en algunos procesos de desmetalización, coagulación y floculación [Lárez V., 2006].

Los antimicrobianos naturales se han convertido en un tema de interés, a raíz de la búsqueda de alimentos sin conservadores químicos.

La quitina, el quitosano y sus derivados se han empleado contra grupos diferentes de microorganismos como bacterias, levaduras y otros hongos, ya que han demostrado tener actividad antimicrobiana [Tharanathan & Kittur, 2003].

La quitina y el quitosano poseen características como biocompatibilidad con células de mamífero, biodegradabilidad, alta absorción de humedad y no presentan toxicidad. También se han reportado otras propiedades biológicas como actividad antitumoral, analgésica, hemostática, hipocolesterolémica, antimicrobiana y antioxidante. Las propiedades biológicas antes señaladas de la quitina y el quitosano son consecuencia de sus características fisicoquímicas. Estas características comprenden el grado de desacetilación, la masa molecular y la cantidad de contenido de humedad [Abo-El-soud & El-Kady, 2019].

1.6 Extracción de quitina

Se han reportado varios métodos para extraer quitina de sus fuentes diversas, aunque el método más común es el químico. Éste se basa en la desmineralización ácida, principalmente de carbonato de calcio en exoesqueletos molidos de crustáceos, utilizando un medio ácido diluido (generalmente HCl) a temperatura ambiente; proceso que es seguido por la desproteínización del material residual mediante tratamiento con soluciones acuosas de NaOH 1 M o KOH a temperaturas de hasta 100°C.

Por la contaminación ambiental inherente al tratamiento químico, se han realizado trabajos enfocados a procesos más ecológicos, como la fermentación bacteriana o el tratamiento con enzimas proteolíticas, que se han aplicado para la desproteínización de los desechos de crustáceos [Hajji *et al.*, 2014].

1.7 Quitina a partir de hongos o crustáceos: ventajas y desventajas

Desde principios de siglo la producción industrial de quitina y quitosano empleando medios fúngicos ha sido tema de interés, debido a sus ventajas de extracción y purificación en comparación a los procesos clásicos empleados con fuentes animales. Desde el punto de vista comercial los métodos de extracción y purificación son de gran relevancia, ya que de acuerdo con su complejidad los costos pueden elevarse. La extracción de quitina a través de hongos o crustáceos traen consigo una serie de ventajas y desventajas, por ejemplo:

- 1) Disponibilidad de materia prima. Las fuentes fúngicas no tienen limitaciones estacionales o geográficas, mientras que las fuentes de crustáceos y otros animales están limitadas por los sitios de localización de la industria pesquera y las temporadas de consumo y veda.
- 2) Materiales inorgánicos presentes tras la extracción. Las fuentes fúngicas presentan niveles bajos, mientras que las fuentes de crustáceos contienen niveles elevados.
- 3) Inconvenientes asociados al proceso de extracción. Las fuentes fúngicas requieren de un procedimiento simple ya que no necesitan desmineralización. Por otro lado, las fuentes de crustáceos requieren HCl y NaOH para la eliminación de minerales y proteínas; haciéndolo un proceso más complejo, tardado, riesgoso para el personal involucrado, además de no ser ambientalmente amigable.
- 4) El costo en la gestión de los residuos generados durante la extracción. En las fuentes fúngicas es bajo, mientras que en las fuentes de crustáceos este costo es elevado.
- 5) Estabilidad en las propiedades fisicoquímicas. Estas son consistentes en fuentes fúngicas, en contraste con las fuentes de crustáceos donde las propiedades son variables debido a los factores ambientales [Abo-Elsoud & El-Kady, 2019] [Lárez V., 2006] [Teng *et al.*, 2001].

Indudablemente la quitina fúngica parece ser una alternativa sumamente atractiva, al no enfrentarse a las limitantes observadas en el proceso con crustáceos [Jones *et al.*, 2020].

1.8. Extracción verde de productos naturales

El diseño de métodos de extracción ecológicos y sostenibles a partir de productos naturales se ha convertido recientemente en un tema relevante de investigación, llamando la atención de académicos en áreas multidisciplinarias como la biología, la química, la física aplicada y la tecnología en general.

Una definición general de química verde es la invención, diseño y aplicación de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias agresivas para el medio ambiente.

En relación con la extracción verde de productos naturales, la definición anterior puede modificarse como: “La extracción verde se basa en la innovación y el diseño perfeccionable de procesos de extracción que reduzcan el consumo de energía, permitan el uso de solventes alternativos y productos naturales renovables; y que garanticen un extracto/producto seguro y de alta calidad”.

Los seis principios de una extracción verde son:

- 1) Innovación por selección de variedades y uso de recursos renovables.
- 2) Uso de disolventes alternativos, principalmente agua o agrodisolventes.
- 3) Reducir el consumo de energía, ya sea mediante su recuperación o el uso de tecnologías innovadoras.
- 4) Producción de coproductos en lugar de residuos, para incluir a la industria de biorrefinación y agrorrefinación.
- 5) Reducir las operaciones unitarias y favorecer procesos seguros y controlados.
- 6) Apuntar a un extracto no desnaturalizado y biodegradable sin contaminantes.

Estos principios han sido identificados y descritos no como reglas sino como ejemplos a seguir, ya que han sido desarrollados por científicos y aplicados con éxito por la industria [Chemat *et al.*, 2012].

1.9 Fenómenos ondulatorios

Existen dos clases principales de ondas, las mecánicas y las electromagnéticas. Su diferencia básica es que las primeras requieren de un medio material para propagarse, mientras que las ondas electromagnéticas pueden viajar aún en el vacío. En este trabajo solo se detallarán aspectos relevantes de las ondas mecánicas, sin abordar las ondas electromagnéticas.

Una fuente que produce una onda mecánica es la que ocasiona una perturbación en el estado termodinámico del medio de propagación (sólido, líquido o gaseoso). Esta perturbación que se desplaza por el medio es lo que se conoce como "onda" y se debe a las vibraciones de las moléculas presentes en éste, las cuales se propagan transfiriendo energía de una molécula a otra. Así las ondas mecánicas transportan energía, a distancias relativamente grandes, pero no hay transporte neto de materia. Localmente, las moléculas oscilan en torno a su posición de equilibrio, pero no viajan junto con la onda. Normalmente hay una pérdida de energía a causa de la fricción, conforme la onda avanza a través del medio. Ejemplos de ondas mecánicas son el sonido, las ondas sísmicas, las ondas superficiales en un estanque de agua cuando es perturbado por la caída de un objeto, etc.

En dicho último ejemplo, la formación de ondas se presenta como una serie de círculos concéntricos que se alejan del lugar de la perturbación como se puede ver en la Figura 3. En cada círculo, todos los puntos están en el mismo estado de movimiento y dan lugar a una superficie denominada "frente de onda". La dirección de propagación será perpendicular al frente de onda si la densidad del medio es uniforme. Se conoce como "rayo" a una línea perpendicular a los frentes de onda con la misma dirección del movimiento de las ondas.

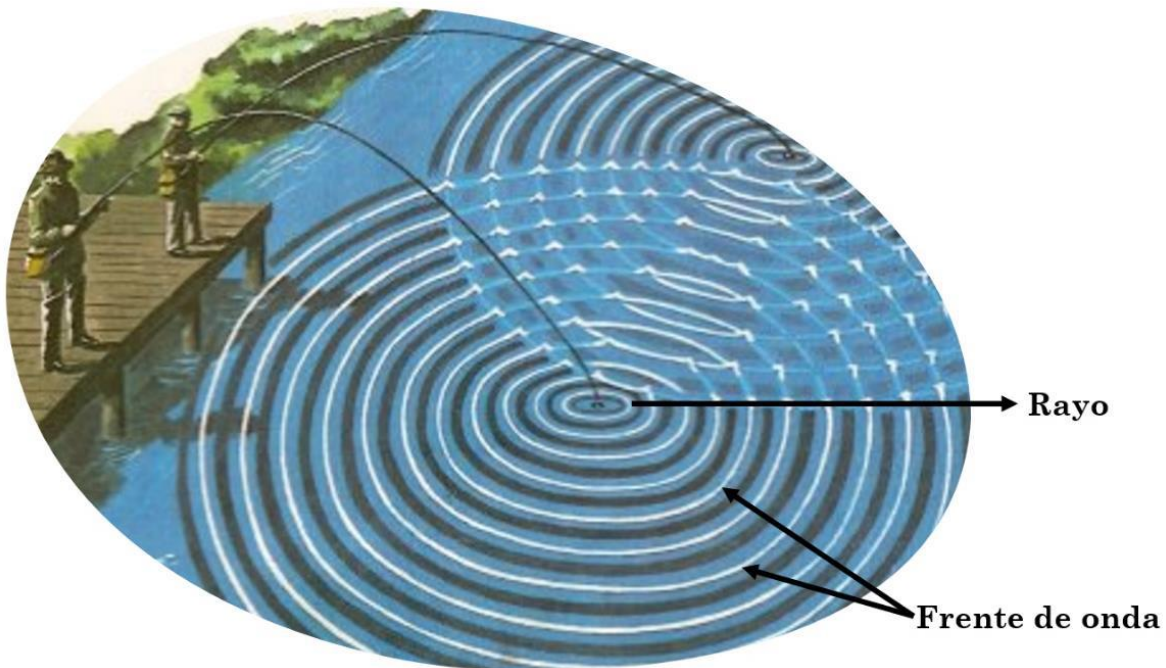


Figura 3. Ondas generadas en una superficie de agua después del lanzamiento de un objeto [Modificado de <https://wordpress.danieltubau.com/ondas-h4el-experimento-de-la-doble/>].

Cuando una perturbación en el medio se desplaza en una sola dirección, se trata entonces de una onda plana, cuya característica radica en que en un determinado instante las condiciones son iguales en todas las partes de cualquier plano perpendicular a la dirección de propagación. En la Figura 4a se muestra una onda plana y cada plano ilustra un frente de onda con una separación (equivalente a una longitud de onda) del siguiente plano o frente de onda. En la Figura 4 las flechas simbolizan los rayos. Por otra parte, las ondas esféricas son ocasionadas por una perturbación puntual tridimensional originada por un movimiento que se propaga en todas las direcciones; por consiguiente, los rayos se manifiestan de forma radial y perpendicular a superficies esféricas y de igual forma con una separación que se asocia con una longitud de onda como se muestra en la Figura 4b [García-Colín *et al.*, 2001].

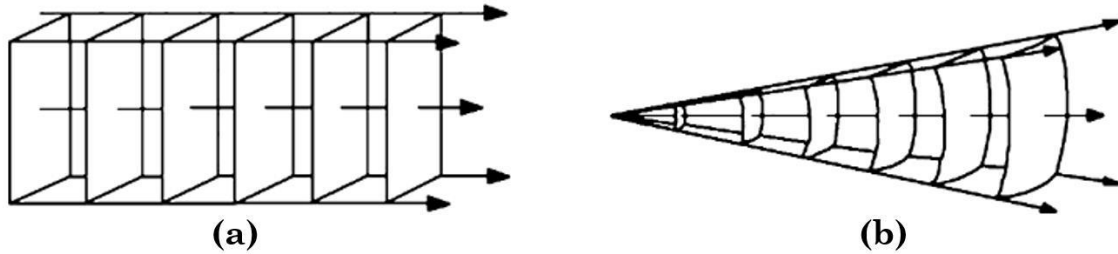


Figura 4. Dos tipos de frentes ondulatorios. (a) Onda plana. (b) Onda esférica [Modificado de García-Colín *et al.*, 2001].

De acuerdo con la dirección del movimiento de oscilación con respecto a la dirección de propagación de las ondas, las ondas mecánicas se catalogan en dos tipos según el tipo de movimiento que ejecutan las moléculas, estas son: ondas longitudinales y ondas transversales. Las ondas longitudinales se presentan cuando el movimiento de oscilación es paralelo a la dirección de propagación de la onda, como en el caso del sonido. En las ondas transversales, el movimiento de oscilación es perpendicular a la dirección de propagación de la onda, tal como se observa en el ejemplo de las ondas en la superficie del agua (Figura 3).

1.9.1 Ondas de choque

Dentro de la física y particularmente en la mecánica, la expresión “onda de choque”, lejos de aludir fenómenos ondulatorios continuos, realmente se utiliza para definir la propagación de un frente de choque en un medio material que puede ser sólido, líquido o gaseoso.

La generación de un frente de choque ocurre por un cambio súbito del estado termodinámico del medio; es decir, por variaciones abruptas de la presión, densidad y temperatura, causadas por una liberación repentina de energía en dicho medio. El ejemplo más común al respecto es una explosión. Este tipo de perturbaciones, aun cuando sus propiedades son diferentes a las de los fenómenos estrictamente ondulatorios (como el sonido antes mencionado), hasta cierto punto obedecen las mismas leyes de la acústica. Una onda de choque hace vibrar la materia y por ello transporta a través de la misma parte de la energía que la ocasionó. También se puede afirmar que una onda de choque está caracterizada por una discontinuidad de presión muy fuerte -a saber: una compresión seguida de una dilatación- que se propaga longitudinalmente en el medio, transportando energía. Así, al pasar la onda de choque por un sitio dado, la presión en este medio aumenta repentinamente y después disminuye a valores menores de su nivel inicial, para finalmente regresar al equilibrio [Fernández, 2008].

La Figura 5 ilustra la forma de una onda de choque típica y destaca los diversos parámetros físicos asociados con dicha presión.

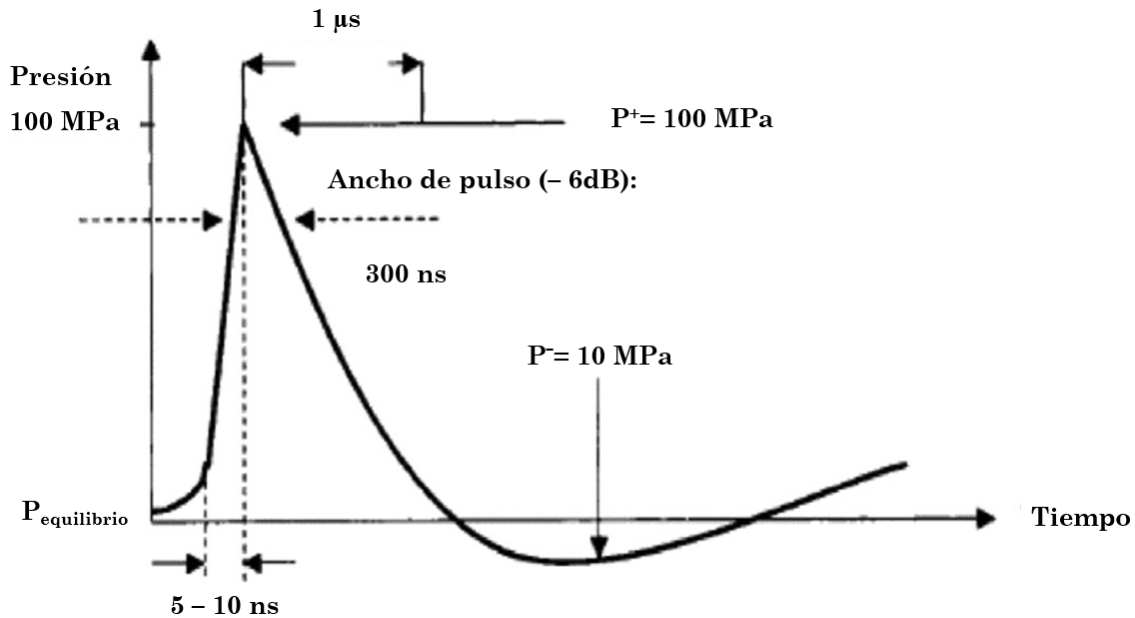


Figura 5. Perfil típico de las ondas de choque extracorpóreas terapéuticas [Modificado de d'Agostino *et al.*, 2015].

