



**Casa abierta al tiempo**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL QUITOSANO EN  
SOLUCIÓN Y EN PELÍCULAS”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**Maribel Plascencia Jatomea**  
Matrícula 97381821

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTORA:**

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

**JURADOS:**

Dra. María Mónica Castillo Ortega  
Dr. Gustavo Viniegra González  
Dr. Roberto Olayo González  
Dra. Claudia Patricia Larralde Corona  
Dr. Humberto Vázquez Torres

México, D.F., 2004

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto, a quien de manera especial expreso mi agradecimiento y respeto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONACyT, No. 400200-5-J33566-E.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

**M. en Biotec. Maribel Plascencia Jatomea**

El día 29 de junio de 2004

**Directora de tesis:**

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

**H. Jurado**

Presidente: Dra. María Mónica Castillo Ortega.

Universidad de Sonora, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales.

Secretario: Dr. Gustavo Viniegra González.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Sinodales: Dr. Roberto Olayo González.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Física.

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona.

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.

Dr. Humberto Vázquez Torres.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Física.

# AGRADECIMIENTOS

Cuando hay que expresar por escrito el agradecimiento que uno siente por las personas con las que se ha convivido a lo largo de casi 7 años, incluso más, resulta casi imposible marcar un punto de partida. Por lo menos a mí.

Agradezco primeramente a la Dra. Keiko Shirai, por guiar y dar forma a este trabajo. Gracias mil, Keiko, por tu apoyo incondicional, por los conocimientos transmitidos, por tus consejos y por haber estado siempre al pendiente de mis necesidades. En especial gracias por tu amistad y por haber confiado en mí para la realización de esta tesis.

Al Dr. Gustavo Viniegra y al Dr. Roberto Olayo, por todas las horas que pacientemente dedicaron a esclarecer mis dudas, por sus consejos, sus comentarios y por el apoyo otorgado.

A la Dra. Mónica Castillo, por haber sido usted quien despertó en mí el interés de ir más allá, por haberme enseñado a perseguir y lograr metas sin perderme en el camino, siempre a paso firme, constante y con entereza. Gracias por haberme dado paz en momentos difíciles, gracias por su amistad.

A la Dra. Patricia Larralde y al Dr. Humberto Vázquez, por sus comentarios, sugerencias e interés para la realización de este trabajo. Gracias Paty por tus enseñanzas en el análisis de procesamiento de imágenes y por tus atenciones durante mis visitas al IBT-UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento otorgado a través de la beca CONACyT, mismo que hizo posible la culminación de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros, Laura Ramírez, José Carmen Ramírez y María del Carmen Marín, porque sé que cuento con ustedes, por su amistad y porque siempre están ahí en todo momento. Gracias también a Neith Pacheco, Alejandra Hernández y Cynthia Rodríguez, por confiar en mí. A todos, gracias por su grata compañía durante las jornadas de trabajo.

A Luis Cira y María Luisa Cárdenas, por su amistad desinteresada, por los momentos tan agradables que hemos compartido y porque me aceptan tal como soy. Porque aún estando lejos se preocupan por mí y por haberme enseñado lo que es una verdadera amistad.

A Octavio García y Carmelita Dávila, por su amistad y porque han llegado a ser parte importante de mi familia. Porque la imagen de ustedes permanece latente en mente, haciéndome siempre recordar no solo mi origen, sino también a mis padres.

A la Sra. Ivonne Novoa, por sus cuidados y atenciones durante el tiempo que viví en su casa. Por su amistad, por la confianza que ha depositado en mí y por esa manera tan especial con la que me ha hecho sentir el calor de un hogar. Gracias también a Julio López, July, por tu amistad y compañerismo, por las experiencias compartidas, por tus buenos deseos y porque sé que podemos contar contigo.

# DEDICATORIAS

Porque constituyen una parte fundamental de mi existencia, dedico esta tesis a mis queridos hermanos, Nydia, Xóchitl y Rigoberto, por todo el buen humor que se destila cada vez que nos reunimos, por sus buenos deseos y por todas las experiencias vividas y por vivir.

A Sheyla, Viviana y Mariana, mis amadas sobrinas, por su amor incondicional (excepto en navidad).

A mis padres Rigoberto y Lupita, por la paciencia con la que me inculcaron el amor a Dios.

Porque verlos unidos me hace fuerte.

Porque a través de sus actos he aprendido el significado de constancia y perseverancia.

Por enseñarme a mirar siempre de frente y por enseñarme a pensar antes de actuar.

Porque los admiro y respeto de la misma forma en que los amo.

Porque amo el amor que se profesan y la seguridad del hogar que han formado.

Porque juntos somos un puño bien cerrado

A ti Javier, mi esposo, amigo y complemento.

A ti que eres la parte vital que engrandece mi espíritu.

A ti que impulsas mi mundo, que siempre estás ahí en las buenas y malas.

A ti que compartes mis sueños y ambiciones.

A ti que en incontables ocasiones te desvelaste junto conmigo para que yo pudiera terminar este trabajo. Porque solo tú sabes lo que pienso antes de hablar.

Por el apoyo y la felicidad que me brinda tu compañía.

Porque te amo y porque me siento amada por sobre todas las cosas.

Que Dios te bendiga siempre.

# CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos.....	4
Dedicatorias.....	5
Contenido.....	6
Lista de tablas.....	9
Lista de figuras.....	10
Nomenclatura y ecuaciones.....	13
Resumen.....	15
1. Introducción.....	18
2. Revisión bibliográfica.....	20
2.1 Polímeros naturales.....	20
2.1.1 Definición.....	20
2.1.2 Aplicaciones en la manufactura de materiales.....	21
2.1.3 Ventajas sobre los polímeros sintéticos.....	21
2.2 Quitosano.....	22
2.2.1 Estructura química.....	22
2.2.2 Obtención.....	23
2.2.3 Propiedades físico-químicas.....	25
2.2.3.1 Viscosidad.....	25
2.2.3.2 Solubilidad.....	26
2.2.3.3 Biomodificación.....	26
2.2.4 Propiedades antimicrobianas.....	27
2.2.4.1 Modo de acción del quitosano.....	27
2.3 Aplicaciones del quitosano.....	28
2.3.1 Biotecnología de alimentos.....	28
2.3.2 Microencapsulación.....	29
2.3.3 Agente quelante y cromatografía de afinidad.....	29
2.3.4 Resistencia contra patógenos en cultivos.....	30
2.3.5 Terapia de genes.....	31
2.3.6 Hemostasis y tratamiento contra heridas.....	31
2.3.7 Lentes de contacto.....	31
2.3.8 Mucoadhesivos.....	31
2.3.9 Agentes filmogénicos en cosméticos.....	32
2.3.10 Tratamiento de aguas residuales.....	32
2.3.11 Manufactura de papel.....	33
2.4 Uso del quitosano como biomaterial.....	33
2.4.1 Elaboración de películas de quitosano.....	33
2.4.1.1 Evaporación de solventes.....	34
2.4.1.2 Extrusión con polímeros sintéticos.....	34
2.4.2 Propiedades físico-químicas de las películas.....	35
2.4.3 Propiedades antimicrobianas de las películas.....	35
3. Justificación.....	36
4. Antecedentes.....	38
5. Objetivos.....	41

6. Hipótesis.....	42
7. Materiales y métodos.....	43
7.1 Preparación de las disoluciones de quitosano.....	45
7.2 Microorganismos.....	45
7.3 Técnicas de inoculación y fijación.....	46
7.4 Evaluación antifúngica del quitosano utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.....	47
7.4.1 Crecimiento radial.....	47
7.4.2 Diámetro y longitud de las hifas.....	47
7.4.3 Producción de biomasa.....	47
7.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	48
7.4.5 Germinación de esporas.....	48
7.4.5.1 Concentración inhibitoria media (CQ <sub>50</sub> ).....	49
7.4.5.2 Porcentaje de inhibición de la germinación.....	49
7.4.5.3 Estimación de los parámetros de germinación.....	50
7.4.5.4 Energía de activación (E <sub>A</sub> ).....	50
7.4.5.5 Determinación del efecto sinérgico entre quitosano y temperatura.....	51
7.5 Evaluación antifúngica del quitosano utilizando medio de cultivo líquido Czapeck.....	51
7.5.1 Polarización y germinación de esporas.....	51
7.5.1.1 Esporas no germinadas.....	51
7.5.2 Diámetro de las esporas e hifas.....	52
7.5.3 Número de divisiones mitóticas.....	52
7.5.4 Número de septos de las hifas.....	52
7.6 Elaboración de películas de quitosano.....	53
7.6.1 Evaporación de solventes.....	53
7.6.2 Extrusión.....	53
7.6.3 Recubrimiento.....	54
7.7 Caracterización de las películas.....	54
7.7.1 Medición de espesores.....	54
7.7.2 Propiedades mecánicas.....	54
7.7.3 Análisis de morfología (SEM).....	54
7.7.4 Análisis de permeabilidad al oxígeno.....	55
7.8 Evaluación de la actividad antifúngica de las películas de quitosano.....	55
7.8.1 Número de unidades contaminadas.....	55
7.8.2 Acidez.....	56
7.8.3 Índice de rancidez.....	56
7.9 Análisis estadístico.....	56
8. Resultados y discusión.....	57
8.1 Efecto inhibitorio del quitosano sobre el crecimiento apical de <i>Aspergillus niger</i> , utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.....	57
8.1.1 Producción de biomasa.....	57
8.1.2 Crecimiento radial.....	59
8.1.3 Diámetro y longitud de las hifas.....	61
8.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	62
8.2 Efecto inhibitorio del quitosano sobre la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> , utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.....	64
8.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	64
8.2.2 Germinación de esporas.....	64
8.2.3 Concentración inhibitoria media (CQ <sub>50</sub> ).....	67
8.2.4 Porcentaje de inhibición de la germinación.....	67

8.2.5 Estimación de los parámetros de germinación.....	72
8.2.6 Energía de activación ( $E_A$ ).....	74
8.2.7 Determinación del efecto sinérgico entre quitosano y temperatura.....	75
8.3 Efecto inhibitorio del quitosano (CQ <sub>50</sub> ) sobre el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> , utilizando medio de cultivo líquido Czapeck.....	76
8.3.1 Diámetro de las esporas e hifas.....	76
8.3.2 Polarización y germinación de esporas.....	78
8.3.2.1 Esporas no germinadas.....	80
8.3.3 Número de divisiones mitóticas.....	81
8.3.4 Número de septos de las hifas.....	83
8.4 Elaboración de películas de quitosano.....	86
8.4.1 Evaporación de solventes.....	86
8.4.2 Extrusión.....	86
8.4.3 Recubrimiento.....	87
8.5 Caracterización de las películas.....	87
8.5.1 Propiedades mecánicas.....	87
8.5.2 Morfología.....	92
8.5.3 Medición de espesores.....	92
8.5.4 Análisis de permeabilidad al oxígeno.....	94
8.6 Evaluación del efecto antifúngico de las películas de quitosano.....	95
9. Conclusiones.....	99
10. Bibliografía.....	101
Anexos.....	109
Trabajos presentados y publicaciones relacionadas con la tesis.....	130



# LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Propiedades físico-químicas del quitosano.....	25
Tabla 2 Propiedades fundamentales del quitosano comercial.....	26
Tabla 3 Aplicaciones del quitosano.....	29
Tabla 4 Producción de biomasa de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio con diferentes concentraciones de quitosano, incubando a 30°C.....	58
Tabla 5 Diámetros y longitudes promedio de las hifas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio de cultivo sólido Czapeck, adicionado con diferentes concentraciones de quitosano.....	62
Tabla 6 Parámetros estimados mediante ajuste logístico de los datos experimentales de la germinación de esporas en medio de cultivo Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano, incubado a diferentes temperaturas.....	72
Tabla 7 Respuesta inhibitoria aditiva (Ee) obtenida del efecto del quitosano (CQ <sub>50</sub> ) y la temperatura sobre el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> , estimada mediante la ecuación de Limpel.....	75
Tabla 8 Diámetro promedio de las esporas e hifas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio de cultivo líquido Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano e incubado a 30°C, obtenido a diferentes intervalos de tiempos.....	75
Tabla 9 Propiedades mecánicas de las películas de quitosano con y sin plastificantes y dispersante, preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes.....	88
Tabla 10 Propiedades mecánicas de las películas de quitosano con y sin plastificantes y dispersante, preparadas mediante la técnica de extrusión.....	90
Tabla 11 Permeabilidad al oxígeno de las películas de quitosano con y sin plastificantes y dispersante, preparadas mediante evaporación de solventes.....	95
Tabla 12 Rancidez de los quesos inoculados con <i>Penicillium chrysogenum</i> , empacados e incubados a <10°C.....	98

# LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Estructuras químicas de la quitina, el quitosano y la celulosa.....	23
Figura 2 Obtención de quitosano a partir de la desacetilación de la quitina.....	24
Figura 3 Diagrama de flujo de la metodología utilizada.....	44
Figura 4 Esporas de <i>Aspergillus niger</i> , tomadas en microscopio óptico a 40X: a) Polarizadas; b) No germinadas; c) Germinadas.....	49
Figura 5 Efecto del quitosano sobre la producción de biomasa de <i>Aspergillus niger</i> , a 30°C. Las líneas continuas representan los valores estimados mediante ajuste logístico.....	58
Figura 6 Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de quitosano (0 a 5.0 g/L).....	59
Figura 7 Efecto inhibitorio de la concentración de quitosano sobre el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> , a diferentes tiempos de incubación.....	60
Figura 8 Micrografías de <i>Aspergillus niger</i> durante el crecimiento apical, a 30°C: a) Hifa en medio control, a 1700X; b) y c) Hifas periféricas en medio con quitosano a 350 y 3500X, respectivamente; d) Colonia en medio con quitosano, a 45X; e) Hifa periférica en contacto con las partículas en medio con quitosano, a 1700X; f) Partículas encontradas en el medio de cultivo con el biopolímero sin inóculo, a 3000X.....	63
Figura 9 Micrografías SEM de las esporas de <i>Aspergillus niger</i> en la etapa de germinación, a 30°C: a) y b) Esporas germinadas en medio con quitosano, a 1000X y 1500X, respectivamente; c) Esporas germinadas en contacto con las partículas encontradas en medio con el biopolímero, a 2000X; d) y e) Esporas germinadas en medio control, a 1000X y 3000X, respectivamente.....	65
Figura 10 Esporas germinadas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio de cultivo Czapeck adicionado con diferentes concentraciones de quitosano. El porcentaje de esporas germinadas se determinó a 30°C, utilizando la técnica de tinción diferencial con otoluidina: ácido bórico (sección 7.4.5).....	66
Figura 11 Efecto de la concentración de quitosano sobre la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> , y estimación de la cantidad del biopolímero que retarda el 50% de la germinación de esporas (CQ <sub>50</sub> ) del hongo, a 30°C, estimada mediante análisis Probit.....	68
Figura 12 Inhibición de la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en medio de cultivo Czapeck adicionado con diferentes concentraciones de quitosano, a 30°C.....	69
Figura 13 Efecto de la temperatura sobre la inhibición de la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en medio de cultivo Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano (CQ <sub>50</sub> ).....	69
Figura 14 Efecto de la temperatura sobre el máximo porcentaje de germinación de esporas (S <sub>max</sub> ) de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio Czapeck control y con 3.5 g/L de quitosano (CQ <sub>50</sub> ).....	73
Figura 15 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de germinación, k, de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio control y con 3.5 g/L de quitosano (CQ <sub>50</sub> ).....	74

Figura 16 Efecto de la temperatura ( $1/T$ , en grados Kelvin) sobre la velocidad de germinación ( $\ln k$ ) de <i>Asperillus niger</i> inoculado en medio control y con 3.5 g/L de quitosano (CQ <sub>50</sub> ). La energía de activación, $E_A$ , fue calculada utilizando la ecuación de Arrhenius, a partir de las pendientes obtenidas.....	75
Figura 17 Incremento en el diámetro promedio de las esporas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio de cultivo líquido Czapeck control y con 3.5 g/L de quitosano, obtenido a diferentes intervalos de tiempo. Los valores fueron calculados a partir del diámetro de las esporas en el control, a $t = 0$ . Las líneas indican la tendencia del incremento del diámetro de las esporas en medio control (—) y con quitosano (---).....	77
Figura 18 Germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en medios de cultivo líquido Czapeck control, con 1.0 g/L de conservador (benzoato de sodio) y con 3.5 g/L de quitosano, incubados a 30°C.....	79
Figura 19 Efecto de la adición de quitosano (3.5 g/L) y conservador (1.0 g/L de benzoato de sodio) sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> , a 30°C, calculada con respecto al control. Quitosano* indica los datos de inhibición del quitosano calculados con respecto al conservador.....	79
Figura 20 Porcentaje de esporas de <i>Aspergillus niger</i> que permanecieron sin germinar y sin polarizar en medio control, medio con benzoato de sodio como conservador (1.0 g/L) y medio adicionado con 3.5 g/L de quitosano, a 30°C.....	80
Figura 21 Esporas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio con 3.5 g/L de quitosano, incubado a 30°C (a 100X). Los núcleos fueron teñidos con solución de Hoechst 33258 (100 ng/mL), incubados a 30°C....	81
Figura 22 Porcentajes de esporas de <i>Aspergillus niger</i> con 0, 1, 2 y 3 divisiones mitóticas, obtenidos a diferentes tiempos en medio de cultivo líquido Czapeck control, con quitosano (3.5 g/L) y con benzoato de sodio como conservador (1.0 g/L), a 30°C: (♦) Control; (o) Quitosano; (x) Conservador.....	82
Figura 23 Imágenes de microscopía de fluorescencia de las hifas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio control y con quitosano, a 30°C, obtenidas mediante tinción con solución de Blanco de Calcoflúor (10 µg/mL): a) y b) Septos de las hifas de <i>A. niger</i> en medio control, a 100X; b) y c) Esporas e hifas del hongo inoculado en medio con 3.5 g/L de quitosano, a 100X.....	84
Figura 24 Porcentajes de hifas de <i>Aspergillus niger</i> con 0, 1, 2, 3 y 4 septos, obtenidos a diferentes tiempos en medio de cultivo líquido Czapeck control, con quitosano (3.5 g/L) y con benzoato de sodio como conservador (1.0 g/L), a 30°C: (♦) Control; (o) Quitosano; (x) Conservador.....	85
Figura 25 Gráficos de esfuerzo-deformación de las películas preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes.....	89
Figura 26 Gráficos de esfuerzo-deformación de las películas preparadas mediante la técnica de extrusión (Laboratory Mixing Extruder, ATLAS Polymer Evaluation Products, USA).....	91
Figura 27 Morfología de las películas de quitosano preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes: a) Película de 100% quitosano, a 100X; b) Película de 94% quitosano + 6% plastificante, a 100X; c) Película de 75% quitosano + 25% plastificante, a 100X; d) Película de 50% quitosano + 50% plastificante, a 100X; e) y f) Películas de 100 y 75% quitosano + 0 y 25% plastificante, respectivamente, tomadas a 350X.....	93
Figura 28 Morfología de las películas extrudidas de quitosano con polietileno de baja densidad (LDPE), tomadas a 75X: a) Película de LDPE (100%); b) Película de 96% LDPE + 4% quitosano; c) Película de 88% LDPE + 10% quitosano + 2% dispersante (sacarosa).....	94

Figura 29 Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en queso manchego, empacado en diferentes tipos de empaques e incubado a 30°C.....	96
Figura 30 Porcentaje de unidades experimentales empacadas que presentaron contaminación por el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> , a las 48 h después de la incubación, a 30°C.....	96
Figura 31 Porcentaje de unidades experimentales empacadas que presentaron contaminación por el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> , a diferentes tiempos de incubación, a <10°C.....	97
Figura 32 Producción de acidez (expresada como % de ácido láctico) de <i>Penicillium chrysogenum</i> en quesos empacados e incubados a <10°C.....	98

# NOMENCLATURA Y ECUACIONES

## Nomenclatura.

$R_c$	Radio promedio de la colonia obtenido en el control (cm).
$R_i$	Radio de la colonia en medio con quitosano (cm).
$U$	Velocidad de extensión radial de la colonia ( $\mu\text{m/h}$ ).
$X$	Densidad de la biomasa ( $\text{mg/cm}^2$ ).
$X_{\text{máx}}$	Máxima producción de biomasa obtenida (cuando $dX/dt = 0$ ) ( $\text{mg/cm}^2$ ).
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidad específica de crecimiento cuando $X \ll X_{\text{máx}}$ ( $\text{mg/cm}^2$ ).
$X_0$	Valor inicial de la densidad de la biomasa ( $\text{mg/cm}^2$ ).
$T$	Tiempo (h).
$S_c$	Porcentaje de esporas germinadas en el medio control.
$S_i$	Porcentaje de esporas germinadas en el medio con quitosano.
$S$	Porcentaje de esporas germinadas después de un determinado tiempo, $t$ .
$S_0$	Porcentaje inicial de esporas germinadas.
$S_{\text{máx}}$	Máximo porcentaje de esporas germinadas cuando $t \rightarrow \infty$ (%).
$k$	Velocidad de germinación ( $\text{h}^{-1}$ ).
$ID$	Incremento en el diámetro de las esporas ( $\mu\text{m}$ ).
$D_Q$	Diámetro promedio de las esporas en medio con quitosano ( $\mu\text{m}$ ).
$D$	Diámetro promedio de las esporas en medio control ( $\mu\text{m}$ ).
$E_A$	Energía de activación (Ahrrenius).
$R$	Constante universal de los gases, $1.879 \text{ cal/mol K}$ .
$T$	Temperatura (Kelvin).
$E_e$	Efecto aditivo esperado para la estimación de sinergismo (Limpel).

## Ecuaciones.

Efecto del quitosano sobre la inhibición radial de *Aspergillus niger* (Ecuación 1):

$$\text{Inhibición radial (\%)} = \frac{\bar{R}_c - \bar{R}_i}{\bar{R}_c} \times 100$$

Efecto del quitosano sobre la producción de biomasa de *Aspergillus niger* (Ecuaciones 2 y 3):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}}\right) X \quad (2)$$

$$X(t) = \frac{X_{\text{máx}}}{1 + \left(\frac{X_{\text{máx}} - X_0}{X_0}\right) e^{-\mu_{\text{máx}} t}} \quad (3)$$

Efecto del quitosano sobre la inhibición en la germinación de esporas y estimación de los parámetros de la germinación (Ecuaciones 4 y 5):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\bar{S}_c - \bar{S}_i}{\bar{S}_c} \times 100 \quad (4)$$

$$S = \frac{S_{\text{máx}}}{1 + \left(\frac{S_{\text{máx}} - S_0}{S_0}\right) e^{-kt}} \quad (5)$$

Cálculo de las energías de activación (Ecuación 6):

$$k = A e^{-\left(\frac{E_A}{RT}\right)}$$

Estimación del sinergismo entre temperatura y quitosano (Ecuación 7):

$$Ee = X + Y - \left(\frac{XY}{100}\right)$$

Efecto del quitosano sobre el número de esporas no germinadas de *Aspergillus niger*, calculado a partir de los datos experimentales de polarización y germinación (Ecuación 8):

$$\text{ENG} = 200 - (\text{EG} + \text{EP})$$

Incremento en el diámetro de las esporas de *Aspergillus niger* inoculado en medio con quitosano (Ecuación 9):

$$\text{ID } (\mu\text{m}) = D_Q - \bar{D}$$

# RESUMEN

En el presente proyecto de tesis doctoral se estudió el efecto antifúngico de soluciones y películas de quitosano sobre el crecimiento de hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*. En este documento se muestra información acerca de la importancia del quitosano como polímero natural, así como también de sus fuentes de obtención, características, aplicaciones y propiedades antimicrobianas (Capítulo 2). Los resultados obtenidos se presentarán en las siguientes etapas fundamentales:

1. Efecto inhibitorio del quitosano sobre el crecimiento apical y la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck (Capítulos 8.1 y 8.2).
2. Efecto inhibitorio del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre la polarización y germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo líquido Czapeck (Capítulo 8.3).
3. Elaboración y caracterización de películas de quitosano (Capítulo 8.4 y 8.5).
4. Evaluación antifúngica de películas de quitosano sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* (Capítulo 8.5.5).

## **Etapas 1. Efecto inhibitorio del quitosano sobre el crecimiento apical y la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.**

En esta etapa se realizaron diversos estudios para determinar el efecto antifúngico del biopolímero sobre la germinación de esporas y el crecimiento apical de *Aspergillus niger* mediante experimentos in vitro, a 30°C, en donde se determinó la capacidad inhibitoria del quitosano sobre el crecimiento radial, diámetros y longitudes de las hifas y producción de biomasa. Asimismo se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido en ambas fases de crecimiento (germinación de esporas y crecimiento apical) (Capítulo 8.1).

Si bien es cierto que existen numerosos reportes relacionados con el estudio del efecto del quitosano sobre el crecimiento de hongos filamentosos, la mayoría describe el efecto del biopolímero sobre el crecimiento apical de diferentes tipos de hongos. No obstante, considerando que las alteraciones pueden ocurrir desde que el microorganismo se ha puesto en contacto con el alimento y de acuerdo a los resultados obtenidos, en este trabajo se realizaron experimentos posteriores sobre el estudio del efecto combinado del quitosano y temperatura de incubación (12, 17, 22, 25 y 37°C) sobre la germinación de

esporas de *A. niger* (Capítulo 8.2). Las determinaciones realizadas fueron las siguientes: concentración inhibitoria media (CQ<sub>50</sub>), porcentaje de inhibición de la germinación, estimación de los parámetros de germinación (S, S<sub>0</sub>, S<sub>max</sub> y k), cálculo de la energía de activación y efecto sinérgico entre el biopolímero y la temperatura.

Todos los experimentos fueron realizados utilizando placas con agar Czapeck y los resultados obtenidos indicaron que la utilización quitosano a un nivel relativamente bajo (<3.5 g/L) es una alternativa viable al empleo de los compuestos químicos que se adicionan para inhibir el desarrollo de microorganismos en alimentos, obteniendo resultados significativamente mejores al combinar el biopolímero con temperaturas de refrigeración y atmósferas modificadas.

### **Etapa 2. Efecto inhibitorio del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre la polarización y germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo líquido Czapeck.**

En la segunda etapa del trabajo se presentará un análisis acerca del efecto del quitosano sobre la polarización y germinación de esporas de *Aspergillus niger* (Capítulo 8.3.2), así como de los parámetros morfométricos (diámetros de las esporas y de las hifas), utilizando análisis de microscopía de imágenes (Capítulo 8.3.1). En un estudio más detallado se determinó la actividad antifúngica del biopolímero sobre el proceso de divisiones mitóticas de las esporas y la septación de las hifas de *Aspergillus niger*, utilizando microscopía de fluorescencia (Capítulos 8.3.3 y 8.3.4). Los resultados demostraron que el quitosano afecta el crecimiento de *A. niger* a nivel de división nuclear, alterando fuertemente el diámetro promedio de las hifas y el proceso de septación del hongo.

### **Etapa 3. Elaboración y caracterización de las películas de quitosano.**

En esta etapa de la tesis se detallarán los estudios relacionados con la elaboración (Capítulo 8.4) y caracterización mecánica de las películas elaboradas a base de quitosano, ya sea solo o en combinación con otros materiales naturales (sorbitol, sacarosa) o sintéticos (polietileno de baja densidad), utilizando las técnicas de evaporación de solventes y extrusión, respectivamente (Capítulo 8.5). Las películas fueron caracterizadas en cuanto a sus propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación, morfología (utilizando análisis de microscopía electrónica de barrido) y permeabilidad al oxígeno; de ésta última solo se discutirán los resultados de las películas obtenidas por la técnica de evaporación.



#### **Etapa 4. Evaluación antifúngica de películas de quitosano sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*.**

En la última etapa del trabajo experimental se presentarán los resultados obtenidos al evaluar la actividad antifúngica de las películas de quitosano preparadas mediante evaporación de solventes (Capítulo 8.5.5). Para lo anterior se llevaron a cabo experimentos in vivo en donde se prepararon empaques, los cuales se utilizaron para guardar piezas de queso manchego comercial inoculadas con esporas de *Aspergillus niger* (a 30°C); los parámetros evaluados fueron crecimiento radial y porcentaje de unidades experimentales contaminadas. Con base en los resultados obtenidos, se diseñó un experimento posterior en donde se evaluó el efecto de las películas sobre el crecimiento de *Penicillium chrysogenum*, seleccionado en base a su mayor incidencia para desarrollarse en el producto alimenticio utilizado, con respecto a *A. niger*. La temperatura de incubación utilizada fue de <10°C (refrigeración), evaluando el porcentaje de unidades experimentales contaminadas, acidez e índice de rancidez.

Al analizar los resultados se encontró que el estudio de las películas elaboradas a base de mezclas de quitosano con otros materiales, naturales o sintéticos, resulta ser un tópico de gran interés en la búsqueda de nuevos materiales que combinen las características antimicrobianas del primero y las propiedades flexibles de los últimos, para su aplicación como materiales de empaques para alimentos. Asimismo, el empleo del quitosano como biomaterial permitiría ofrecer una alternativa potencial al uso indiscriminado de materiales sintéticos, los cuales no son biodegradables y ocasionan graves problemas ambientales.

# 1. INTRODUCCIÓN

El quitosano es un biopolímero obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, la cual es un biopolímero unido por enlaces 1-4 de la N-acetil-D-glucosamida y se produce en grandes cantidades en la naturaleza, siendo el más abundante después de la celulosa; se ha estimado que la producción anual de la quitina es de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  toneladas y los desechos de crustáceos son las mejores fuentes de este material, aunque también puede encontrarse en las paredes celulares de microorganismos y plantas. A diferencia de la quitina, el quitosano se caracteriza por poseer una carga positiva, la cual le confiere potenciales aplicaciones en diversos campos de investigación. Este biopolímero es biodegradable, no tóxico y biocompatible para humanos y para la mayoría de los animales (Felse y Panda, 1999).

Asimismo se ha demostrado que el quitosano posee propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos. Algunos autores han reportado que el grupo amino en la posición del carbono 2 del residuo de glucosamina es el que le da la característica antimicrobiana al quitosano, siendo por ello que este biopolímero se ha empleado en solución para inhibir el crecimiento de microorganismos como *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y patógenos post-cosecha comunes, además de que se ha reportado que disminuye el crecimiento de los hongos *Trichophyton equinum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger* (Hirano y Nagao, 1989; El Ghaouth y col., 1991; Plascencia y col., 2003). Con base en lo anterior, es importante el estudio detallado de las propiedades antimicrobianas del biopolímero, utilizando otras formas de aplicación del quitosano.

Estudios in vivo han demostrado que el quitosano es capaz de formar películas impermeables al oxígeno y al dióxido de carbono y también se ha reportado que, en tejidos vegetales, este biopolímero es capaz de actuar como un inductor de la síntesis de enzimas de defensa (por ejemplo quitinasas y glucanasas) que degradan las paredes celulares de hongos, además de otras moléculas de defensa como compuestos fenólicos, fitoalexinas y pisatina (Hirano y Nagao, 1989; El Ghaouth y col., 1991; Benhamou, 1992; Benhamou y col., 1994; Krochta y col., 1994; El Ghaouth y col., 1997; Zhang y Quantick, 1998; Reddy y col., 1999). Asimismo, se han estudiado las propiedades antimicrobianas del quitosano en películas con polímeros tales como celulosa, y se reporta un aumento en la inhibición del crecimiento de microorganismos como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton equinum*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa* (Seo y col., 1997; Shin y col., 1997; Shin y col., 1999).