Todas las ondas de choque que se tratan en este trabajo son generadas y propagadas en agua, tanto por las aplicaciones con los organismos utilizados como sujetos biológicos (en los que tal medio es vital), como por los efectos adicionales que ocurren en medios acuosos; es decir, las ondas de choque en agua pueden provocar la expansión y el colapso violento de microburbujas presentes en el fluido. Este fenómeno es conocido como cavitación acústica, el cual genera ondas de choque secundarias y emite microjets de fluido a alta velocidad (ver Figura 6).

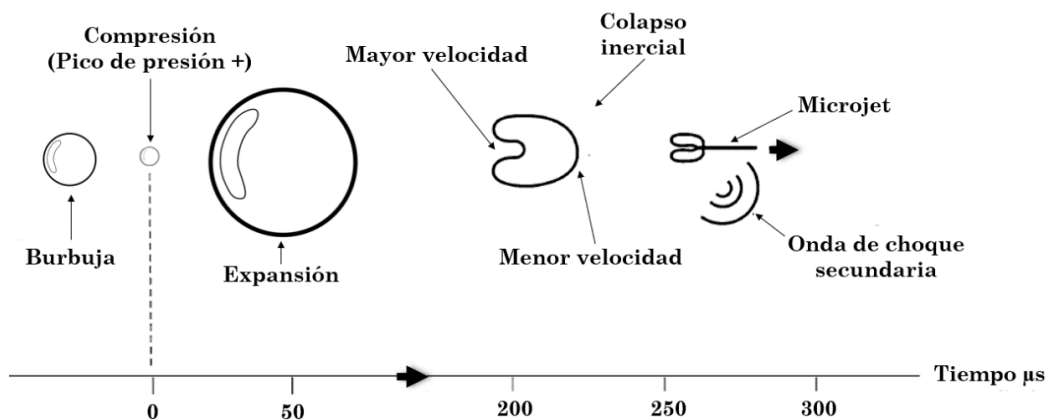


Figura 6. Fenómeno de cavitación acústica. Una burbuja en un medio acuoso se expande y colapsa violentamente tras el paso de una onda de choque [Modificado de López-Marín *et al.*, 2017].

En la figura anterior, se puede notar que el pulso de presión positiva de la onda de choque produce la compresión rápida de una microburbuja en el medio acuoso al tiempo $t=0$. Casi de inmediato, la presión así elevada dentro de la burbuja y la fase de dilatación de la onda de choque, provocan un crecimiento muy rápido de la burbuja y finalmente -después de cientos de microsegundos- ocurre su colapso violento por la presión hidrostática del agua en el contenedor de la misma. Debido a que la presión que actúa sobre la burbuja desde el exterior por lo regular no es homogénea, su colapso es de forma asimétrica. Esto también puede deberse al arrastre de flujo producido por un límite cercano a la burbuja. Una parte de la superficie de la burbuja acelera hacia adentro más rápidamente que el lado opuesto, lo que ocasiona un microjet del fluido con velocidad de hasta 700 m/s, como se muestra en la Figura 6.

También, la colisión entre ambas paredes de la burbuja y la generación del microjet promueven la formación de una onda de choque secundaria. Las burbujas tardan de 50 a 100 μs en expandirse tras el paso de la onda de choque, y colapsan luego de 200 a 500 μs . Los microjets generados por ondas de choque tiene la capacidad de inyectar una cantidad muy pequeña de una suspensión líquida en una célula; es decir, tanto las ondas de choque secundarias como los microjets inducidos pueden ocasionar una permeabilización transitoria en la membrana y pared celular [López-Marín *et al.*, 2017], por lo que también se ha afirmado que el crecimiento y colapso de microburbujas presentes en fluidos o tejidos constituye el principal fenómeno responsable de los efectos biológicos reportados [Peña *et al.*, 2020].

1.9.2 Ondas de choque en tándem

Una onda de choque tándem consiste en dos frentes de choque sucesivos que se generan con un retraso entre sí muy preciso ($\pm 2 \mu\text{s}$) y seleccionable en el intervalo de 10 a 900 μs . Varios estudios han demostrado que la cavitación puede controlarse emitiendo dos ondas de choque en el modo tándem [Lukes *et al.*, 2016].

La energía del colapso de una burbuja puede aumentar significativamente si llega una segunda onda de choque durante o poco antes de que las microburbujas, generadas por la onda de choque anterior, comiencen a colapsar. Así, al ajustar el retraso entre ambas ondas de choque, es posible mejorar la emisión de microjets y ondas de choque secundarias [Loske *et al.*, 2014].

Si el retraso es demasiado corto, la expansión de la burbuja se interrumpe, reduciendo la violencia del colapso de la burbuja [Lukes *et al.*, 2016].

1.10 *Aspergillus niger*

La mayoría de los hongos son microscópicos; en el caso de los multicelulares o filamentosos su unidad anatómica fundamental es la hifa, mientras que los hongos unicelulares o levaduras presentan una forma celular oval o redonda. [López *et al.*, 2012].

Aspergillus es un género taxonómico anamorfo, que tiene entre 260 y 837 especies, pertenece a la familia *Trichocomaceae*, orden *Eurotiales*, *phylum Ascomycota* y reino Fungi. Son hongos filamentosos mitospóricos caracterizados por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos. Estas se encargan de la producción de células conidiógenas que originarán los propágulos asexuales o “conidios”. El conidióforo propio de las especies de *Aspergillus*, a pesar de ser una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula, estípite y célula pie. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que únicamente presentan fiálides se designan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, se denominan biseriadas (ver Figura 7) [Abarca, 2000].

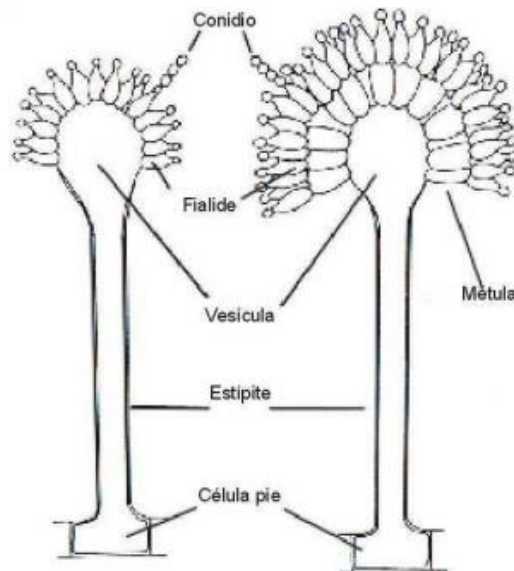


Figura 7. Estructuras morfológicas características del género *Aspergillus* [Modificado de Abarca, 2000].

La clasificación de este género en subgéneros y secciones está basada fundamentalmente en la presencia de teleomorfo, presencia o ausencia de métulas; disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula y coloración de las colonias [Abarca, 2000].

Las especies de *Aspergillus* se encuentran entre los hongos más abundantes en todo el mundo. Se consideran poco selectivos en sus condiciones de crecimiento abiótico, pueden crecer en un amplio rango de temperatura (6–55 °C) y con humedad relativamente baja; se alimentan de una gran variedad de sustratos que incluyen desde heces de animales hasta tejido humano. No obstante, se encuentran predominantemente colonizando polímeros vegetales complejos y se consideran hongos comunes que deterioran los alimentos.

La popularidad de algunas especies de este género también se debe a su dispersión eficaz. Sus conidios se encuentran entre las estructuras fúngicas más dominantes en el aire, dispersándose a distancias cortas y largas [Krijgheld *et al.*, 2013].

A. niger es uno de los organismos más importantes desde un punto de vista biotecnológico a nivel mundial. Esta revolución biotecnológica inició en la década de 1920, cuando Pfizer desarrolló la fermentación de ácido cítrico a partir de azúcares simples empleando *A. niger*. 20 años más tarde, la producción de ácido glucónico mediante *A. niger* tuvo éxito industrial. La fermentación de ácido orgánico a partir de *A. niger* continúa creciendo anualmente. La producción de otros ácidos orgánicos utilizando *A. niger* se ha desarrollado continuamente, como la producción de ácido málico y ácido itacónico, que son requeridos en áreas a nivel industrial. Otra aplicación destacable de *A. niger* es la producción de enzimas que comenzó a fines de la década de 1950. La aplicación más exitosa de estas enzimas es quizá la sacarificación de almidón a glucosa utilizando glucoamilasa; esta tecnología es empleada por diversas compañías biotecnológicas multinacionales. En las últimas décadas, *A. niger* también ha sido utilizado como productor de metabolitos secundarios [Cairns *et al.*, 2021].

Debido a las aplicaciones de este hongo en condiciones del espacio exterior, ha surgido recientemente una nueva frontera en la biotecnología de *A. niger*. Es uno de los pocos hongos que se sabe que crece con fuerza dentro de la estación espacial internacional, y el perfil de metabolitos sugiere que el aislamiento en entornos espaciales genera niveles elevados del antioxidante piranonigrina A, una molécula que puede mejorar la protección contra la radiación. Ya que los hongos producen metabolitos secundarios en respuesta al estrés ambiental, las investigaciones sobre la producción de éstos a partir de cepas de *A. niger* aisladas de entornos espaciales pueden revelar niveles de producción mejorados de moléculas bioactivas y proporcionar información sobre los mecanismos subyacentes a tales adaptaciones [Romsdahl *et al.*, 2020].

Por lo anterior, se ha planteado la hipótesis de que *A. niger* es un excelente candidato para su uso en una variedad de aplicaciones biotecnológicas espaciales, desde la generación de productos útiles durante vuelos espaciales prolongados hasta esfuerzos de terraformación.

1.11 Estructura celular fúngica

Los hongos anteriormente eran considerados como un tipo de plantas, debido a que comparten características morfológicas y de hábitat con los vegetales. Una vez que los estudios en la composición molecular avanzaron, con el análisis filogenético se comprobó que los hongos son diferentes a las plantas.

Entre los componentes estructurales de la célula fúngica se encuentran:

La membrana citoplasmática que está constituida por una doble capa lipídica ubicada bajo la pared celular, salvo en algunas regiones en las que se desarrolla una bolsa o pliegue que contiene material vesicular. Estas regiones biológicamente descritas como invaginaciones reciben el nombre de lomasomas y se suelen describir como un organelo típico de los hongos. Entre los componentes característicos de la membrana fúngica están los ergosteroles, los cuales afectan la membrana celular en términos de fluidez y estabilidad. El citoplasma es el fluido acuoso que forma la mayor parte del volumen celular, este se encuentra confinado dentro de la membrana citoplasmática. El citoplasma no tiene color y en él se encuentran suspendidas inclusiones citoplasmáticas (estructuras inertes que pueden ser vitales o no para la función celular) y el resto de los organelos celulares (núcleos, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias, ribosomas y vacuolas; ver Figura 8) [Curiosoando.com, 2018].

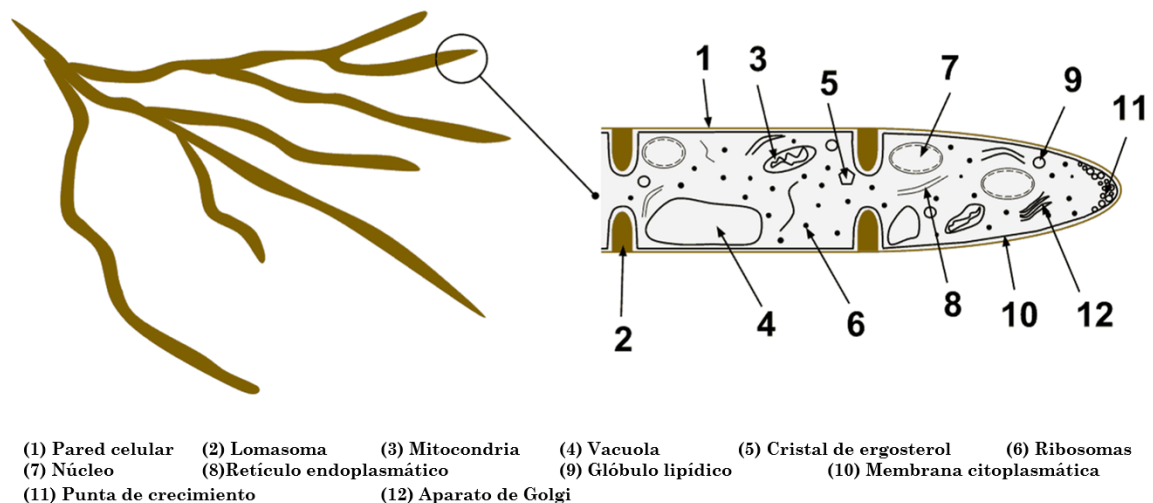


Figura 8. Composición de la estructura celular fúngica [Modificado de López B. 2019].

La pared celular, está compuesta por una combinación de glucanos y quitina que varía entre los grupos del reino Fungi (ver Figura 9). El tipo de quitina que se produce en los hongos es diferente de la presente en el exoesqueleto de insectos. La fórmula de la quitina de hongos más común es $(C_{22} H_{54} N_{21})_n$. Esta toma el aspecto de microfibrillas alargadas que se entrelazan y se disponen en capas paralelas a la membrana citoplasmática. El interior de la pared celular se denomina protoplasto que abarca la membrana citoplasmática, el citoplasma y los diferentes organelos celulares.

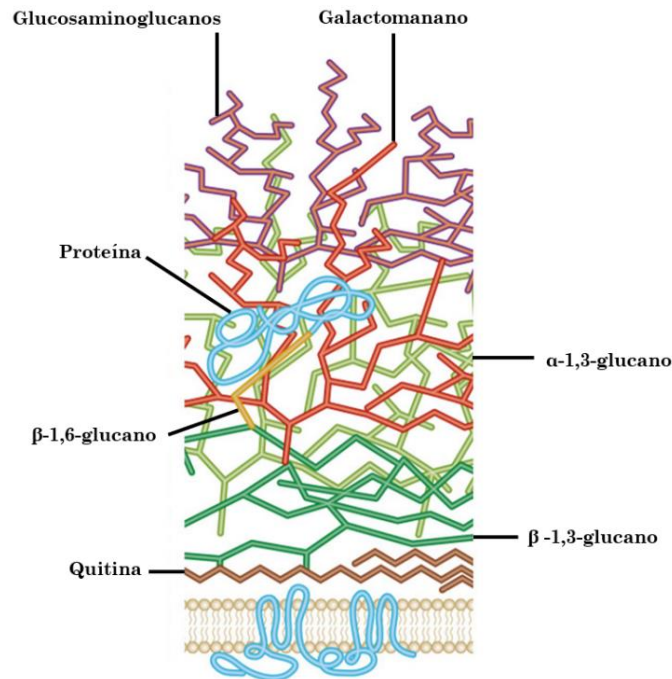


Figura 9. Organización estructural de la pared celular fúngica [Modificado de Gow *et al.*, 2017].

II. Antecedentes

La primera mención de la quitina calcificada en invertebrados fue realizada por Charles Hatchett, quien descalcificó caparazones de cangrejos, langostas, gambas y cangrejos de río con ácidos minerales. El 13 de junio de 1799 escribió: “parece que la inmersión del caparazón en ácido cítrico o en ácido nítrico diluido, proporcionó carbonato y fosfato de cal, el primero, sin embargo, en mayor cantidad”; pero, Hatchett no impulsó más allá sus investigaciones científicas [Crini, 2019].

A pesar del estudio de Hatchett, el descubrimiento de la quitina se atribuye oficialmente a Henri Braconnot. En 1811 él describió una fracción insoluble de hongos como *Agaricus volvaceus*, que obtuvo mediante tratamiento con álcali caliente diluido. Le dio el nombre de fungina, una sustancia “de naturaleza particular”. Braconnot analizó el contenido de nitrógeno en el líquido obtenido por destilación de esta fracción y encontró que el líquido contenía acetato de amonio contaminado con aceite. Esta fracción también produjo ácido acético por degradación con ácido sulfúrico concentrado [Crini, 2019].

Aseguró que "la fungina parece contener más nitrógeno que la madera" y concluyó que es "una sustancia muy distinta entre las identificadas en las plantas". “*Daré a conocer la naturaleza de la sustancia que forma el cuerpo o la base carnosa insoluble del hongo, y que designaré con el nombre de fungina*”. (Henri Braconnot, 1811) [Muzzarelli, 1977].

En 1823, Odier aisló un residuo insoluble al que nombró quitina, a partir del élitro del escarabajo abejorro, o chinche de mayo, a través de tratamientos repetidos con soluciones calientes de KOH. No halló nitrógeno en los élitros y concluyó que la quitina está relacionada con sustancias vegetales más que animales, comentando que es muy notable que la misma sustancia se encuentre tanto en los insectos como en los vegetales [Roberts G. 1992].

Aunque hace más de dos siglos se realizaron los primeros intentos de aislamiento y purificación de este biopolímero a partir de hongos, actualmente el material principal para su obtención son los exoesqueletos de crustáceos, cuyo contenido de quitina está entre el 14 y 75%. En los insectos puede variar entre el 2 y 64%, en órganos de moluscos entre el 6.1 y 41% y en hongos se halla desde 2.9 % en levaduras hasta 44.5% en especies del género *Mucor* [Tharanathan & Kittur, 2003].

En 1997, Synowiecki *et al.* analizaron el contenido de quitosano, cantidad de agua, proteína cruda y D-glucosamina en muestras tomadas a tiempos diferentes de crecimiento de *M. rouxii*. Cuantificaron el rendimiento de los procesos de extracción de quitina y quitosano. Encontraron que la biomasa incrementó rápidamente en las primeras 48 horas de cultivo, similar a lo previamente reportado. Durante un periodo de 12 a 96 horas disminuyó el contenido de proteína; sin embargo, la cantidad de quitosano tuvo un incremento desde 4.4 hasta 7% en el peso seco de micelio. Los autores concluyeron que los cultivos de 48 horas podrían ser útiles como fuente de quitina y quitosano. También mencionaron que el crecimiento prolongado no influyó significativamente en las cantidades de los polímeros estudiados.

Teng *et al.* documentaron en 2001 la producción de quitina a partir de exoesqueletos de camarón y 34 cepas fúngicas (deuteromicetos y zigomicetos), utilizando enzimas proteolíticas de hongos. Encontraron que las cepas de *A. niger* 0576, 0307 y 0474 presentaron mayor actividad de proteasa sobre las proteínas y minerales en complejos con la quitina en exoesqueletos de camarón lavados. Reportaron rendimientos desde 26 hasta aproximadamente el 50 %. Todos los aislados de quitina de exoesqueletos lavados y fermentados; así como de micelio mostraron espectros de FT-IR similares a los de la quitina comercial. Los autores concluyeron que la fermentación fúngica es un método rentable en comparación con las enzimas proteasas comerciales, las cuales solo desproteinizan pero no desmineralizan los exoesqueletos de los camarones.

Nitschke *et al.* reportaron en 2011 un método novedoso de cuantificación basado en la formación de un complejo coloreado de quitosano con lugol al 1%, con el cual obtuvieron valores de quitina desacetilada de manera indirecta por medición de quitosano, obtenido a partir de masa seca de micelio y cuerpos fructíferos de varias especies de hongos basidiomicetos. Utilizando un estándar de quitosano para establecer una curva de calibración, los autores reportaron contenidos de quitina en micelio en el rango de 0.8 - 9.6 g/100g de masa seca; mientras que en los cuerpos fructíferos obtuvieron 0.4 - 9.8 g/100g de masa seca. Su método resultó confiable ya que no causaron reacción cruzada con otros polímeros como el almidón.

En el 2014, Ospina *et al.* realizaron un estudio donde emplearon cinco protocolos para el aislamiento de quitina a partir del hongo *Ganoderma lucidum*, crecido bajo condiciones de cultivo sumergido optimizado para la producción de biomasa. Tres de estos protocolos se hicieron mediante extracción química utilizando ácidos y álcalis en distintas molaridades. En uno se utilizó agua caliente previo al proceso de desproteinización. En el último protocolo se realizó un proceso de sonicación y lavado con etanol. La quitina obtenida fue analizada utilizando difracción de rayos X y FT-IR. Los autores reportaron que el pico máximo de producción de biomasa fue a los 8 días y encontraron entre 78 y 413 mg de quitina por gramo de biomasa. También reportaron que dos de los métodos químicos y el de sonicación fueron los que permitieron una mayor extracción de quitina.

En busca de alternativas para la extracción de quitosano a partir de quitina, Ngo *et al.* reportaron en 2017 que el ultrasonido mejoró la velocidad de desacetilación de la quitina, reduciendo así el tiempo de reacción y el consumo de productos químicos durante el proceso de extracción. Se basaron en la propiedad del ultrasonido que permite mejorar las condiciones de reacción (temperatura, tiempo, productos químicos) en términos de reducción de la concentración de NaOH. Sus análisis estadísticos indicaron que no solo la concentración de NaOH sino también la sonicación contribuyó significativamente tanto al grado de desacetilación como a la solubilidad del quitosano.

III. Justificación

Para la extracción de quitina a partir de hongos no es necesario un tratamiento de desmineralización, dado que el micelio es considerablemente consistente en términos de su composición y no está asociado con materiales inorgánicos [Teng *et al.*, 2001].

La producción industrial de quitina y quitosano a partir de fuentes fúngicas ha sido tema de interés reciente para investigadores en diversos países, debido a sus ventajas de menor cantidad de pasos de procesamiento, en comparación con los métodos que se usan actualmente [Abo-El-soud & El-Kady, 2019].

La extracción de quitina procedente de crustáceos tiene limitantes importantes tales como la dependencia por la variación estacional y regional. Adicionalmente requiere del tratamiento agresivo con ácido, para la purificación y desmineralización. Indudablemente la quitina fúngica parece ser una alternativa atractiva, por no tener las limitantes presentes en los crustáceos [Jones *et al.*, 2020].

Por otro lado, se ha descrito que las ondas de choque pueden ocasionar daños celulares o muerte, debido a los fenómenos asociados a éstas; entre ellos la cavitación acústica, ocasionada por diferencias rápidas de presión en el medio en el que se propagan [Loske, 2007]. Dados los efectos celulares observados, se considera que las ondas de choque pueden ser una alternativa viable y novedosa que funcione como adyuvante para la extracción de quitina.

IV. Objetivo general

Caracterizar quitina/quitosano obtenidos de micelio del hongo *A. niger*, utilizando un nuevo método de extracción implementado en el laboratorio, en el que se involucra la aplicación ondas de choque.

V. Objetivos particulares

Establecer el tipo de cultivo líquido o sólido para el crecimiento y obtención de la mayor cantidad de micelio (masa fúngica).

Determinar las especificaciones de aplicación de las ondas de choque: número de ondas; tipo (monopulso o tándem), voltaje de generación, etc.

Evaluar el disolvente durante la aplicación de ondas de choque (agua, hidróxido de sodio 1 M o 2 M)

Determinar los porcentajes resultantes de quitina/quitosano y proteína para cada variante del método de extracción.

Caracterizar por FT-IR.

VI. Materiales, métodos y desarrollo

6.1 Cultivo de *A. niger*

El hongo se inoculó previamente en agar medio mínimo para promover la conidiación. Se creció durante 5 días a 30°C en una incubadora marca Benchmark modelo H2200-HC. A partir de este cultivo fresco se obtuvo un fragmento de la colonia por matraz y se ocuparon 4 matraces con 250 ml de los medios: caldo dextrosa de Sabouraud (Sigma-Aldrich) y caldo papa dextrosa (Sigma-Aldrich), los cuales se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm y 33°C durante 6 días, en una incubadora marca Benchmark modelo Incu-Shaker. Se eliminó el medio de cultivo por filtración y se reemplazó con agua desionizada estéril. Posteriormente se realizó la inactivación durante 1 hora en autoclave, para la remoción de carbohidratos y proteínas no ancladas a la pared celular.

6.2 Procesamiento de la masa fúngica

La masa fúngica obtenida fue separada del sobrenadante; después se realizó un lavado con 250 ml de agua desionizada estéril y ésta se filtró utilizando dos capas de papel filtro de poro medio, con dimensiones de 15 x 15 cm y constituidos por derivados de celulosa.

Una vez separada la masa fúngica se procedió a su secado en horno durante 3 horas a 90°C; después fue molida mediante un mortero y pistilo hasta que el tamaño de grano alcanzó la apariencia de polvo y finalmente se pesó y almacenó a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

6.3 Preparación de muestras para evaluación del disolvente

Se utilizaron dos disolventes: H₂O grado MQ y NaOH (1, 2, 3, 4, 5 y 6 M). En tubos de 50 ml con fondo cónico (Corning Falcon REF 352098), se agregaron 25 mg/ml y se prepararon 3 ml para cada muestra (75 mg de masa fúngica en 3 ml del disolvente). A continuación, las muestras fueron homogenizadas empleando un vórtex marca Benchmark modelo BV1000.

Debido a que en la literatura se hace poca referencia a la proteína presente en la quitina que se extrae con el método químico convencional (independientemente de la fuente de materia prima), en este trabajo se determinó la cantidad de proteína al disolver dichos 25 mg de masa fúngica seca en 1ml de NaOH con molaridades de 6 M, 5 M, 4 M, 3 M y 2 M en los tubos mencionados.

Adicionalmente, las muestras con molaridades distintas se colocaron en baño maría (My Bath, Benchmark Scientific) a 65°C durante 3 horas, a fin de someterlas a procesos análogos al convencional. Una vez finalizado el tratamiento de calor, las muestras fueron neutralizadas con agua desionizada estéril hasta un pH cercano a 7. A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas con ácido bicinónico, mediante un espectrofotómetro de placa marca Thermo Fisher Scientific, modelo Varioskan Flash, en el que las absorbancias fueron medidas a 562 nm. Se obtuvo la curva estándar y su regresión lineal para determinar los porcentajes de proteína en estas muestras.

6.4 Incubación en NaOH

Las muestras fueron sometidas a combinaciones diferentes de tiempos de incubación, antes y después de aplicar las ondas de choque, como se muestra a continuación:

Tabla 1. Tiempos de incubación en NaOH 1 M utilizados antes y después de la aplicación de las ondas de choque (NA: No aplica).

Tiempo previo al tratamiento con ondas de choque	Tiempo posterior al tratamiento con ondas de choque
NA	NA
1 hora	NA
24 horas	24 horas
1 hora	24 horas
24 horas	NA

Para los disolventes NaOH 2 M y H₂O estéril no se evaluaron períodos de incubación antes ni después de las ondas de choque.

6.5 Aplicación de ondas de choque

Se utilizó el generador de ondas de choque denominado "Multifuncional", cuyo transductor de emisión es tipo Piezolith 2501 de la marca Richard Wolf GmbH (Knittlingen, Alemania). Las muestras de masa fúngica resuspendida se colocaron en pipetas de transferencia estériles de 4 ml (marca Samco Sedi-Pet, también conocidas como "viales") y se sellaron, para ser tratadas con 2000 eventos de choque en modo tándem y los parámetros de operación siguientes.

En todos los eventos, ambas unidades de excitación del transductor se cargaron al voltaje de 6 kV, para tener una densidad de flujo de energía de 0.895 mJ/mm^2 en cada frente de choque. Se usaron tres valores del tiempo de retraso a lo largo de cada tratamiento, a fin de aplicar gradualmente microjets de mayor a menor intensidad y alcance, conforme a pruebas sobre cavitación realizadas y documentadas con anterioridad en el Laboratorio de Ondas de Choque. Así, en los primeros 200 eventos tándem se usó un retraso de $216 \mu\text{s}$, luego este fue de $166 \mu\text{s}$ para los siguientes 700 eventos y finalmente se usaron $116 \mu\text{s}$ para los 1100 eventos restantes.

Al finalizar la aplicación de ondas de choque, los viales fueron abiertos y las muestras se recuperaron en los tubos de fondo cónico de 50 ml antes mencionados (Corning Falcon REF 352098).

6.6 Tratamiento con calor

Posteriormente a la aplicación de ondas de choque, las muestras seleccionadas fueron sometidas al tratamiento de calor mencionado en la sección 6.3 (a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ en baño maría durante 3 horas). Para este paso las muestras se conservaron en las pipetas de transferencia donde recibieron las ondas de choque.

Se evaluó este tratamiento de calor sin períodos de incubación en NaOH 1 M y en conjunto a períodos de incubación en el disolvente de 1 y 24 horas antes del tratamiento con ondas de choque y calor.

6.7 Neutralización de especímenes

Para bajar el pH básico de las muestras hasta un pH cercano al neutro, se realizaron dos procesos. El primero consistió en agregar HCl 1 N, haciendo mediciones con un pHmetro (Hanna Instruments, modelo HI 2210).

El segundo método consistió en hacer lavados con 20 ml de agua desionizada estéril, hasta alcanzar un pH cercano a 7. Las muestras fueron homogenizadas en vórtex en cada ocasión; la masa restante se recuperó por centrifugación (Heraeus Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) durante 5 minutos a 10,000 *xg* y el sobrenadante fue desechado cuidadosamente. El procedimiento se repitió 4 o 5 veces. Se empleó el pHmetro para vigilar el pH después de cada lavado. Finalmente, el producto se mantuvo en 10 ml de suspensión final.

6.8 Obtención del producto final

Para conocer la cantidad del producto final obtenida por el proceso, una vez concluida la neutralización 3 ml de suspensión final de cada muestra se colocaron en un molde de teflón. Después, los moldes fueron colocados en un horno a 50°C durante 3 horas y finalmente el producto fue recuperado en forma de película la cual fue separada del molde, pesada y almacenada.

6.9 Método colorimétrico con lugol para detección de quitosano

La quitina disuelta en NaOH puede ser desacetilada dando lugar a quitosano. La presencia de éste se evaluó por un método colorimétrico con lugol, como lo reporta Nitschke y colaboradores en 2011. Para preparar la curva de concentración se pesaron 10 mg de quitosano comercial de bajo peso molecular (Sigma Aldrich) y se diluyeron en 1ml de ácido acético al 2%. De esta preparación de 10mg/ml se hicieron diluciones para alcanzar las concentraciones de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.0781, y 0.03906 mg/ml. En un papel filtro Whatman CAT GB003 se colocaron 10 μ l de cada dilución y de las muestras bajo análisis. Posteriormente, con la ayuda de un atomizador se roció solución de Yodo-Lugol 1% (Sigma Aldrich) sobre las muestras. Por último, el papel filtro fue colocado en un horno a 50°C para su secado y documentación [Nitschke *et al.*, 2011].

6.10 Evaluación de porcentajes de proteína en las extracciones

Se evaluaron los porcentajes de proteína en las muestras obtenidas con los distintos tratamientos, utilizando un kit de ácido biciconinico (ABP Biosciences). Se elaboró una curva de referencia para microplacas, construida con cantidades conocidas de proteína; se empleó albumina de suero bovino (BSA) marca ABP Bioscience (2 mg/ml). Esta curva se utilizó para determinar la cantidad de proteína presente en las muestras de interés. Las concentraciones diferentes de proteína se obtuvieron con diluciones seriadas a partir de la solución de referencia. Cada nueva concentración fue homogenizada cuidadosamente. La preparación de las diluciones, así como las concentraciones finales de proteína para cada punto de la curva se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidades utilizadas en las diluciones para construir la curva patrón necesaria para la determinación de concentraciones de proteína.