Por otro lado, considerando que durante los últimos 20 o 30 años se ha incrementado notablemente el uso de plásticos como materiales de empaque para alimentos, debido a su costo relativamente bajo y a su fácil moldeo (Bosquez y Colina, 1999), la combinación de quitosano con otros materiales es una vía que puede permitir la obtención de una inmensa gama de materiales de empaque flexibles, semirrígidos y/o rígidos. En este sentido, las principales características que deben tomarse en cuenta para elaborar los empaques son: a) Propiedades de permeabilidad al oxígeno, al vapor de agua, a otros gases o a compuestos volátiles, b) Estabilidad física frente a cambios de temperatura, humedad, etc., c) Sellado, d) Resistencia a las grasas, e) Resistencia a factores mecánicos como la tensión, corte o punciones, f) Transmisión de olores y sabores al alimento, g) Apariencia y transparencia y h) Costo (Bosquez y Colina, 1999).

De acuerdo con Krochta y col. (1994), las películas de quitosano presentan una velocidad de transferencia de vapor de agua de 0.8 mg agua/cm<sup>2</sup>/hr, mientras que la permeabilidad para O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> varía de acuerdo al porcentaje de humedad ambiental (H). Por debajo de 70% H, la película es impermeable a ambos gases, pero a valores de 100% H, penetran 44 µL de O<sub>2</sub> y 3 µL de CO<sub>2</sub> por cada cm<sup>2</sup> de película/hora. La absorción de agua abre la estructura de la película y facilita el transporte de gases que son solubles en agua.

De igual forma, varios investigadores han estudiado la elaboración de materiales a partir de mezclas de quitosano con distintos polímeros tales como celulósicos, polivinil alcohol (PVA), polietileno (LDPE), polipropileno (PE), polietilentereftalato (PET) y óxido de polietileno (PEO), teniendo como objetivo principal la biodegradabilidad (Kweon y Kang, 1999; Hosokawa y col., 1990; Ratajska y Boryniec, 1999; Piekielna y col., 1997; Wiczorek y Mucha, 1997; Arvanitoyannis y col., 1997).

Lo anterior muestra la posibilidad de mezclar quitosano con distintos polímeros para crear materiales que, además de presentar buenas propiedades mecánicas, posean propiedades antimicrobianas para que sean aplicables en la elaboración de empaques. Ambos aspectos no han sido ampliamente explorados en forma conjunta y, por lo tanto, merecen ser estudiados.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Polímeros naturales.

#### 2.1.1 Definición.

Los polímeros han existido en forma natural desde el inicio de la vida, y aquellos tales como DNA, RNA, proteínas y polisacáridos juegan un papel crucial en animales y vegetales. Desde la antigüedad, el hombre ha explotado los polímeros naturales para proveerse alimento, ropa, abrigo, armas, materiales de escritura y otros requerimientos. Sin embargo, comúnmente se acepta el hecho de que el origen de la industria polimérica actual dio inicio en el siglo XIX, cuando se hicieron importantes descubrimientos con respecto a la modificación de ciertos biopolímeros (Young y Lovell, 1991).

Como tal, la ciencia de los polímeros apareció por primera vez en 1930, seguida de un gran desarrollo tecnológico. En general, la ciencia de los materiales poliméricos o macromoléculas se divide en materiales biológicos y no biológicos, cada uno de las cuales es de gran importancia. Los polímeros biológicos constituyen una parte fundamental de la vida y proveen la mayor parte de los alimentos consumidos por el humano, mientras que los no biológicos son empleados para elaborar materiales plásticos sintéticos (Billmeyer, 1984).

En términos estrictos, un polímero es una sustancia compuesta de moléculas con largas secuencias de una o más especies de átomos o grupos de átomos ligados entre sí por enlaces primarios, usualmente covalentes. En esta definición, el énfasis acerca de tal sustancia es remarcar que aunque las palabras polímero y macromolécula son empleadas indistintamente, la última define estrictamente las moléculas de las cuales se forma el compuesto. Las macromoléculas están formadas por la unión de moléculas monoméricas a través de reacciones químicas, proceso conocido como polimerización. Asimismo, las macromoléculas pueden tener una estructura lineal representada por una cadena con 2 extremos finales, una estructura ramificada o bien, pueden encontrarse formando redes poliméricas con estructuras tridimensionales (Billmeyer, 1984; Young y Lovell, 1991).

La longitud de las cadenas varía de acuerdo al número de unidades existentes en la molécula, lo cual se conoce como grado de polimerización. Conforme aumenta el grado de polimerización, la sustancia se hace grasienta, luego cerosa y finalmente sólida, cuando el grado de polimerización es alrededor de 1000; es entonces cuando se habla de un verdadero polímero (Anderson y col., 1978; Billmeyer, 1984).

### **2.1.2 Aplicaciones en la manufactura de materiales.**

Actualmente, el empleo de los polímeros naturales en la manufactura de materiales avanzados se ha vuelto un tópico de interés. La naturaleza por sí misma ha hecho buen uso de los biopolímeros estructurales, como por ejemplo la celulosa y la quitina, con las cuales se han producido fuertes fibras poliméricas (Shogren y Bagley, 1999). No obstante, muchas de las aplicaciones de los polímeros naturales se han perdido de vista debido al competitivo mundo de los materiales sintéticos, cuyas propiedades pueden ser modificadas de acuerdo a las necesidades.

A diferencia de los materiales naturales, los polímeros petroquímicos poseen propiedades independientes, ya que el peso molecular, el grado de ramificación y el tipo de grupos funcionales existentes en la cadena pueden ser controlados y modificados rápidamente de una manera sencilla. Sin embargo, en algunos casos, las modificaciones químicas de determinados polímeros naturales pueden dar como resultado la obtención de materiales con características de particular interés.

### **2.1.3 Ventajas sobre los polímeros sintéticos.**

En años recientes, la situación socio-económica ha cambiado de tal modo que el valor de los polímeros naturales vuelve a ser de consideración para muchas aplicaciones. En primer lugar, los derrames de petróleo, la disponibilidad finita y los altos precios del mismo, han forzado a la búsqueda de fuentes alternas y renovables para elaborar materiales; en segundo lugar, los materiales sintéticos son resistentes a la biodegradación, además de que cuando se desechan de manera inapropiada causan severos daños en la ecología, incluyendo animales marinos como tortugas, aves y otras formas de vida; de igual forma, los compuestos recalcitrantes se acumulan en el medio ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas anuales (Niño y col., 1999; Wu y col., 2002). Aunado a lo anterior, el reciclado de los polímeros sintéticos tiene un costo elevado, requiriéndose de incineradores especiales o contenedores de diferentes colores de acuerdo al origen, color y aditivos presentes en el material desechado (Hosokawa y col., 1990; Ratajska y Boryniec, 1999).

Los materiales plásticos más utilizados son el polietileno lineal de baja densidad y los copolímeros como el etilen-vinil acetato. Por mencionar un ejemplo de aplicaciones, estos polímeros son ampliamente utilizados en la agricultura, en donde absorben grandes cantidades de pesticidas y otros compuestos químicos que son rociados sobre los cultivos; lo anterior propicia problemas de contaminación al desecharlos, ya que los compuestos químicos migran a la parte externa del material, depositándose sobre cualquier superficie, incluyendo el agua (Nerón y Batlle, 1999).

La incorporación directa de agentes químicos sobre la superficie de los alimentos es un método comúnmente utilizado para inhibir el crecimiento microbiano; asimismo, el empleo de películas poliméricas incorporadas con agentes químicos antimicrobianos puede permitir que el compuesto migre lentamente hacia la superficie del alimento, ayudando de ese modo a mantener altas concentraciones del antimicrobiano en donde se necesite (Ouattara y col., 2000). No obstante, estos métodos pueden resultar ineficientes ya que son laboriosos y las sustancias activas pueden difundirse rápidamente dentro del mismo alimento, además de que los agentes antimicrobianos tienen que ser previamente disueltos en solventes adecuados, o mezclados con diluyentes en polvo antes de ser utilizados (Weng y col., 1997), sin olvidar mencionar los problemas relacionados con los desechos generados una vez que los materiales plásticos han cumplido con su función.

Con base en lo anterior, el empleo de materiales naturales es un tópico de gran interés debido a su biodegradabilidad y baja o nula toxicidad, además de los bajos costos requeridos al desecharlos. Los carbohidratos y las proteínas son los materiales naturales más comunes y abundantes, siendo el quitosano uno de los mejores ejemplos, ya que posee un elevado potencial para la obtención de polímeros funcionales con múltiples y versátiles aplicaciones (Li y col., 1997; Wu y col., 2002).

## **2.2 Quitosano.**

### **2.2.1 Estructura química.**

El quitosano es un polisacárido catiónico de gran interés en la industria bioquímica y de alimentos. Es el derivado desacetilado más importante de la quitina, la cual químicamente es una molécula análoga a la celulosa; el monómero de la quitina es el 2-acetoamida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa, mientras que el del quitosano es el 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa con uniones  $\beta$ -(1-4) (Figura 1) (Shirai, 1996).

La diferencia entre ambos biopolímeros es arbitraria debido a que las formas completamente acetiladas o desacetiladas no existen en la naturaleza, ni como productos finales en un proceso; por tal motivo, en la práctica se le llama quitina al polímero que presenta mayor acetilación y quitosano al más desacetilado (Hansen y Llanes, 1994). La presentación comercial de ambos es en forma de polvo, hojuelas, fibras, láminas y lechos.

Actualmente se ha observado un creciente interés relacionado con el uso de quitina y quitosano debido a que son materiales 100% naturales y pueden tener distintas aplicaciones en el mercado. Japón es el productor líder, siendo Kyowa Yushi Inc. (Chiba, Japón) la primera en producir quitosano a nivel

industrial. A partir de entonces otras compañías japonesas, estadounidenses y de otros países se han encargado de su industrialización; por ejemplo, Kyokuyo Company (Tokio, Japón), Polypate (Calcuta, India) a partir de camarón, Kypro Company (Seattle, E.U.A) a partir de cangrejo, Fisheries Central Board (Szeczin, Polonia) a partir de krill y esqueleto de calamar, Bioshell Products (Albany, E.U.A.) y Novachem (Halifax, Canadá).

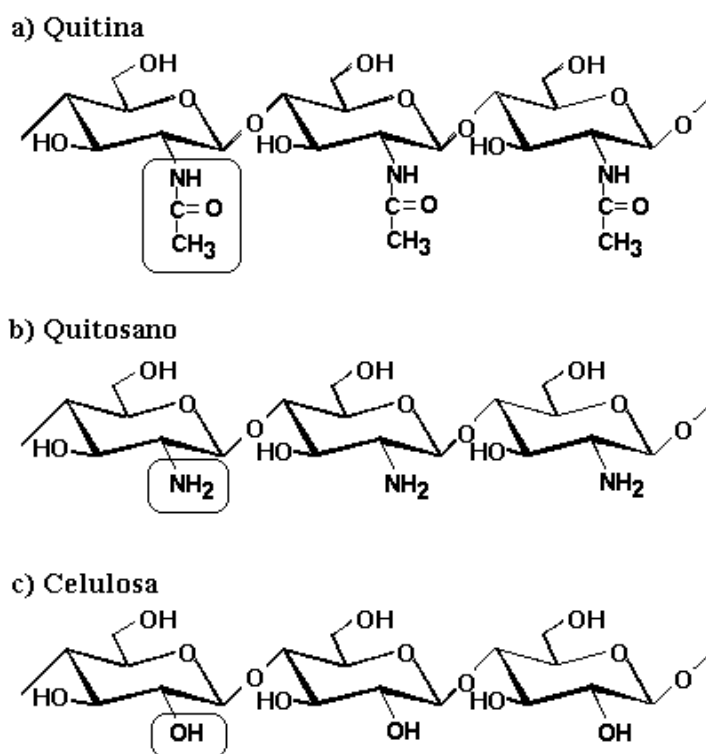


Figura 1. Estructuras químicas de la quitina, el quitosano y la celulosa.

Ambos productos son compuestos de interés comercial debido a su elevado contenido de nitrógeno (6.89%), el cual hace que el quitosano se comporte como un agente quelante potencial (Simpson y col., 1994). El mercado mundial de quitina se estima en 2000 toneladas anuales; Japón es el principal consumidor (700,000 kg anuales), seguido por Europa (250,000 kg anuales) y Estados Unidos (100,000 kg anuales), siendo el primero el único cuyo producto está aceptado para ser utilizado en alimentos (Tombs y Harding, 1998).

### 2.2.2 Obtención.

El quitosano fue descubierto en 1859 por Rouget (Li y col., 1997), quien obtuvo quitina desacetilada al hervir las hojuelas en una solución de hidróxido de potasio concentrada. La quitina es el componente

estructural que proporciona rigidez a las cutículas de insectos, exoesqueletos de crustáceos y paredes celulares de hongos. Comercialmente, ésta se obtiene de las cáscaras, conchas y caparazones de crustáceos mediante una desmineralización con ácidos diluidos, seguida de una desproteínización con álcalis a temperatura moderada (Shirai y col., 1996; Tharanathan y Kittur, 2003), aunque otra fuente de obtención es el micelio de champiñones y de algunos hongos, que pueden contener hasta un 20% de quitina.

Para producir quitosano en forma comercial a partir de quitina marina, los desechos de crustáceos son desmineralizados con HCl; enseguida las proteínas son removidas mediante tratamiento enzimático con proteasas (pepsina o tripsina) o bien utilizando solución de NaOH al 5%, a 90°C, mientras que la despigmentación se realiza con peróxidos. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de desacetilación controlada utilizando álcalis concentrados y altas temperaturas, el cual, a la fecha, sigue siendo el método químico tradicional para obtener quitosano (Figura 2) (Ockerman, 1992). Convencionalmente la desacetilación se lleva a cabo en un 80-85%, aunque puede variar debido a que el tratamiento alcalino origina además una despolimerización de la quitina, la cual es monitoreada por una caída en la viscosidad (Tombs y Harding, 1998).

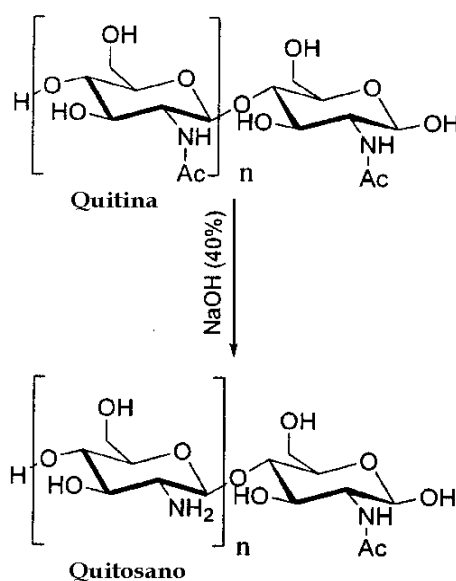


Figura 2. Obtención de quitosano a partir de la desacetilación de la quitina.

Los crustáceos contienen principalmente  $\alpha$ -quitina, la cual es la forma más abundante y común de este biopolímero en la naturaleza. Se estima que la producción anual de desechos de camarón es alrededor de  $5.12 \times 10^6$  toneladas cúbicas (Shahidi y col., 1999), mientras que la cantidad de quitina producida se ha



estimado en 1,560 millones de toneladas al año. El contenido de quitina en los desechos de crustáceos es de 15-30%, dependiendo de la especie y de la época estacional (Agulló y col., 2003; Tombs y Harding, 1998).

### 2.2.3 Propiedades fisicoquímicas.

El quitosano es un producto biodegradable, no antigénico y no tóxico. Aunque han sido pocos los estudios que han documentado acerca de la conformación molecular del quitosano, un análisis de difracción de rayos X reveló que posee una estructura similar a la de la  $\alpha$ -quitina (Averbach, 1975 (citado por Li y col., 1997)). Aunque el quitosano existe formando una sola cadena, la repulsión entre las cargas hace que la molécula adopte una estructura rígida lineal cuando se encuentra en solución (Tombs y Harding, 1998).

**2.2.3.1 Viscosidad.** La viscosidad de las soluciones se ve influenciada por diversos factores como el grado de desacetilación, el peso molecular, la concentración de la solución, la fuerza iónica, el pH, la temperatura y el tipo de ácido utilizado. Por lo general, un incremento en la temperatura da como resultado una disminución en la viscosidad de la solución, mientras que el efecto del pH sobre la viscosidad depende del ácido utilizado. Las características del quitosano que pueden variar, de acuerdo a los requerimientos para una aplicación en particular, son el grado de desacetilación (con respecto a la quitina) y el peso molecular (Li y col., 1997). Algunas de las propiedades físico-químicas del quitosano se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del quitosano.

<i>Aplicación</i>	<i>Ejemplos</i>
Tratamiento de aguas. Papel.	Remoción de iones metálicos; floculación o coagulación de proteínas, colorantes o aminoácidos; filtración. Tratamiento superficial; papel fotográfico; papel libre de carbón, para fotocopiado.
Medicina.	Vendajes, esponjas, control de colesterol sanguíneo, inhibición de tumores, membranas, inhibición de placa dental, piel artificial, quemaduras cutáneas, lentes de contacto, fármacos de liberación controlada, tratamientos contra enfermedades óseas.
Cosméticos.	Maquillajes, esmalte de uñas, humectantes, lociones, cremas corporales, pastas de dientes, espumas.
Biotecnología.	Inmovilización de enzimas y células, separación de proteínas, cromatografía, recuperación de células, electrodos para glucosa.
Agricultura. Alimentos.	Cobertura de semillas y hojas, fertilizantes. Remoción de colorantes y sólidos, agente preservante, estabilizador de color, aditivos para alimentos animales.
Membranas.	Ósmosis reversa, control de permeabilidad, separación de solventes.

Fuente: Li y col., 1997.

**2.2.3.2 Solubilidad.** El quitosano es insoluble en agua, álcalis o solventes orgánicos, aunque es soluble en la mayoría de las soluciones de ácidos orgánicos cuando el pH es <6.0-6.5. Las sales de quitosano solubles en agua se obtienen por neutralización con ácidos como ácido hidroclicóric, ácido acético, ácido láctico o ácido fórmico. Entre los mejores disolventes para el quitosano se encuentran el ácido acético y el ácido fórmico, aunque con agitación constante y aplicando calentamiento es posible obtener soluciones utilizando ácidos inorgánicos diluidos tales como el ácido nítrico, ácido hidroclicóric, ácido perclórico y el ácido fosfórico (Austin, 1988; Li y col., 1997).

**2.2.3.3 Biomodificación.** En cuanto a las modificaciones, el sitio clave para biomodificar la molécula del quitosano es el grupo N-acetilo; este sitio sirve también como punto para la hidrólisis enzimática por lisozimas, quitinasas o quitosanasas para la obtención de quitosanos con cadenas más cortas también conocidos como oligosacáridos, los cuales son particularmente importantes para aplicaciones biomédicas. El otro sitio adecuado para la sustitución es el grupo hidroxilo del carbono 6 (C-6), el cual es el punto de esterificación o eterificación para dar origen a uno de los más importantes derivados de la quitina y del quitosano, la 6-O-carboximetilquitina y 6-O-carboximetilquitosano (Tombs y Harding, 1998). Las propiedades fundamentales del quitosano comercial se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Propiedades fundamentales del quitosano comercial.

Propiedad	Característica
Tipo de polímero	Policatiónico; repetición ininterrumpida
Tipo de conformación	Zona B (rígida)
Grado de desacetilación	0.11
Solubilidad	pH < 6
Peso molecular	~(160,000 ± 10,000) Da
Viscosidad intrínseca	~(540 ± 20) mL/g
Coefficiente de sedimentación	(1.41 ± 0.05) S
Sítios claves para la biomodificación	Grupo N-acetilo: alteración del grado de desacetilación. Grupo OH del carbono 6 (C-6): eterificación.

Fuente: Tombs y Harding, 1998.

En general, el quitosano tiene tres tipos de grupos funcionales reactivos, el grupo amino, dos grupos hidroxilo secundarios localizados en los carbonos C-2 y C-3, y el grupo hidroxilo primario del C-6. La modificación química de cualquiera de estos grupos puede dar como resultado la obtención de diferentes materiales con diversas aplicaciones (Shahidi y col., 1999). De acuerdo con Agulló y col. (2003), el quitosano N-acetilado (NAC) es un derivado cuya modificación química le permite ser soluble en agua,

lo cual es una propiedad de importancia en la industria de alimentos; los autores sintetizaron quitosano N-metilen fosfónico (NMPC) mediante la utilización de ácido fosfórico y formaldehído, encontrando que, aunque el derivado obtenido presentó la naturaleza filmogénica característica del quitosano, la solubilidad se mejoró notablemente en un intervalo de pH más amplio.

#### **2.2.4 Propiedades antimicrobianas.**

Se ha demostrado que el quitosano posee actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de microorganismos incluyendo hongos, algas y algunas bacterias. Sin embargo, la acción antimicrobiana es influenciada por factores intrínsecos como tipo de quitosano, grado de polimerización y desacetilación, la célula huésped, la presencia de nutrientes naturales, la composición química o nutricional de los sustratos y las condiciones ambientales. La concentración inhibitoria mínima varía de acuerdo con el microorganismo, siendo influenciada por el pH del medio, el grado de polimerización del biopolímero y la presencia o ausencia de sustancias de interferencia tales como lípidos y proteínas (Agulló y col., 2003).

La capacidad antimicrobiana del quitosano lo convierte en una sustancia atractiva de interés para controlar enfermedades fúngicas en productos post-cosecha debido a los inminentes problemas asociados con el empleo de agentes químicos, los cuales involucran el desarrollo de resistencia a los fungicidas y el incremento en la tolerancia de los microorganismos hacia los químicos, sin mencionar que numerosos fungicidas se utilizan aunque aún se encuentren en estudio (Shahidi y col., 1999; Vander y col., 1998).

**2.2.4.1 Modo de acción del quitosano.** Como se mencionó anteriormente, el quitosano es más soluble y presenta mejor actividad antimicrobiana que la quitina debido a la carga positiva del C-2 del monómero de glucosamina que se forma a valores de pH por debajo de 6. La actividad antimicrobiana del quitosano sólo ocurre cuando el biopolímero se encuentra en medio ácido; asimismo, el efecto antimicrobiano varía con respecto al peso molecular, grado de desacetilación, concentración y pH del medio. El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana de la quitina, el quitosano y sus derivados aún permanece sin esclarecer, aunque se han propuesto diferentes mecanismos:

- a) Interacción entre las cargas (+) del quitosano y las cargas (-) de la membrana celular de los microorganismos, lo cual puede ocasionar una degradación de proteínas y otros constituyentes intracelulares, o bien, alteraciones en la permeabilidad de la célula microbiana; éste último aspecto se ha relacionado a un incremento en la permeabilidad de los lípidos de la membrana de la célula, ocasionando la muerte a través de la pérdida de materiales esenciales (Chan y col.,

2001; Fang y col., 2001). Otro mecanismo propuesto se basa en la inhibición del crecimiento de microorganismos a través de la capacidad del quitosano para quelar selectivamente trazas de metales que son importantes para la célula.

- b) Activación de mecanismos de defensa en células huésped, los cuales se relacionan con la reducción de aflatoxinas, la inducción de fitoalexinas y compuestos fenólicos, y el incremento en la producción de enzimas quitinasas, quitosanasas, glucanasas o fenilalanina amonía-liasas (sección 2.3.4) (Vander y col., 1998).
- c) Penetración del quitosano al interior de la célula microbiana e interacción entre el biopolímero con el DNA, inhibiendo la síntesis de RNA mensajero, proteínas y enzimas.

## **2.3 Aplicaciones del quitosano.**

El quitosano es el único polímero catiónico que existe en la naturaleza, por lo que la alta densidad de grupos aminos presentes en la cadena le permiten interactuar rápidamente con sustancias cargadas negativamente tales como proteínas, polisacáridos aniónicos (como alginatos, carrageninas, pectinas, etc.), ácidos grasos, ácidos biliares y fosfolípidos (Agulló y col., 2003). Asimismo, su naturaleza catiónica le confiere propiedades más adecuadas en términos de solubilidad, por lo que el quitosano presenta mayor capacidad de aplicación que la quitina. La calidad y las propiedades del quitosano y productos derivados, tales como pureza, viscosidad, peso molecular y estructura polimórfica, varían de acuerdo con la fuente de obtención, el proceso de manufactura, el grado de polimerización y de desacetilación (Hirano, 1986).

Las principales aplicaciones del quitosano han sido en el tratamiento de aguas residuales, en el procesamiento de alimentos, como agente quelante, y como floculante para la clarificación de efluentes industriales (Knorr, 1991); industrialmente puede ser aplicado en la obtención de productos valiosos como cosméticos, acarreadores de fármacos, aditivos alimenticios, membranas semipermeables, medicamentos, pinturas y textiles (Tabla 3). Otra aplicación importante es debido a su habilidad para actuar como barrera de la humedad en cosméticos y como encapsulante, cuando no tiene carga positiva (Van Ornum, 1992).

### **2.3.1 Biotecnología de alimentos.**

El quitosano se utiliza para la elaboración de jugos de frutas y cerveza. Generalmente los jugos de frutas contienen partículas con cargas negativas derivadas de las pectinas, y el procedimiento usual de clarificación es vía sedimentación o centrifugación. La velocidad de clarificación puede ser aumentada

al utilizar la carga positiva del quitosano, lo cual permitiría obtener mayor rendimiento en la floculación. La propiedad del biopolímero para atrapar (“ligar”) colorantes también puede ser aprovechada para la recuperación de betacarotenos en el procesamiento de jugos de zanahoria (Tombs y Harding, 1998).

Tabla 3. Aplicaciones del quitosano.

Aplicación	Ejemplos
Tratamiento de aguas	Remoción de iones metálicos; floculación o coagulación de proteínas, colorantes o aminoácidos; filtración.
Papel	Tratamiento superficial; papel fotográfico; papel libre de carbón, para fotocopiado.
Medicina	Vendajes, esponjas, control de colesterol sanguíneo, inhibición de tumores, membranas, inhibición de placa dental, piel artificial, quemaduras cutáneas, lentes de contacto, fármacos de liberación controlada, tratamientos contra enfermedades óseas.
Cosméticos	Maquillajes, esmalte de uñas, humectantes, lociones, cremas corporales, pastas de dientes, espumas.
Biotecnología	Inmovilización de enzimas y células, separación de proteínas, cromatografía, recuperación de células, electrodos para glucosa.
Agricultura	Cobertura de semillas y hojas, fertilizantes.
Alimentos	Remoción de colorantes y sólidos, agente preservante, estabilizador de color, aditivos para alimentos animales.
Membranas	Ósmosis reversa, control de permeabilidad, separación de solventes.

Fuente: Li y col., 1997.

### 2.3.2 Microencapsulación.

Los lechos de gel basados en quitosano se han aplicado para el atrapamiento de microorganismos, enzimas y células de vegetales y mamíferos. Las combinaciones de quitosano/alginato, quitosano/carragenina o quitosano/carboximetilcelulosa son de particular interés debido a que son sistemas que permiten un mejor control de los mecanismos de atrapamiento y liberación (Tombs y Harding, 1998).

### 2.3.3 Agente quelante y cromatografía de afinidad.

El quitosano interactúa con metales pesados a través del grupo amino, lo cual ha permitido que el biopolímero sea empleado en la tecnología de lechos porosos para la quelación de iones metálicos pesados y en el diseño de columnas de afinidad para la inmovilización de proteínas (Inoue y col., 1994; Tombs y Harding, 1998).

### 2.3.4 Resistencia contra patógenos en cultivos (agricultura).

El quitosano presente en las paredes celulares de algunos hongos juega un papel importante en la relación del hongo con la planta, ya que la difusión del quitosano en el vegetal puede inducir una respuesta en la planta, incluyendo la resistencia de los genes contra la enfermedad; en este sentido, la aplicación externa del biopolímero en los cultivos es capaz de aumentar la resistencia contra el ataque de hongos. Estos mecanismos parecen estar involucrados con la formación de complejos entre el quitosano y el DNA de la célula huésped (vegetal) probablemente debido a interacciones anión-cación, aunque aún se encuentran en estudio (Tombs y Harding, 1998).

Debido a que el quitosano no causa problemas de contaminación y es completamente natural y biodegradable, se puede utilizar para cubrir productos agrícolas. El tratamiento de tejidos vegetales con el biopolímero tiene efectos benéficos ya que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, incrementa los mecanismos de defensa de las plantas contra las enfermedades y estimula la inducción de quitinasas, quitosanasas y lisozimas, las cuales son enzimas capaces de degradar el biopolímero. Tales enzimas hidrolíticas tienen una función importante para la protección de plantas contra el ataque ocasionado por insectos o microorganismos patógenos, y es por ello que su estimulación e inducción es de vital interés en la agroindustria, en donde permitirían reducir el empleo de insecticidas y pesticidas. Algunas de las posibles aplicaciones del quitosano en el campo de la biotecnología agraria son las siguientes (Hirano y col., 1994):

- a) Adición del biopolímero en el medio de cultivo de células vegetales y animales para incrementar el crecimiento y prevenir infecciones por patógenos o gérmenes.
- b) Cobertura de semillas con soluciones de quitosano para estimular la actividad enzimática (quitinasas, quitosanasas) e incrementar la producción de la planta.
- c) Adición de quitosano en suelos para mejorar las propiedades del terreno y para preparar fertilizantes hidropónicos (Li y col., 1997), además de estimular el crecimiento de hongos benéficos como Actinomicetos que inhiban el desarrollo de hongos filamentoso como *Fusarium*.
- d) Rociado de suelos y hojas de las plantas con soluciones de quitosano para activar las células y los tejidos del vegetal.

Entre otros compuestos de defensa inducidos por el tratamiento de tejidos vegetales con quitosano se encuentran las fitoalexinas (pisatina, faseolina, risitina, orcinol, ipomeamarona, etc.), proteínas PR relacionadas con la patogénesis, inhibidores de proteínas y lignina. En las semillas de las plantas, la actividad enzimática de las quitinasas se incrementa por arriba de 1.5 veces durante el proceso natural

de germinación (Hirano, 1997). Adicionalmente, cuando los productos post-cosecha (frutas y vegetales) han sido tratados con soluciones de quitosano, la película que se forma sobre la superficie mantiene la frescura y previene la liberación de CO<sub>2</sub> y etileno, disminuyendo el proceso de ablandamiento y las infecciones microbianas, lo cual permite extender la vida de anaquel de dichos productos (El Ghaouth y col., 1997).

### **2.3.5 Terapia de genes.**

Actualmente, la interacción DNA-quitosano se encuentra en estudio debido a su posible empleo en la terapia de genes; el biopolímero podría condensar el DNA (por analogía con la acción de las histonas), permitiendo la inserción del material genético dentro de las células de los pacientes. Con base en lo anterior, el quitosano resulta ser una alternativa potencial al empleo de otros agentes condensadores tales como la espermidina, la cual es considerablemente tóxica (Tombs y Harding, 1998).