Punto de la curva	Preparación	Concentración
1	200 µl BSA (2mg /ml) + 200 µl H2O desionizada estéril	1 mg/ml
2	200 µl del punto 1 + 200 µl H2O desionizada estéril	0.5 mg/ml
3	200 µl del punto 2 + 200 µl H2O desionizada estéril	0.25 mg/ml
4	200 µl del punto 3 + 200 µl H2O desionizada estéril	0.125 mg/ml
5	200 µl del punto 4 + 200 µl H2O desionizada estéril	0.0625 mg/ml
6	200 µl H2O desionizada estéril	0 mg/ml

Posteriormente se preparó el reactivo de trabajo, de acuerdo con las instrucciones del proveedor:

$$(n^{\circ} \text{ de patrones} + n^{\circ} \text{ de muestras}) (n^{\circ} \text{ de replicas}) (200 \mu\text{l}) = V \text{ total}$$

Para la preparación del reactivo de trabajo, se mezclaron 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B del Kit.

A continuación, en una microplaca de 96 pocillos marca Costar-3599 fueron colocados 200 μl del reactivo de trabajo en cada pocillo. Se evaluaron los porcentajes de proteína tanto en las películas como en las suspensiones finales de cada muestra.

- Para la determinación de proteína en las películas, se cortaron muestras en forma de cuadrados de 2 x 2 mm, usando un bisturí.
- Para evaluar la cantidad de proteína en las muestras en suspensión, se agregaron 20 μl de cada muestra a analizar, así como de la curva patrón en su respectivo pozo. Las muestras fueron medidas por triplicado.

Una vez realizada la mezcla de la proteína con la solución de trabajo, la microplaca se colocó en una incubadora (Benchmark H2200-HC) a 37°C durante 30 minutos, protegida de la luz.

Finalmente, se dejó enfriar la placa hasta temperatura ambiente. Se tomaron lecturas de absorbancia a 562 nm utilizando el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) en modo de espectrofotómetro.

Los datos de absorbancia de la curva patrón fueron desplegados en función de su concentración y por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la curva. Ésta fue utilizada para determinar la concentración de proteína total en las muestras, despejando para x y sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras. El valor R^2 indica que tan cerca se encuentran nuestros valores a la línea recta; un valor cercano a 1 indica una buena correlación.

6.11 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se examinaron las características superficiales de las películas obtenidas como aislado final, procedentes del micelio de *A niger* bajo el efecto de diversas condiciones experimentales, utilizando un microscopio electrónico de barrido de alta resolución Hitachi SU-8230.

Se analizaron cuatro muestras correspondientes a los tratamientos experimentales siguientes:

- Control (sin ondas de choque).
- Incubando en NaOH 1 M 24 horas antes y después de aplicar ondas de choque.
- Sin incubación, con aplicación de ondas de choque seguida de tratamiento con calor.
- Incubando 24 horas en NaOH 1 M antes de suministrar ondas de choque y tratamiento con calor en seguida.

Para cada uno de los cuatro tratamientos, una muestra de película aislada con su tratamiento correspondiente se fijó en un portamuestras empleando cinta de carbono Ted Pella. La observación se realizó a 1kV como voltaje de aceleración y magnificaciones 500, 1000, 2000, 5000, 6000, 10000 y 20000.

6.12 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para obtener información sobre la composición molecular de las películas extraídas como producto final a partir de masa fúngica, las mismas muestras descritas en la sección anterior fueron sometidas a un análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

El equipo utilizado fue un espectrómetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Nicolet, Madison, WI) y los datos obtenidos fueron valores de absorbancia.

Estas absorbancias se registraron como una función de la longitud de onda (i.e., como números de onda 4000 - 500 cm^{-1}). Las películas se ubicaron en un cristal de reflectancia total atenuada (ATR).

Finalmente se adquirieron los espectros FT-IR que sirven como una característica "huella digital molecular" empleada para identificar muestras orgánicas e inorgánicas.

VII. Resultados y discusión

7.1 Selección del medio de cultivo

Los medios utilizados para el crecimiento del hongo fueron caldo de Sabouraud y medio líquido de papa y dextrosa. Durante los días de seguimiento al crecimiento, se observó la formación de motas o bolas fúngicas a partir del segundo día de incubación. Se obtuvieron 3 lotes en donde la masa fúngica seca recuperada fue pesada y los datos obtenidos se ilustran en la Tabla 3. En ésta se muestra que el contenido de masa fue mayor en el medio de Sabouraud, comparado con el medio de papa.

Tabla 3. Peso seco de la masa fúngica recuperada con dos medios de cultivo distintos (ND: No determinado).

Lote	Medio Sabouraud (g)	Medio dextrosa y papa (g)
Primero	0.4281	0.2525
Segundo	ND	1.3131
Tercero	ND	1.3041

Crecimiento en medio dextrosa de Sabouraud

A simple vista se observó abundante crecimiento, así como producción de conidios en las zonas que quedaron en la interfaz con el aire. Las colonias formadas mostraron pigmentación, un color amarillo mostaza (ver Figura 10). Como lo reportaron Bocobo y Benham en 1949, esto podría deberse a la disponibilidad de dextrosa en el medio en combinación con la fuente de nitrógeno utilizada. La pigmentación en los hongos es una característica poco conveniente, ya que podría afectar el proceso de extracción de quitina debido a que se requeriría de un paso adicional para la eliminación del pigmento, similar al procesamiento que se le da cuando la fuente es de crustáceos, como se reporta en el trabajo de Abo Elsoud y El Kady en 2019 [Abo-Elsoud & El-Kady, 2019] y el estudio de Jones y colaboradores en 2020 [Jones *et al.*, 2020]. Por lo tanto, dada esta característica se descartó la posibilidad de usar este medio de cultivo desde el primer lote.



Figura 10. Cultivo en medio Sabouraud con pigmentación (izquierda) y cultivo en medio de papa y dextrosa sin pigmentación (derecha).

Crecimiento en medio de Caldo dextrosa y papa

El crecimiento del hongo utilizando este medio de cultivo fue menor que en el medio de Sabouraud, según se observa tanto en la Figura 10 como en la Tabla 3. También la apariencia del medio muestra que no hubo producción de pigmento. Este medio de cultivo es utilizado de manera general para el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras que son patógenos de plantas, como es el caso de especies del género *Aspergillus* [Bocobo & Benham, 1949].

Dadas las características buscadas para tener una fuente homogénea de obtención de quitina, el medio de papa y dextrosa resultó más prometedor. Por ello, se eligió este medio para la obtención de la masa fúngica a utilizar durante el desarrollo de este trabajo.

7.2 Parámetros de las ondas de choque

Unas muestras fueron inicialmente tratadas con 2,000 y 4,000 eventos de ondas de choque en tándem con un voltaje de 6kV. No hubo distinción alguna entre ambos tratamientos y debido a que 2,000 eventos implicaron menor tiempo del proceso, se estableció tal cantidad para todas las muestras. Adicionalmente, por pruebas sobre cavitación realizadas con anterioridad en el laboratorio, se ha determinado que la variación en los tiempos de retraso entre una onda y la segunda en tándem produce modificaciones en el alcance e intensidad de los microjets, lo que a su vez induce efectos en las muestras.

Por ello, el tratamiento aplicado fue con las variaciones en los tiempos de retraso especificadas en la sección 6.5. Lo anteriormente descrito permitió disminuir el tiempo de aplicación maximizando el efecto de las ondas de choque. Como lo describe Knidri y sus colaboradores [Knidri *et al.*, 2019]: actualmente, diversos autores buscan resolver la problemática que requieren los tiempos de extracción de quitina.

7.3 Selección de disolvente








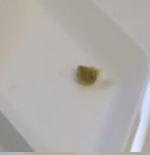

Para seleccionar el disolvente, se tomó en cuenta la cantidad de masa fúngica recuperada después de los tratamientos con ondas de choque. Para ello, 3 ml de suspensión final neutralizada de cada muestra se dejaron secando durante toda la noche en un molde de teflón a 50 °C.




Como se muestra en la Tabla 4, las cantidades fueron variables. Adicionalmente, después del secado se observaron algunas de las muestras con características morfológicas inesperadas, que resultaron de interés por sus posibles aplicaciones biotecnológicas. La característica que fue considerada como la más importante en este trabajo, fue la capacidad de formar películas.

Las muestras que de inicio formaron una película homogénea, fueron aquellas tratadas con NaOH 1 M, crecidas tanto en medio de Sabouraud como en el de papa y dextrosa. También se observó dicha característica cuando el disolvente fue H₂O de grado MQ estéril en combinación con ondas de choque, aunque su consistencia fue más bien frágil y quebradiza. Las muestras que fueron tratadas con NaOH 2 M, no formaron las películas, sino sólo botones o agregados más rígidos, difíciles de disgregar o redisolver (ver Tabla 4).

Dada la importancia biotecnológica que podría tener la capacidad de formar películas delgadas de quitina, se optó por utilizar al NaOH 1 M como solvente para resuspender la masa fúngica que recibió o no la aplicación de ondas de choque. De acuerdo con trabajos previamente reportados, el uso de NaOH 1 M permite que la quitina mantenga su estructura, ya que el uso de molaridades mayores promueve la desacetilación y fragmentación parcial de este biopolímero, favoreciendo la producción quitosano [Tsurkan *et al.*, 2021].

Tabla 4. Películas formadas por las muestras del hongo tratadas con ondas de choque y usando tres disolventes distintos. P indica formación de película y ND No determinado.

Tipo de cultivo	Disolvente	Tiempo en el disolvente antes de dar ondas de choque (h)	Tiempo en el disolvente después de dar ondas de choque (h)	Formación de película	Peso de la masa fúngica recuperada
Sabouraud	NaOH 1 M	ND	24		0.0105 g
Sabouraud	NaOH 2 M	ND	24		0.0115 g
Sabouraud	H ₂ O MQ	ND	24		0.0192 g
Sabouraud	NaOH 1 M	ND	24		0.0129 g
Sabouraud	NaOH 2 M	ND	24		0.0126 g
Sabouraud	H ₂ O MQ	ND	24		0.0268 g
Papa y dextrosa	NaOH 1 M	ND	24		0.0091 g
Papa y dextrosa	NaOH 2 M	ND	24		0.0088 g
Papa y dextrosa	H ₂ O MQ	ND	24		0.0290 g

Papa y dextrosa	NaOH 1 M	ND	24		0.0104 g
Papa y dextrosa	NaOH 2 M	ND	24		0.0090 g
Papa y dextrosa	H ₂ O MQ	ND	24		0.0289 g

7.4 Disparidad en los procedimientos de neutralización

Como se anticipó en la sección 6.7, se probaron procesos tanto con HCL 1N como con agua desionizada estéril, para neutralizar el PH de las muestras que resultó cercano a 14 (fuertemente básico).

La neutralización química con HCl 1N resultó ser un método rápido y sencillo; sin embargo, después del secado se observó la formación de cristales de cloruro de sodio, los cuales impidieron la formación de la película en dos ocasiones sucesivas, según se muestra en la Tabla 5.

Por otro lado, la neutralización mediante lavados con agua desionizada estéril fue más laboriosa (debido a la recuperación por centrifugación entre cada lavado), pero no obstante de ello resultó en un mejor proceso, ya que se obtuvo la formación de película homogénea, aunque poco flexible.

En este trabajo se eligió usar la neutralización por medio de lavados, como lo reportan otros autores, ya que los cristales de cloruro de sodio resultan difíciles de eliminar y representan puntos de fractura en las películas. Adicionalmente podrían llevar a una sobreestimación del peso seco de la masa recuperada después de los tratamientos.

Tabla 5. Formación de película por las muestras del hongo tratadas con ondas de choque, evaluando dos procesos de neutralización diferentes (NA: No Aplica).

Tipo de neutralización	Formación de película	Peso de la masa fúngica recuperada
HCl	Sin formación 	NA
HCl	Sin formación 	NA
H ₂ O desionizada estéril	Con película 	0.0144 g

7.5 Tiempo en el disolvente

Una vez seleccionados el medio de cultivo, el disolvente y la técnica de neutralización, se procedió con la evaluación del tiempo de incubación de las muestras en el disolvente, tanto antes de recibir ondas de choque como después de su aplicación.

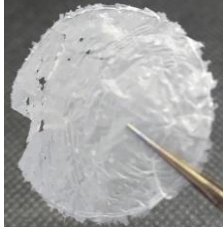

El objetivo pretendido fue la formación de películas homogéneas y flexibles, para lo cual se probaron combinaciones diversas de tiempo. Es importante resaltar que se manejaron triplicados para cada tratamiento.

Para evaluar el efecto del NaOH 1 M en la recuperación de masa fúngica, así como en la formación de películas, se trataron 3 muestras a temperatura ambiente durante 24 horas previas y 24 horas posteriormente a recibir tratamiento con ondas de choque.

Esta combinación se escogió así ya que, sin un período de incubación previo al tratamiento con ondas de choque, la muestra en el disolvente no tenía una apariencia homogénea, resultando esto en una manipulación complicada de la muestra, además de dificultar otros análisis.

En la Tabla 6 se muestran los resultados y se resalta que hubo recuperación de material que permitió la formación de películas en al menos dos de las tres muestras, aunque -como se puede observar- son películas que presentan irregularidades y en algunas zonas falta material.

Tabla 6. Películas formadas por las muestras del hongo tratadas con 4,000 ondas de choque en tándem, evaluando un periodo de incubación en el disolvente de 24 horas antes y después del tratamiento de ondas de choque (NA: No aplica).

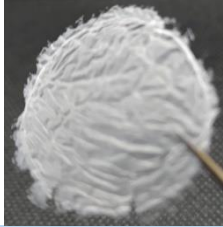

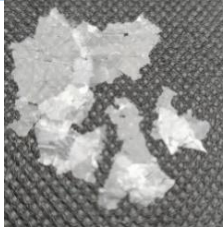
Tiempo en el disolvente antes de dar ondas de choque (h)	Tiempo en el disolvente después de dar ondas de choque (h)	Formación de película	Peso de la masa fúngica recuperada
24	24		0.0058 g
24	24		0.0046 g
24	24	Sin formación	
24	24	Sin formación	

Por otro lado, se analizó la posibilidad de reducir los tiempos de incubación a temperatura ambiente, tanto antes como después de la aplicación de ondas de choque, así como sus posibles efectos en la formación de película.

La reducción a 1 hora de incubación previo al tratamiento con ondas de choque, pero manteniendo la incubación durante 24 horas después de su aplicación, no modificó el resultado esperado. En las 3 muestras que recibieron ondas de choque hubo formación no homogénea de la película (con huecos); mientras que en el control (sin ondas de choque) no se obtuvo película (ver Tabla 7).

Estos resultados indican que es posible reducir el tiempo de 24 a 1 hora de incubación previa en el disolvente; sin embargo, hace falta conocer si estos tiempos afectaron la cantidad de proteína residual en las muestras.

Tabla 7. Películas formadas por las muestras del hongo tratadas con ondas de choque evaluando un periodo de incubación en el disolvente de 1 hora antes y 24 horas después de las ondas de choque (NA: No Aplica).

Tiempo en el disolvente antes de dar ondas de choque (h)	Tiempo en el disolvente después de dar ondas de choque (h)	Formación de película	Peso de la masa fúngica recuperada
1	24		0.0060 g
1	24		0.0065 g
1	24		0.0041 g
1	24	Sin formación	

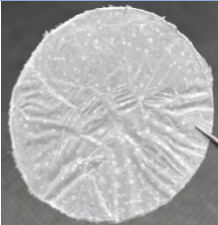



7.6 Consecuencias de la aplicación de calor

Para la extracción de quitina algunos autores reportan que el calentamiento de muestra promueve la desnaturalización de proteínas. En dichas publicaciones se usan temperaturas que están entre 65 y 100 °C [Kaur & Dhillon, 2015]. En este trabajo se decidió incubar con la menor temperatura reportada para minimizar el riesgo por manipulación durante el proceso.

Las muestras que se presentan a continuación no tuvieron tiempo de incubación previo al tratamiento con ondas de choque, pero sí cumplieron con las 3 horas de incubación a 65°C. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 8, donde se puede notar la formación de película tanto en las muestras tratadas como en el control. Todas ellas fueron flexibles y homogéneas.