### **2.3.6 Hemostasis y tratamiento contra heridas.**

La capacidad del quitosano para unirse a las células se ha conocido desde hace casi 2 décadas, por lo que esta propiedad se ha empleado en la tecnología contra el cáncer. Aunque el quitosano es hemostático, algunos derivados son anticoagulantes, como por ejemplo el quitosano sulfatado; debido a sus propiedades hemostáticas, el biopolímero ha sido utilizado en la preparación de vendas de curación y esponjas para tratamiento quirúrgico. Otras aplicaciones médicas incluyen la elaboración de membranas anticoagulantes para ultrafiltración sanguínea, inmovilizando moléculas bioactivas como heparina o antitrombina (Li y col., 1997; Tombs y Harding, 1998).

### **2.3.7 Lentes de contacto.**

El posible uso en el tratamiento contra heridas y las propiedades antimicrobianas, junto con sus excelentes propiedades para formar películas, han hecho que el quitosano sea un material atractivo para el desarrollo de lentes de contacto, particularmente para mejorar la curación de problemas en la córnea (Tombs y Harding, 1998).

### **2.3.8 Mucoadhesivos.**

La ruta oral es un método popular para administrar medicamentos, requiriendo el paso del fármaco a través del tracto alimentario y su eventual adsorción en la mucosa de la membrana próxima al intestino delgado. Desafortunadamente, la cantidad de fármaco adsorbido puede ser mucho más pequeña que la cantidad total ingerida debido a factores como: a) tránsito rápido del sistema que contiene el fármaco, pasando demasiado pronto por el sitio ideal de absorción, b) rápida degradación del fármaco en el tracto

gastrointestinal y c) baja permeabilidad en la mucosa debido al tamaño, ionización, solubilidad u otras características del medicamento (Tombs y Harding, 1998).

Considerando la complementariedad policationica del quitosano a las mucinas polianiónicas que constituyen el principal componente macromolecular de la mucosa, el biopolímero resulta ser un mucoadhesivo atractivo ya que podría funcionar como un freno molecular para los fármacos encapsulados. Sin embargo, aunque la fuerte propiedad mucoadhesiva del quitosano esta bien establecida, aún se estudia su capacidad para acarrear y liberar fármacos contenidos en una formulación. Parece ser que el quitosano tiene un efecto adicional aumentando la capacidad de la membrana mucosa para absorber fármacos de moléculas grandes como la insulina, lo cual se ha demostrado para el epitelio nasal; en este caso, el mecanismo sugerido es que el quitosano reduce la frecuencia de los cilios para asistir la apertura de las estructuras pericelulares (Tombs y Harding, 1998).

### **2.3.9 Agentes filmogénicos en cosméticos.**

La capacidad para formar películas es una propiedad de importancia en la industria de cosméticos para la elaboración de productos como cremas y fijadores de cabello, barniz de uñas y cremas corporales. En este sentido, las propiedades adicionales del quitosano para formar películas delgadas lo hacen atractivo para su empleo en champú y acondicionadores de cabello (Tombs y Harding, 1998).

### **2.3.10 Tratamiento de aguas residuales.**

El quitosano es un buen agente coagulante y floculante debido que posee una alta densidad de grupos aminos, los cuales pueden interactuar con sustancias cargadas negativamente tales como proteínas, sólidos, colorantes y polímeros; de igual forma, la naturaleza catiónica puede ser útil en la formación de capas e inmovilización de reactivos biológicos incluyendo enzimas (Van Ornum, 1992). No obstante, el comportamiento del quitosano es diferente frente a los metales de transición; el nitrógeno del grupo amino puede actuar como donador de electrones, siendo el posible responsable de que el quitosano funcione como quelante de iones metálicos (Cu, Fe, Mn, Zn, Hg, Pb, Cr, U y Pu) o radioactivos, los cuales posteriormente floculan y son separados por filtración, centrifugación o prensado (McKay y col., 1987; Hawke y col., 1991; Simpson y col., 1994; Fang y col., 1994); esta propiedad de quelar iones fue la base para que inicialmente el quitosano fuera aplicado en el tratamiento de aguas residuales. De acuerdo con Ogawa y Oka (citado por Li y col., 1997), un ión metálico se puede coordinar con cuatro grupos aminos en el dímero de D-glucosamina.



El quitosano ha sido aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de E.U. (EPA) para potabilizar agua, así como también por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y EPA para su uso como agentes precipitantes de proteínas durante el procesamiento de alimentos. Se ha empleado también como clarificante de vinos y agua potable en Reino Unido y otros países europeos (Knorr, 1991), y se le asocian propiedades terapéuticas tales como que pueden ligar sales biliares y disminuir el colesterol sanguíneo (Hirano y col., 1990). Muchas sustancias tóxicas como pesticidas y colorantes comerciales pueden ser removidas de los suelos y aguas (Torres y col., 1999).

### **2.3.11 Manufactura de papel.**

Las aplicaciones del quitosano en la manufactura de papel incluyen el tratamiento de la superficie con una solución del quitosano al 1%, lo cual incrementa la dureza y la resistencia al doblamiento sin disminuir el brillo del papel; el tratamiento de soluciones al 0.5% mejora el color de las fibras. La aplicación de una capa de quitosano sobre papel fotográfico incrementa las propiedades antiestáticas, lo cual mejora la calidad de las fotos; después del tratamiento con quitosano, la resistencia electrostática de la superficie se incrementa hasta 10,000 veces (Li y col., 1997).

## **2.4 Uso del quitosano como biomaterial.**

### **2.4.1 Elaboración de películas de quitosano.**

El empleo de dos o más materiales es frecuente con objeto de combinar propiedades convenientes para materiales de empaque. Normalmente los envases combinados son flexibles y se obtienen ya sea mediante películas recubiertas, películas laminadas o películas coextruidas. Estas últimas se elaboran por extrusión simultánea de dos o más capas de distintos polímeros, lo cual les confiere algunas ventajas en comparación con los otros tipos de películas combinadas, entre las que se pueden mencionar que son muy impermeables, delgadas y resultan más económicas sin presentar el riesgo de despegarse o separarse en capas. Debido a que para la fabricación de las películas sólo pueden utilizarse polímeros de estructura química, fluidez y viscosidad en estado líquido semejantes, las películas coextruidas están restringidas a tres grupos de polímeros: poliolefinas, poliestirenos y polímeros de cloruro de vinilo. Estos pueden mezclarse entre sí para obtener diferentes películas (Bosquez y Colina, 1999).

No obstante, debido a que la mayoría de los polímeros son materiales sintéticos, su compatibilidad y biodegradabilidad es mucho más limitada que la de los polímeros naturales como el quitosano. Sin embargo, el empleo de este abundante biopolímero como material es limitado en cuanto a su reactividad y procesabilidad. Para la preparación de membranas de quitosano se pueden utilizar técnicas como

evaporación de soluciones de quitosano (“casting”), intercrossamiento con reactivos bifuncionales, quelación con iones aniónicos o bien por la formación de complejos con proteínas o polímeros.

**2.4.1.1 Evaporación de solventes.** De las técnicas existentes para elaborar películas de quitosano, la técnica de evaporación de solventes es el método más sencillo para elaborar películas las cuales por lo general resultan ser solubles en agua; este tipo de películas son amorfas y poseen propiedades de permeabilidad al vapor de agua similar a la del celofán (Li y col., 1997).

El interés en el estudio de películas de quitosano se originó debido a su capacidad para formar películas semipermeables cuando se aplican soluciones del biopolímero sobre productos alimenticios, ya que modifica la atmósfera interna, disminuye la pérdida de agua (transpiración) y retarda el deterioro de frutas y vegetales (El Ghaout y col., 1997), lo cual ha sentado las bases para la elaboración de películas comestibles a base de quitosano. Como polímero, el quitosano es un buen aditivo en la preparación de materiales biológicos, siendo posible utilizarlo para crear lentes de contacto (sección 2.3.7) mediante técnicas de evaporación de solventes o moldes; los lentes de contacto deben de ser ópticamente transparentes, seguros y húmedos, con excelentes propiedades de permeabilidad al oxígeno (Li y col., 1997).

**2.4.1.2 Extrusión con polímeros sintéticos.** Como es sabido, los plásticos persisten en el medio ambiente debido a su alta resistencia a la biodegradación, porque el deshecho inapropiado causa serios problemas a la fauna marina, incluyendo aves marinas, tortugas y otras formas de vida; en adición, los plásticos recalcitrantes se acumulan en el ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas anuales (Niño y col., 1997). Con base en lo anterior, los materiales plásticos formulados con quitosano como componente biodegradable representan una alternativa para incrementar la susceptibilidad de los materiales obtenidos para que, una vez desechados, sean biodegradados bajo la influencia de procesos ambientales y, eventualmente, desintegrados en bioproductos más pequeños y benignos.

Experimentos previos han demostrado que las mezclas extrudidas de quitina, almidón y polietileno de baja densidad (LDPE) reducen la resistencia a la tensión y la elasticidad de las películas, limitando el empleo del material a unas cuantas aplicaciones prácticas; no obstante, las propiedades de degradación se incrementaron debido a que la incorporación de los materiales naturales sirvió como sitios de acceso para enzimas microbianas (Niño y col., 1997).

### **2.4.2 Propiedades fisicoquímicas de las películas.**

Las películas de quitosano son rígidas, durables, flexibles y difíciles de rasgar; la mayoría de sus propiedades mecánicas son comparables a las de algunos polímeros comerciales de mediano esfuerzo. Se ha reportado que las películas poseen valores moderados de permeabilidad al agua y pueden ser utilizadas para incrementar la vida de anaquel de productos frescos con altos valores de actividad de agua; asimismo también resultan ser excelentes barreras para la permeabilidad al oxígeno.

Hosokawa y col. (1990) reportaron que la combinación de quitosano y fibras de celulosa permitió obtener películas fuertes, permeables y resistentes al agua; los autores utilizaron métodos sencillos de evaporación de solventes, empleando un postratamiento con álcalis para las películas resultaran permeables al agua. En adición, la rigidez de las películas fue controlada utilizando glicerol como plastificante, mientras que la biodegradabilidad fue controlada ajustando las condiciones de reacción.

### **2.4.3 Propiedades antimicrobianas de las películas.**

Normalmente, la elaboración de películas con propiedades antimicrobianas consiste en la incorporación directa de agentes conservadores durante la manufactura de las formulaciones destinadas para el diseño de los empaques, lo cual permite inhibir solo el crecimiento de la flora superficial debido a la inactivación parcial de las sustancias activas por los constituyentes del material. Por otro lado, la aplicación directa de los agentes antimicrobianos sobre la superficie de los alimentos mediante técnicas como el recubrimiento, resulta ineficiente debido a la rápida difusión de las sustancias activas al interior del producto (Ouattara y col., 2000). Algunos ejemplos incluyen la producción de películas antimicrobianas obtenidas por la incorporación de imazalil o ácido benzoico en polietileno de baja densidad, o bien la incorporación de ácido sórbico o ácido benzoico en películas de metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y quitosano (Bégin y Van Calsteren, 1999).

Con base en lo anterior, el empleo de empaques poliméricos formulados con quitosano resultaría más efectivo debido a que el biopolímero migraría lentamente hacia el alimento, ayudando a mantener altas concentraciones justo en donde se requiera.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los factores que causan el deterioro de los alimentos provienen principalmente de la contaminación microbiana sobre la superficie del producto. Por lo tanto, para inhibir el crecimiento de microorganismos en tales productos se han desarrollado algunas técnicas directas de aplicación como recubrimiento o inmersión, empolvado y rociado, el fin de cubrir la superficie de los alimentos con agentes conservadores. No obstante, estos métodos de conservación son procesos inconvenientes y laboriosos; por citar un ejemplo, los agentes antimicrobianos tienen que estar disueltos en solventes adecuados, o bien tienen que ser mezclados con diluyentes en forma de polvo antes de ser aplicados (Weng y col., 1997).

Otra posibilidad para solucionar los problemas de contaminación superficial en alimentos está dada por el desarrollo de técnicas en donde se combinen materiales de empaque con agentes antimicrobianos. En este sentido, el quitosano representa una alternativa debido a que es un biopolímero renovable, biocompatible, no antigénico, no tóxico y bifuncional, de tal modo que es importante emplearlo como materiales biotecnológicos para el beneficio de todos los seres vivos, ya que, además de ser ecológicos, no dañan el medio ambiente (Hirano, 1999). Su empleo en la agricultura aún permanece sin explotarse, aunque sus propiedades específicas tales como biodegradabilidad, potencial antimicrobiano y actividad inductora son criterios que lo hacen ser un agente de biocontrol muy prometedor (Benhamou, 1996).

No obstante, la estructura copolimérica del quitosano parcialmente desacetilado generalmente disminuye las propiedades mecánicas de esfuerzo, aunque existen numerosos métodos físicos o mecánicos para mejorarlas, en particular las del módulo inicial, tenacidad y esfuerzo a la ruptura. Actualmente, uno de los principales objetivos es el desarrollo de productos moldeables (filamentos y películas) a partir de quitina y quitosano, de tal modo que los nuevos materiales preparados tengan propiedades físicas únicas, además de funciones biológicas (Knaul y col., 1999; Hirano, 1999). Este es el caso de las películas elaboradas a partir de mezclas de quitosano con diversos compuestos poliméricos, en las cuales se combinan las propiedades antimicrobianas de los primeros con las características mecánicas de los últimos con la finalidad principal de elaborar materiales antimicrobianos con aplicación potencial en las áreas médica y textil (Seo y col., 1997; Shin y col., 1999). Sin embargo, el estudio de estas películas como materiales de empaque para la preservación de productos alimenticios aún permanece sin explorar.

Por otro lado, para preservar productos alimenticios se han desarrollado varias técnicas de almacenamiento, siendo el empleo de películas plásticas uno de los métodos más comunes; estos materiales tienen la capacidad de mantener la frescura del producto debido a que proveen barreras semipermeables a gases y al vapor de agua (Krochta y col., 1994). Siguiendo al proceso de empaquetamiento no existe otra intervención antimicrobiana a excepción de la refrigeración, por lo que la combinación de atmósferas modificadas, almacenamiento a temperaturas de refrigeración e inhibición del desarrollo de microorganismos por efecto del quitosano, puede proporcionar un producto con mayor estabilidad hacia el ataque de microorganismos. En este caso, los materiales elaborados permitirán combinar las propiedades antimicrobianas del quitosano con las características de flexibilidad, elasticidad y maleabilidad que poseen los polímeros, con lo cual se incrementará la resistencia contra enfermedades causadas por hongos filamentosos.

Con base en lo anterior, el estudio de las propiedades antifúngicas del quitosano representará una herramienta de gran utilidad para predecir el crecimiento de hongos filamentosos alteradores de productos alimenticios aún a temperaturas de refrigeración, lo cual puede permitir el desarrollo de metodologías y estrategias relacionadas con el diseño de materiales con propiedades biológicas

## 4. ANTECEDENTES

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que, con base en sus propiedades antimicrobianas, el quitosano puede ser utilizado como agente floculante para el tratamiento de aguas residuales, como aditivo en la industria alimenticia, agente hidratante en cosméticos, agente farmacéutico en biomedicina y como compuesto antimicrobiano en agricultura (Agulló y col., 2003).

Con respecto a la aplicación del quitosano en agricultura, se ha demostrado que el tratamiento de diversos tejidos vegetales con soluciones de quitosano, ya sea por aspersión o por sumergimiento total, ha dado como resultado la protección del producto contra infecciones locales o sistémicas ocasionadas por microorganismos. Desde luego, la eficiencia inhibitoria del biopolímero depende del modo de aplicación, peso molecular, dosis y del sistema vegetal-microorganismo en estudio (Struszczyk y Pospieszny, 1997).

Reddy y col. (1999) recubrieron semillas de trigo con soluciones de quitosano de concentración  $\geq 4 \leq 8$  g/L, encontrando que el biopolímero mejoró significativamente la germinación y resistencia de las semillas, estimulando la síntesis de compuestos fenólicos y lignina en las hojas, además de reducir el desarrollo de *Fusarium graminearum*. En un experimento similar, Zhang y Quantick (1998) observaron que a 13°C, el quitosano (10 y 20 g/L) redujo notablemente el deterioro de fresas y cerezas ocasionado por *Botrytis cinerea* y *Rhizopus* sp., induciendo un incremento significativo en la actividad enzimática de quitinasas y  $\beta$ -1-3-glucanasas; asimismo, cuando los frutos fueron almacenados a 4°C se encontró un efecto benéfico en cuanto a la firmeza, acidez total titulable, contenido de vitamina C y contenido de antocianina.

En un estudio previo, El Ghaouth y col. (1991) utilizaron soluciones del biopolímero (10 y 15 g/L) para recubrir fresas, encontrando resultados similares a los reportados por Zhang y Quantick (1998). Los frutos cubiertos con el biopolímero y almacenados a 4°C fueron más firmes y con mayor acidez total titulable, con una velocidad de síntesis de antocianina menor a la de Rovral®, un fungicida comercial (iprodiona); asimismo, se encontró que el quitosano redujo la velocidad de respiración. Posteriormente, los autores estudiaron el efecto *in vivo* del biopolímero sobre la vida postcosecha de productos vegetales (tomates, pimiento y pepino), encontrando que el tratamiento con quitosano redujo la velocidad de respiración y la producción de etileno de los tomates, modificando la atmósfera interna y mejorando la

firmeza, color y acidez total titulable; en los pepinos y pimientos se observó que el biopolímero redujo la pérdida de peso y la velocidad de respiración (El Ghaout y col., 1997); el estudio in vitro mostró que el quitosano no solamente inhibió el crecimiento de patógenos postcosecha comunes, sino que también indujo la degradación de aminoácidos y proteínas en *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, además de inducir severos cambios morfológicos caracterizados por alteraciones en la pared celular los cuales fueron atribuidos en parte a la capacidad del quitosano para estimular la actividad de enzimas quitinasas (quitin deacetilasas) en *R. stolonifer*.

Además de la inducción de enzimas y moléculas de defensa, otros investigadores han estudiado los cambios ultraestructurales y citoquímicos que aparecen tanto en células vegetales como microbianas después del tratamiento de las primeras con soluciones de quitosano a diferentes concentraciones. Después de la aplicación, los cambios morfológicos encontrados en las células de los tejidos vegetales fueron caracterizados por una marcada desorganización (formación de agregados) del citoplasma y alteración de la membrana plasmática, además de encontrar una mayor actividad de quitinasas,  $\beta$ -1-3-glucanasas y  $\beta$ -1-4-glucanasas con respecto a los controles sin quitosano. Por otro lado, en las células microbianas se observó distorsión e hinchamiento de las hifas (Benhamou, 1992; Benhamou y col., 1994).

El tratamiento de uva de mesa, ya sea en racimos o por separado, con soluciones de quitosano de 5 y 10 g/L, controló efectivamente el crecimiento de *Botrytis cinerea*, reduciendo los niveles de incidencia y severidad e incrementando la actividad de la enzima fenilalanina amonía-liasa, PAL (Romanazzi y col., 2002). Por otro lado, Li y Yu (2000) estudiaron el efecto del quitosano sobre la incidencia, calidad y atributos fisiológicos de duraznos post-cosecha, reportando una reducción en la velocidad de respiración, una disminución en la cantidad de etileno y malondialdehído, y un aumento en la actividad de superóxido dismutasa en los productos tratados con el biopolímero.

Tsai y col. (1997) analizaron las actividades antimicrobianas de quitosano obtenido a partir de camarón, reportando que el polímero con alto grado de desacetilación mostró mejor actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum*; así mismo añadieron 2000 ppm de quitosano en ostras almacenadas a 5°C y observaron una significativa reducción en las cuentas de coliformes, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Aeromonas* y *Vibrio*.

Con respecto al estudio de la actividad antimicrobiana del quitosano en forma de películas, Seo y col. (1991) realizaron un estudio en dónde prepararon fibras de quitosano con celulosa, observando que el

material elaborado presentó un efecto inhibitorio sobre algunos hongos y bacterias. También se encontró que las películas mantuvieron buena actividad aún después del lavado. La concentración de quitosano fue de 30 g/L y el método para realizar la película fue procesado dentro de la fibra. No obstante, aunque se han utilizado otros métodos para la elaboración de películas con quitosano, el estudio de los materiales obtenidos se ha enfocado al análisis de las propiedades físico-mecánicas o de permeabilidad. Una de las técnicas utilizadas es la de recubrimiento (“mojado”), la cual consiste en depositar una capa de quitosano sobre la superficie de un material; mediante esta técnica y utilizando polipropileno como material base, Shin y col. (1997; 1999) encontraron que la rigidez de la película aumentó de acuerdo con el contenido de quitosano, mientras que parámetros tales como permeabilidad al O<sub>2</sub> (expresada como permeabilidad al aire), resistencia a la tensión y elongación se vieron disminuidos conforme aumentó la concentración del biopolímero.

En cuanto al estudio de películas de quitosano con polímeros para la elaboración de materiales biodegradables, Pieknielna y col. (1997) analizaron la morfología y las propiedades físicas de mezclas de quitosano con polivinil alcohol (PVA) y óxido de polietileno (POE), encontrando que las películas fueron biodegradables y homogéneas. Los autores concluyeron que la presencia de quitosano aumenta el valor de la temperatura inicial para llevar a cabo la degradación térmica de PVA y POE en las películas elaboradas. Hosokawa y col. (1990) utilizaron mezclas de celulosa y observaron que la resistencia a la tensión de las películas se incrementó al aumentar el contenido de quitosano y se encontró que las películas fueron insolubles en agua, impermeables al O<sub>2</sub> y biodegradables. Ambos grupos de autores utilizaron el método de “casting”.

Otro de los métodos reportados para la preparación de las películas es el de extrusión de poliolefinas con quitosano, con el cual Ratajska y Boryniec (1999) observaron una alta dispersión de las partículas de quitosano, lo cual representa una ventaja en términos de biodegradabilidad, ya que los agregados encontrados sirvieron como puntos de partida para la biodegradación por parte de microorganismos.

Con base en lo anterior y debido a que el quitosano es un biopolímero que tiene muchas aplicaciones en el mercado, es importante promover su uso en diferentes campos de aplicación. En este sentido, la elaboración de nuevos materiales plásticos, en donde se exploten las propiedades biológicas y biodegradables del quitosano, constituye una alternativa. Lo anterior debido a que actualmente las mezclas de polímeros que contienen materiales biodegradables han recibido mucha atención debido a la facilidad con la que se pueden modificar las propiedades físicas y a la capacidad de degradación (Pieknielna y col., 1997; Arvanitoyannis y col., 1997).



## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Análisis de la actividad antifúngica del quitosano sobre el crecimiento de hongos filamentosos, utilizando medio de cultivo superficial, medio líquido y películas compuestas con aplicación potencial como materiales de empaque.

### Objetivos particulares

1. Estudio del efecto inhibitorio del quitosano sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.
2. Estudio de la actividad inhibitoria del quitosano sobre el crecimiento apical de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.
3. Estudio del efecto antifúngico del quitosano sobre el proceso de divisiones mitóticas, formación de septos y germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo líquido Czapeck.
4. Elaboración y caracterización físico-mecánica de películas elaboradas a partir de mezclas de quitosano con polímeros naturales y/o materiales termoplásticos sintéticos, utilizando diferentes métodos de mezclado.
5. Evaluación in vivo de las propiedades antifúngicas de las películas de quitosano, utilizando piezas de queso inoculadas con esporas de *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*.

## 6. HIPÓTESIS

El estudio detallado de las propiedades antifúngicas del quitosano utilizando cultivo superficial, medio líquido y películas compuestas, permitirá predecir el crecimiento de hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, ayudando a establecer las bases para el desarrollo de materiales con propiedades biológicas para controlar el desarrollo de microorganismos alteradores de alimentos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada se presenta en las siguientes secciones (Figura 3):

1. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck (sección 7.4).
2. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo líquido Czapeck (sección 7.5).
3. Elaboración de películas de quitosano (sección 7.6).
4. Caracterización de las películas en cuanto a propiedades físico-mecánicas, morfología y permeabilidad al oxígeno (sección 7.7).
5. Evaluación de las propiedades antifúngicas de películas compuestas de quitosano (sección 7.8).

En la primera etapa se realizaron diversos estudios para determinar el efecto antimicrobiano del biopolímero sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* mediante experimentos in vitro, incluyendo un análisis detallado de la actividad antifúngica sobre la germinación de esporas, mientras que en la segunda se presenta un estudio profundo a nivel de divisiones mitóticas de las esporas y número de septos de las hifas, utilizando microscopía de fluorescencia.

En la tercera y cuarta etapas del trabajo se presentan los estudios relacionados con la elaboración y caracterización físico-mecánica de las películas elaboradas a base de quitosano, ya sea solo o en combinación con otros materiales naturales o sintéticos. Por último, en la etapa 5 se muestra la evaluación de la actividad antimicrobiana de los empaques mediante experimentos in vivo, para lo cual se utilizaron piezas de queso manchego inoculadas con esporas de *Aspergillus niger* y/o *Penicillium chrysogenum*.

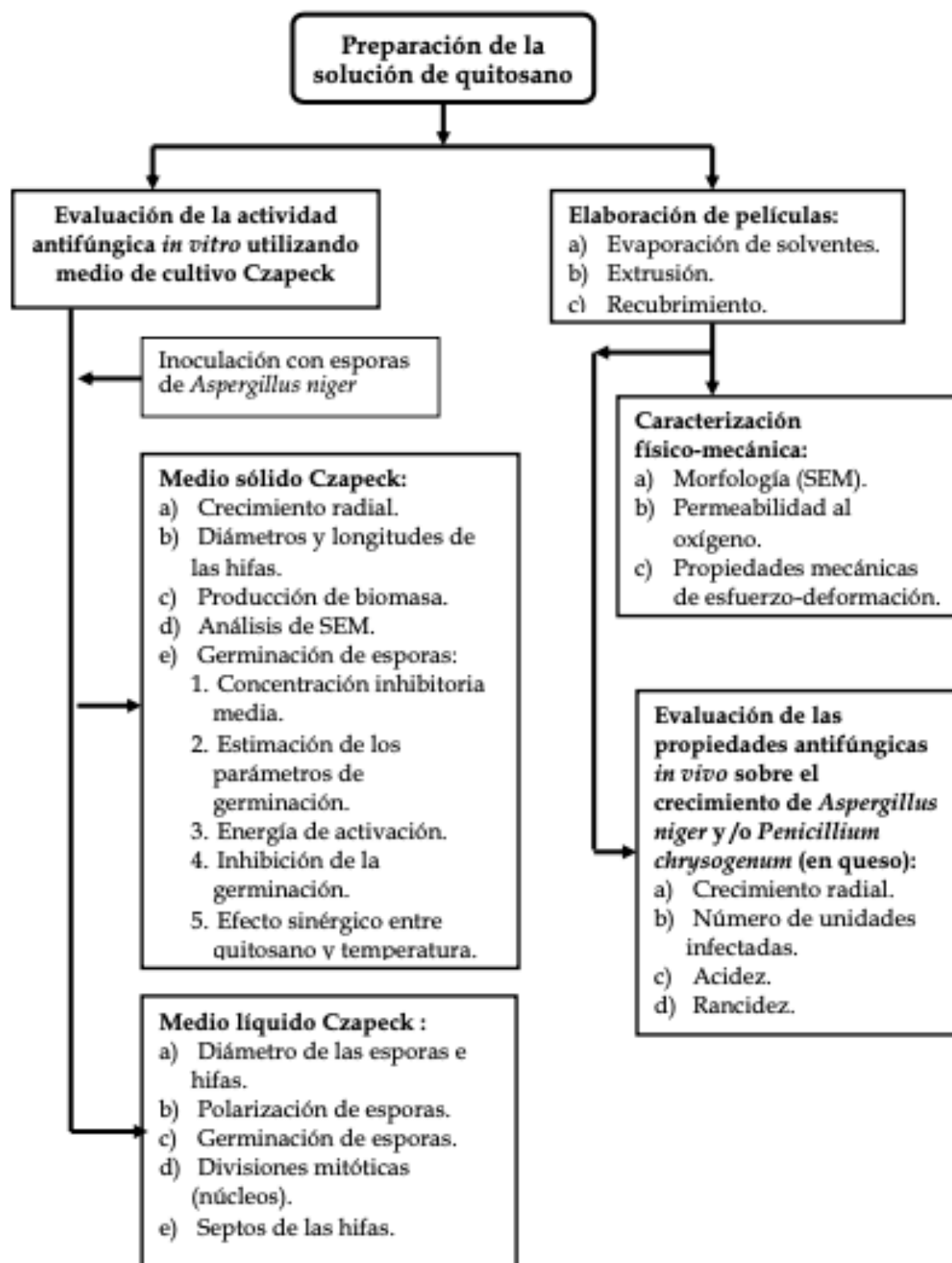


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.

## 7.1 Preparación de las disoluciones de quitosano.

Hojuelas de quitosano (Fluka, Biochemika, USA) de peso molecular medio (400 kDa) y grado de desacetilación de 85% fueron disueltas en solución de ácido acético 0.1 M, bajo agitación magnética a 25°C durante 24 h. La disolución obtenida, con concentración de 30 g/L, fue separada en diferentes volúmenes los cuales posteriormente fueron esterilizados a 121°C durante 15 min, antes de ser añadidos a matraces con medio de cultivo Czapeck estéril. La concentración de quitosano en el medio sólido fue 1.0, 1.3, 3 y 5 g/L, mientras que en medio líquido fue de 3.5 g/L. El pH final fue de 4.9 y el pH del medio control (sin quitosano) fue ajustado a 4.9 utilizando solución de ácido acético 0.1 M.

## 7.2 Microorganismos.

Se utilizaron cepas de colección, *Aspergillus niger* (NRRL 3, ARS Culture Collection) y *Penicillium chrysogenum* (CECT 2267, Colección Española de Cultivo Tipo), las cuales fueron seleccionadas debido a su elevada ocurrencia como microorganismos alteradores de alimentos. Las cepas fueron obtenidas de las colecciones correspondientes y se mantuvieron liofilizadas a -20°C hasta su activación en caldo dextrosa Sabourau (Bioxon, USA), incubando a 30°C y 100 rpm durante 4 días. Posteriormente se preparó un inóculo utilizando matraces con agar papa dextrosa, PDA, (Bioxon, USA), incubando a 30°C durante 5 días. Una vez desarrolladas las esporas, estas fueron resuspendidas adicionando solución de Tween-80 al 0.1% (v/v) y agitando con una barra magnética estéril durante 5 min. La concentración de esporas en la suspensión fue determinada mediante conteo en cámara de Neubauer, ajustándose a una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL.

Los análisis in vitro posteriores, crecimiento radial, producción de biomasa, SEM, análisis morfométricos (diámetros y longitudes de las hifas) y germinación de esporas, se llevaron a cabo utilizando placas con medio de cultivo sólido Czapeck, las cuales fueron inoculadas con la cepa de *Aspergillus niger*; la misma cepa fue empleada para determinar el efecto del quitosano en medio de cultivo líquido, evaluando parámetros morfométricos (diámetros de las esporas e hifas), número de divisiones mitóticas (núcleos), septos de las hifas, polarización y germinación de esporas.

Por otro lado, la actividad antifúngica in vivo de las películas del biopolímero se realizó utilizando piezas de queso manchego comercial inoculadas con una suspensión de esporas de *Penicillium chrysogenum*, determinando el número de unidades infectadas, acidez y rancidez de los productos empacados. El microorganismo fue seleccionado en base a su alta ocurrencia en productos lácteos y la suspensión de esporas fue preparada siguiendo la metodología antes descrita.

### 7.3 Técnicas de inoculación y fijación.

Se utilizaron 3 técnicas de inoculación:

- a) Inoculación por picadura: el inóculo fue tomado con la punta del asa bacteriológica y posteriormente fue depositado mediante picadura en el centro de la caja con el agar Czapeck. Esta técnica se utilizó para determinar el crecimiento radial de la colonia (Holmes y Eckert, 1999; El Ghaouth y col., 1991; Zhang y Quantick, 1998), el diámetro y la longitud de las hifas (Larralde y col., 1997; Cox y col., 1998) y el análisis microscópico (SEM) de la colonia durante el crecimiento apical.
- b) Inoculación por siembra en placa: se inocularon 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas con concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL, los cuales fueron colocados en el centro de la caja y esparcidos sobre toda la superficie del agar, con ayuda de una varilla de vidrio estéril. Los análisis realizados fueron producción de biomasa (Larralde y col., 1997), germinación de esporas (Paul y col., 1993) y morfología microscópica de las esporas (SEM) de *A. niger* inoculado en placas con agar.
- c) Inoculación en medio líquido: 10 mL de medio de cultivo líquido Czapeck fueron inoculados con 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas de *A. niger*, con concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL; la solución inoculada fue vertida sobre placas petri estériles previamente adicionadas con cubreobjetos e incubadas a 30°C. Esta técnica fue empleada para determinar el diámetro de las esporas e hifas (Larralde y col., 1997; Cox y col., 1998), esporas germinadas, esporas polarizadas, número de divisiones mitóticas (núcleos de las esporas y septos de las hifas (Harris, 1999; Momany y Taylor, 2000).

Fijación de muestras. Las observaciones microscópicas de las muestras inoculadas en medio de cultivo líquido se realizaron utilizando preparaciones en fresco o bien, previamente fijadas en solución de 3.7% formaldehído, 0.2% tritón X-100 y buffer de fosfatos 50 mM (pH 7). El proceso de fijación de las esporas adheridas a los cubreobjetos consistió en sumergir completamente los cubreobjetos en la solución fijadora durante 1 h, a 25°C; enseguida las muestras fueron retiradas, enjuagadas con agua destilada y montadas sobre portaobjetos para su observación en el microscopio óptico (Momany y Tylor, 2000).

## **7.4 Evaluación antimicrobiana del quitosano utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.**

### **7.4.1 Crecimiento radial.**

La determinación del crecimiento radial de *A. niger* se realizó en cajas petri con agar Czapeck inoculadas por picadura. El diámetro de la colonia fue medido manualmente cada 24 h y comparado con el crecimiento del hongo en el medio control (sin quitosano), con la finalidad de calcular el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial de la colonia (ecuación 1):

$$\text{Inhibición radial (\%)} = \frac{\bar{R}_c - \bar{R}_i}{\bar{R}_c} \times 100$$

en donde  $R_c$  fue el radio promedio de la colonia en el control y  $R_i$  fue el radio de la colonia en medio con quitosano (Holmes y Eckert, 1999; El Ghaouth y col., 1991; Zhang y Quantick, 1998). La velocidad de extensión radial de la colonia,  $U$  ( $\mu\text{m/h}$ ), fue determinada a partir de la pendiente obtenida al graficar los datos experimentales del radio de la colonia versus tiempo ( $R^2 \approx 1$ ) (Anexo 1). El experimento fue realizado por triplicado.

### **7.4.2 Diámetro y longitud de las hifas.**

El efecto del quitosano sobre la diferenciación estructural en las regiones apicales y distales de *A. niger* se determinó mediante la medición de los parámetros morfométricos, utilizando análisis de procesamiento de imágenes. De cada tratamiento se tomaron 50 mediciones de los diámetros de las hifas a 40X y 60 mediciones de las longitudes a 10X. Las imágenes del micelio desarrollado sobre la placa de agar (a las 72 h después de la inoculación) fueron capturadas moviendo manualmente el campo del microscopio y empleando las funciones predeterminadas del programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Maryland, USA) (Larralde y col., 1997; Cox y col., 1998). De cada imagen se tomaron aleatoriamente entre 4 y 5 mediciones.

### **7.4.3 Producción de biomasa.**

La producción de biomasa fue cuantificada como el peso seco de la colonia, realizando muestreos cada 24 h hasta que el micelio alcanzó el borde de la caja petri. Para la cuantificación, la placa de agar con el micelio fue separada de la caja petri e introducida en un vaso pp. de 400 mL previamente adicionado con 200 mL de agua destilada, el cual fue introducido en un horno de microondas y puesto a ebullición durante 1 min para fundir completamente todo el agar. Enseguida la solución fue filtrada a vacío utilizando papel filtro Whatman No. 40, realizando 2 lavados con agua destilada. Finalmente, el papel

filtro con el micelio fue puesto a secar en estufa a 105°C durante 2 h y enfriado en el desecador, antes de registrar el peso. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

El peso seco de la colonia fue expresado en mg/cm<sup>2</sup> de placa (López y col., 1997; Larralde y col., 1997) y las curvas de crecimiento fueron ajustadas a la expresión logística (ecuación 2), en donde X fue la densidad de la biomasa (mg/cm<sup>2</sup>), X<sub>máx</sub> fue la máxima producción de biomasa obtenida (cuando dX/dt = 0) y μ<sub>máx</sub> fue la velocidad específica de crecimiento (cuando X << X<sub>máx</sub>).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}}\right) X \quad (\text{Ecuación 2})$$

Los parámetros de crecimiento fueron estimados utilizando el programa STATISTICA Versión 6.0 (Stat Soft, Inc., USA), el cual minimizó la suma del cuadrado del error mediante comparación de los datos experimentales con los datos predichos obtenidos por la resolución de la ecuación (2), dada por la ecuación 3, en donde X<sub>0</sub> fue el valor inicial de la densidad de la biomasa (Anexo 2).

$$X(t) = \frac{X_{\text{máx}}}{1 + \left(\frac{X_{\text{máx}} - X_0}{X_0}\right) e^{-\mu_{\text{máx}} t}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

#### 7.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las observaciones de microscopía electrónica se realizaron en las dos etapas de crecimiento del hongo, en la fase de germinación de las esporas y en la fase de crecimiento apical; en el primer caso se utilizó la técnica de inoculación por siembra en placa con agar, mientras que en el segundo se inoculó por picadura. Las observaciones se realizaron cortando trozos de agar (de 0.5 x 0.5 cm) con las esporas o bien con el micelio, tomadas a las 8 y 48 h después de la inoculación, respectivamente, en medio control y con quitosano. Las muestras fueron fijadas por inmersión total en solución de glutaraldehído al 5% (v/v) durante 24 h a 4°C, continuando con una post-fijación en solución de tetróxido de osmio al 1% (p/v) durante 2 h a 4°C. Enseguida las muestras fueron deshidratadas utilizando una serie de soluciones de acetona (al 30, 40, 50, 70, 80, 90 y 100%) y cubiertas con carbón y oro antes de su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900 LV) (Benhamou, 1992; Benhamou y col., 1994).

#### 7.4.5 Germinación de esporas.

Cajas Petri con agar Czapeck adicionado con 0, 1.6, 3 y 5 g/L de quitosano, fueron inoculadas con 10 μL de una suspensión de esporas de *A. niger* con concentración de 1.5x10<sup>6</sup> esporas/mL, utilizando la técnica de siembra en placa descrita anteriormente; enseguida las placas fueron incubadas a una



temperatura 30°C, realizando muestreos aleatorios a diferentes intervalos de tiempo. La germinación de esporas se determinó mediante la técnica de tinción diferencial con solución de o-toluidina (al 1%) y ácido bórico (al 1%) (proporción 1:1), adicionando 1 mL del colorante sobre la superficie del agar de cada una de las placas muestreadas; el colorante permitió diferenciar los túbulos germinales de las esporas (Paul y col., 1993). Posteriormente, utilizando un microscopio óptico, de cada placa se contaron al azar 200 esporas (germinadas y no germinadas), determinando el número de esporas germinadas por placa. Una espora se consideró germinada cuando la longitud del tubo germinal alcanzó el doble del diámetro total de la espora (Figura 4) (Smilanick y col., 1990; Paul y col., 1993).

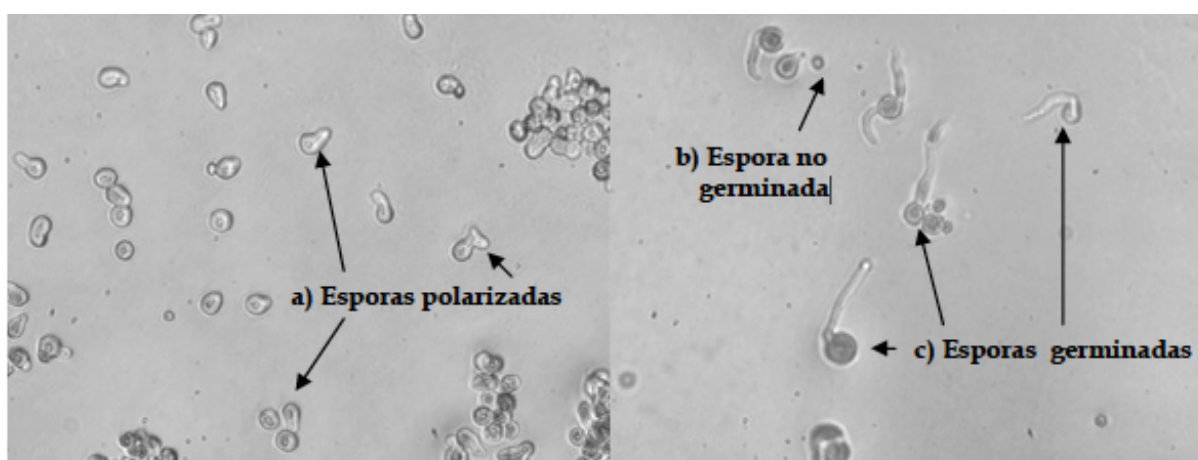


Figura 4. Esporas de *Aspergillus niger*, tomadas en microscopio óptico a 40X: a) Polarizadas; b) No germinadas; c) Germinadas.

Cada tratamiento fue realizado por duplicado y los datos experimentales obtenidos fueron analizados para calcular los siguientes parámetros:

**7.4.5.1 Concentración inhibitoria media (CQ<sub>50</sub>).** La concentración que retardó la germinación de esporas en un 50%, CQ<sub>50</sub>, fue determinado mediante análisis Probit a un intervalo de confianza de 95%, utilizando el programa estadístico NCSS 2001 (NCSS Inc., USA) (Finney, 1952; Infante y Calderón, 1994).

**7.4.5.2 Porcentaje de inhibición de la germinación.** El porcentaje de la inhibición de la germinación fue calculada con respecto al control, utilizando la ecuación 4,

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\bar{S}_c - \bar{S}_i}{\bar{S}_c} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

en donde  $S_c$  fue el porcentaje de esporas germinadas en el control y  $S_i$  fue el porcentaje de esporas germinadas en los diferentes tratamientos; éstos consistieron en los experimentos realizados variando la concentración de quitosano e incubando a 30°C, y en los experimentos en donde se varió la temperatura de incubación, manteniendo constante la concentración del biopolímero, CQ<sub>50</sub> (3.5 g/L). Los porcentajes de inhibición fueron calculados a partir de los datos experimentales obtenidos en el control.

**7.4.5.3 Estimación de los parámetros de germinación.** El valor estimado de CQ<sub>50</sub> fue empleado para la realización de experimentos posteriores de germinación, en donde se varió la temperatura de incubación a 12, 18, 22, 25 y 37°C. Para cada temperatura (incluyendo 30°C), el porcentaje de esporas de *A. niger* germinadas, S, fue ajustado a la expresión logística (ecuación 5),

$$S = \frac{S_{\text{máx}}}{1 + \left(\frac{S_{\text{máx}} - S_0}{S_0}\right) e^{-kt}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

en donde S es el porcentaje de esporas germinadas después de un determinado tiempo (t),  $S_0$  es el porcentaje inicial de esporas germinadas,  $S_{\text{máx}}$  es el máximo porcentaje de esporas germinadas ( $t \rightarrow \infty$ ) y k es la velocidad de germinación. Se supuso que los parámetros  $S_{\text{máx}}$  y k son función de la temperatura, pudiendo ser afectados por la presencia del quitosano en el medio de cultivo. Los valores de  $S_0$ ,  $S_{\text{máx}}$  y k fueron estimados utilizando el programa NCSS 2001 (NCSS Inc., USA).

**7.4.5.4 Energía de activación (EA).** Para describir el efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas en medio control o adicionado con quitosano, los valores estimados de k fueron ajustados al modelo de Arrhenius (ecuación 6),

$$k = Ae^{-\left(\frac{E_A}{RT}\right)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

en donde k es la velocidad de germinación, T es la temperatura absoluta (en grados Kelvin), R es la constante universal de los gases (1.987 cal/mol K), y EA es la energía de activación requerida para la germinación, cuyas unidades fueron expresadas en kcal/mol °K.

**7.4.5.5 Determinación del efecto sinérgico entre quitosano y temperatura.** La inhibición de la combinación de quitosano y temperatura sobre la germinación de esporas fue determinada mediante la fórmula de Limpel (ecuación 7),

$$Ee = X + Y - \left(\frac{XY}{100}\right) \quad (\text{Ecuación 7})$$

en donde Ee es la respuesta aditiva esperada al combinar el quitosano con la temperatura, y X y Y son los porcentajes de inhibición obtenidos para el quitosano y la temperatura, respectivamente. La existencia de sinergismo se consideró cuando la combinación de los dos factores inhibitorios produjo cualquier valor de inhibición mayor que Ee (Lorito y col., 1994).

## **7.5 Evaluación antimicrobiana del quitosano utilizando medio de cultivo líquido Czapeck.**

### **7.5.1 Polarización y germinación de esporas.**

El conteo de esporas polarizadas se llevó a cabo utilizando cajas petri de vidrio con cubreobjetos, las cuales fueron esterilizadas y adicionadas con 10 mL de medio de cultivo líquido Czapeck con 0 (control) y 3.5 g/L de quitosano. Cada una de las placas fue inoculada con 10  $\mu$ L de una suspensión de esporas de *A. niger* con concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL, e incubada a 30°C. A diferentes intervalos de tiempo se realizaron muestreos, los cuales consistieron en retirar los cubreobjetos de las cajas. Posteriormente, cada cubreobjeto (con las esporas adheridas) fue teñido con una gota de solución de azul de metileno y montado sobre un portaobjetos para su observación en un microscopio óptico (Zeiss Axiostar plus, Alemania).

El conteo de esporas polarizadas se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito para el conteo de esporas germinadas en medio de cultivo sólido, seleccionando aleatoriamente un total de 200 esporas (polarizadas y no polarizadas); una espora se consideró polarizada cuando ésta perdió su esfericidad, adquiriendo formas elípticas (Figura 4). Asimismo, se determinó también el número de esporas germinadas, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.4.5. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

**7.5.1.1 Esporas no germinadas.** El número de esporas sin germinar se calculó a partir de los datos experimentales de los experimentos de polarización y germinación, utilizando la ecuación (8),

$$\text{ENG} = 200 - (\text{EG} + \text{EP}) \quad (\text{Ecuación 8})$$

en donde ENG es el número de esporas no germinadas, EG es el número de esporas germinadas, EP es el número de esporas polarizadas y 200 fue el número total de esporas contadas.

### **7.5.2 Diámetro de las esporas e hifas.**

Las determinaciones de los diámetros de las esporas e hifas (a 40X) inoculadas en medio de cultivo líquido se llevaron a cabo siguiendo la técnica de procesamiento de imágenes descrita en la sección 6.4.2. En total se tomaron 100 mediciones a diferentes intervalos de tiempo (cada 3 h), hasta que el porcentaje de esporas germinadas en el control fue del 100%. Las mediciones morfométricas fueron realizadas utilizando muestras frescas (no fijadas), teñidas con una gota de solución de azul de metileno. El incremento en el diámetro de las esporas a través del tiempo fue calculado utilizando la siguiente fórmula (ecuación 9),

$$\text{ID } (\mu\text{m}) = D_Q - \bar{D} \quad (\text{Ecuación 9})$$

en donde ID es el incremento en el diámetro de las esporas ( $\mu\text{m}$ ),  $D_Q$  es el diámetro de las esporas de los diferentes tratamientos y  $\bar{D}$  es el diámetro promedio de las esporas en medio control, al inicio del experimento ( $t = 0$ ).

### **7.5.3 Número de divisiones mitóticas.**

La determinación del número de divisiones mitóticas de las esporas se llevó a cabo utilizando preparaciones fijadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 7.3. Los cubreobjetos fijados fueron teñidos mediante la adición de 2 gotas de solución Hoechst 33258 (Bisbenzimidazol H 33258, Sigma, USA) con concentración de 100 ng/mL, incubando a 25°C durante 5 min; el colorante es específico para DNA, por lo que permite la visualización de los núcleos de las células. Posteriormente, cada uno de los cubreobjetos fue montado sobre un portaobjetos de vidrio para la posterior observación de los núcleos de las esporas en un microscopio de fluorescencia, utilizando un filtro azul-violeta a una longitud de onda de excitación y de emisión de 350-360 y 600-610 nm, respectivamente. Cada experimento fue realizado por duplicado (Momany y Taylor, 2000; Harris, 1994).

### **7.5.4 Número de septos de las hifas.**

El conteo de los septos de las hifas se realizó empleando tinción con solución de Blanco de Calcoflúor (Fluostain I, Sigma, USA) con concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ; el colorante emite fluorescencia cuando se

adhiera a quitina y a glucanos, permitiendo de este modo la visualización de las paredes celulares y septos. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro azul-violeta a una longitud de onda de emisión y excitación de 330-380 y >420 nm, respectivamente (McIntyre y col., 2001; Momany y Taylor, 2000; Harris, 1994).

## **7.6 Elaboración de películas de quitosano.**

La preparación de las películas de quitosano con materiales naturales o sintéticos se llevó a cabo utilizando los siguientes métodos: a) Evaporación de solventes, b) Extrusión y c) Recubrimiento por impregnación y secado.

### **7.6.1 Evaporación de solventes.**

Se prepararon soluciones de quitosano de peso molecular ~400 kDa y grado de desacetilación de 85% (Fluka, Biochemika, USA), siguiendo la metodología descrita en la sección 7.1. La disolución obtenida, con concentración de 1 g/L, se dejó reposar durante al menos 12 h a 25°C. Enseguida se tomaron diferentes volúmenes que fueron vertidos sobre placas de poliestireno, dejándose nuevamente en reposo durante 24 h a 25°C, sobre una superficie previamente nivelada. Por último, las placas con las soluciones se pusieron a secar en estufa a 40°C, hasta la evaporación completa del ácido.

Debido a que las películas de quitosano presentan deficientes propiedades en cuanto a elongación y resistencia cuando se aplica un esfuerzo, en este estudio se modificaron las propiedades mecánicas de esfuerzo de las películas obtenidas, mediante la adición de diferentes cantidades de agentes dispersantes y plastificantes en las mezclas, las cuales variaron desde 2 hasta 60%. Los compuestos fueron añadidos directamente a las soluciones de quitosano y se homogenizaron mediante agitación magnética durante 1 h a 25°C. La elaboración de las películas se llevó a cabo utilizando el procedimiento de evaporación anteriormente descrito.

### **7.6.2 Extrusión.**

Se prepararon mezclas de quitosano con dos polímeros termoplásticos sintéticos, poliestireno (PS) y polietileno de baja densidad (LDPE), las cuales fueron extrudidas en un equipo de extrusión para pequeños volúmenes de mezclas (LME Laboratory Mixing Extruder. ATLAS Polymer Evaluation Products, USA) (Castillo-Ortega y col., 2003). Las mezclas de quitosano con PS se extrudieron utilizando temperaturas de 195 y 210°C para el rotor y el cabezal, respectivamente, mientras que la extrusión de las mezclas con LDPE se realizó a temperaturas de 150 y 160°C. En ambos casos, la

velocidad del motor de salida fue de 10 mm/min. Cada uno de los termoplásticos fue previamente pulverizado antes de ser mezclado con las soluciones del biopolímero, ya sea solo o mezclado con dispersantes y/o plastificantes, las cuales se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito para la técnica de evaporación de solventes. Las pastas heterogéneas obtenidas se dejaron secar a 40°C durante 4 h y se trituraron en un mortero liso, antes de ser introducidas en el extrusor.

### **7.6.3 Recubrimiento por impregnación y secado.**

Las películas extrudidas de PS y LDPE, con espesores promedio de  $0.033 \pm 0.006$  y  $0.027 \pm 0.004$  mm, respectivamente, fueron recubiertas con una capa de quitosano mediante inmersión en solución del biopolímero al 1% (p/v) en ácido acético 0.1 M, dejándolas secar a 25°C durante 12 h.

## **7.7 Caracterización de las películas.**

### **7.7.1 Medición de espesores.**

Los espesores de las películas fueron obtenidos en un micrómetro semiautomático Mitutoyo 700355 (Mitutoyo Inc., Japan), con un rango de sensibilidad de 0.0005-0.001 mm; el equipo fue previamente calibrado con estándares de 0.05, 0.10 y 0.15 mm de espesor (Mitutoyo thickness gage). Los espesores obtenidos fueron reportados como el promedio de 10 mediciones.

### **7.7.2 Propiedades mecánicas.**

Las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación de las películas se evaluaron en un equipo Instron 4502, serie 2115 (Automated Materials Testing System 6.01. Canton, MA, USA). De cada una de las muestras se cortaron tiras de 20 mm de largo por 10 mm de ancho, con centro adelgazado de 5 mm, las cuales fueron sujetadas por los extremos con mordazas. La fuerza y la elongación fueron monitoreadas hasta el rompimiento de las películas; los valores obtenidos fueron reportados como el promedio de al menos 3 réplicas.

### **7.7.3 Análisis de morfología (SEM).**

Las características morfológicas y la homogeneidad de las películas fueron determinadas mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para lo anterior se cortaron piezas de película de 9 mm<sup>2</sup>, las cuales fueron previamente recubiertas con un baño de oro antes de su observación en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5410LV Scanning microscope, USA).

#### **7.7.4 Análisis de permeabilidad al oxígeno.**

La permeabilidad al oxígeno de las películas preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes se evaluó utilizando un equipo OX-TRAN 100 A (Oxygen Permeability Tester. Monocon Modern Controls, Inc., USA) (Islas y col., 2002); las condiciones del análisis fueron las siguientes: sensibilidad de 1-100 mV, resistencia del sensor de 5.3  $\Omega$  y velocidad de la carta de 1.0 mm/min. El área de superficie de la película utilizada para el análisis fue de 2.5 cm<sup>2</sup>, requiriéndose un tiempo de estabilización de 4-6 h. Los análisis se realizaron en una cámara de temperatura controlada a 25°C y humedad relativa de 0%. Las unidades de la velocidad de transmisión de oxígeno fueron obtenidas en cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> día.

#### **7.8 Evaluación de la actividad antifúngica de las películas de quitosano.**

Se elaboraron empaques de quitosano, ya sea solo o plastificados, cortando trozos de película de 5x5 cm, cuyos extremos fueron sellados empleando una solución de adhesivo natural comestible (gretina). Como referencia (control) se prepararon empaques de polietileno de baja densidad (empaque comercial) y celofán comercial (celulosa), utilizando las mismas dimensiones que las bolsas del biopolímero. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los empaques se realizó mediante pruebas in vivo, para lo cual se cortaron piezas de queso manchego (Producto Nacional Menonita, México) de 0.5 cm de espesor y un peso promedio de 6 g. En un experimento preliminar, las piezas de queso fueron inoculadas por picadura con esporas de *Aspergillus niger*; posteriormente fueron empacadas y selladas, incubando a una temperatura de 30°C. Cada 24 h se revisaron los empaques, midiendo el crecimiento radial de hongo y descartando las unidades contaminadas.

Con base en los resultados obtenidos, en un segundo experimento se utilizaron quesos inoculados con *Penicillium chrysogenum*, seleccionado en base a su ocurrencia en productos lácteos. Cada una de las piezas de alimento fue inoculada con 10  $\mu$ L de una suspensión de esporas de *P. chrysogenum* con concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL, utilizando la técnica de siembra; enseguida los quesos inoculados fueron introducidos dentro de los empaques, sellados e incubados a una temperatura de refrigeración (<10°C), determinándose los siguientes parámetros:

##### **7.8.1 Número de unidades contaminadas.**

Cada 24 h se revisaron las muestras empacadas, descartando el número de unidades que hayan presentado contaminación. Una unidad se consideró infectada al momento de presentar daños visibles relacionados con el crecimiento del hongo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de productos contaminados con respecto al tiempo.

### **7.8.2 Acidez.**

Una vez desempacados, cada uno de los productos fue mezclado con agua previamente calentada a 50°C y licuado en un homogeneizador eléctrico (Sper Scientific 460003, USA) durante 2 min a la máxima velocidad. La solución obtenida fue filtrada y el sobrenadante fue analizado para determinar el porcentaje de acidez, utilizando la técnica de titulación con NaOH 0.1 M, empleando fenolftaleína como indicador. El porcentaje de acidez fue expresado como ácido láctico (Kirk y col., 1996).

### **7.8.3 Rancidez.**

La rancidez de los quesos fue determinada mediante la prueba de Kreis, utilizando los sobrenadantes obtenidos en la sección anterior (7.8.2). Las muestras fueron mezcladas con cloroformo, ácido tricloroacético al 30%, floroglucinol al 1% y etanol, midiendo la transmitancia a una longitud de onda de 545 nm (Leslie y Hart, 1991).

## **7.9 Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de las fuentes de variación, tratamientos, tiempo y las interacciones respectivas, fueron determinados mediante análisis ANOVA de dos vías con un intervalo de confianza del 95%; las diferencias estadísticas entre las medias fueron comparadas utilizando la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (ver sección de Anexos). El programa estadístico empleado fue el NCSS 2001 (NCSS Inc., USA).



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Varios autores han reportado el estudio del efecto del quitosano sobre el crecimiento de diversos microorganismos, entre ellos los hongos filamentosos; sin embargo, en la mayoría de los trabajos se analiza únicamente la actividad antimicrobiana del biopolímero sobre la etapa de crecimiento apical. Considerando que las alteraciones pueden ocurrir desde el momento en que el hongo ha sido puesto en contacto con el biopolímero, el estudio de la acción del quitosano sobre ambas fases de crecimiento, la germinación de esporas y el crecimiento apical, provee información valiosa para esclarecer el efecto crítico del biopolímero. Lo anterior resulta de gran interés en términos de aplicaciones, ya que permitiría el establecimiento de estrategias y metodologías para la utilización del quitosano en diversas áreas, desde la preservación de alimentos hasta el diseño de nuevos materiales naturales con propiedades biológicas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentarán en 4 etapas fundamentales:

1. Estudio de la actividad antimicrobiana del quitosano sobre el crecimiento apical y la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck (secciones 8.1 y 8.2, respectivamente).
2. Estudio del efecto inhibitorio del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo líquido Czapeck (sección 8.3).
3. Elaboración y caracterización de películas de quitosano (secciones 8.4 y 8.5).
4. Evaluación del efecto antifúngico de las películas de quitosano (sección 8.6).

### **8.1 Efecto inhibitorio del quitosano sobre el crecimiento apical de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.**

#### **8.1.1 Producción de biomasa.**

La biomasa (mg/cm<sup>2</sup>) fue cuantificada como el peso seco de la colonia desarrollada sobre las cajas petri con agar Czapeck, realizando muestreos cada 24 h hasta que el micelio alcanzó el borde de la placa (López y col., 1997; Larralde y col., 1997). El ajuste de los datos experimentales a la expresión logística (ecuación 3) permitió evidenciar que, a las concentraciones de quitosano estudiadas, la evolución de la biomasa presentó una curva de crecimiento sigmoideal con un alto coeficiente de determinación,  $R^2 > 0.91$  (Figura 5).

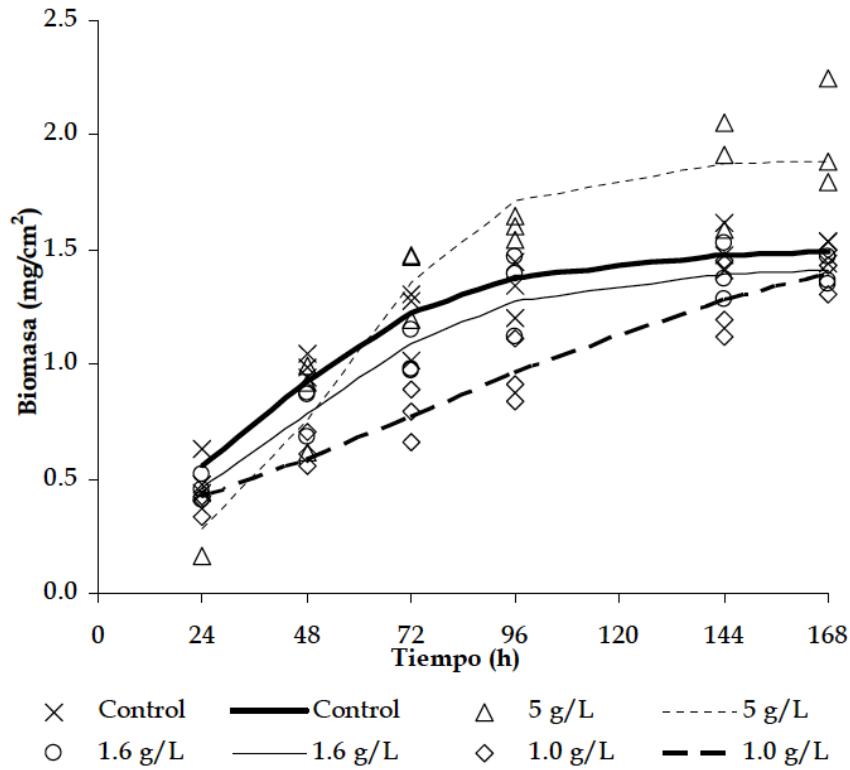


Figura 5. Efecto del quitosano sobre la producción de biomasa de *Aspergillus niger*, a 30°C. Las líneas continuas representan los valores estimados mediante ajuste logístico.

Los valores de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y la máxima producción de biomasa ( $X_{\max}$ ) presentaron una variación modesta de acuerdo con la concentración del biopolímero (Tabla 4). Los valores más bajos de  $\mu_{\max}$  y de la producción de biomasa inicial,  $X_0$ , se obtuvieron en los medios adicionados con 1.0 y 5.0 g/L de quitosano, respectivamente, mientras que los valores más bajos de  $X_{\max}$  se observaron en el medio con 1.6 g/L del biopolímero.