Fue conveniente el tratamiento con calor para la eliminación de material celular no deseado, lo que facilitó la recuperación del biopolímero. La aplicación de calor es un paso importante en el proceso de extracción, como se ha reportado antes, independientemente del origen de la materia prima [Kaur & Dhillon, 2015].

Tabla 8. Películas formadas por las muestras del hongo tratadas con ondas de choque, evaluando un tratamiento de calor cuyo propósito es promover la desnaturalización de proteínas (NA: No Aplica).

Tiempo en el disolvente antes de dar ondas de choque (h)	Tiempo en el disolvente después de dar ondas de choque (h)	Tratamiento con calor	Formación de película	Peso de la masa fúngica recuperada
NA	NA	3 h a 65°C		0.0054 g
NA	NA	3 h a 65°C		0.0036 g
NA	NA	3 h a 65°C		0.0041 g
NA	NA	3 h a 65°C		0.0043 g

7.7 Efecto de las ondas de choque y del NaOH 1 M sobre el micelio fúngico

En la Figura 11A se aprecia una colonia de *A niger* crecida a manera de control en medio mínimo líquido con agitación constante; es de notarse que el micelio crece de forma aglomerada. En las Figuras 11B y 11C se muestra la modificación que sufre el micelio al ser expuesto en NaOH 1 M durante 24 y 48 horas respectivamente. De forma análoga al control de crecimiento (A), se observa que el micelio mantiene su forma conglomerada, impidiendo la penetración adecuada del solvente en las zonas más densas de la colonia. En la Figura 11D se expone la imagen del efecto que se ejerce en la colonia tras la aplicación de ondas de choque; en esta es claro que hubo una disgregación de la colonia. La separación del micelio a causa de las ondas de choque podría promover el efecto de degradación de proteínas, por el álcali ingresando directamente en las hifas.

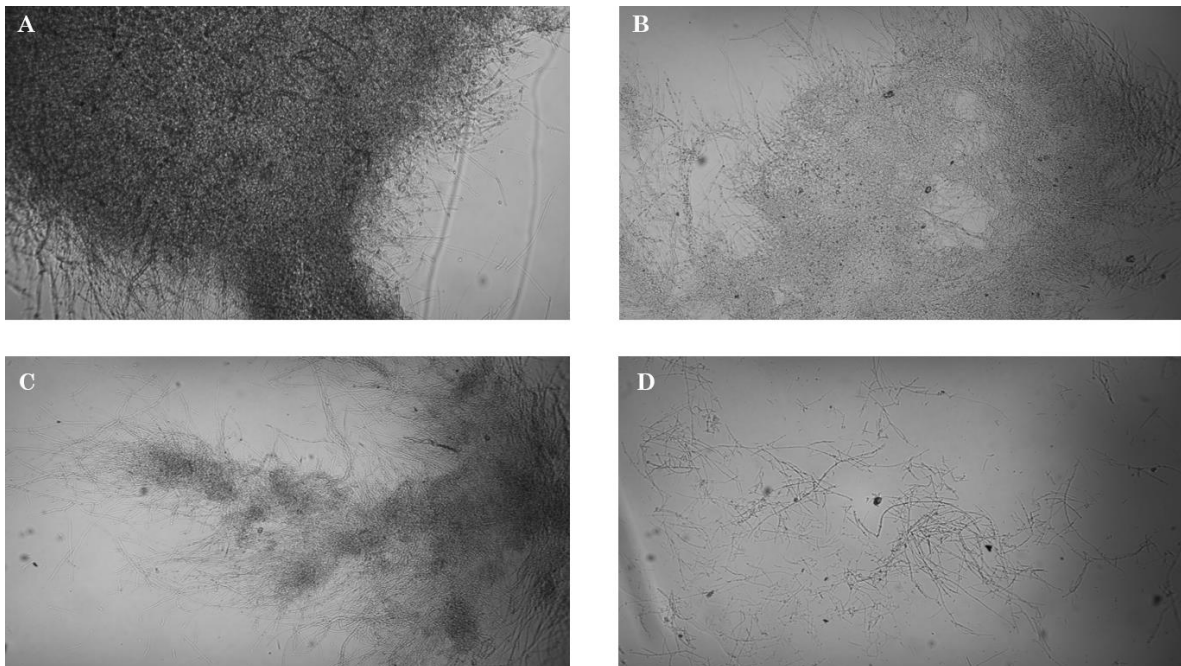


Figura 11. Micelio de *A niger* visto en microscopio óptico con un aumento 10X. (A) En medio mínimo líquido. (B) con 24 horas de incubación en NaOH 1 M, (C) con 48 horas de incubación en NaOH 1 M y (D) después del tratamiento con ondas de choque.

7.8 Evaluación de quitosano por método colorimétrico con lugol

Para determinar si el NaOH estaba teniendo un efecto sobre la quitina (desacetilándola y en consecuencia volviéndose quitosano), se empleó el método colorimétrico con disolución de Lugol descrito por Nitschke y colaboradores en 2011. En la Figura 12A se muestra la curva construida a partir de diluciones de 10mg de quitosano en 1ml de ácido acético, la cual sirvió para comparar con las muestras y saber de manera cualitativa las concentraciones en que podría presentarse el quitosano en ellas. En la Figura 12B se presentan las reacciones del lugol con los 10 μ l provenientes de muestras con NaOH 1 M, 2 M y H₂O MQ. Se observa que en ninguna de ellas se mostró coloración, indicando que no hubo quitosano o por lo menos no en cantidades suficientes para evidenciar su coloración. La Figura 12C corresponde al análisis de las muestras con un período de incubación de 24 horas en NaOH 1 M anterior y posteriormente a las ondas de choque. Se aprecia que en la muestra de control (sin ondas de choque) hubo una tenue coloración, indicando la presencia de quitosano.

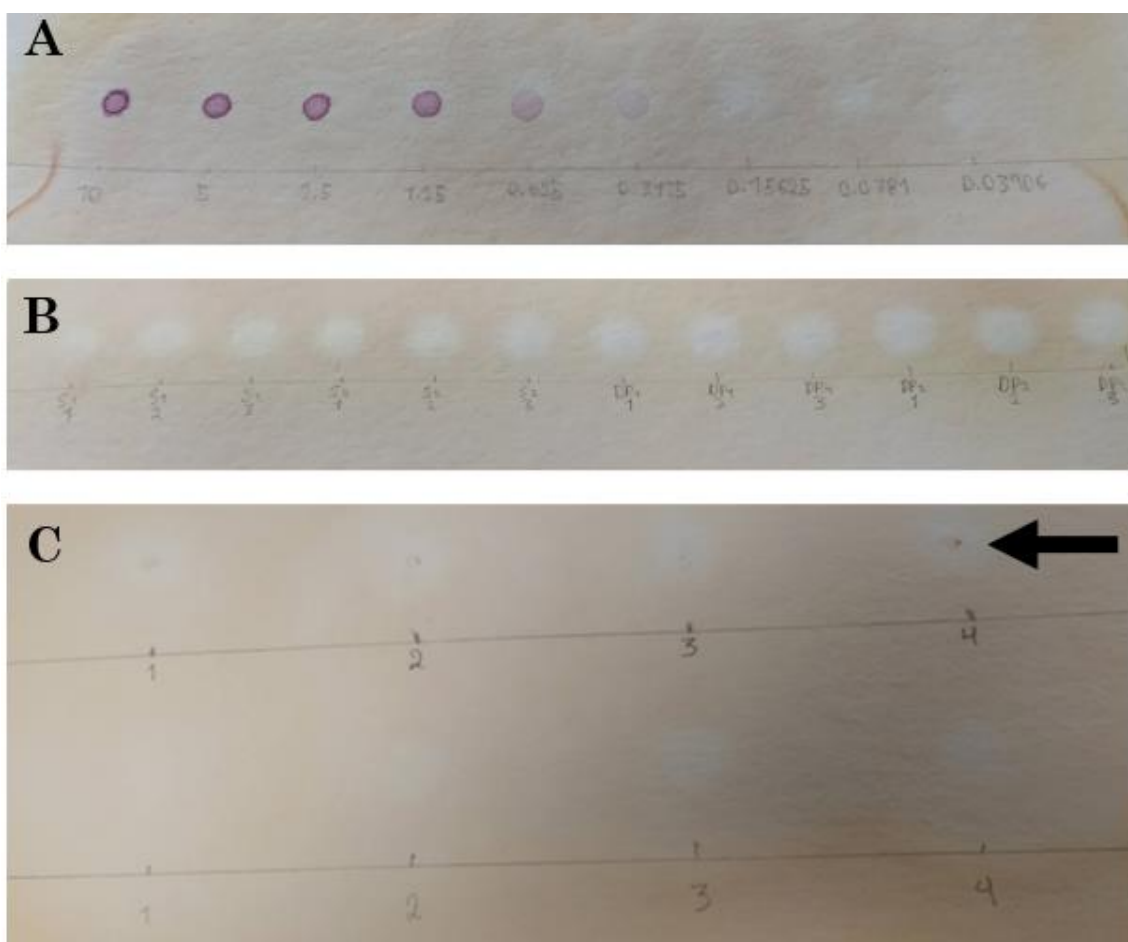


Figura 12. (A) Curva con diluciones de quitosano comercial en ácido acético al 2% teñido con lugol. (B) Cuantificación de quitosano con lugol en muestras con NaOH 1 M, 2 M y H₂O MQ. (C) Cuantificación de quitosano con lugol en muestras con un período de incubación de 24 horas en NaOH 1 M anterior y posteriormente a las ondas de choque.

7.9 Estimación de porcentajes de proteína residual

Una vez que se determinaron las variables relacionadas con el tipo de medio de cultivo, disolvente, proceso de neutralización, tiempo en el disolvente y el tratamiento con calor para la extracción de quitina; se procedió con la determinación de proteína presente en las muestras tratadas con cada una de las variantes, ya que en este trabajo también se pretende un protocolo para la extracción de quitina con la menor cantidad de impurezas.

La quitina de crustáceos generalmente contiene un mínimo de proteína residual que se une a proteínas y minerales esclerotizados; por otro lado, la quitina fúngica se asocia con otros polisacáridos, como el glucano, que puede presentarse en cantidades que superan el contenido de quitina [Jones *et al.*, 2020].

Para la cuantificación de proteína se utilizó el método de ácido bicinconínico (BCA), el cual genera una reacción colorimétrica detectable a 562 nm. Este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino con la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando el ácido bicinconínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu^{+1} . El complejo hidrosoluble absorbe a 562 nm, de manera lineal con el incremento de proteína. La concentración de proteína de las muestras se evaluó graficando la curva de calibración construida con la proteína BSA como referencia de concentración conocida, según se muestra en la Figura 13. A partir de esta curva se estableció la concentración de proteína desconocida en las muestras, a partir de la ecuación de la recta obtenida con regresión lineal e interpolando las mediciones de absorbancia.

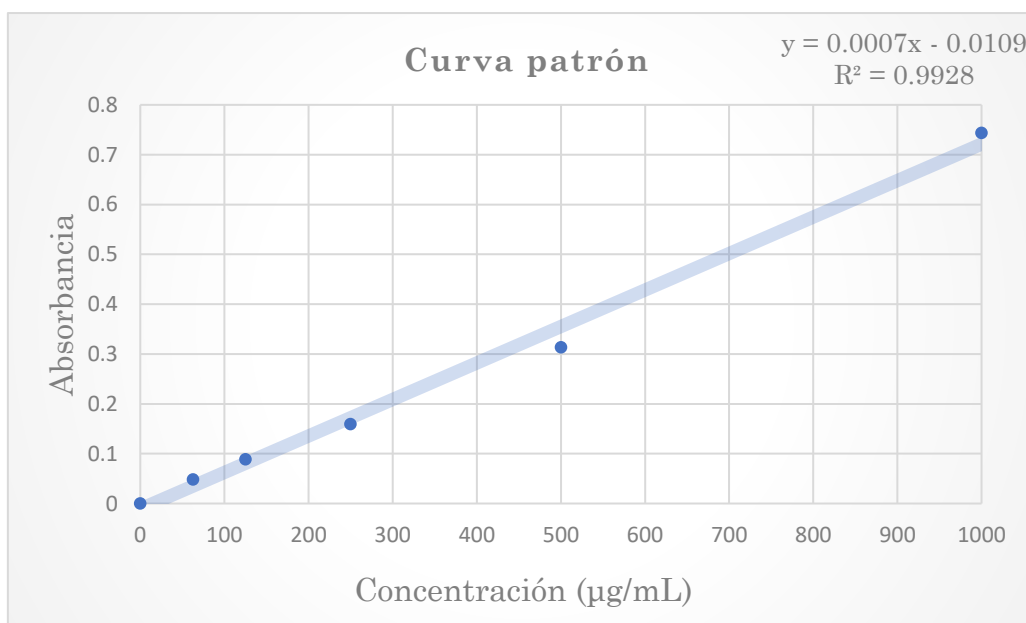


Figura 13. Curva patrón empleada para determinar la concentración de proteína desconocida en las muestras empleando regresión lineal.

Las condiciones experimentales que proporcionaron mejores resultados (valores más bajos) en la cuantificación de proteína, se muestran en la Tabla 9. Estas fueron:

1.- Incubación en NaOH 1 M 24 horas previas y 24 posteriormente al tratamiento con ondas de choque. Con estas condiciones el valor más alto de proteína en suspensiones fue de 192.43 $\mu\text{g/mL}$ y el más bajo fue en el control con 114.54 $\mu\text{g/mL}$. En películas, el valor más alto de proteína fue de 64.88 $\mu\text{g/mL}$ y el más bajo fue de 18.20 $\mu\text{g/mL}$.

2.- Incubación en NaOH 1 M, 1 hora previa y 24 horas posteriormente al tratamiento con ondas de choque. Con este proceso el valor más alto de proteína en suspensiones fue de 470.83 $\mu\text{g/mL}$ y el más bajo fue 180.72 $\mu\text{g/mL}$; mientras que en las películas la mayor cantidad de proteína fue de 67.69 $\mu\text{g/mL}$ y la menor fue de 47.77 $\mu\text{g/mL}$.

3.- Tratamiento de calor en baño maría durante 3 horas a 65° C, posterior a la aplicación de ondas de choque. Con esta variante el valor más alto de proteína en suspensiones fue de 204.98 $\mu\text{g/mL}$ y el más bajo fue de 106.75 $\mu\text{g/mL}$. En las películas el valor más alto de proteína fue de 19.84 $\mu\text{g/mL}$ y el valor más bajo fue de 7.55 $\mu\text{g/mL}$.

4.- Combinación de 1 hora de incubación en NaOH 1 M previo a las ondas de choque y un tratamiento de calor durante 3 horas a 65° C después de la aplicación de ondas de choque. Con esta otra variante el valor más alto de proteína en suspensiones fue de 151.37 $\mu\text{g/mL}$ y el más bajo fue de 66.47 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de proteína más alta en las películas fue 14.96 $\mu\text{g/mL}$ y la más baja fue 10.85 $\mu\text{g/mL}$.

5.- Combinación de 24 horas de incubación en NaOH 1 M previo a las ondas de choque y un tratamiento de calor durante 3 horas a 65° C, después de la aplicación de ondas de choque. Con este tratamiento el valor más alto de proteína en suspensiones fue de 157.16 $\mu\text{g/mL}$ y el más bajo fue de 40.91 $\mu\text{g/mL}$. En las películas la concentración de proteína más alta fue 42.78 $\mu\text{g/mL}$ y la más baja fue -2.47 $\mu\text{g/mL}$. Este valor negativo se interpreta como una ausencia de proteína.