**Tabla 4.** Producción de biomasa de *Aspergillus niger* inoculado en medio adicionado con diferentes concentraciones de quitosano, incubando a 30°C.

Quitosano (g/L)	$X_{\max}$	$X_0$	$\mu_{\max}$	$R^2$
0	1.75 ± 0.12	0.305 ± 0.09	0.050 ± 0.020	0.9148
1.0	1.86 ± 0.25	0.337 ± 0.17	0.020 ± 0.003	0.9328
1.6	1.68 ± 0.11	0.262 ± 0.12	0.039 ± 0.005	0.9103
5.0	2.20 ± 0.16	0.117 ± 0.08	0.053 ± 0.012	0.9232

Valores reportados como la media ± el error estándar.

Con base en lo anterior, no se encontró algún patrón fisiológico que relacione la producción de biomasa ( $X_{max}$ ) con el nivel de quitosano adicionado en el medio de cultivo. En general, el biopolímero presentó un efecto moderado sobre la velocidad específica de crecimiento de *A. niger*, aunque se observó un aumento de  $\mu_{max}$  en el medio con 5.0 g/L de quitosano. Los datos obtenidos del peso seco del micelio demostraron que el hongo fue capaz de crecer en presencia del quitosano, observando un ligero retardo en la fase de crecimiento inicial, relacionado con la germinación de las esporas; este retardo fue proporcional a la concentración del biopolímero (Anexo 1).

### 8.1.2 Crecimiento radial.

La variación del radio de la colonia con respecto al tiempo resultó ser una típica curva de crecimiento logarítmico con un alto coeficiente de determinación ( $R^2 > 0.97$ ), encontrando que todas las concentraciones de quitosano presentaron un efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento radial,  $U$ , de *Aspergillus niger*, obteniendo mayor inhibición ( $P \leq 0.05$ ) a altas concentraciones del biopolímero (Figura 6; Anexo 2).

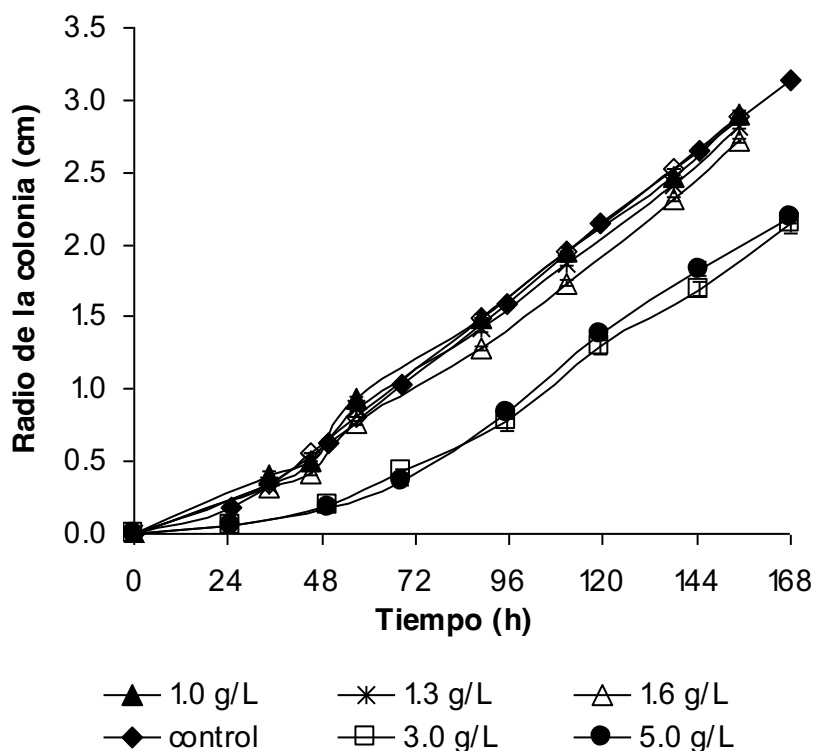


Figura 6. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* inoculado en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de quitosano (0 a 5 g/L).

Al calcular la actividad inhibitoria del quitosano a partir de la medición de la extensión radial de la colonia del hongo inoculado en medio control y con el biopolímero (Ecuación 1), los resultados obtenidos indicaron que los mayores porcentajes de inhibición radial ( $P \leq 0.05$ ) se obtuvieron en los medios adicionados con altas concentraciones del biopolímero (3.0 y 5.0 g/L) (Figura 7).

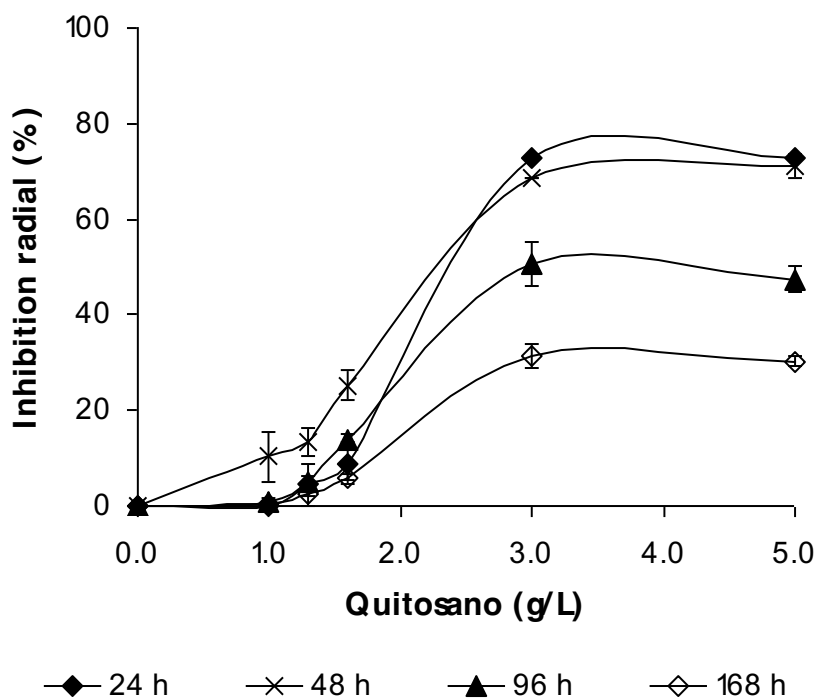


Figura 7. Efecto inhibitorio de la concentración de quitosano sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, a diferentes tiempos de incubación.

En estudios previos se ha reportado que el quitosano, a concentraciones entre 1.5 y 2.0 g/L, resultó ser más efectivo que otros fungicidas comerciales tales como la iprodiona (Rovral®) (El Ghaouth y col., 1991) o el tiabendazol (TBZ) (Zhang y Quantick, 1998), para retardar el deterioro ocasionado por el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* sobre frutas frescas como fresas y cerezas. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 7, en este estudio se encontró que el biopolímero presentó una actividad fungistática en lugar de fungicida, lo cual se relacionó directamente de acuerdo con la concentración de quitosano presente en el medio de cultivo. Los máximos valores de inhibición radial ( $P \leq 0.05$ ) se observaron a las 24 y 48 h después de la inoculación en el medio de cultivo adicionado con 5.0 g/L del biopolímero, los cuales fueron alrededor de 73 y 71%, respectivamente.

El Ghaouth y col. (1997) reportaron resultados semejantes, encontrando valores de inhibición radial de 71.5% para *Rhizopus stolonifer* en medio de cultivo PDA adicionado con 6.0 g/L de quitosano, a los 3 días después de la inoculación. Con base en estos resultados, es muy probable que el quitosano sea capaz de inhibir el crecimiento de diversos hongos filamentosos, lo cual representa una alternativa al empleo de agentes químicos.

Observando la figura 7, el fuerte efecto fungistático del quitosano se presentó durante las primeras horas de crecimiento de *Aspergillus niger*, disminuyendo gradualmente conforme se incrementó el tiempo de incubación; los porcentajes de inhibición obtenidos a las 96 y 168 h fueron de 50 y 30%, respectivamente. Asimismo, se observó que cuando el hongo se desarrolló en medio con alta concentración del biopolímero, este tendió a formar colonias con una alta producción de micelio (Figura 5).

Roller y Covill (1999) reportaron un comportamiento similar con *Mucor racemosus*, el cual formó colonias compactas con producción de un micelio aéreo cuando creció en presencia del biopolímero. Comparando con los resultados presentados en la figura 5, lo anterior indica que el hongo evita el contacto directo con el quitosano localizado sobre la placa con agar, creciendo hacia arriba y formando micelio aéreo; no obstante, este comportamiento se observó sólo a elevadas concentraciones de biopolímero y disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de incubación.

### **8.1.3 Diámetro y longitud de las hifas.**

Como se describió en la sección 7.4.2, las imágenes del micelio de 72 h fueron capturadas moviendo manualmente el campo del microscopio (Larralde y col., 1997), tomando aleatoriamente entre 4 y 5 mediciones por campo. Los resultados indicaron que la presencia del quitosano en el medio de cultivo afectó tanto el diámetro como la longitud de las hifas (Tabla 5), encontrando mayor efecto en los diámetros ( $P \leq 0.05$ ) (Anexo 3). El biopolímero incrementó drásticamente el diámetro promedio de las hifas ocasionando el hinchamiento de las mismas, el cual fue proporcional de acuerdo a la cantidad de quitosano en el medio. Tales trastornos pueden deberse a alteraciones de la pared celular ocasionadas por el quitosano, o bien, a cambios en la presión y en la tensión de la pared, lo cual originó el incremento del diámetro de la región subapical.

Considerando que el quitosano tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad de las células epiteliales debido a que afecta irreversiblemente las rutas metabólicas extracelulares e intracelulares (Dodane y col., 1999), los cambios morfológicos encontrados en las hifas de *Aspergillus niger* pueden estar relacionados con alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, lo cual ocasionó el

incremento en el grosor de las hifas. Asimismo, se puede deducir que el quitosano modificó la relación área/volumen de las hifas del hongo, con lo cual se redujo la cantidad de superficie expuesta a los efectos tóxicos del biopolímero.

**Tabla 5.** Diámetros y longitudes promedio de las hifas de *Aspergillus niger* inoculado en medio de cultivo sólido Czapeck, adicionado con diferentes concentraciones de quitosano.

<i>Quitosano (g/L)</i>	<i>Diámetro (μm)</i>	<i>Longitud (μm)</i>
0	5.9 ± 0.14 <sup>a</sup>	174.4 ± 10.5 <sup>c</sup>
1.6	5.4 ± 0.10 <sup>a</sup>	116.5 ± 11.8 <sup>a</sup>
3.0	7.8 ± 0.15 <sup>b</sup>	133.3 ± 7.4 <sup>ab</sup>
5.0	9.0 ± 0.17 <sup>c</sup>	173.8 ± 13.8 <sup>bc</sup>

Valores reportados como la media ± el error estándar.

Valores con el mismo superíndice no son estadísticamente diferentes entre sí (P≤0.05).

En un trabajo previo, El Ghaouth y col. (1997) reportaron que el biopolímero indujo severos cambios morfológicos en las hifas de *Rhizopus stolonifer*, caracterizados por alteración de diversas partes de la pared celular. Tomando en cuenta que los autores no observaron efectos similares al utilizar quitosano modificado “N,O-carboximetil quitosano”, se puede deducir que la capacidad del biopolímero para inducir cambios morfológicos en las hifas de hongos filamentosos parece estar asociada a su naturaleza catiónica.

#### **8.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

Comparando con el control (Figura 8a), las micrografías electrónicas de *A. niger* durante la fase de crecimiento apical revelaron los cambios morfológicos ocasionados por el quitosano, los cuales fueron caracterizados por deformaciones de las hifas y daños sobre la superficie de las mismas (Figuras 8b y 8c). Los cambios fueron evidenciados principalmente en las hifas periféricas del micelio. Asimismo, fue posible detectar que el hongo desarrolló hifas aéreas en presencia de quitosano, tendiendo a crecer lejos de la superficie del agar; lo anterior sugiere una respuesta estructural al estrés fisiológico debido a que producción de hifas aéreas está involucrada con la etapa inicial de diferenciación, para producir esporas.

Cuando se adicionó quitosano al medio de cultivo, *A. niger* formó un micelio altamente denso en la zona central de la colonia (Figura 8d), lo cual afectó la velocidad de extensión radial en lugar de la producción de biomasa. De igual forma se detectó la presencia de grumos de diferentes tamaños, algunos de los cuales se encontraban en contacto directo con las hifas de *A. niger* (Figura 8e) o bien, distribuidos sobre las placas con agar adicionado con el biopolímero (Figura 8f).

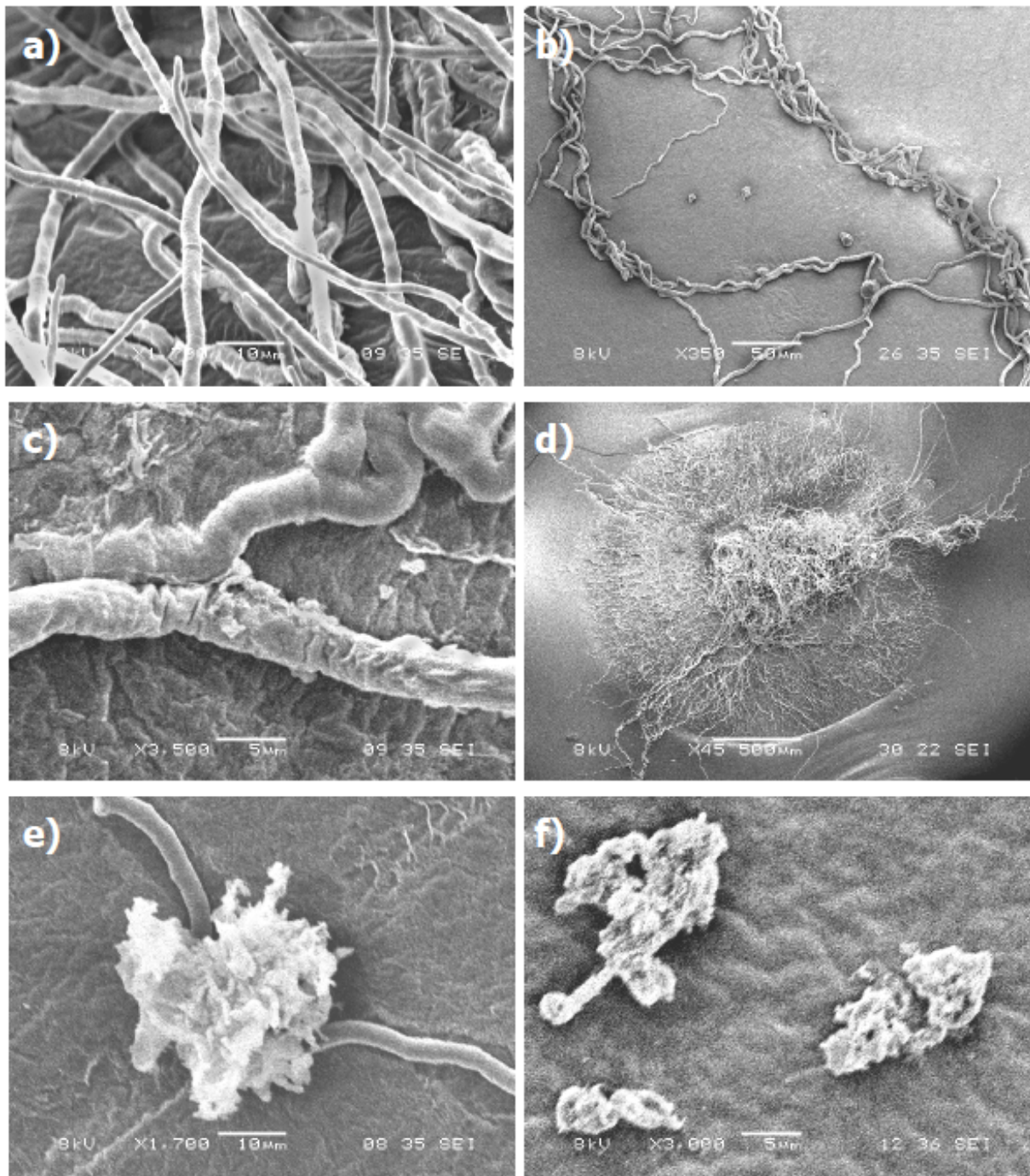


Figura 8. Micrografías de *Aspergillus niger* durante el crecimiento apical, a 30°C: a) Hifa en medio control, a 1700X; b) y c) Hifas periféricas en medio con quitosano a 350 y 3500X, respectivamente; d) Colonia en medio con quitosano, a 45X; e) Hifa periférica en contacto con las partículas en medio con quitosano, a 1700X; f) Partículas encontradas en el medio de cultivo con el biopolímero sin inóculo, a 3000X.

Con respecto a la localización de los grumos, éstos se encontraron distribuidos de manera irregular sobre toda la superficie del agar o bien en contacto con el micelio, por lo que es posible que se trate de partículas de quitosano agregadas durante el proceso de solidificación del medio de cultivo. No obstante, estudios posteriores in vivo utilizando moléculas marcadas de quitosano podrían ayudar a estudiar las implicaciones fisiológicas de los diversos tipos de interacciones, ya que permitiría confirmar si efectivamente se trata de agregados del biopolímero, o bien si existe alguna relación en cuanto a la especificidad del quitosano sobre alguna estructura en particular del hongo.

## **8.2 Efecto inhibitorio del quitosano sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo sólido Czapeck.**

### **8.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

Las micrografías de las esporas en proceso de germinación demostraron que cuando *A. niger* crece en medio de cultivo adicionado con 5.0 g/L de quitosano, tiende a producir grandes cantidades de material extracelular (Figuras 9a y 9b), el cual cubrió totalmente la superficie.

En forma adicional se observaron partículas en contacto directo con las esporas (Figura 9c), mientras que en medio control no se observó la producción de compuestos extracelulares (Figuras 9d y 9e). Todas las observaciones fueron realizadas utilizando muestras extraídas al mismo después de la inoculación, encontrando que a las 8 h, los túbulos germinales fueron más largos en el medio control con respecto al medio con quitosano.

Al comparar las imágenes de las esporas inoculadas en medio control y con quitosano (Figuras 9a y 9d), se observa que el biopolímero ocasionó un hinchamiento de las esporas, lo cual se puede relacionar directamente con las alteraciones morfológicas encontradas una vez que el hongo se encuentra en la etapa de crecimiento apical (Figura 8). A su vez, la presencia del compuesto producido indica que los mecanismos de defensa del hongo ocurren antes de que la espора inicie el proceso de germinación en presencia del biopolímero.

### **8.2.2 Germinación de esporas.**

Como se mostró anteriormente, a una temperatura óptima para el crecimiento del hongo, 30°C, el quitosano presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento inicial de *Aspergillus niger* (Figuras 6 y 7), así como también sobre la producción inicial de biomasa (Tabla 4, Anexo 2).



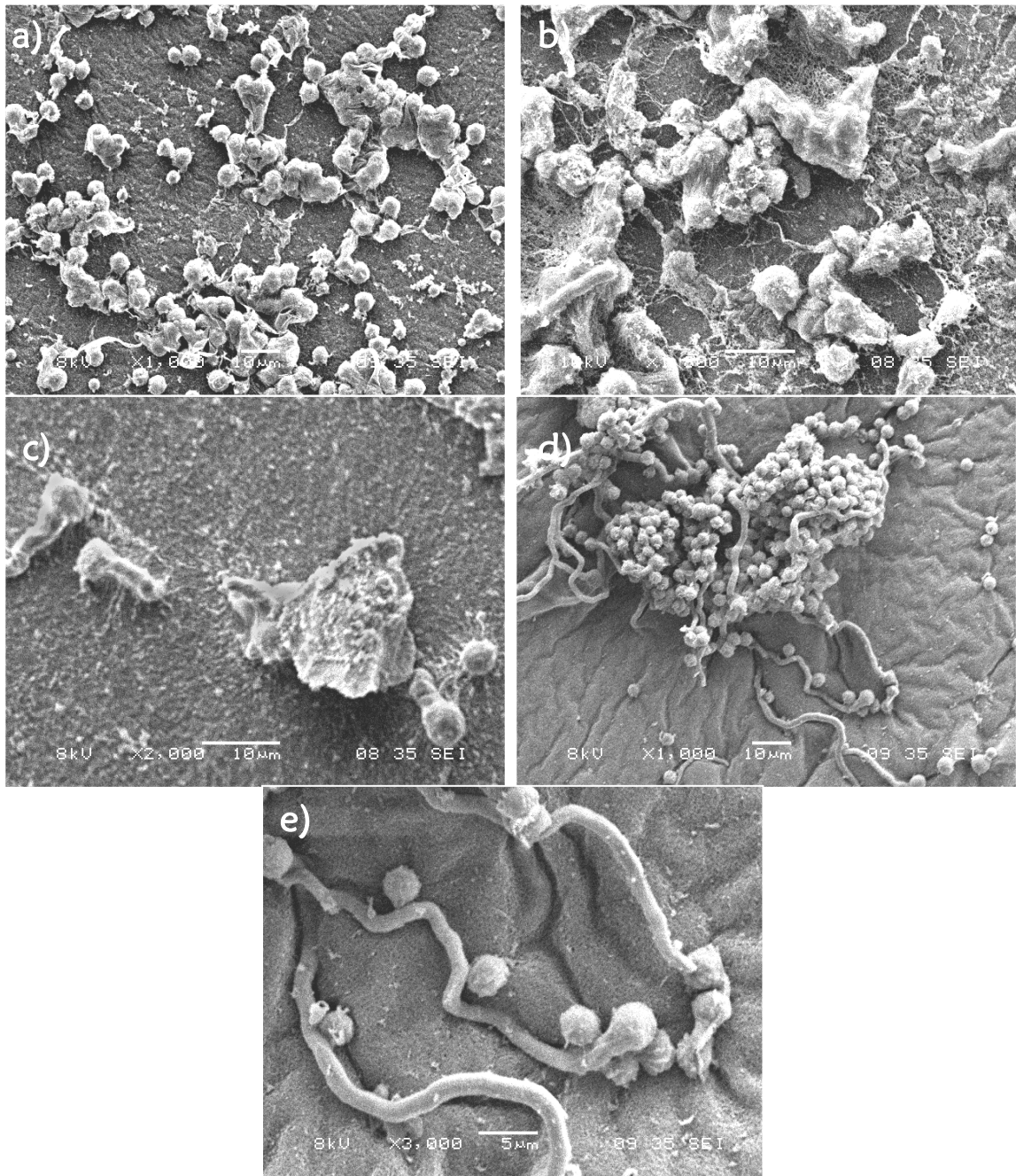


Figura 9. Micrografías SEM de las esporas de *Aspergillus niger* en la etapa de germinación, a 30°C: a) y b) Esporas germinadas en medio con quitosano, a 1000X y 1500X, respectivamente; c) Esporas germinadas en contacto con las partículas encontradas en medio con el biopolímero, a 2000X; d) y e) Esporas germinadas en medio control, a 1000X y 3000X, respectivamente.

Tomando en cuenta el mecanismo de inhibición propuesto con base en la naturaleza catiónica del quitosano, lo anterior hizo suponer que el principal efecto del biopolímero ocurre durante la primera etapa de crecimiento del hongo, por lo cual se llevó a cabo un estudio más detallado sobre la germinación de esporas, utilizando la técnica de tinción diferencial con o-toluidina:ácido bórico (proporción 1:1), descrita en la sección 7.4.5

Los datos experimentales obtenidos indicaron que la germinación de esporas se incrementó exponencialmente con respecto al tiempo (Figura 10) y al analizar los resultados se corroboró que el quitosano retardó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el proceso de la germinación de las esporas, observando mayor efecto al incrementarse la cantidad del biopolímero en el medio de cultivo. Cuando en el control se alcanzó un valor de esporas germinadas alrededor del 100%, a las 13 h después de la inoculación, en el medio adicionado con quitosano se obtuvo una germinación del 37% (Anexo 4).

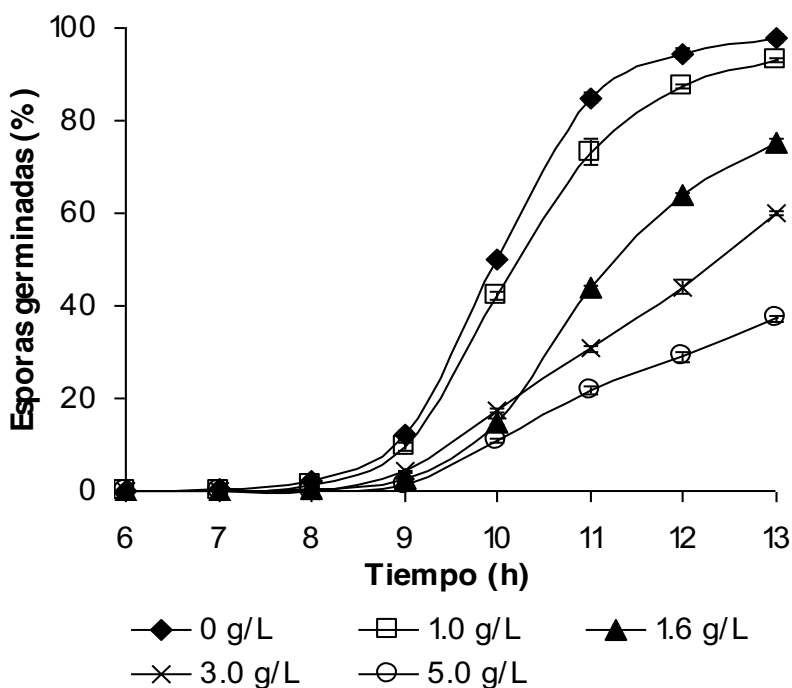


Figura 10. Esporas germinadas de *Aspergillus niger* inoculado en medio de cultivo Czapeck adicionado con diferentes concentraciones de quitosano. El porcentaje de esporas germinadas se determinó a 30°C, utilizando la técnica de tinción diferencial con o-toluidina:ácido bórico (sección 7.4.5).

De acuerdo con los resultados del porcentaje de germinación y a las micrografías observadas, el posible mecanismo de inhibición parece estar relacionado con una interacción directa entre el quitosano y la superficie externa de la spora; es probable que la mayor parte de las esporas pudieron haber quedado

en contacto directo con el quitosano presente en el medio de cultivo, permitiendo la germinación únicamente de aquellas células que quedaron libres. Rhoades y Roller (2000) reportaron un comportamiento similar con *Candida* sp. expuesta a quitosano, en donde la población de la levadura presentó una rápida disminución del crecimiento inicial, la cual fue explicada en términos de la interacción entre el quitosano y las células.

Con base en los estudios realizados, se sugiere que el biopolímero presente en la placa con agar es capaz de alterar el aumento en el volumen, causando un retardo en el inicio de la germinación (Figura 10). Lo anterior es apoyado en gran medida por los resultados obtenidos del análisis de microscopía electrónica de barrido (Figuras 8 y 9) y del análisis morfométrico de las hifas (Tabla 5), en donde se observó que las esporas presentaron anomalías morfológicas tales como esporas equinuladas. Por el contrario, en el medio control, las esporas de *A. niger* fueron esféricas desde el inicio del experimento. El proceso de germinación se inició a partir de las 7 h de incubación a 30°C (Figura 10); mientras que en unas esporas fue posible detectar la presencia del túbulo germinal, otras empezaron adquirir forma de pera (Figura 4), lo cual indicó que se encontraban en estado de polarización.

### **8.2.3 Concentración inhibitoria media (CQ<sub>50</sub>).**

La concentración que retardó la germinación de esporas en un 50%, CQ<sub>50</sub>, fue estimada mediante análisis Probit (Finney, 1952; Infante y Calderón, 1994), a partir de los datos experimentales obtenidos a las 13 h después de la inoculación, cuando en el control se alcanzó cerca del 100% de la germinación de esporas, a 30°C. El resultado indicó que se requieren 3.5 g/L de quitosano para retardar la germinación al 50% (Figura 11) (Anexo 5).

### **8.2.4 Porcentaje de inhibición de la germinación.**

Debido a que el deterioro de alimentos por microorganismos depende de varios factores tales como pretratamiento, condiciones de temperatura durante el almacenamiento y distribución, se llevaron a cabo experimentos posteriores de germinación en donde se varió la temperatura de incubación a 12, 18, 22, 25, y 37°C, además de la temperatura óptima para el crecimiento del hongo, 30°C. Para la realización de los experimentos a diferentes temperaturas se utilizaron medios de cultivo adicionados con 3.5 g/L de quitosano (valor estimado de CQ<sub>50</sub>).

El porcentaje de inhibición de la germinación fue calculada con respecto al control, utilizando la ecuación 4, a partir de los datos experimentales variando la concentración del biopolímero, a 30°C y fijando la CQ<sub>50</sub> con diferentes temperaturas de incubación. Para el primer caso, los porcentajes de inhibición

obtenidos para cada concentración de quitosano fueron calculados con respecto al control, mientras que, en el segundo caso, los porcentajes de inhibición a las diferentes temperaturas de incubación se calcularon a partir de los datos obtenidos cuando el control alcanzó alrededor del 100% de germinación.

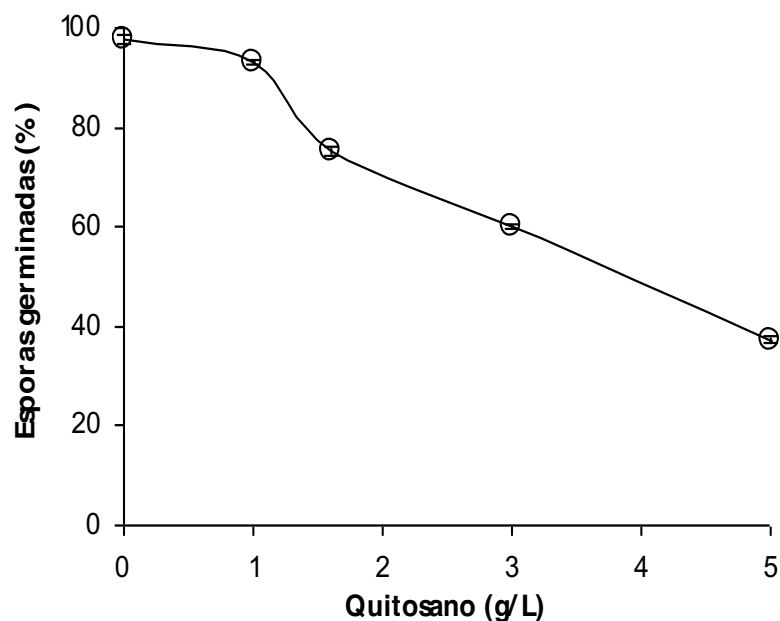


Figura 11. Efecto de la concentración de quitosano sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, y estimación de la cantidad del biopolímero que retarda el 50% de la germinación de esporas (CQ50) del hongo, a 30°C, estimada mediante análisis Probit.