Si bien en varios casos parece no haber diferencia significativa entre los valores obtenidos con respecto al control, ello podría ser debido a que en las muestras de control se forman conglomerados de hifas (ver imágenes obtenidas por microscopía óptica) y este tipo de estructuras podría enmascarar la cantidad de proteínas presentes en la muestra, por lo que estaría siendo subcuantificada. A diferencia de lo anterior, las imágenes de las muestras que fueron tratadas con ondas de choque muestran que el micelio e hifas se encuentran disgregadas, por lo que en estas es altamente probable que los valores de la proteína obtenidos sean más confiables.

Tabla 9. Condiciones experimentales utilizadas que proporcionaron los mejores resultados en cuanto a concentración de proteína; es decir, concentraciones menores (NA: No Aplica).

Condiciones experimentales	Tiempo en NaOH 1 M previo	OCH	Calor	Tiempo en NaOH 1 M posterior	Proteína en suspensión [µg/ml]	Proteína en películas [µg/ml]
1	24 h	Sí	NA	24 h	155.05	35.60
		Sí			177.4	30.79
		Sí			192.43	18.20
		Control			114.54	64.88
2	1 h	Sí	NA	24 h	260.21	67.01
		Sí			470.83	47.77
		Sí			180.72	67.69
		Control			182.86	
3	NA	Sí	Sí	NA	204.98	19.48
		Sí			106.75	19.84
		Sí			171.21	7.55
		Control			126.28	19.05
4	1 h	Sí	Sí	NA	66.47	10.85
		Sí			72.06	13.43
		Sí			126.88	14.96
		Control			151.37	11.36
5	24 h	Sí	Sí	NA	89.42	10.40
		Sí			40.91	-2.47
		Sí			150.96	19.87
		Control			157.16	42.78

7.10 Tratamiento convencional de extracción de quitina

La cuantificación de proteína resultante en este proceso químico convencional, variando molaridades (6 M, 5 M, 4M, 3 M y 2 M) y con un tratamiento de calor de 3 horas a 65°C, señala que una molaridad más alta no se relaciona con una disminución en la cantidad de proteína. En la Figura 14 se puede notar que el disolvente NaOH 2 M muestra una concentración de proteína de -3.23 µg/mL (valor negativo asociado con la ausencia de proteína), mientras que con NaOH 6 M el valor obtenido fue de 33.93 µg/mL. Esto ratifica la decisión de usar el NaOH 1 M como el disolvente de elección.

Cabe mencionar que las variables usadas en este trabajo para estandarizar la extracción de quitina de hongos mediante ondas de choque, tienen la característica de representar un menor riesgo para el medio ambiente y el personal involucrado, ya que propone emplear concentraciones de NaOH con molaridades bajas, en combinación con un método electromecánico como el de las ondas de choque para reforzar la extracción.

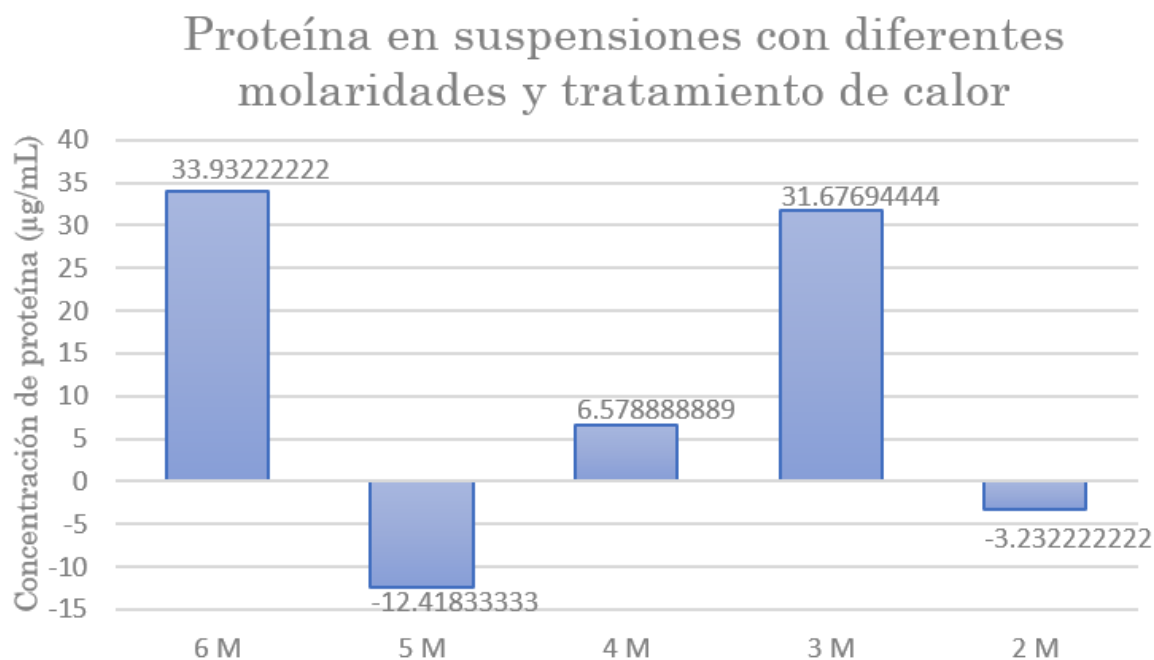


Figura 14. Concentraciones de proteína residual al emplear diferentes molaridades y tratamiento con calor.

7.11 Caracterización por FT-IR

En la figura siguiente se presentan los espectros FT-IR de las muestras que tuvieron los menores porcentajes de proteína, con las condiciones experimentales que se describen a continuación.

Figura 15A: Control (sin ondas de choque).

Figura 15B: 24 horas de incubación en NaOH 1 M, antes y después de las ondas de choque.

Figura 15C: Ondas de choque sin incubación previa y tratamiento con calor posterior.

Figura 15D: 24 horas de incubación en NaOH 1 M, antes de las ondas de choque y tratamiento con calor posterior.

En estos se resalta la primera banda relevante en 3269 cm^{-1} , correspondiente a un estiramiento N-H presente en β -quitina. La deformación simétrica del grupo funcional CH_3 aparece en 2918 cm^{-1} , la cual se asocia a γ -quitina (ver Figuras 17 A y D).

Las bandas de absorción que son características de la quitina se han reportado como las bandas de amida I y II. En el caso de la amida I, su banda se ve en 1640 cm^{-1} para β -quitina (ver Figura 15A y Figura 15D). La amida II para α -quitina y β -quitina se asocia a la banda 1552 cm^{-1} . En las 4 muestras esta banda aparece corrida hacia 1555 o 1543 cm^{-1} .

Los picos en 1375 y 1374 cm^{-1} corresponden a α -quitina y β -quitina respectivamente; y se asocian a una deformación simétrica de CH inducida por CH_3 (estos se aprecian en las 4 muestras).

La banda de absorción en 1154 cm^{-1} ocurre por un estiramiento asimétrico de puente de oxígeno para α -quitina y γ -quitina; ésta aparece en todas las muestras, excepto en la Figura 15B, donde aparece corrida a la posición 1147 cm^{-1} .

El pico en 1027 cm^{-1} está presente en todas las muestras y se relaciona con un estiramiento asimétrico C–O en fase de anillo correspondiente a β -quitina.

Por último, la banda en 894 cm^{-1} se asocia a un estiramiento del anillo CH para γ -quitina. Dicha banda se observa en todos los espectros, excepto en el de la Figura 15B.

Todo este análisis de espectroscopia infrarroja fue conforme al trabajo de Tsurkan y colaboradores, que presentaron en el 2021 con las asignaciones de las bandas relevantes de los espectros FT-IR de α , β y γ -quitina.

La presencia de los picos correspondientes a CH_3 demuestra la presencia principalmente de quitina.

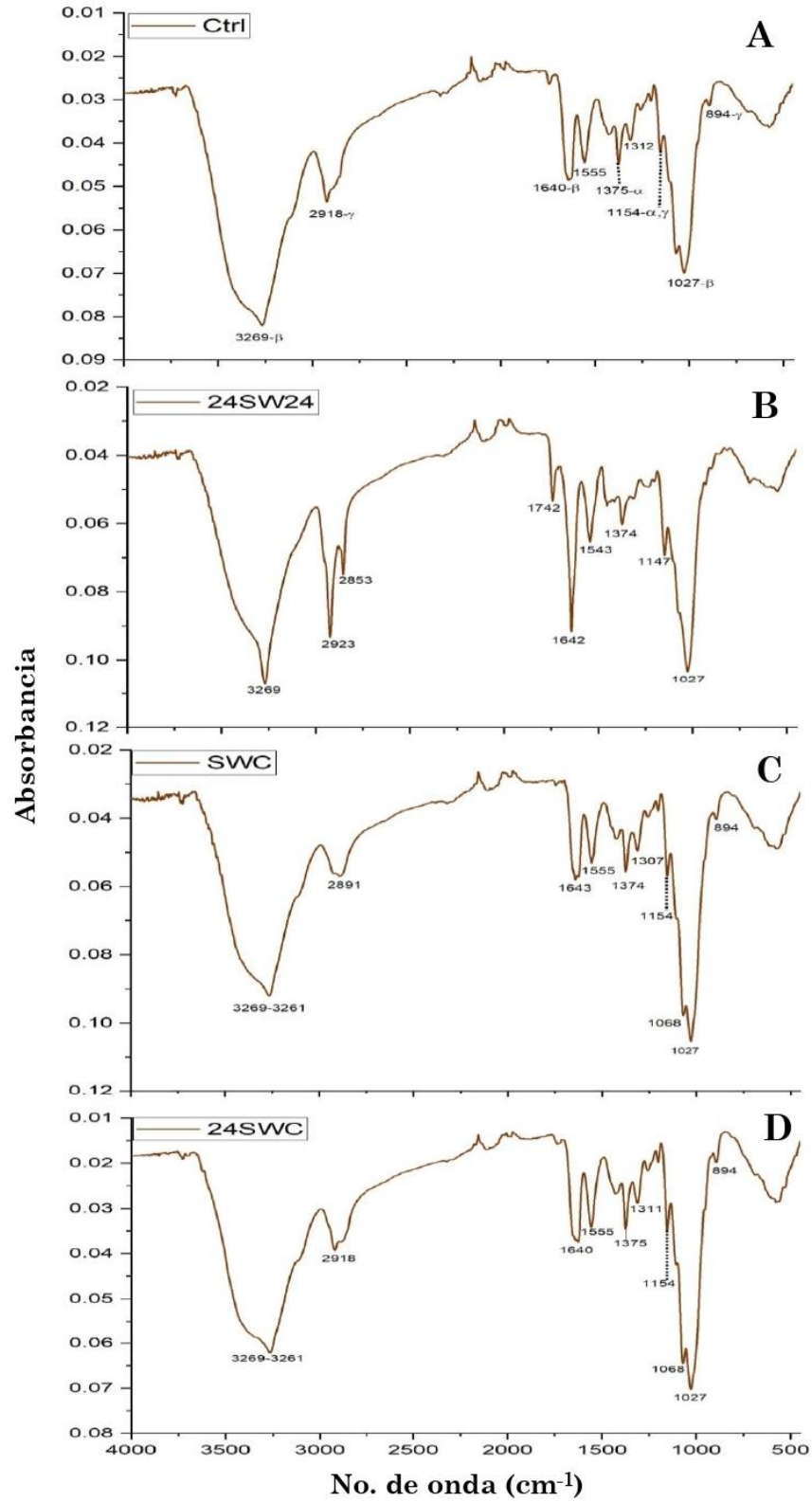


Figura 15. Espectros FT-IR de 4 muestras con tratamientos distintos. (A) Control. (B) En incubación durante 24 h en NaOH 1 M, antes y después de las ondas de choque. (C) Con ondas de choque sin incubación previa y tratamiento con calor posterior. (D) En incubación durante 24 h en NaOH 1 M, antes de las ondas de choque y un tratamiento con calor.

7.12 Visualización mediante SEM

En la Figura 16 se muestran cuatro muestras diferentes que formaron película. En todas ellas se aprecia un alineamiento homogéneo de las microfibras y escasos poros. A nivel morfológico no se aprecia una diferencia clara entre los tratamientos usados. Este alineamiento permitió la formación de películas.

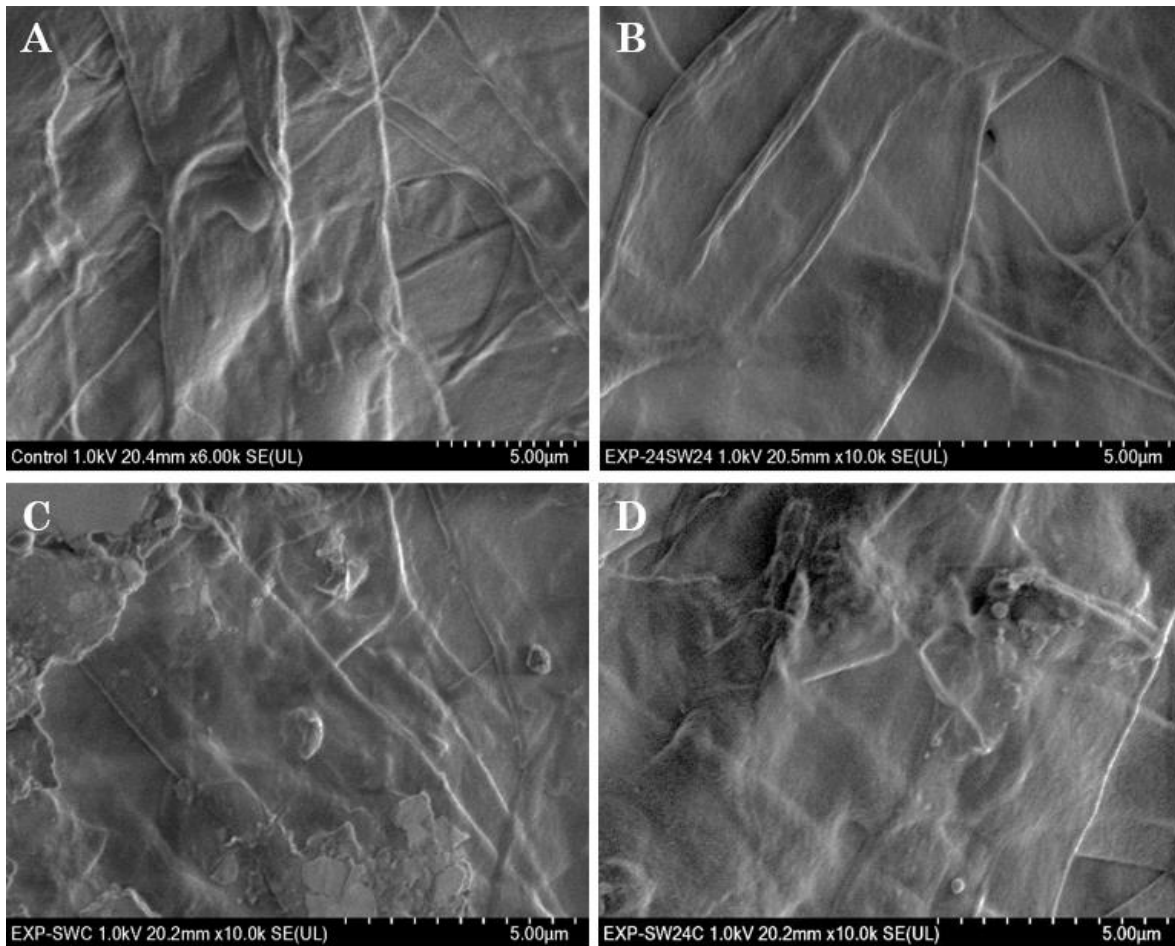


Figura 16. SEM de 4 muestras con tratamientos diferentes. (A) Control. (B) En incubación durante 24 h en NaOH 1 M, antes y después de las ondas de choque. (C) Con ondas de choque sin incubación previa y tratamiento con calor posterior. (D) En incubación durante 24 h en NaOH 1 M, antes de las ondas de choque y un tratamiento con calor.

VIII. Conclusiones

Se investigaron y evaluaron las condiciones experimentales para la extracción de quitina de *A. niger*, mediante un método novedoso que involucra el uso de ondas de choque. Por dicha novedad, fue necesario cuidar en lo posible la metodología seguida, especialmente en los primeros pasos, a fin de aumentar las probabilidades de éxito en el producto final pretendido. Así, para la obtención de la materia prima (micelio de *A. niger*), se tuvo cuidado especial en la elección del medio de cultivo, habiendo probado los dos más recomendados en la literatura al respecto (sección 6.1), eligiendo el caldo de dextrosa y papa como el más adecuado a este trabajo, ya que este no presentó una pigmentación que hubiera requerido pasos adicionales para removerla.

Después se estableció el NaOH 1 M como disolvente para eliminar las proteínas en el micelio, haciendo notar que molaridades más altas (2 M, 3 M 4 M 5M y 6 M) no tienen un efecto desproteinizante mayor y sí efectos adversos al medio ambiente. Para la eliminación de este disolvente en el producto final, se probó que los lavados con H₂O desionizada son un mejor procedimiento que el uso de HCl, teniendo en cuenta la formación de películas como producto final.

También se evaluaron tiempos de incubación en el disolvente, antes y después de la aplicación de ondas de choque. Los tiempos de incubación de 1 hora antes y 24 horas después de aplicar ondas de choque mostraron los mejores resultados, en cuanto a la reducción del tiempo necesario al proceso y la proteína residual en el producto final. Esto combinado con un tratamiento de calor durante 3 horas a 65 °C, mostró concentraciones de proteína residual bajas y en algunos casos nulas. Es cuestionable la pureza de la quitina extraída con fuentes y métodos convencionales, ya que en la literatura al respecto se omite un análisis proteínico. La metodología presentada en este trabajo reporta cantidades de impurezas mínimas relacionadas a proteína.

La exposición del micelio en el NaOH ocasiona desacetilación de la quitina produciendo quitosano. El método colorimétrico con lugol utilizado, indicó que con el procedimiento propuesto no hay presencia de quitosano en las muestras tratadas, reduciendo así las impurezas en el producto final debidas a existencia de quitosano.

Con el estudio de SEM realizado se concluye que con la metodología propuesta hay un alineamiento a nivel morfológico y no se aprecia una clara distinción entre los tratamientos empleados, pero con la observación en microscopio óptico es notoria una separación del micelio cuando se aplicaron ondas de choque, sugiriendo que su uso podría promover el efecto de degradación de proteínas por parte del NaOH, ingresando así directamente en las hifas, dada esta separación.

La formación de biopelículas como producto final de la metodología propuesta fue una serendipia, ya que estas biopelículas son una tecnología que está ganando importancia para prolongar la conservación de alimentos. Lo que se busca es que sean abundantes, biodegradables, comestibles y económicas; aunque hay otros factores importantes como el sabor, el perfil nutritivo, el contenido, la vida útil y el color, entre otros. Este método pionero con ondas de choque sugiere ser una buena herramienta para la elaboración de estas películas de gran interés industrial. Además, las propiedades triboeléctricas que presentaron estas películas resaltan otra área de oportunidad para la aplicación comercial en las áreas de la electricidad y electrónica (fabricación de componentes como resistencias, capacitores y varistores).

Con espectroscopia infrarroja, se comprobó la existencia de grupos funcionales reportados en los alomorfos de quitina, coincidiendo con lo estipulado en los espectros de las muestras de *A. niger* y haciendo evidente la composición molecular del producto final adquirido con este proceso.

Para la extracción de quitina actualmente se lucra con los desechos de procesamiento de alimentos marinos, que indudablemente abundan y son renovables, pero los procesos tradicionales de extracción utilizan químicos agresivos a temperaturas elevadas durante un tiempo prolongado, que pueden afectar las propiedades fisicoquímicas del producto aislado y son responsables de deterioro ambiental.

No obstante de que el proceso de extracción de quitina mediante ondas de choque todavía se encuentra distante en cuanto a una producción a nivel industrial, ya se ha demostrado su potencial para la producción sostenible de quitina y como un método de extracción “verde”. Afortunadamente, en la actualidad el diseño de métodos de extracción de productos naturales que se caractericen por ser ecológicos y sostenibles, es un tema de investigación destacable en un contexto multidisciplinario.

IX. Apéndice

Pruebas eléctricas a biopelículas de quitina

Primeras observaciones

Una vez formada la película de la suspensión final, esta se separó del molde de teflón y fue pesada y fotografiada para su documentación. Al llevar a cabo esas acciones, se observaron propiedades triboeléctricas¹ muy ostensibles en las películas.

En el momento en que la película tuvo contacto con el recipiente de material plástico donde fue pesada, hubo complicaciones para manipularla, pues se adhería a su superficie, así como al sobre de papel aluminio donde se almacenaba. Para su registro fotográfico se usó una escenografía pequeña, también de un material plástico; y de la misma manera cuando la película tuvo contacto con las paredes del estudio, esta presentó adherencia fuerte, como en el sobre de papel aluminio y el recipiente de la balanza. Tales experiencias motivaron el desarrollo del apartado siguiente.

Caracterización de posible comportamiento óhmico

Se les llama materiales óhmicos a todos aquellos que obedecen la ley de Georg Simon Ohm, la cual establece que al hacer fluir una corriente eléctrica de intensidad I a través de un trozo del material en cuestión, entonces en los extremos del material surge una diferencia de potencial eléctrico V que es directamente proporcional a la corriente aplicada y la constante de proporcionalidad se conoce como la resistencia eléctrica R del material.

Lo anterior se resume matemáticamente en la expresión:

$$V = R I \quad (1)$$

¹ Se define como triboelectricidad al fenómeno de electrificación por frotamiento y el vocablo proviene del griego τριβειν (tribein: frotar).

donde las unidades de sus parámetros en el sistema MKS internacional son respectivamente los volts (V), ohms (Ω) y amperes (A). A la diferencia de potencial eléctrico V , también se le llama coloquialmente "voltaje", por sus unidades.

La ecuación anterior, por ser de tipo lineal, establece que en el mismo trozo de material con resistencia R (considerada constante), los incrementos o decrementos de la corriente ocasionarán respectivamente incrementos o decrementos proporcionales del voltaje en sus extremos, lo cual es una forma de verificar el comportamiento óhmico del material. Los gases nobles -entre otros- contenidos en tubos de vidrio con fines de iluminación pulsada o continua mediante ionización por descargas eléctricas, presentan decrementos de voltaje ante incrementos de corriente en dicho proceso (fenómeno de relajación), por lo que se consideran materiales no óhmicos.

La Ecuación. 1 también predice que si se aplica un voltaje V_c conocido o medible en los extremos del trozo de material y además la corriente I_c así provocada en el mismo también es medible, entonces se puede determinar su resistencia por el simple cociente de tales datos, que pueden obtenerse para varios valores de voltaje y sus magnitudes de corriente correspondientes, desde luego dentro de los límites de sensibilidad y no alteración del material, además de considerar las incertidumbres en las mediciones y su propagación.

Ohm también encontró que la resistencia eléctrica (R) de los materiales con los que experimentó, dependía tanto de su geometría (longitud L y área seccional a , en su forma más simple, según se muestra en la Figura 17) como de una propiedad inherente al material en sí, que se conoce como su *resistividad* ρ y es la que tipifica al material en cuanto al grado de oposición que presenta al flujo de la corriente eléctrica; es decir, Ohm también determinó la expresión:

$$R = \rho(L/a) \quad (2)$$

la cual establece la relación de la resistencia de un trozo de material determinado con su longitud (proporción directa) y con su área seccional (proporción inversa), considerando a la resistividad ρ como una constante de proporcionalidad paramétrica, ya que también puede depender de otras variables físicas como la temperatura (termistor), luz (foto-resistencia), etc.; e inclusive del voltaje o corriente aplicado sobre el material (varistor).

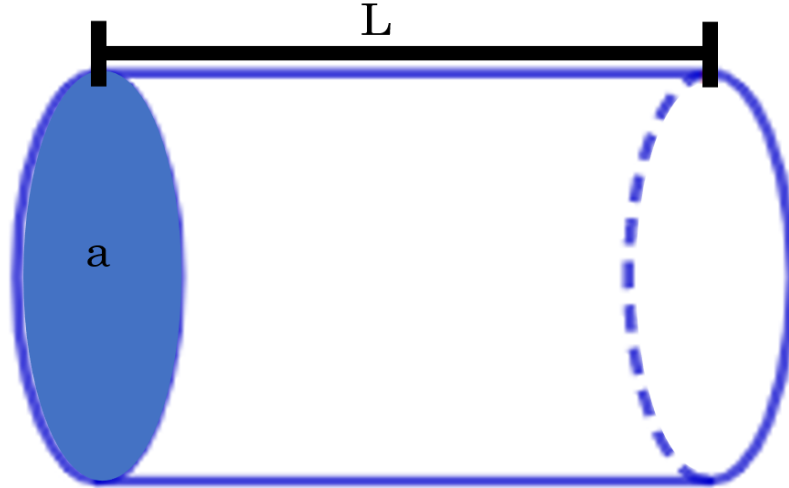


Figura 17. Trozo de un material con área seccional a y longitud L .

En la ecuación anterior puede hacerse explícita la resistividad del material en cuestión, para obtener su magnitud en términos de las dimensiones geométricas (a/L) y la resistencia eléctrica (R):

$$\rho = R(a/L) \quad (3)$$

Para la propagación de incertidumbres sistemáticas absolutas, se calculó la diferencial de la expresión anterior con términos en valor absoluto y tomando en cuenta que es una función de tres variables, según la teoría de errores al respecto [Baird & Hende, 1965]. i.e.:

$$\rho = \rho(R, a, L) \rightarrow d\rho = \left| \frac{\delta\rho}{\delta R} dR \right| + \left| \frac{\delta\rho}{\delta a} da \right| + \left| \frac{\delta\rho}{\delta L} dL \right| \rightarrow d\rho = \frac{a}{L} (dR + \frac{R}{a} da + \frac{R}{L} dL) \quad (4)$$

La incertidumbre relativa propagada, se obtuvo simplemente por el cociente de las dos ecuaciones anteriores, resultando en la suma de las incertidumbres relativas de las variables:

$$\frac{d\rho}{\rho} = \frac{dR}{R} + \frac{da}{a} + \frac{dL}{L} \quad (5)$$

Ya con los antecedentes anteriores, se tomó la biopelícula de quitina en forma de ortoedro y se midieron sus dimensiones con un vernier marca Mitutoyo, modelo 530-312, de 0.02 mm de resolución (i.e., con incertidumbre absoluta $dL = \pm 0.01$ mm en toda su escala), obteniendo 36.57 mm de largo, 2.40 mm de ancho y 0.27 mm de espesor; de donde su área seccional resultó ser $a = 0.6480 \pm 0.0267$ mm².

Posteriormente, se intentó medir directamente su resistencia con el óhmetro de un multímetro marca Steren, modelo MUL-600 (capaz de medir hasta 40 M Ω), a fin de obtener su resistividad mediante la Ecuación. 3, pero dicho instrumento mostró lectura saturada (resistencia muy elevada), lo que condujo a suponer que tal biopelícula debería tener una resistencia superior a 120 M Ω , ya que también se intentó la medición directa de tres trozos similares en paralelo.

Por lo anterior, se decidió determinar la resistencia de la biopelícula de quitina según se anticipó al principio de la página anterior; es decir, sometiéndola a voltajes en el orden de decenas de kilovolts y tratar de registrar corrientes en el orden de nanoamperes, a fin de poder alcanzar hasta el orden de decenas de teraohms que muy probablemente cubrirían el valor esperado en dicha muestra de la quitina. Tal proceso de medición (con precisión aceptable) no es muy común, por lo que se describe con mayor detalle en los apartados siguientes.

Verificación de la calibración de los equipos e instrumentos de medición

En el laboratorio donde se desarrolló este trabajo, se cuenta con una fuente de alto voltaje marca Gamma High Voltage Research, mod. HVR RR30-20R, la cual es regulada, puede suministrar hasta 30 mA de corriente y su voltaje es variable en el intervalo de 0 a 30 kV mediante un helipot de 10 vueltas con vernier, que permite establecer valores de dicho parámetro con resolución de 0.2 % (± 30 V de incertidumbre fija en todo el intervalo de voltajes). También tiene linealidad elevada (coeficiente de correlación $r = 0.99999$), aunque su carátula indicadora de voltaje tiene una incertidumbre de ± 250 V, por ser de tipo analógico con partición mínima de escala de 500 V.

Cuando tal fuente se utiliza para mediciones más precisas (como este caso), se le conecta el voltímetro de un multímetro digital (aquí se usó uno de 3½ dígitos, marca Steren, mod. MUL-050, con incertidumbre de $\pm 0.5\%$ de la lectura + 1 dígito), generalmente acoplado con una punta atenuadora marca Simpson, mod. 00168, con factor de atenuación nominal 1000:1 y 2 % de tolerancia; y usualmente se revisa la calibración de esta última antes de las mediciones de interés, a fin de mejorar su precisión; i.e., para disminuir en lo posible el error involucrado en las mediciones de los altos voltajes. Así, inicialmente se armó el montaje mostrado en la Figura 18, estableciendo 10 valores distintos de voltaje en dicha fuente, comprendidos en el intervalo de 0 a 900 volts, los cuales fueron medidos por dicho voltímetro tanto directamente (V_M) como a través del atenuador (V_{At}), usando el selector mostrado en la Figura 18.

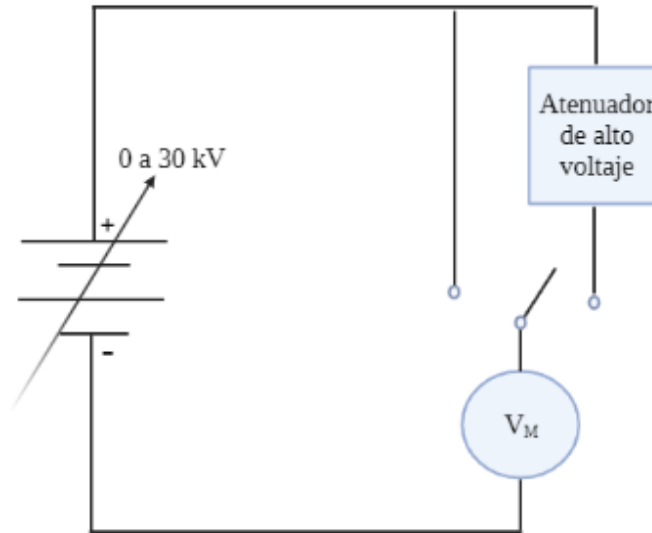


Figura 18. Circuito para verificar la calibración del atenuador de alto voltaje y la linealidad de la fuente.

En la Tabla 10 se muestran los valores registrados de dichos parámetros (V_M y V_{At}), incluyendo la incertidumbre absoluta de los voltajes medidos directamente (dV_M), además de los resultados obtenidos al aplicar una regresión lineal a V_M como función de V_{At} (parte inferior de la tabla), ya que la punta atenuadora sólo debe involucrar un coeficiente constante ($1/m$) de reducción del voltaje de la fuente al momento de su medición; es decir, se debe cumplir que $V_{At} = V_M/m$ y según el fabricante de la punta, el valor de m debe ser $1000 \pm 2\%$.

Tabla 10. Mediciones de voltajes con y sin el atenuador, para verificar la confiabilidad de la fuente y el atenuador.