Los resultados obtenidos indicaron que a las 8 h después de la inoculación el quitosano inhibió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el crecimiento de *A. niger*, obteniendo valores de inhibición alrededor del 100% en los medios adicionados con altas concentraciones del biopolímero (Figura 12) (Anexo 6). El efecto inhibitorio disminuyó conforme se incrementó el tiempo de incubación, obteniendo valores alrededor del 70 y 60% a las 12 y 13 h, respectivamente, en los medios con 5.0 g/L del biopolímero.

El estudio detallado de las cinéticas de germinación de *Aspergillus niger* variando la temperatura demostró que la actividad inhibitoria del quitosano se incrementó al bajar la temperatura de incubación ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 13) (Anexo 7). Cuando el hongo fue incubado a 12 y 18°C se obtuvieron valores de inhibición alrededor de 80 y 70%, respectivamente, mientras que a 37°C se obtuvo un valor de 2.3%.

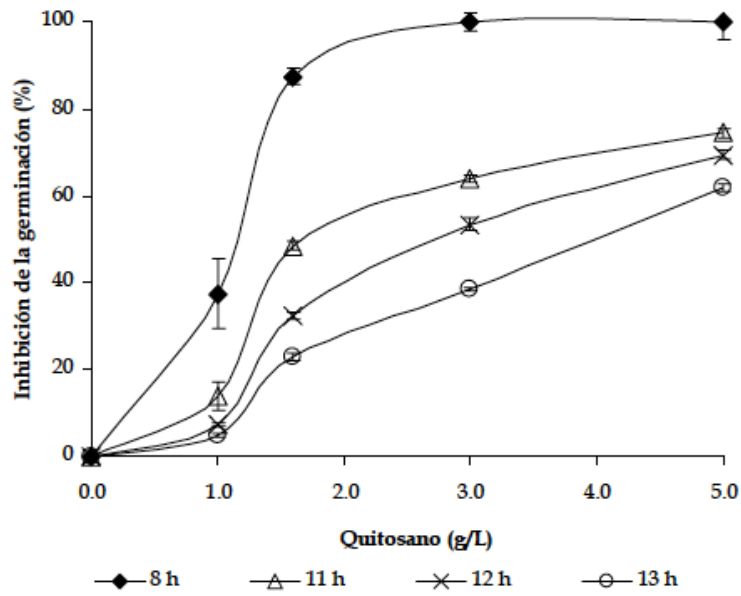


Figura 12. Inhibición de la germinación de esporas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo Czapeck adicionado con diferentes concentraciones de quitosano, a 30°C.

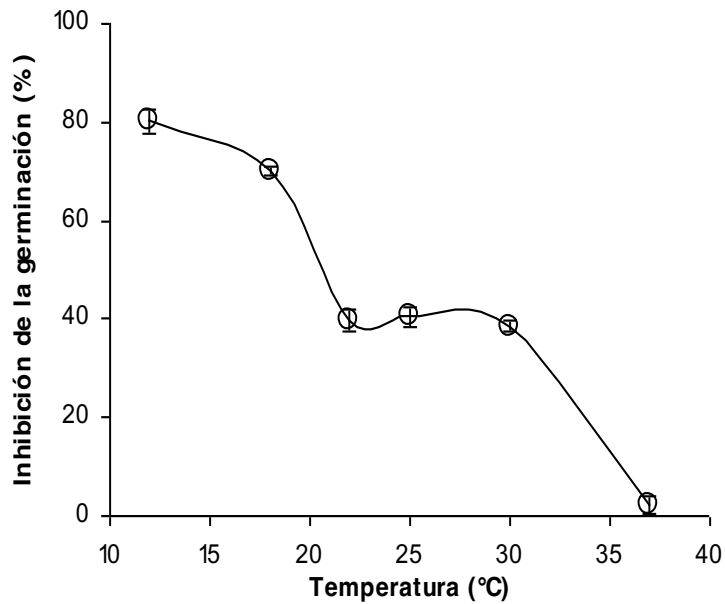


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la inhibición de la germinación de esporas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano (CQ<sub>50</sub>).

Para cada temperatura, el valor de la inhibición en la germinación fue calculada con respecto al control, cuando en éste se alcanzó cerca del 100% de esporas germinadas; lo anterior sucedió a las 240, 96, 30, 24, 13 y 14 h después de la inoculación en los medios incubados a 12, 18, 22, 25, 30 y 37°C, respectivamente.

De acuerdo con Lorito y col. (1993), la inhibición de la germinación de esporas es un proceso muy correlacionado con la elongación de las hifas, sugiriendo que tanto las enzimas como los agentes químicos son capaces de inducir anomalías morfológicas dentro de las estructuras de las hifas, incluyendo destrucción o estallido de las células vegetativas como en el caso de las enzimas.

Con base en lo anterior es posible deducir que, en una primera etapa, el quitosano afecta el proceso inicial del crecimiento de *A. niger* y retarda la germinación de esporas (Figuras 9 y 10), lo cual da como resultado una alteración en el proceso natural de elongación de los túbulos germinales del hongo; es en esta segunda etapa en donde fueron evidentes las alteraciones morfológicas, las cuales se relacionaron directamente con el hinchamiento y la distorsión de las hifas (Tabla 5, Figura 8).

Por otro lado, durante el proceso de esporulación de los hongos se acumulan grandes cantidades de calcio en las esporas y este mineral juega un papel importante en la germinación (Shyu y Foegeding, 1991; Lydan y Cotter, 1995; Salas y col., 1983; Roller y Covill, 1999). Warwar y Dickman (1996) reportaron que la adición de EGTA (ácido etilen-bis-(oxietilen-nitro)tetra acético) o bien de bloqueadores específicos, ocasionaron una alteración en la homeostasis del calcio, dañando el desarrollo del apresorio de *Colletotrichum trifolli*; más aún, los inhibidores de calmodulina (proteína reguladora específica que actúa como receptor intracelular de  $Ca^{2+}$ ) afectaron los procesos de germinación y diferenciación, lo cual significa que la vía de transducción de la señal de  $Ca^{+2}$ /calmodulina es importante para el desarrollo temprano de *C. trifolli* sobre la superficie de la planta.

Comparando los requerimientos de calcio, Shyu y Foegeding (1991) reportaron que para mantener esporas de *Bacillus cereus* en estado latente e inactivo se requiere un complejo calcio-proteína (posiblemente una enzima); la alteración de la estabilidad de dicha estructura, o bien de la localización del calcio, puede influir sobre las reacciones de unión las cuales dependen de la disponibilidad del calcio, ya sea en forma localizada o intracelular. Los autores reportaron que la activación de enzimas específicas para la germinación, tales como enzimas proteolíticas parecidas a la tripsina, proteasas que hidrolizan pequeñas proteínas solubles en ácido que posee la misma, o bien enzimas líticas de la corteza, ocurre

durante la fase temprana de la germinación, y por consiguiente los defectos en estos procesos enzimáticos resultan en efectos similares a los obtenidos con antagonistas de calmodulina.

Considerando que el quitosano tiene la propiedad de actuar como quelante de cationes (Wu y col., 1999), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el biopolímero puede limitar el crecimiento inicial de hongos filamentosos tales como *A. niger*, mediante un mecanismo indirecto haciendo que el calcio u otros minerales, o bien nutrientes esenciales, no estén disponibles para el desarrollo de los microorganismos.

Con respecto a los mecanismos de inhibición basados en la inducción de enzimas, otros autores han reportado que el quitosano puede inducir la producción de las enzimas quitinolíticas o glucanolíticas en tejidos vegetales como fresas y cerezas (Zhang y Quantick, 1998), tomate (Benhamou, 1992, 1996; Benhamou y col., 1994) y semillas de trigo (Reddy y col., 1999). Tales enzimas han sido aisladas de diversos hongos como *Trichoderma harzianum* (Lorito y col., 1993) y *Verticillium lecanii* (Matsumoto y col., 2003), y utilizadas para incrementar sinérgicamente las propiedades antifúngicas de diferentes compuestos tóxicos. Lorito y col. (1994) mezclaron enzimas (quitinasas y glucanasas) con fungicidas como glicotoxina, flusilazol, miconazol, captan y benomyl para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, encontrando que la adición de 10 µg/L de endoquitinasa de *T. harzianum* redujo la LD<sub>50</sub> de la toxina.

La inducción de enzimas puede explicar la producción de compuestos extracelulares observados por análisis SEM cuando *A. niger* se desarrolló en medio con el biopolímero (Figura 9), ya que es posible que el hongo haya producido compuestos como enzimas u otras moléculas de defensa durante la fase de crecimiento inicial. Lo anterior se relaciona con el efecto retardado encontrado en el proceso germinativo, debido a que durante este tiempo el hongo adaptó su metabolismo a la presencia de quitosano en el medio de cultivo, para posteriormente crecer.

Estudios previos confirman esta hipótesis, ya que se encontró que cuando *Aspergillus niger* se desarrolla en medio líquido Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano (CQ<sub>50</sub>), el hongo fue capaz de producir enzimas quitosanasas, las cuales se incrementaron con respecto al control a partir de las 100 h, obteniendo valores de 0.05 y 0.45 unidades de actividad (UA, µmol/mL) para el medio control y el medio con quitosano, respectivamente (datos no presentados). Una unidad de actividad de quitosanasasa se definió como la cantidad de N-acetilglucosamina liberada por 1 µmol de enzima.

### 8.2.5 Estimación de los parámetros de germinación.

Los parámetros de la germinación fueron estimados para cada temperatura, ajustando los datos experimentales a la expresión logística (ecuación 5); en todos los casos se obtuvieron coeficientes de determinación,  $R^2 \geq 0.96$  (Tabla 6). Los valores estimados (Tabla 6) indicaron que el quitosano afectó el máximo porcentaje de esporas germinadas ( $S_{max}$ ) de *A. niger* con respecto al control (Figura 14), obteniendo valores de  $S_{max}$  alrededor del 100% para el control, los cuales permanecieron constantes a todas las temperaturas probadas, mientras que en los medios con quitosano se encontró un aumento constante conforme se incrementó la temperatura de incubación.

Tabla 6. Parámetros estimados mediante ajuste logístico de los datos experimentales de la germinación de esporas en medio de cultivo Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano, incubado a diferentes temperaturas.

<i>Temperatura (°C)</i>	$S_{max}$ (%)	$S_0$ (%)	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$
<b>Control</b>				
12	98.9 ± 3.55	0.476 ± 0.21	0.035 ± 0.003	0.9914
18	89.9 ± 1.94	0.447 ± 0.26	0.150 ± 0.017	0.9850
22	96.1 ± 1.33	0.806 ± 0.20	0.346 ± 0.018	0.9959
25	95.7 ± 1.08	0.001 ± 0.0001	0.851 ± 0.031	0.9964
30	103.2 ± 2.84	0.0002 ± 0.00004	1.257 ± 0.022	0.9903
37	99.2 ± 1.68	0.010 ± 0.01	1.049 ± 0.083	0.9968
<b>Quitosano</b>				
12	32.5 ± 2.86	0.055 ± 0.002	0.028 ± 0.002	0.9670
18	32.6 ± 4.40	0.892 ± 0.38	0.056 ± 0.009	0.9599
22	61.3 ± 4.05	0.003 ± 0.001	0.408 ± 0.083	0.9901
25	61.2 ± 3.08	0.018 ± 0.001	0.454 ± 0.102	0.9887
30	71.6 ± 2.11	0.001 ± 0.0001	0.957 ± 0.193	0.9931
37	94.5 ± 3.51	0.003 ± 0.001	1.163 ± 0.227	0.9902

Valores reportados como la media ± el error estándar.

De acuerdo con Paul y col. (1993), durante el proceso de germinación de esporas ocurren 3 principales cambios estructurales: hinchamiento de la espora, salida del túbulo germinal y elongación. Además, en



el inicio del proceso, el crecimiento del túbulo depende en gran medida de las reservas endógenas de la espora y posteriormente de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo (Trinci, 1971). Tomando en cuenta que el calcio es uno de los minerales necesarios para la germinación y el crecimiento de las esporas (Roller y Covill, 1999), es posible deducir que el quitosano es capaz de interferir en el suministro de minerales u otros compuestos requeridos para la célula.

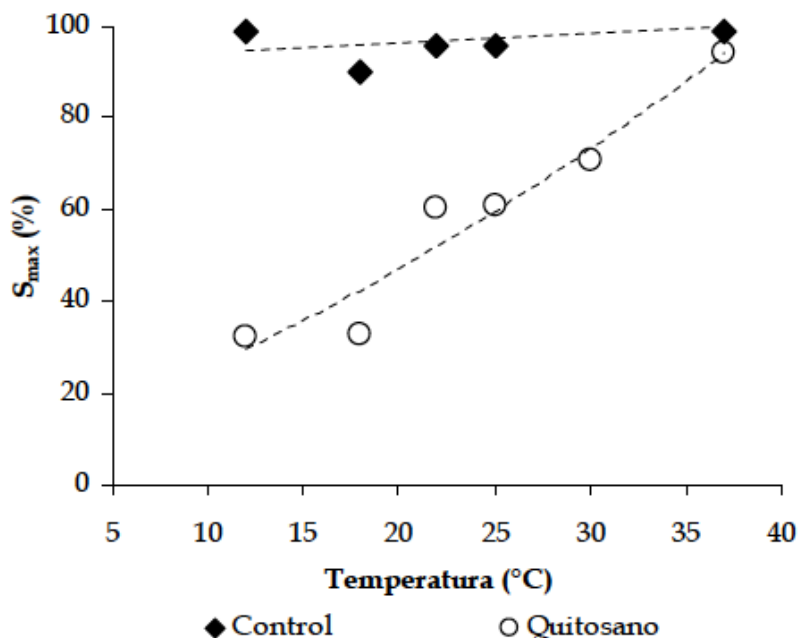


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el máximo porcentaje de germinación de esporas ( $S_{max}$ ) de *Aspergillus niger* inoculado en medio Czapeck control y con 3.5 g/L de quitosano (CQ<sub>50</sub>).

Cuando *A. niger* creció en el medio control, el valor de  $S_{max}$  fue mayor con respecto al valor obtenido en medio adicionado con 3.5 g/L de quitosano, lo cual sucedió a todas las temperaturas probadas. La presencia del biopolímero afectó fuertemente el valor estimado de  $S_{max}$  a todas las temperaturas de incubación, mientras que en el control permaneció constante. Con respecto a las velocidades de germinación,  $k$ , estimadas para cada temperatura, se observó que el quitosano presentó un efecto modesto con respecto al control (Figura 15).

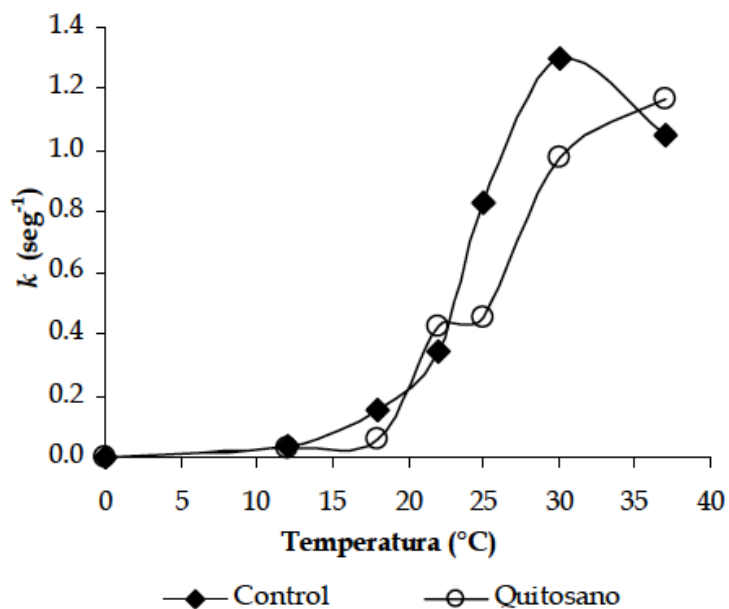


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de germinación,  $k$ , de *Aspergillus niger* inoculado en medio control y con 3.5 g/L de quitosano (CQ<sub>50</sub>).

### 8.2.6 Energía de activación ( $E_A$ ).

Para determinar la energía de activación (kcal/mol °K) requerida para la germinación del hongo y describir el efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas en medio control o adicionado con quitosano, los valores estimados de  $k$  fueron ajustados al modelo de Arrhenius (ecuación 6). Los valores de las energías de activación ( $E_A$ ) fueron calculados a partir de las pendientes obtenidas en la gráfica de Arrhenius de *A. niger* inoculado en medio control y medio adicionado con 3.5 g/L de quitosano (Figura 16), encontrando valores de 35.6 y 36.5 kcal/mol K, respectivamente, con un coeficiente de determinación,  $R^2 \geq 0.92$ .

Los valores obtenidos de EA indicaron que la presencia de quitosano en el medio no afectó la velocidad de germinación, lo cual se pudo deber a que el efecto inhibitorio del biopolímero sobre la germinación de esporas de *A. niger* presentó resultados significativos ( $P \leq 0.05$ ) sólo a bajas temperaturas ( $<18^\circ\text{C}$ ).

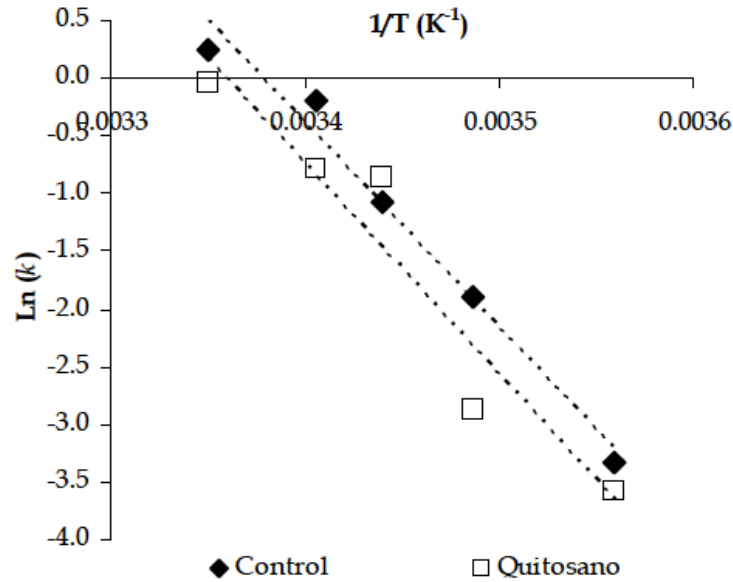


Figura 16. Efecto de la temperatura ( $1/T$ , en grados Kelvin) sobre la velocidad de germinación ( $\ln k$ ) de *Aspergillus niger* inoculado en medio control y con 3.5 g/L de quitosano (CQ<sub>50</sub>). La energía de activación,  $E_A$ , fue calculada utilizando la ecuación de Arrhenius, a partir de las pendientes obtenidas.

### 8.2.7 Determinación del efecto sinérgico entre quitosano y la temperatura.

Tal como se indica en la sección 7.4.5.5, el efecto sinérgico ( $E_e$ ) obtenido al combinar el efecto del quitosano y la temperatura sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, se determinó mediante la fórmula de Limpel (ecuación 7), en donde  $E_e$  fue la respuesta aditiva esperada al combinar el biopolímero con la temperatura de incubación (Lorito y col., 1994). Se encontró que la combinación de baja temperatura ( $\leq 18^\circ\text{C}$ ) y la toxicidad del biopolímero a un nivel de 3.5 g/L (CQ<sub>50</sub>) presentaron un efecto sinérgico, debido a que la respuesta aditiva esperada ( $E_e$ ) fue menor con respecto a los porcentajes de inhibición de cada uno de los factores por separado (Tabla 7).

Tabla 7. Respuesta inhibitoria aditiva ( $E_e$ ) obtenida del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) y la temperatura sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, estimada mediante la ecuación de Limpel.

Temperatura (°C)	Inhibición (%) <sup>1</sup>	$E_e$ (%)	Sinergismo
12	80.2 ± 2.3	69.9	+
18	70.2 ± 1.0	69.2	+
22	39.6 ± 2.2	69.7	-
25	40.4 ± 2.0	68.9	-
37	2.3 ± 1.8	68.8	-

<sup>1</sup>Valores experimentales obtenidos al combinar el efecto del quitosano con temperatura (Figura 15).

El valor de Ee observado para la inhibición de la germinación de esporas de *A. niger* en medio con quitosano, a 12°C, fue de  $50.9 + 38.6 - [(50.9 * 38.6) / 100] = 69.9$ , mientras que el porcentaje de inhibición obtenido al incubar el hongo a 12°C en medio con quitosano (CQ<sub>50</sub>) fue de 80.2% (Figura 13). Por el contrario, no se observó sinergismo cuando *A. niger* fue inoculado en medio con el biopolímero e incubado a temperaturas >18°C, debido a que los valores de Ee resultaron ser mayores que los porcentajes de inhibición obtenidos de los análisis de germinación del hongo. Con base en lo anterior se puede deducir que la combinación de ambos factores, temperaturas moderadas y 3.5 g/L de quitosano, puede ser un método viable para aumentar en gran medida la vida de anaquel de diversos tipos de alimentos, ya que el efecto inhibitorio se da directamente sobre la etapa de crecimiento inicial del hongo.

### **8.3 Efecto inhibitorio del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, utilizando medio de cultivo líquido Czapeck.**

#### **8.3.1 Diámetro de las esporas e hifas.**

Las determinaciones de los diámetros de las esporas e hifas, desarrolladas en medio de cultivo líquido Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano, se llevaron a cabo realizando muestreos a diferentes intervalos de tiempo y utilizando muestras frescas (no fijadas) teñidas con solución de azul de metileno (sección 7.4.2). Los resultados del análisis morfométrico indicaron que el quitosano incrementó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) tanto el diámetro promedio de las esporas como el de las hifas (Tabla 8), encontrando mayor efecto en los diámetros de las hifas con respecto al control (Anexos 8 y 9).

A las 18 h después de la inoculación, el diámetro promedio de las hifas en el medio control fue de 2.4  $\mu\text{m}$ , mientras que en los medios adicionados con quitosano fue de 3.5  $\mu\text{m}$ . Al igual que en el experimento en dónde se utilizaron placas con agar Czapeck (sección 7.1.3), la presencia de quitosano dio como resultado hifas más hinchadas y deformes con respecto al control. Al calcular el incremento en el diámetro de las esporas a partir del diámetro promedio del control al tiempo inicial  $t = 0$  (Ecuación 9), los resultados indicaron que el biopolímero retardó ( $P \leq 0.05$ ) el proceso natural de hinchamiento de las esporas con respecto al control (Anexo 10). El máximo incremento en el control se observó entre las 10 y 12 h, disminuyendo a medida que se alcanzó el 100% de la germinación; por el contrario, en el medio con quitosano se observó una tendencia exponencial conforme se incrementó el tiempo de incubación (Figura 17).

Tabla 8. Diámetro promedio de las esporas e hifas de *Aspergillus niger* inoculado en medio de cultivo líquido Czapeck adicionado con 3.5 g/L de quitosano e incubado a 30°C, obtenido a diferentes intervalos de tiempos.

Tiempo (h)	Diámetro promedio ( $\mu\text{m}$ )			
	Esporas		Hifas	
	Control	Quitosano	Control	Quitosano
0	$3.5 \pm 0.037^a$	$3.5 \pm 0.037^a$	N.D.	N.D.
5	$4.3 \pm 0.039^{bc}$	$4.3 \pm 0.046^{bc}$	N.D.	N.D.
8	$4.4 \pm 0.053^{bc}$	$4.6 \pm 0.059^{def}$	$2.0 \pm 0.053^b$	N.D.
12	$4.7 \pm 0.075^{def}$	$4.5 \pm 0.050^{bcde}$	$2.2 \pm 0.033^{bcd}$	$2.4 \pm 0.223^a$
14	$4.4 \pm 0.082^{bcd}$	$4.7 \pm 0.082^{efg}$	$2.3 \pm 0.032^{cd}$	$3.6 \pm 0.058^b$
16	$4.8 \pm 0.088^{ef}$	$4.8 \pm 0.083^{efg}$	$2.2 \pm 0.043^{bcd}$	$3.6 \pm 0.048^b$
18	$4.4 \pm 0.072^{bc}$	$4.8 \pm 0.081^{fg}$	$2.4 \pm 0.039^{bc}$	$3.5 \pm 0.040^b$

Valores reportados como la media  $\pm$  el error estándar.

Valores con el mismo superíndice en la misma columna, no son estadísticamente diferentes entre sí ( $P \leq 0.05$ ).

N.D.: No determinado debido a que no se observaron túbulos germinales.

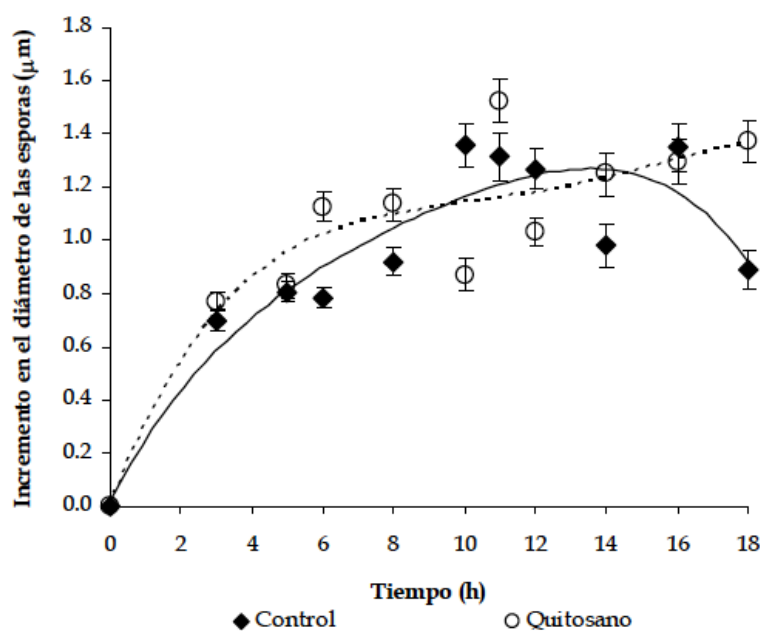


Figura 17. Incremento en el diámetro promedio de las esporas de *Aspergillus niger* inoculado en medio de cultivo líquido Czapeck control y con 3.5 g/L de quitosano, obtenido a diferentes intervalos de tiempo. Los valores fueron calculados a partir del diámetro de las esporas en el control, a  $t = 0$ . Las líneas indican la tendencia del incremento del diámetro de las esporas en medio control (—) y con quitosano (----).

Al final del experimento (a las 18 h) se obtuvieron incrementos en los diámetros de 0.89 y 1.37  $\mu\text{m}$  en el control y en el medio con quitosano, respectivamente. Lo anterior se puede deber a que el quitosano retarda el crecimiento inicial y, por consiguiente, el incremento en grosor de la espora, debido a la acumulación de reservas endógenas y a la síntesis de enzimas, ambas destinadas para la germinación.

### **8.3.2 Polarización y germinación de esporas.**

Con base en las observaciones realizadas durante el estudio de la actividad antifúngica del quitosano y considerando la importancia de los resultados obtenidos al estudiar ampliamente el efecto del biopolímero sobre la germinación de esporas de hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, para el análisis de la polarización y germinación de esporas utilizando medio de cultivo líquido, se incluyó un control con un conservador comercial (benzoato de sodio), el cual fue adicionado en el medio de cultivo a las dosis recomendadas por la FDA ( $<1.0$  g/L). Lo anterior permitió comparar la actividad inhibitoria del biopolímero contra la del benzoato de sodio.

El conteo de esporas polarizadas y germinadas se realizó a diferentes intervalos de tiempos, a  $30^{\circ}\text{C}$ , utilizando muestras fijadas y teñidas con solución de azul de metileno. La metodología empleada fue la misma descrita para el conteo de esporas en medio de cultivo sólido (sección 7.4.5), seleccionando en forma aleatoria un total de 200 células (germinadas/no germinadas y polarizadas/no polarizadas). Los resultados obtenidos indicaron que la adición de 3.5 g/L de quitosano retardó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) la germinación de esporas de *A. niger* en medio de cultivo líquido, a  $30^{\circ}\text{C}$  (Figura 18) (Anexo 11).

Comparando las cinéticas de la germinación de esporas en medio de cultivo líquido, se puede observar que el quitosano presentó un efecto inhibitorio mayor ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control y al conservador comercial (benzoato de sodio). Mientras que el medio control se obtuvo  $>98\%$  de esporas germinadas a las 18 h después de la inoculación, en los medios de cultivo adicionados con benzoato de sodio y quitosano se obtuvieron valores de 85.8 y 15.3% de germinación, respectivamente.

Por otro lado, al calcular los porcentajes de inhibición con respecto al control, se encontró que el quitosano fue capaz de inhibir la germinación de esporas del hongo hasta en un 84.5% a las 18 h después de la inoculación, mientras que el conservador presentó una inhibición de 12.7% (Figura 19). Lo anterior indica que el quitosano resultó ser más efectivo que el benzoato de sodio para inhibir la germinación de esporas de *Aspergillus niger* a  $30^{\circ}\text{C}$ , encontrando que el biopolímero inhibió el 82.1% de la germinación de esporas con respecto al conservador, el cual fue similar en el control.

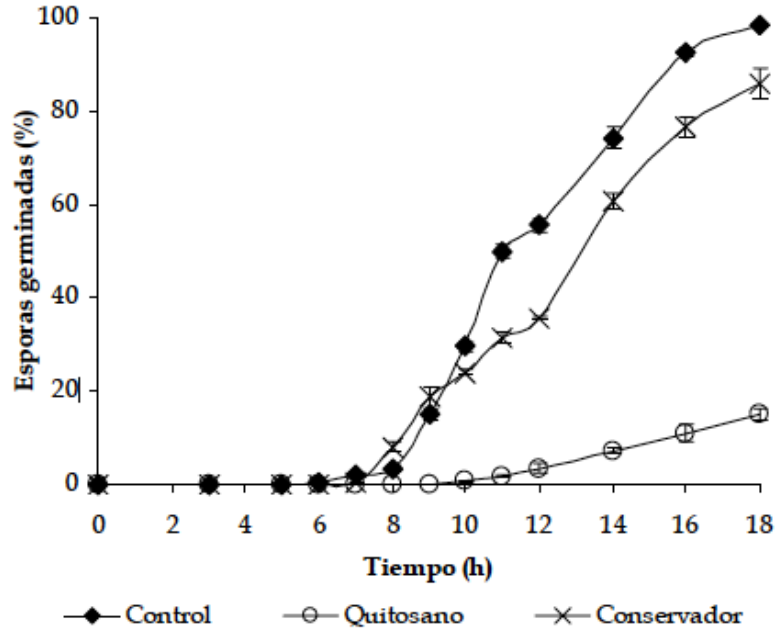


Figura 18. Germinación de esporas de *Aspergillus niger* en medios de cultivo líquido Czapeck control, con 1.0 g/L de conservador (benzoato de sodio) y con 3.5 g/L de quitosano, incubados a 30°C.

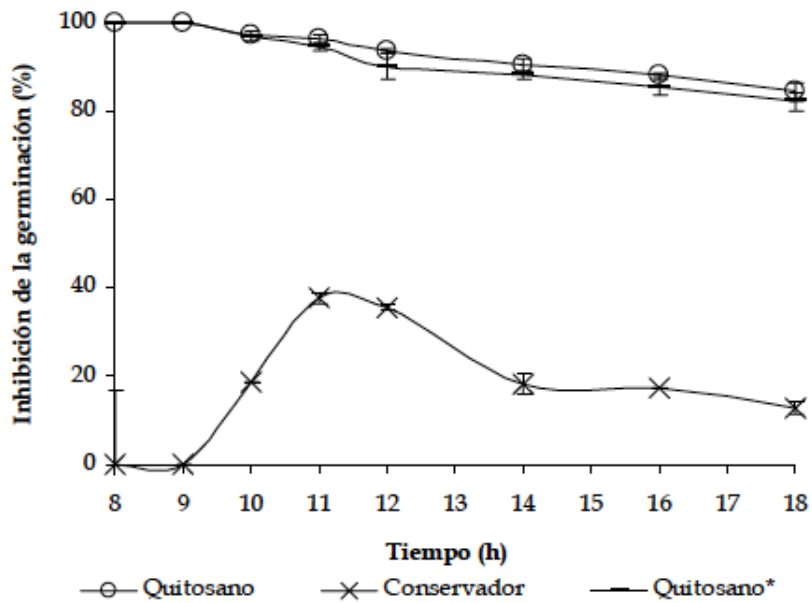


Figura 19. Efecto de la adición de quitosano (3.5 g/L) y conservador (1.0 g/L de benzoato de sodio) sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, a 30°C, calculada con respecto al control. Qitosano\* indica los datos de inhibición del quitosano calculados con respecto al conservador.

La notable diferencia en cuanto al efecto inhibitorio del quitosano y del conservador sobre la germinación del hongo se puede deber al modo de acción con que actúa cada uno. Siendo una macromolécula polimérica, el quitosano es incapaz de pasar a través de la pared de la célula para interactuar directamente con los componentes intracelulares. Por el contrario, la actividad antimicrobiana de la mayoría de los conservadores que funcionan como ácidos débiles involucra la difusión de moléculas lipofílicas no disociadas a través de la membrana plasmática en el interior del citoplasma, en donde se disocian en aniones cargados y protones; ello ocasiona una reducción en el pH intracelular, lo cual inhibe la actividad de algunas enzimas (Sagoo y col., 2002).

**8.3.2.1 Esporas no germinadas.** Los valores obtenidos del número de esporas sin germinar fueron calculados a partir de los datos de los experimentos de polarización y germinación, considerando el número total de esporas contadas (200) y utilizando la ecuación 8. Los resultados indicaron que la adición de quitosano incrementó el número de esporas sin germinar y sin polarizar con respecto al control (Figura 20). A las 12 h después de la inoculación, solo el 35.8% de las esporas inoculadas en el control permanecieron sin germinar y sin polarizar, mientras que en el medio añadido con el quitosano se encontró un valor de esporas no germinadas del 76.8%.

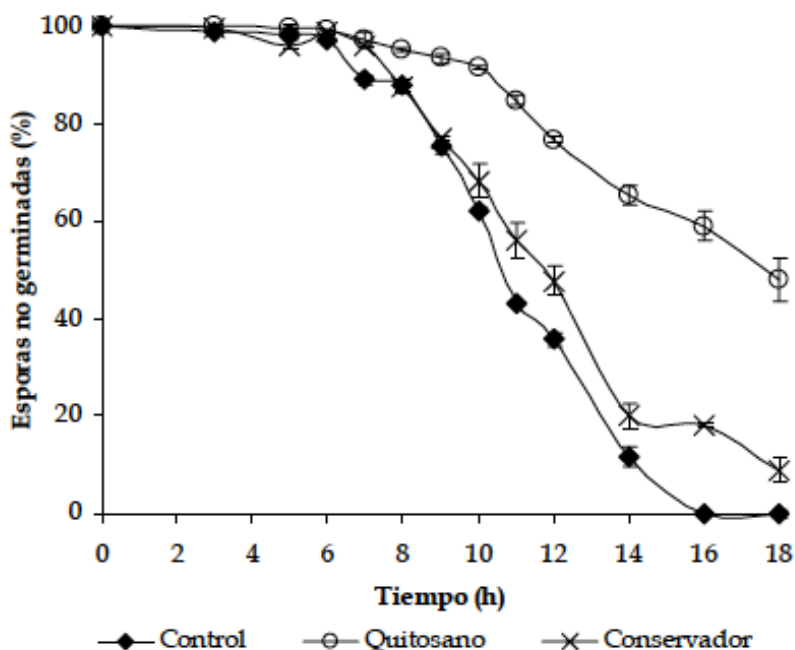


Figura 20. Porcentaje de esporas de *Aspergillus niger* que permanecieron sin germinar y sin polarizar en medio control, medio con benzoato de sodio como conservador (1.0 g/L) y medio adicionado con 3.5 g/L de quitosano, a 30°C.



El benzoato de sodio presentó un efecto modesto sobre el proceso de la germinación, obteniendo un valor de 47.8%. Siguiendo el proceso de crecimiento del hongo, el porcentaje de esporas no germinadas disminuyó conforme se incrementó el tiempo de incubación, obteniendo valores de 0, 48 y 9% en medio control, con quitosano (CQ<sub>50</sub>) y con el conservador, respectivamente, a las 18 h; estos valores confirman que el biopolímero es más efectivo que el conservador para retardar el crecimiento inicial de *A. niger*, a 30°C.

### 8.3.3 Número de divisiones mitóticas.

La determinación del número de divisiones mitóticas se llevó a cabo realizando un conteo del número de núcleos existentes dentro de las esporas del hongo, utilizando preparaciones fijadas y teñidas con solución Hoechst 33258 (100 ng/mL) (Figura 21), contando un total 100 células. Al analizar los resultados se observó que a las 3 h después de la inoculación, en el medio control se obtuvo un 91.5% de esporas con un solo núcleo (0 divisiones mitóticas), mientras que en medio con quitosano y con conservador se encontraron valores de 74 y 77%, respectivamente (Figura 22).

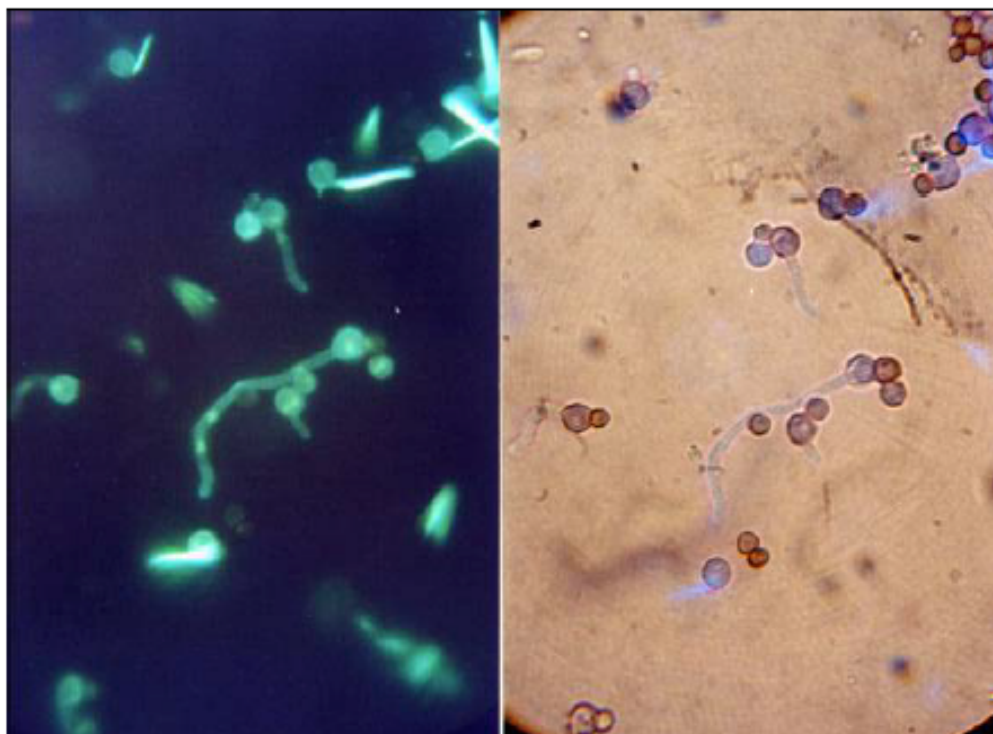


Figura 21. Esporas de *Aspergillus niger* inoculado en medio con 3.5 g/L de quitosano, incubado a 30°C (a 100X). Los núcleos fueron teñidos con solución de Hoechst 33258 (100 ng/mL), incubados a 30°C.

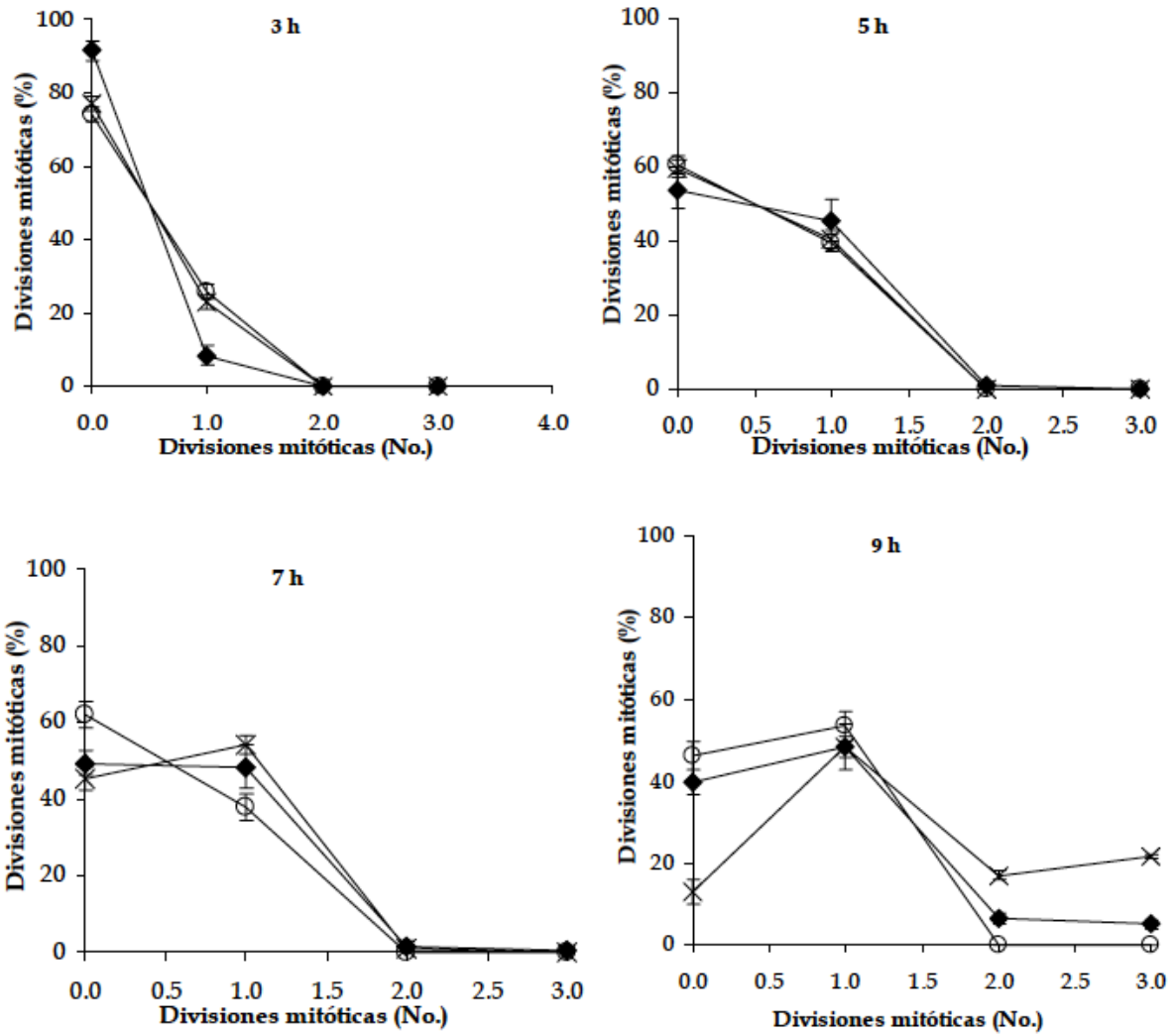


Figura 22. Porcentajes de esporas de *Aspergillus niger* con 0, 1, 2 y 3 divisiones mitóticas, obtenidos a diferentes tiempos en medio de cultivo líquido Czapeck control, con quitosano (3.5 g/L) y con benzoato de sodio como conservador (1.0 g/L), a 30°C: (♦) Control; (o) Quitosano; (x) Conservador.

Como era de esperarse, a medida que disminuyó el porcentaje de esporas con 0 divisiones mitóticas (con 1 núcleo) se incrementó el número de esporas binucleadas (con 1 división mitótica), encontrando valores de 48.5 y 38% de esporas con 2 núcleos para el control y el medio adicionado con quitosano, respectivamente, a las 7 h. A este mismo tiempo después de la inoculación, los porcentajes de esporas con 0 divisiones mitóticas fueron de 49.5% en el control y 62% en el medio con el biopolímero. Comparando con los resultados obtenidos en el medio de cultivo adicionado con el conservador, se

observó que, a las 7 h, el porcentaje de núcleos con 0 y 1 división mitótica fueron similares al control (45.5 y 54%, respectivamente) (Figura 22).

Por otro lado, al final del experimento (a las 9 h), el número de esporas con 1 división mitótica fue alrededor del 48.5% para el medio control y el conservador, mientras que, en el medio con el biopolímero, el número observado fue mayor (53.5%) ( $P \leq 0.05$ ) (Anexo 12). Lo anterior corrobora el retraso en el crecimiento inicial del hongo, ya que cuando la mayoría de las esporas ha iniciado el proceso de duplicación en el medio control, en el medio adicionado con el biopolímero el conteo de esporas con 1 núcleo resultó ser mayor a partir de las 5 h. Asimismo, comparando el número de divisiones mitóticas en el medio con el conservador, la presencia del biopolímero resulta ser más tóxica para el crecimiento hongo.

Los resultados obtenidos muestran que el quitosano afecta el crecimiento de *Aspergillus niger* a nivel de duplicación celular, ocasionando un retardo inicial de los procesos de polarización y germinación de la espora. Tomando en cuenta los resultados obtenidos al calcular el incremento en el diámetro promedio de las esporas (Figura 17), es posible que el retardo pueda estar relacionado con alteraciones a nivel de membrana, lo cual a su vez explica el hinchamiento inicial de la espora con respecto al control.

#### **8.3.4 Número de septos de las hifas.**

El conteo de los septos de las hifas se realizó siguiendo la metodología descrita para el conteo del número de divisiones mitóticas, utilizando solución de Blanco de Calcoflúor (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con el fin de teñir la quitina y los glucanos de las paredes celulares y septos (McIntyre y col., 2001; Momany y Taylor, 2000; Harris, 1994).

El análisis de fluorescencia permitió evidenciar la presencia de material extracelular en las muestras incubadas en medio con quitosano; dicho material fue teñido con la solución de blanco de Calcoflúor, lo cual vuelve a corroborar los resultados obtenidos en experimentos anteriores (Figuras 23c y 23d). Es posible que el material encontrado sobre la superficie de las preparaciones de *A. niger* inoculado en medio de cultivo líquido Czapeck con quitosano, sea una respuesta fisiológica del hongo al estrés ocasionado por la presencia del biopolímero; posteriormente, el diámetro del túbulo germinal crece de manera anormal, siendo posible observar el incremento en el diámetro con respecto al control (Figuras 23a y 23b). Por otro lado, dicho material fue teñido con el colorante y no fue evidenciado en el control, lo cual indica que posiblemente se trate de residuos de quitosano parcialmente hidrolizados por el hongo.

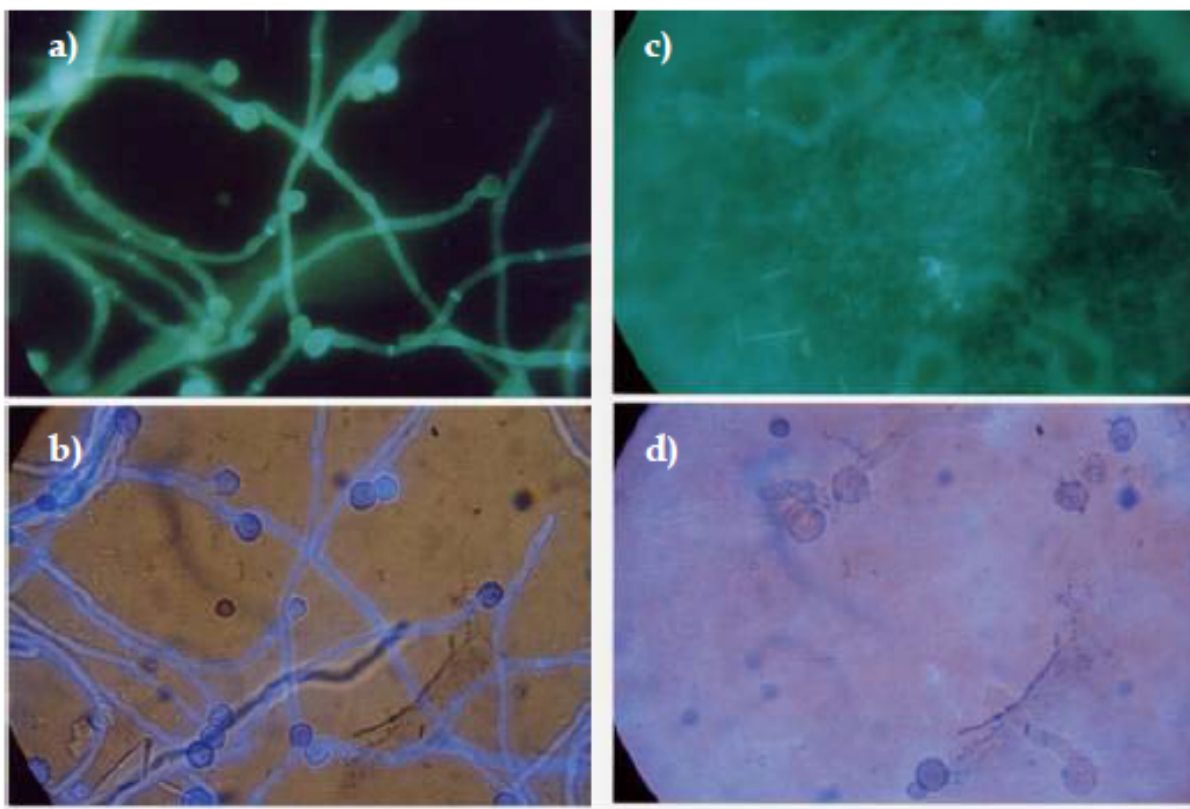


Figura 23. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las hifas de *Aspergillus niger* inoculado en medio control y con quitosano, a 30°C, obtenidas mediante tinción con solución de Blanco de Calcoflúor (10 µg/mL): a) y b) Septos de las hifas de *A. niger* en medio control, a 100X; b) y c) Esporas e hifas del hongo inoculado en medio con 3.5 g/L de quitosano, a 100X.

Al observar las preparaciones en el microscopio de fluorescencia, se observó que, en el medio control, el número de hifas aseptadas disminuyó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) conforme se incrementó el tiempo de incubación, encontrando 59% de hifas con 0 septos, a las 12 h después de la inoculación. Mientras tanto, al igual que los resultados obtenidos al contar el número de divisiones mitóticas, la presencia del quitosano resultó ser más tóxica con respecto al conservador, obteniendo 86 y 100% de hifas aseptadas en el medio de cultivo con conservador (1.0 g/L) y con quitosano (3.5 g/L), respectivamente (Figura 24) (Anexo 13).

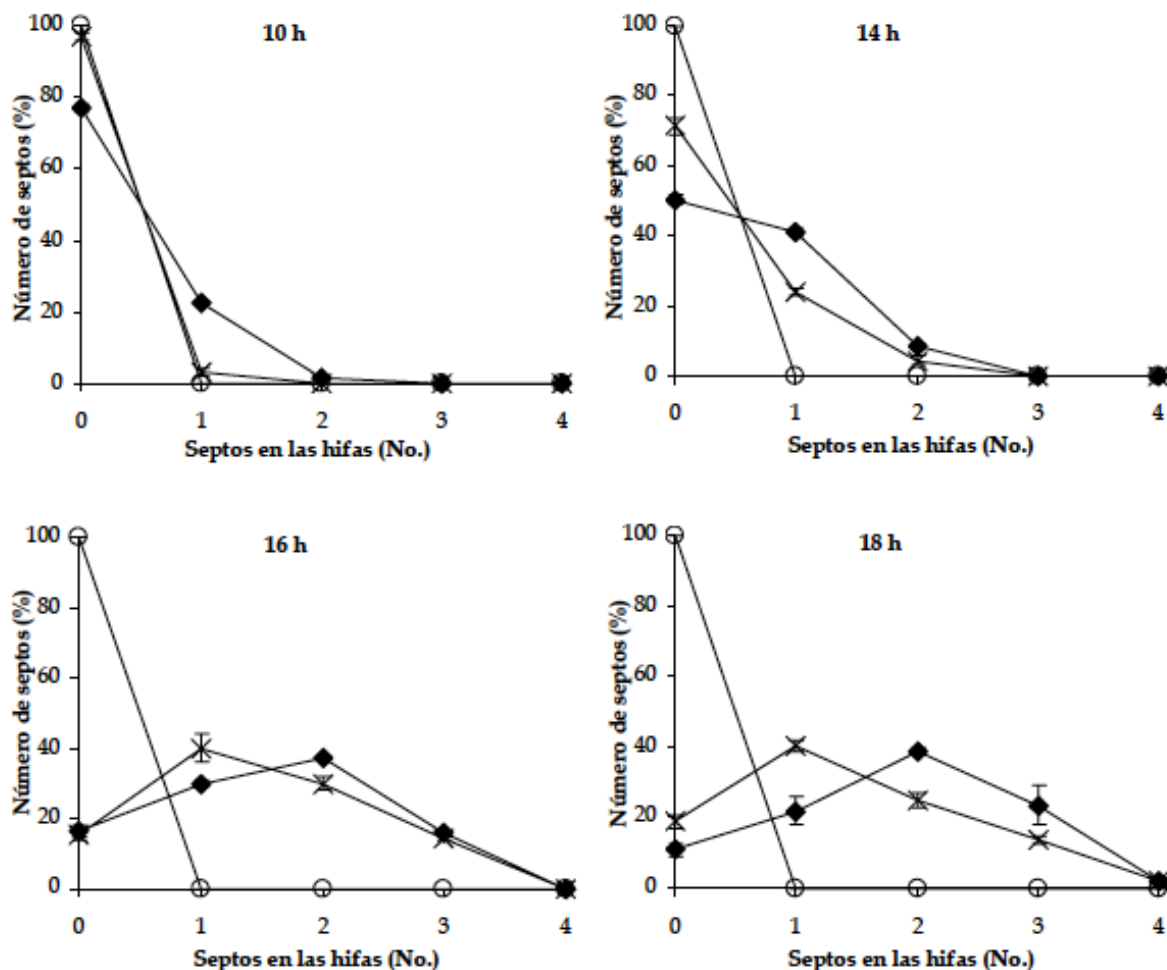


Figura 24. Porcentajes de hifas de *Aspergillus niger* con 0, 1, 2, 3 y 4 septos, obtenidos a diferentes tiempos en medio de cultivo líquido Czapeck control, con quitosano (3.5 g/L) y con benzoato de sodio como conservador (1.0 g/L), a 30°C: (♦) Control; (o) Quitosano; (x) Conservador.

El número de septos en las hifas se incrementó con respecto al tiempo de incubación, encontrando 11 y 22% de hifas con 0 y 1 septo en el control, respectivamente, a las 18 h, cuando en el medio con quitosano se obtuvo 100% de esporas aseptadas. Comparando las alteraciones morfológicas encontradas en las hifas (Tabla 8, Figuras 8 y 23), el análisis del proceso de septación del hongo permitió conocer el efecto del biopolímero sobre la etapa de crecimiento apical de *A. niger*, en dónde es evidente el incremento en el diámetro de las hifas (Tabla 8) y la deformación de los túbulos germinales (Figura 8), dando como resultado hifas hinchadas con modificaciones en el proceso de formación de septos (Figura 24). Con base en lo anterior, es posible deducir que el quitosano modifica el patrón fisiológico de *Aspergillus niger*, ocasionando que éste se desarrolle de manera irregular en el medio líquido; no obstante, una vez que el hongo logra adaptarse al biopolímero, el crecimiento se da de manera similar al del control, lo cual se

evidencia de acuerdo con los resultados obtenidos al estudiar el efecto del quitosano sobre la etapa de crecimiento apical (sección 8.1).

## **8.4 Elaboración de películas de quitosano.**

Debido a que la principal causa de contaminación de los alimentos es el crecimiento microbiano sobre la superficie, la elaboración de empaques con actividad antimicrobiana resulta ser un área de investigación muy prometedora. Considerando las características físicas de las películas obtenidas, los resultados de este estudio indicaron que la técnica de evaporación de solventes fue la más adecuada ya que permitió la obtención de películas transparentes, homogéneas, sin irregularidades superficiales y fácilmente moldeables.

### **8.4.1 Evaporación de solventes.**

De acuerdo con Bégin y Van Calsteren (1999), el arreglo intramolecular del quitosano en medio acuoso es influenciado por las características de la solución ácida utilizada, tales como fuerza iónica, grado de disociación y presencia de grupos aminos e hidroxilo (Park y col., 2002). En este sentido, la compatibilidad y homogeneidad encontrados en las películas obtenidas en este estudio al evaporar las disoluciones del biopolímero en ácido acético diluido, puede explicarse debido a un aumento en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y los grupos amino, los cuales se incrementaron a medida que se aumentó la concentración del biopolímero.

En este trabajo, la incorporación de sacarosa como dispersante dio como resultado películas sumamente rígidas y quebradizas, mientras que la adición de plastificantes, en particular sorbitol, mejoró en gran medida las propiedades físicas, obteniendo películas con mayor flexibilidad y resistencia. El mejor efecto plastificante obtenido al utilizar sorbitol en lugar de glicerol, puede explicarse en términos de compatibilidad entre el quitosano y el sorbitol, la cual se puede atribuir a la fuerte interacción de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de quitosano con el plastificante, o bien, a la formación de una mezcla homogénea en donde todas las moléculas del biopolímero fueron rodeadas por el plastificante.

### **8.4.2 Extrusión.**

El método de extrusión con polietileno de baja densidad permitió la obtención de películas moldeables y elásticas, con una superficie ligeramente rugosa debido a la presencia de las partículas de quitosano, las cuales quedaron distribuidas en forma de agregados tanto en la superficie como en el interior de la película, dando una sensación un poco áspera al tacto. Asimismo, la adición del dispersante mejoró

notablemente la homogeneidad de las muestras, aunque se observó un ligero oscurecimiento originado por la caramelización de la sacarosa, el cual se incrementó gradualmente conforme se aumentó la concentración de dispersante en la mezcla a extrudir.

Ratajska y Boryniec (1999) encontraron características similares al extrudir mezclas de poliolefinas (polietileno, polipropileno y polietilentereftalato) con quitosano, reportando la presencia de grandes agregados distribuidos a lo largo de toda la película, los cuales facilitaron la degradación del material; de acuerdo a los autores, la biodegradabilidad de películas poliméricas constituidas por 2 componentes depende considerablemente de las dimensiones y la distribución de las partículas del material natural en la película. Con base en lo anterior, los agregados de quitosano encontrados en las películas extrudidas con polietileno (LDPE) podrían funcionar como sitios susceptibles para la descomposición microbiana del material obtenido.

#### **8.4.3 Recubrimiento.**

En las películas extrudidas y recubiertas se observó que el biopolímero presentó baja adherencia a los polímeros sintéticos utilizados (poliestireno y polietileno de baja densidad), dando como resultado la obtención de un material compuesto de 2 capas desprendibles una de la otra. Mediante esta técnica y utilizando polipropileno como material base, Shin y col. (1999; 2002) encontraron que la rigidez de la película aumentó de acuerdo con el contenido de quitosano, mientras que la permeabilidad al O<sub>2</sub> (expresada como permeabilidad al aire), tensión y elongación se vieron disminuidos conforme aumentó la concentración del biopolímero. Con base a lo anterior, la técnica de evaporación de solventes fue seleccionada para la preparación de los empaques poliméricos que se utilizaron en la etapa de caracterización y evaluación antimicrobiana.

### **8.5 Caracterización de las películas.**

#### **8.5.1 Propiedades mecánicas.**

De acuerdo con Khan y col. (2000), las pruebas de tensión ofrecen un indicio de la fuerza y elasticidad de las películas, los cuales pueden ser reflejados por la resistencia a la tensión y elongación a la ruptura. Considerando que la estructura copolimérica del quitosano parcialmente desacetilado tiende a disminuir las propiedades mecánicas de esfuerzo, en este estudio se analizaron diversos métodos físicos para mejorarlas, en particular las del módulo inicial y esfuerzo a la ruptura.

*Películas preparadas por evaporación de solventes.* Las películas elaboradas a partir de mezclas de quitosano con plastificantes y/o dispersante, preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes, presentaron una estructura rígida y frágil, la cual se incrementó al aumentar la concentración del biopolímero. Sin embargo, las películas resultaron ser transparentes, de aspecto uniforme (homogéneo) y fácilmente moldeables, al igual que las muestras obtenidas por Park y col. (2002), quienes utilizando el mismo método obtuvieron películas resistentes, transparentes y brillantes. En este estudio, la presencia de sorbitol y glicerol en las películas de quitosano presentaron un efecto plastificante, mejorando las propiedades de esfuerzo (Tabla 9, Figura 25). La incorporación de sacarosa como dispersante dio como resultado películas rígidas y quebradizas, aunque tales deficiencias se vieron mejoradas al adicionar el dispersante en combinación con los plastificantes. Mientras que en las películas de quitosano (100%) se observó un esfuerzo a la ruptura de 119.0 MPa y una deformación de 27%, las muestras adicionadas con los plastificantes y el dispersante mostraron valores de esfuerzo a la ruptura y deformación de 94.3 MPa y 46.3%, respectivamente (Figura 25).

Tabla 9. Propiedades mecánicas de las películas de quitosano con y sin plastificantes y dispersante, preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes.

	<b>Esfuerzo a la ruptura (MPa)</b>	<b>0.2% YD (MPa)</b>	<b>Módulo (MPa)</b>
Q (100%)	119.0 ±	104.3 ± 10.3	2678.0 ± 315.8
Q + P1 (17%)	114.0 ±	64.78 ± 2.5	1348.5 ± 203.5
Q + P1 (8.5%) + P2 (8.5%)	94.3 ±	39.5 ± 1.5	910.0 ± 97.9
Q + P1 (5.6%) + P2 (5.6%) + D (5.6%)	61.3 ±	14.0 ± 7.6	361.7 ± 209.1

Valores reportados como la media ± el error estándar.