No. de medición	V_M [volts]	dV_M [volts]	V_{At} [volts]
1	134	1.670	0.136
2	197	1.985	0.200
3	261	2.305	0.265
4	332	2.660	0.337
5	381	2.905	0.386
6	465	3.325	0.472
7	505	3.525	0.512
8	562	3.810	0.571
9	625	4.125	0.635
10	682	4.410	0.692
Pendiente de V_M en función de V_{at} : $m = 984.881719$ Ordenada al origen $V_M(0)$: $b = 0.158749$ Coeficiente de correlación: $r = 0.999997$			

De la regresión lineal se deduce la expresión: $V_M = m V_{At} + b$, en la que el valor de la pendiente no fue precisamente 1000, pero quedó dentro del intervalo de tolerancia especificado por el fabricante de la punta atenuadora de alto voltaje; es decir, $m \approx 984.88 \in [980, 1020]$ e inclusive $m = 985$ es una buena aproximación que permite despreciar el error involucrado por la punta y considerar como incertidumbre de las medidas de los altos voltajes, sólo a la debida al voltímetro utilizado ($\pm 0.5\%$ de la lectura + 1 dígito).

La ordenada al origen $b \approx 0.16$ volts, que idealmente debería haber resultado nula, muy probablemente se debió a la rutina de redondeo del voltímetro por el rango utilizado (1000 V) en las mediciones directas; sin embargo, tal valor es despreciable aún comparado con la menor de las incertidumbres de la tabla (1ª medición).

El coeficiente de correlación obtenido en la regresión lineal ($r = 0.999997$), confirmó la muy buena linealidad de la fuente de alto voltaje, por lo que no se esperaron cambios de su comportamiento al usarse con valores de V_M en el orden de decenas kilovolts, los cuales fueron registrados como lecturas de V_{At} y la conversión se hizo con la simple expresión: $V_M = 985 V_{At}$.

Evaluación indirecta de la resistencia de la biopelícula de quitina

Finalmente, la biopelícula de quitina antes mencionado se evaluó con el arreglo mostrado en la Figura 19, donde el micro-amperímetro necesario al registro de la corriente I_Q (con sensibilidad de nano-amperes), tuvo que ser implementado con una resistencia de precisión (1 M Ω al 1% de tolerancia) acoplada a un segundo voltímetro de 5½ dígitos, marca Schlumberger, mod. 7150plus, con impedancia mayor a 10 G Ω en el rango utilizado (0.2 volts) e incertidumbre de 0.2 % de la lectura + 3 dígitos. Así, cada lectura resultó análoga a la corriente I_Q en μA , ya que de la ecuación 1 se deduce $[I] = [V] / (10^6 \Omega) = [V/\Omega] \times 10^{-6} = [\mu A]$; y en cuanto a la propagación de incertidumbres se cumple que $dI_Q = (dV_{M2} + 0.01V_{M2}) [\mu A]$, o bien en forma relativa: $dI_Q/I_Q = dV_Q/V_Q + 0.01$.

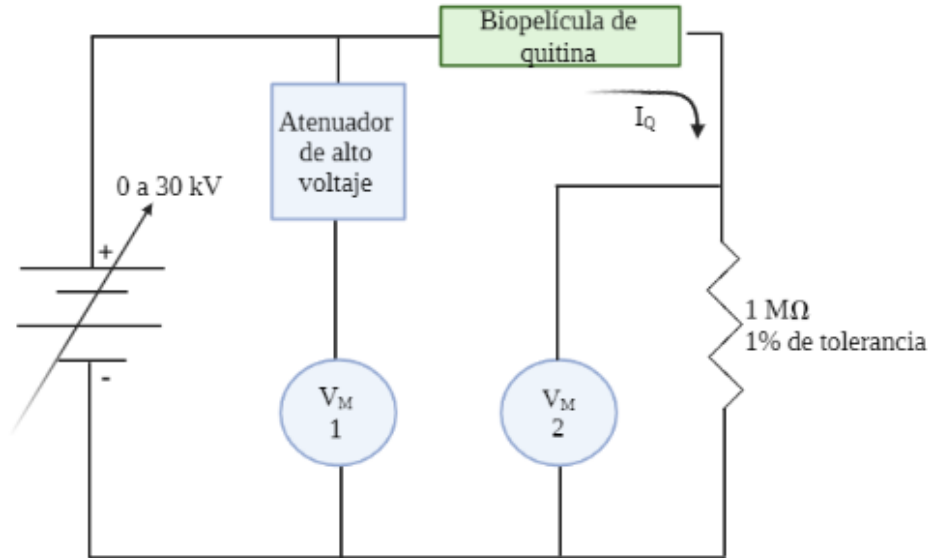


Figura 19. Circuito para aplicar altos voltajes a la biopelícula de quitina (en el orden de decenas de kV) y registrar corrientes con sensibilidad de nano-amperes.

En la Tabla 11 se muestran 7 mediciones efectuadas con el circuito de la Figura 21, donde los datos de la 2ª columna son los voltajes medidos mediante la punta atenuadora (V_{M1}), los cuales se multiplicaron por el factor 985 para conocer los altos voltajes aplicados a la biopelícula de quitina (3ª columna). La 5ª columna contiene las corrientes respectivas a través de la biopelícula, que fueron medidas con el segundo voltímetro (V_{M2}) configurado como micro-amperímetro. Las incertidumbres absolutas de esos voltajes y corrientes se muestran respectivamente en las columnas 4 y 6.

En la parte derecha de la Tabla 11 (columnas 7 a 10) se encuentran la resistencia de la biopelícula de quitina (R_Q) y la resistividad de esta última (ρ_Q), que fueron calculadas con sus incertidumbres relativas porcentuales correspondientes, a partir de las mediciones antes mencionadas.

Tabla 11. Valores de los voltajes y corrientes aplicados a la biopelícula de la quitina (con sus incertidumbres absolutas respectivas), así como la resistencia y resistividad calculadas, incluyendo las incertidumbres relativas porcentuales propagadas.

No. de med.	V_{At} [V]	V_Q [kV]	dV_Q [kV]	$V_{M2@I_Q}$ [μA]	dI_Q [μA]	R_Q [$T\Omega$]	dR_Q/R_Q [%]	ρ_Q [$\Omega \cdot m$]	$d\rho_Q/\rho_Q$ [%]
1	10.26	10.106	0.052	0.00101	0.000032	10.006	3.68	1.773×10^8	4.18
2	11.42	11.249	0.057	0.00198	0.000034	5.681	2.22	1.007×10^8	4.19
3	12.41	12.224	0.062	0.00300	0.000036	4.075	1.71	0.722×10^8	4.19
4	14.16	13.948	0.071	0.00503	0.000040	2.773	1.30	0.491×10^8	4.19
5	15.82	15.583	0.079	0.00796	0.000046	1.958	1.08	0.347×10^8	4.20
6	17.33	17.070	0.086	0.01109	0.000052	1.539	0.98	0.273×10^8	4.21
7	18.04	17.769	0.090	0.01297	0.000056	1.370	0.94	0.243×10^8	4.22

De los resultados de la Tabla 11, se deduce que la biopelícula de quitina obtenida en este trabajo presenta un comportamiento óhmico, ya que su resistividad ocasiona incrementos o decrementos de corriente ante cambios similares del voltaje aplicado, lo cual se refleja en la resistencia de la misma biopelícula, ya que sus dimensiones no fueron alteradas.

También es claro que la resistividad de la biopelícula de quitina no puede considerarse constante para los intervalos de valores de voltaje y corriente con los que se analizó, ya que los cambios encontrados son evidentemente significativos y apuntan al comportamiento de un varistor no lineal, según se muestra en las gráficas siguientes, donde la resistividad muestra la tendencia a estabilizarse en algún valor cercano a $20 \text{ M}\Omega \cdot \text{m}$, lo cual no se intentó comprobar, ya que para ello había que usar magnitudes mayores del alto voltaje aplicado, con la posibilidad de alcanzar el rompimiento eléctrico abrupto de la biopelícula y ocasionar daños a la instrumentación.

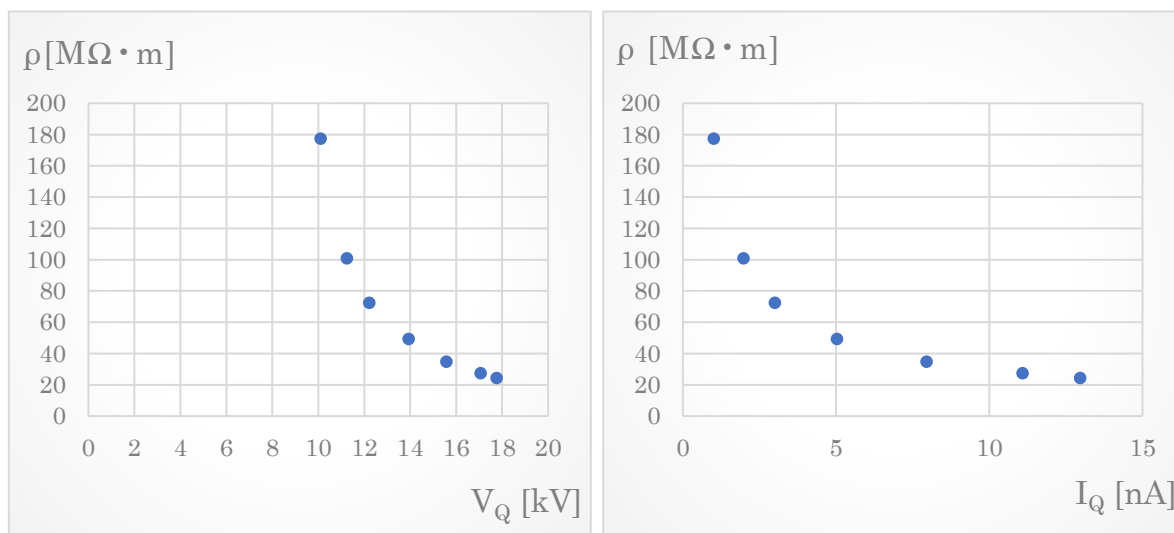


Figura 20. Comportamiento de la resistividad de la biopelícula de quitina ante el voltaje aplicado (gráfica izquierda) y la corriente a través de la misma (gráfica derecha).

Por otra parte, las gráficas anteriores también muestran que la resistividad de la biopelícula de quitina tiende a valores muy elevados cuando el voltaje y la corriente disminuyen. No se lograron obtener más datos experimentales al respecto, por la carencia de medidores o detectores de corriente más sensibles (en el orden de picoamperes o mejor), además de requerirse un montaje experimental más aislado de perturbaciones ambientales (una cámara de vacío, entre otros).

X. Bibliografía

- Abarca L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista iberoamericana de micología*, 17(3): S79–S84.
- Abo Elsoud, M.M., El Kady, E.M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre* 43: 59. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y>
- Baird, D.C., & Hende, W.R. (1965). Experimentation: An Introduction to Measurement Theory and Experiment Design. *American Journal of Physics*, 33, 64-64.
- Bocobo F. & Benham R. (1949). Pigment Production in the Differentiation of *Trichophyton Mentagrophytes* and *Trichophyton Rubrum*. *Mycologia*. 41(3): 291-302. <https://doi.org/10.1080/00275514.1949.12017773>
- Cairns T., Barthel L., & Meyer V. (2021). Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. *Essays in biochemistry*, 65(2): 213–224. <https://doi.org/10.1042/EBC20200139>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7): 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Crini G. (2019). Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters* 17: 1623–1643. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>
- d'Agostino, M. C., Craig, K., Tibalt, E., & Respizzi, S. (2015). Shock wave as biological therapeutic tool: From mechanical stimulation to recovery and healing, through mechanotransduction. *International journal of surgery (London, England)*, 24(Pt B): 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2015.11.030>
- Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3): 411–427.
- Fernández G. (2008). Estudios en vivo sobre la fragmentación de urolitos mediante litotricia extracorporeal tándem. Tesis para médico veterinario zootecnista. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UNAM.

- García-Colín L., Mendoza A., Sandoval A., Santillán A., Soto G., Camacho C., Dehonor M. (2001). Ondas Mecánicas. Notas para el curso de Física Universitaria. Universidad Iberoamericana.
- Gow N., Latge J., & Munro C. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Hajj, S., Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Hajji R., Rinaudo M., Nasri M., & Jellouli K. (2014). Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International journal of biological macromolecules*, 65: 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045>
- Jones, M., Kujundzic, M., John, S., & Bismarck, A. (2020). Crab vs. Mushroom: A Review of Crustacean and Fungal Chitin in Wound Treatment. *Marine drugs*, 18(1): 64. <https://doi.org/10.3390/md18010064>
- Kaur, S. & Dhillon G. (2015). Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. *Critical reviews in biotechnology*. 35(1): 44–61. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798256>
- Knidri H., Dahmani J., Addaou A., Laajeb A., Lahsini A. (2019). Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*. 139: 1092-1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.079>
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 74(1): 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Lárez Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2): 15-21. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93310204>
- López B. (23 de abril de 2019). Células fúngicas: características, organelos y funciones. *Lifeder*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/celulas-fungicas/>
- López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Castaño-González, K., Aceves, C., Fernández, F., Varela-Echavarría, A., & Loske, A. M. (2017). Shock Wave-Induced Damage and Poration in Eukaryotic Cell Membranes. *The Journal of membrane biology*, 250(1): 41–52. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9921-2>

- López R., Méndez L., Hernández F., Castañón L. (2012). *Micología Médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Trillas.
- Loske, A. (2007). *Shock Wave Physics for Urologists*. Universidad del Valle de México.
- Loske M., Fernández F., Magaña-Ortíz D., Coconi-Linares N., Ortiz-Vázquez E., Gómez-Lim A. (2014). Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics*. 54: 1656-1662. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.03.003>
- Lukes P., Fernández F., Gutiérrez-Aceves J. *et al.* (2016). Tandem shock waves in medicine and biology: a review of potential applications and successes. *Shock Waves* 26: 1–23. <https://doi.org/10.1007/s00193-015-0577-0>
- Muzzarelli A. (1997). *Chitin*. Pergamon Press.
- Ngo, T., & Ngo, D. N. (2017). Effects of low-frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin. *International journal of biological macromolecules*, 104(Pt B): 1604–1610. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.117>
- Nitschke J., Altenbach, H., Malolepszy, T., & Mölleken, H. (2011). A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate research*, 346(11): 1307–1310. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.040>
- Ospina S., Ramírez D., Escobar D., Ossa C., Rojas D., Zapata P., & Atehortúa L. (2014). Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *BioMed research international*, 2014: 169071. <https://doi.org/10.1155/2014/169071>
- Peña, M., Delgado-Gonzalez, E., López-Marín, L. M., Millán-Chiu, B. E., Fernández, F., Rodríguez-Castelan, J., Muñoz-Torres, C., Carrasco, G., Anguiano, B., Loske, A. M., & Aceves, C. (2020). Shock Wave Application Increases the Antineoplastic Effect of Molecular Iodine Supplement in Breast Cancer Xenografts. *Ultrasound in medicine & biology*, 46(3): 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.015>
- Roberts G. (1992). *Chitin chemistry*. Macmillan.
- Romsdahl J., Blachowicz A., Chiang Y., Venkateswaran K., & Wang, C. (2020). Metabolomic Analysis of *Aspergillus niger* Isolated From the International Space Station Reveals Enhanced Production Levels of the Antioxidant Pyranonigrin A. *Frontiers in microbiology*, 11: 931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00931>

- Synowiecki J & Al-Khateeb N. (1997). Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60: 605-610. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00039-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00039-3)
- Teng, L., Khor, E., Tan, T., Lim, L., & Tan, S. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate research*, 332(3): 305–316. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(01\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00084-2)
- Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(1): 61–87. <https://doi.org/10.1080/10408690390826455>
- Tsurkan, M. V., Voronkina, A., Khrunyk, Y., Wysokowski, M., Petrenko, I., & Ehrlich, H. (2021). Progress in chitin analytics. *Carbohydrate polymers*, 252: 117204. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117204>
- Curiosoando.com (Actualizado el 15 febrero, 2018). "¿Qué organelos celulares tienen los hongos?". Disponible en <https://curiosoando.com/que-organelos-celulares-hay-en-los-hongos>