YD = esfuerzo a la cedencia.

Q = quitosano.

P1 = plastificante (sorbitol).

P2 = plastificante (glicerol).

D = dispersante (sacarosa).

Al analizar el esfuerzo a la cedencia de las películas, “yield point” (0.2% YD), se observó un comportamiento similar, encontrando una reducción conforme se adicionaron plastificantes y el dispersante en las mezclas; mientras las películas de quitosano mostraron un YD de 104.3 MPa, en las películas del biopolímero con los plastificantes y el dispersante se obtuvo un valor de 14.0 MPa. Lo anterior indica que se pueden obtener películas flexibles y con mayor resistencia a la ruptura, con propiedades similares a las del “egapack” comercial.



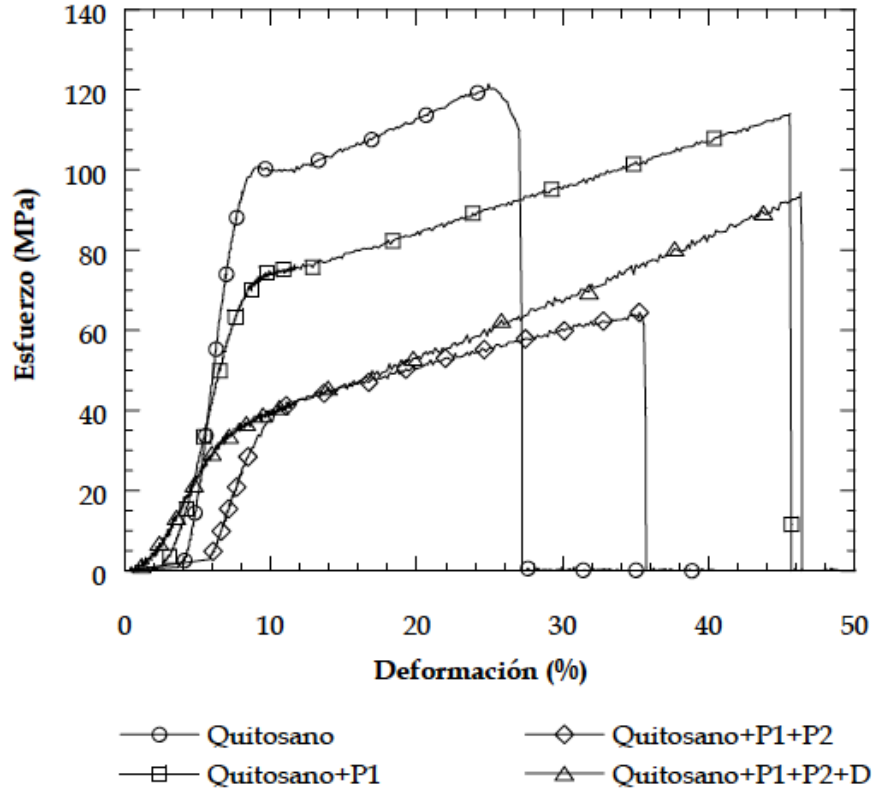


Figura 25. Gráficos de esfuerzo-deformación de las películas preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes.

Los mejores resultados obtenidos al utilizar sorbitol como plastificante pueden explicarse en términos de compatibilidad entre el quitosano y el sorbitol, la cual se puede atribuir a la fuerte interacción de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de quitosano con el plastificante, o bien, a la formación de una mezcla homogénea en donde todas las moléculas del biopolímero fueron rodeadas por el plastificante.

De acuerdo con Bégin y Van Calsteren (1999), el arreglo intramolecular del quitosano en medio acuoso es influenciado por las propiedades del ácido utilizado tales como la fuerza iónica y el grado de disociación. Por consiguiente, es posible deducir que la compatibilidad y homogeneidad encontrada en las películas obtenidas a partir de soluciones de quitosano en ácido acético puede explicarse en términos de un incremento en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y amino del biopolímero, los cuales se incrementaron a medida que se aumentó la concentración del biopolímero.

Asimismo, es posible asumir que la presencia del plastificante modificó aún más las propiedades de las películas obtenidas, lo cual puede en términos de interacciones representadas por la configuración espacial de las moléculas del biopolímero, del plastificante y del ácido durante la formación de la

película, dando como resultado un incremento en las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación. Caner y col. (1998) reportaron resultados similares al utilizar polietilén glicol 400 (PEG) como plastificante en películas de quitosano preparadas mediante evaporación de solventes, encontrando que las propiedades de elongación de las películas se incrementaron al aumentarse la concentración de plastificante.

*Películas preparadas por extrusión.* Comparando con las películas preparadas mediante evaporación de solventes, el método de extrusión con polietileno de baja densidad, LDPE, permitió la obtención de películas más moldeables y elásticas, con una superficie ligeramente irregular y rugosa debido a la presencia de las partículas de quitosano, las cuales quedaron distribuidas en forma de agregados tanto en la superficie como en el interior de la película. Como era de esperarse, las películas extrudidas presentaron mejores propiedades mecánicas en términos de resistencia a la elongación y esfuerzo a la ruptura (Tabla 10, Figura 26). No obstante, tales propiedades disminuyeron conforme se incrementó la concentración de quitosano en las mezclas, mientras que la transparencia y la homogeneidad de las películas se vieron afectadas al incrementarse la concentración tanto del biopolímero como del dispersante.

Tabla 10. Propiedades mecánicas de las películas de quitosano con y sin plastificantes y dispersante, preparadas mediante la técnica de extrusión.

	<b>Esfuerzo a la ruptura (MPa)</b>	<b>0.2% YD (MPa)</b>	<b>Módulo (MPa)</b>
LDPE (Control)	52.9 ±	7.3 ± 1.9	339.2 ± 11.3
Q (2%)	46.6 ±	2.4 ± 1.1	262.3 ± 16.1
Q (3%) + P1 (1%) + D (1%)	37.2 ±	5.2 ± 1.8	290.4 ± 9.8
Q (6%) + P1 (1%) + D (3%)	37.1 ±	9.2 ± 1.5	301.5 ± 8.8
Q (9%) + P1 (1%) + D (3%)	29.0 ±	2.9 ± 1.5	277.1 ± 13.1
Q (13%) + P1 (3%) + D (4%)	19.9 ±	4.9 ± 1.2	273.8 ± 24.5
Q (15%) + P1 (3%) + D (6%)	21.1 ±	9.7 ± 0.2	243.3 ± 3.6

Valores reportados como la media ± el error estándar.

YD = esfuerzo a la cedencia.

Q = quitosano.

P1 = plastificante (sorbitol).

D = dispersante (sacarosa).

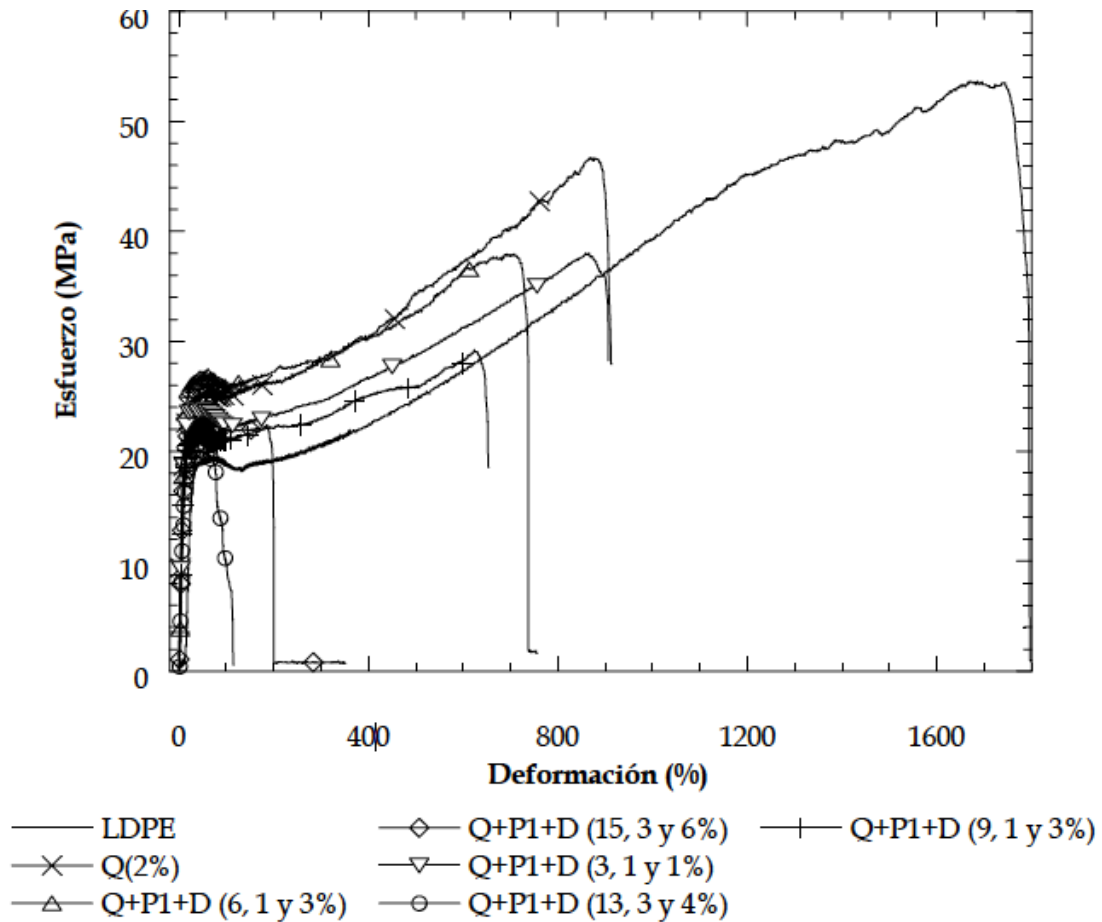


Figura 26. Gráficos de esfuerzo-deformación de las películas preparadas mediante la técnica de extrusión (Laboratory Mixing Extruder, ATLAS Polymer Evaluation Products, USA).

La adición de sacarosa mejoró notablemente la homogeneidad de las muestras, aunque se observó un oscurecimiento originado por la desnaturalización del dispersante, la cual se intensificó conforme se aumentó la concentración de dispersante en la mezcla a extrudir. Ratajska y Boryniec (1999) encontraron características similares al extrudir mezclas de poliolefinas con quitosano, reportando la presencia de grandes agregados distribuidos a lo largo de toda la película los cuales facilitaron la degradación del material.

En este estudio, al igual que las películas elaboradas por “casting”, la adición de sorbitol como plastificante mejoró las propiedades de esfuerzo, permitiendo obtener películas con mayor concentración de quitosano (Tabla 10, Figura 26). Mientras que en las mezclas de LDPE, quitosano y LDPE (2 y 98%, respectivamente) se observó una deformación de 883.1% y un esfuerzo a la ruptura de 46.6 MPa,

respectivamente, las mezclas de LDPE con quitosano, sorbitol y sacarosa (76, 15, 6 y 3%, respectivamente) presentaron valores de 185.1% y 22.4 MPa. Con respecto al esfuerzo a la cedencia, se encontró que el valor de éste se incrementó de 2.4 en las películas de LDPE con 2% de quitosano, a 9.7 MPa en los extrudidos de LDPE con 15% quitosano, 3% sorbitol y 6% sacarosa.

### **8.5.2 Morfología.**

Las micrografías de las películas revelaron que, tras el proceso de evaporación del solvente, se obtuvieron películas transparentes con aspecto uniforme. Sin embargo, se observó que, al aumentar la concentración del biopolímero en la solución, éste tendió a formar grumos que dieron origen a zonas con agujeros o rasgaduras en toda la superficie de la película (Figura 27a). Estas observaciones concuerdan con las reportadas por Ratajska y Boryniec (1999), en donde se concluyó que la presencia de tales grumos sirvió como puntos iniciales para la biodegradación de las películas de quitosano con poliolefinas. En cuanto a las películas extrudidas, la homogeneidad se mejoró al disminuir la concentración del quitosano en la mezcla (Figura 28). Las observaciones microscópicas mostraron que, aunque se obtiene una buena homogeneidad, es posible detectar la presencia de aglomerados expuestos sobre la superficie, o bien situados en el interior de las películas.

La adición de dispersante y plastificante mejoró la homogeneidad de los extrudidos, aunque la presencia del dispersante en la mezcla dio como resultado películas más oscuras debido a la oxidación de la sacarosa, ocasionada por la elevada temperatura requerida para la extrusión (150 a 160°C); asimismo, las películas presentaron olor característico al agente dispersante utilizado (sacarosa).

### **8.5.3 Medición de espesores.**

Los factores que determinaron el espesor de las películas fueron el área superficial de las placas utilizadas para vaciar las soluciones a evaporar y el volumen de la solución. En este experimento ambos factores fueron controlados en su totalidad, permitiendo la obtención de películas de quitosano con espesor constante, el cual se incrementó desde 0.031 a 0.075 mm, conforme se aumentó la concentración del biopolímero en la solución (de 0.5 a 1% p/v).

La adición de plastificantes y dispersante en las mezclas dio como resultado un incremento significativo ( $P \leq 0.05$ ) en el espesor promedio, con lo cual se obtuvieron películas con espesores mayores (0.037 a 0.153 mm) con respecto a las películas con 100% de biopolímero (Tabla 11).

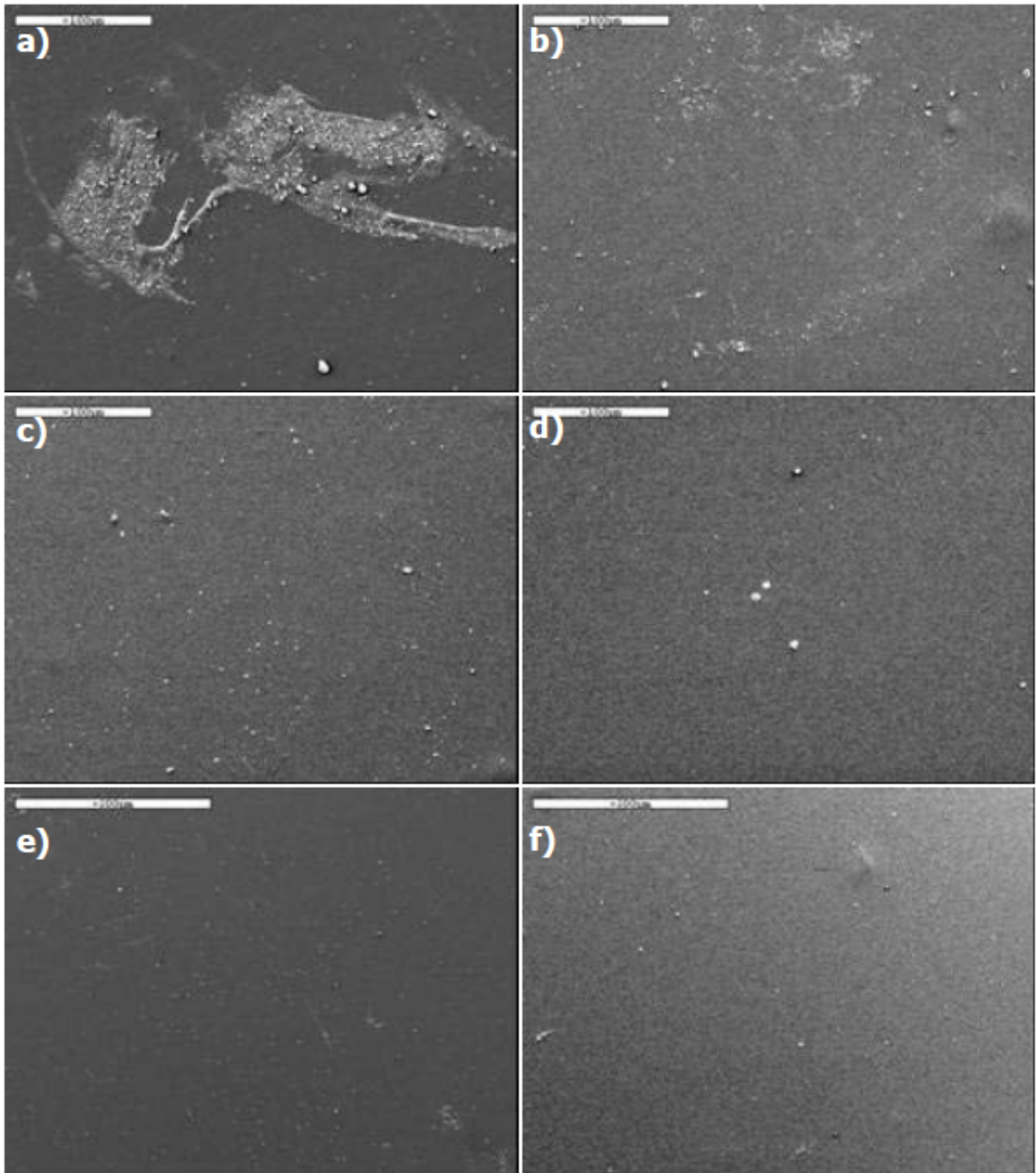


Figura 27. Morfología de las películas de quitosano preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes: a) Película de 100% quitosano, a 100X; b) Película de 94% quitosano + 6% plastificante, a 100X; c) Película de 75% quitosano + 25% plastificante, a 100X; d) Película de 50% quitosano + 50% plastificante, a 100X; e) y f) Películas de 100 y 75% quitosano + 0 y 25% plastificante, respectivamente, tomadas a 350X.

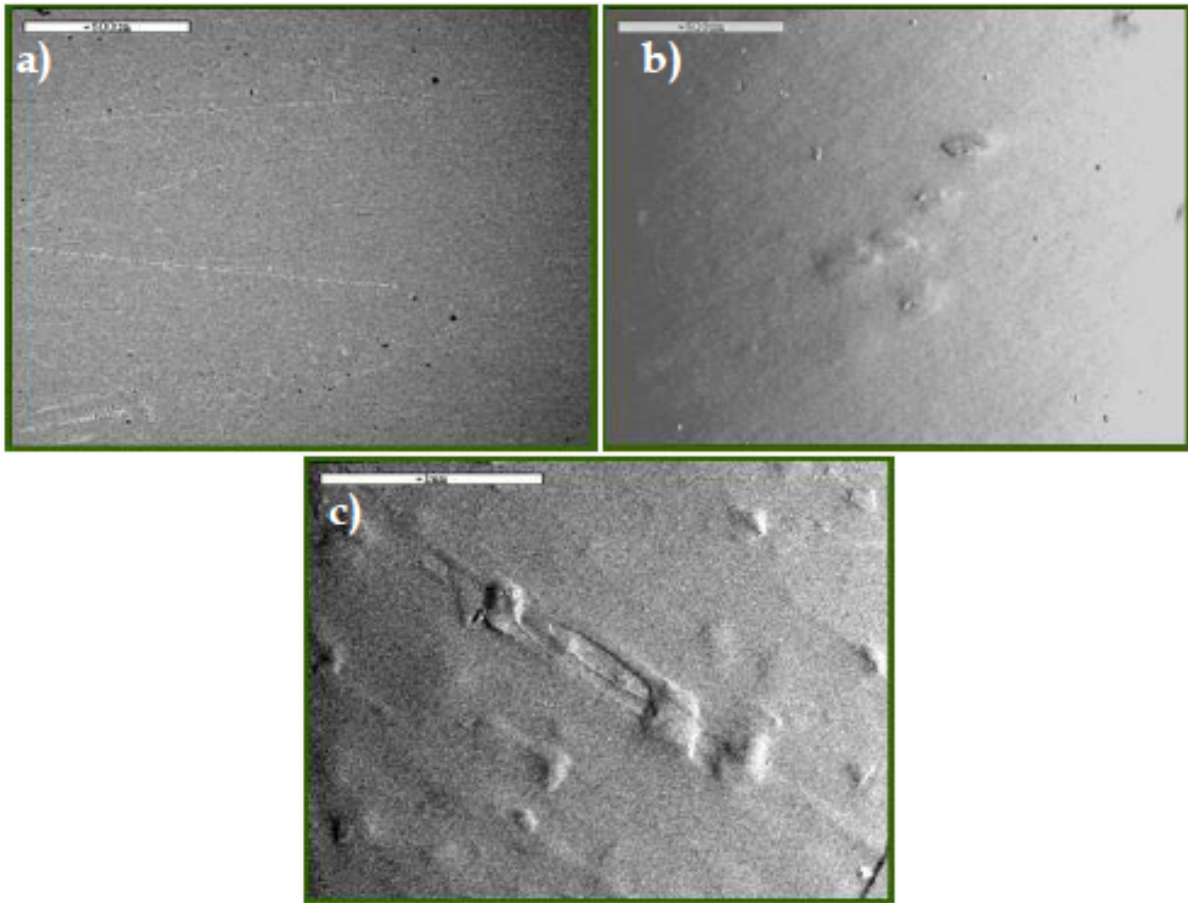


Figura 28. Morfología de las películas extrudidas de quitosano con polietileno de baja densidad (LDPE), tomadas a 75X: a) Película de LDPE (100%); b) Película de 96% LDPE + 4% quitosano; c) Película de 88% LDPE + 10% quitosano + 2% dispersante (sacarosa).

#### **8.5.4 Análisis de permeabilidad al oxígeno.**

Las películas de quitosano presentan baja permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono, por lo que se ha propuesto emplearlas como método de preservación de alimentos. En este estudio, la permeabilidad al oxígeno de las películas de quitosano preparadas mediante evaporación de solventes, disminuyó al incrementarse el grosor de las mismas, obteniendo valores de 35,890 cc/m<sup>2</sup> día para las películas más gruesas y 1,952 para las más delgadas (Tabla 11).

Se encontró que la adición de plastificante (cualquier proporción con respecto a la cantidad del biopolímero) a las mezclas dio como resultado películas impermeables bajo las condiciones utilizadas. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Hosokawa y col. (1990), quienes reportaron nulos o muy bajos valores de permeabilidad al oxígeno (2-8 cc/m<sup>2</sup> día) para películas compuestas por 20%

quitosano, 75% glicerol y 5% celulosa. De acuerdo con Islas y col. (2002), la permeabilidad al oxígeno de una película de polietileno de baja densidad (empaquete comercial) es de 6700 cc/m<sup>2</sup> día, lo cual indica que la permeabilidad de las películas de quitosano se puede modificar variando su espesor.

Tabla 11. Permeabilidad al oxígeno de las películas de quitosano con y sin plastificantes y dispersante, preparadas mediante evaporación de solventes.

Mezcla	Espesor (mm)	Permeabilidad al O <sub>2</sub> (cc/m <sup>2</sup> día)
Quitosano	0.031 ± 0.003 <sup>a</sup> a 0.075 ± 0.004 <sup>c</sup>	1,952 a 35,890
Quitosano + P1 (17%)	0.037 ± 0.005 <sup>a</sup> a 0.091 ± 0.005 <sup>d</sup>	0
Quitosano + P1 (8.5%) + P2 (8.5%)	0.041 ± 0.004 <sup>ab</sup> a 0.087 ± 0.005 <sup>d</sup>	0
Quitosano + P1 (5.6%) + P2 (5.6%) + D (5.6%)	0.062 ± 0.005 <sup>bc</sup> a 0.153 ± 0.012 <sup>e</sup>	0

Valores reportados como la media ± el error estándar.

Valores con el mismo superíndice no son estadísticamente diferentes entre sí (P≤0.05).

P1 = Plastificante (sorbitol).

P2 = Plastificante (glicerol).

D = Dispersante (sacarosa).

## 8.6 Evaluación del efecto antifúngico de las películas de quitosano.

En experimentos in vitro, Coma y col. (2002) reportaron valores de inhibición del 100% a los 8 días para *Listeria monocytogenes* inoculada en placas con películas de quitosano, concluyendo que el efecto bactericida disminuyó con respecto al tiempo de incubación, probablemente debido a la disminución de la disponibilidad de los grupos amino del biopolímero. En este estudio, al evaluar la actividad antimicrobiana de las películas se observó que los productos empacados en las películas de quitosano se preservaron mejor comparando con el control de celofán (celulosa).

La adición de sorbitol como plastificante (a concentraciones desde 1 a 6%) a los empaques disminuyó las propiedades de permeabilidad (Tabla 11), obteniendo mejores resultados en cuanto a la conservación de los quesos con respecto a los empaques con el biopolímero puro. Tomando en cuenta los resultados de permeabilidad obtenidos, es razonable deducir que los empaques de quitosano y plastificante mostraron una disminución considerable del crecimiento radial de *Aspergillus niger* en los quesos, debido a la combinación del biopolímero con la asfisia provocada por la impermeabilidad del empaque (Figura 29). La técnica de inoculación utilizada fue la de picadura.

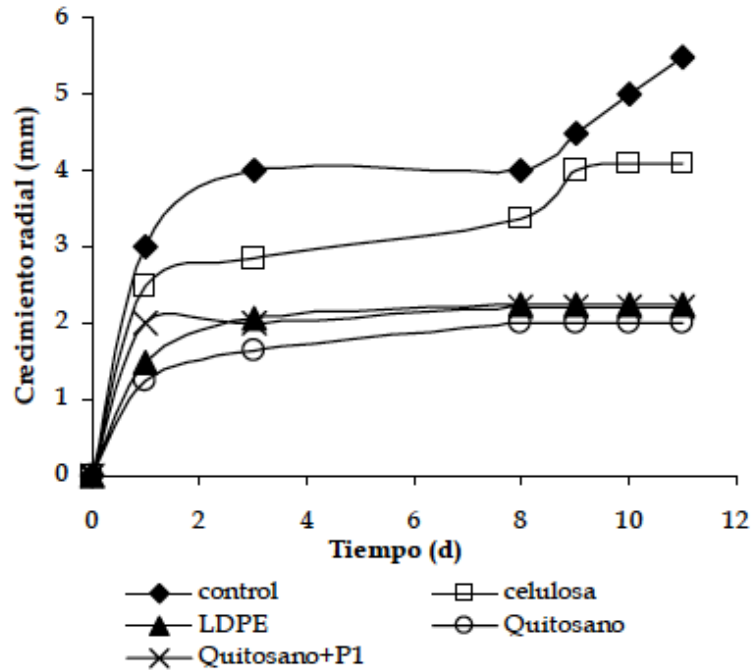


Figura 29. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* inoculado en queso manchego, empacado en diferentes tipos de empaques e incubado a 30°C.

Con respecto al número de unidades experimentales (productos empacados), se observó que los menores números de unidades infectadas o infectadas a las 48 h después de la inoculación, se obtuvieron al utilizar empaques de quitosano puro o bien adicionado con plastificante, a 30°C (Figura 30).

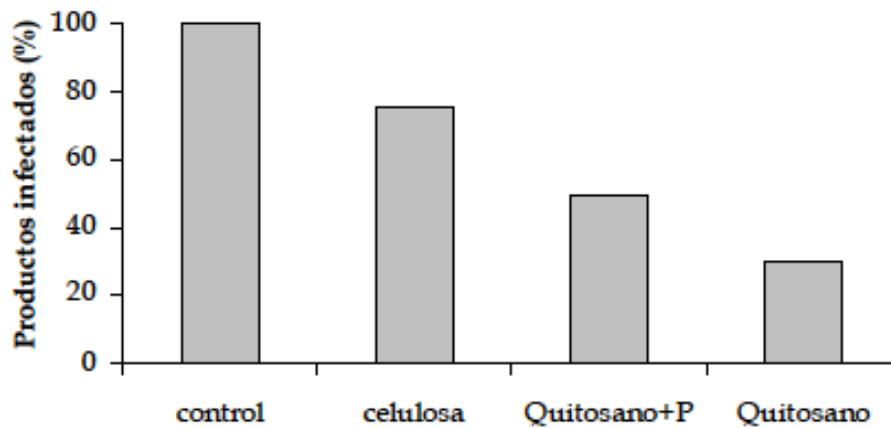


Figura 30. Porcentaje de unidades experimentales empacadas que presentaron contaminación por el crecimiento de *Aspergillus niger*, a las 48 h después de la incubación, a 30°C.



Con base en los resultados obtenidos se realizaron experimentos posteriores in vivo utilizando *Penicillium chrysogenum* e inoculando los quesos mediante la técnica de siembra en césped, incubando a una temperatura de refrigeración (<10°C). El hongo fue seleccionado con base en su ocurrencia en productos lácteos y, al igual que el experimento anterior, cada 24 h se descartaron las unidades contaminadas y cada semana se realizaron determinaciones de acidez y rancidez. Los resultados indicaron que las películas de quitosano, con o sin plastificante, presentaron mejores resultados en cuanto a la conservación de los quesos, obteniendo 0% de unidades infectadas con respecto a los controles de celofán y LDPE (Figura 31).

La acidez de los quesos inoculados con *P. chrysogenum* e incubados a <10°C, resultó ser mayor en los empaques de celofán y polietileno, mientras que los menores valores se encontraron en los productos empacados con quitosano (Figura 32).

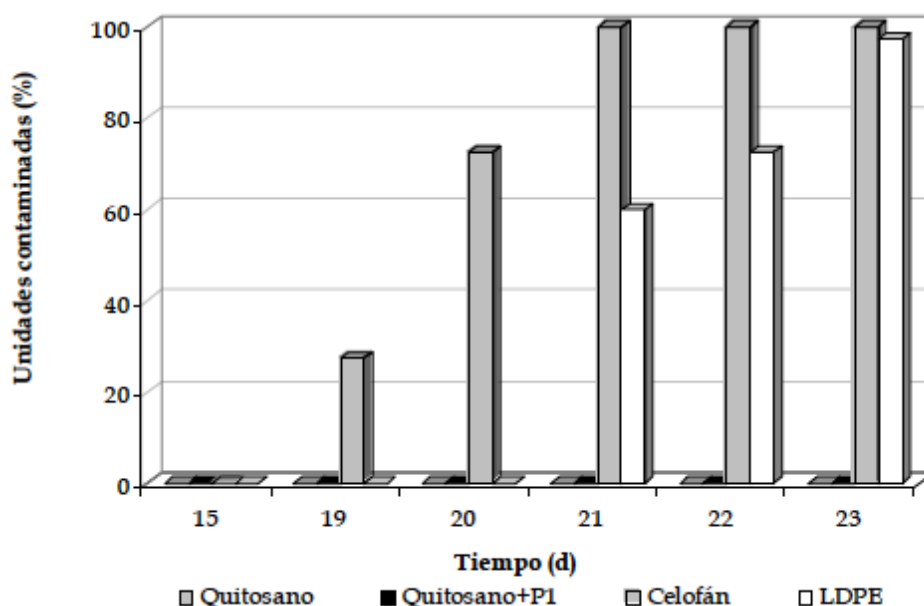


Figura 31. Porcentaje de unidades experimentales empacadas que presentaron contaminación por el crecimiento de *Penicillium chrysogenum*, a diferentes tiempos de incubación, a <10°C.

En cuanto a los resultados de rancidez, se observó que los empaques de quitosano con sorbitol resultaron ser más efectivos para controlar y evitar el enranciamiento de los quesos inoculados con el hongo, observando una rancidez incipiente a los 35 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (<10°C) (Tabla 12).

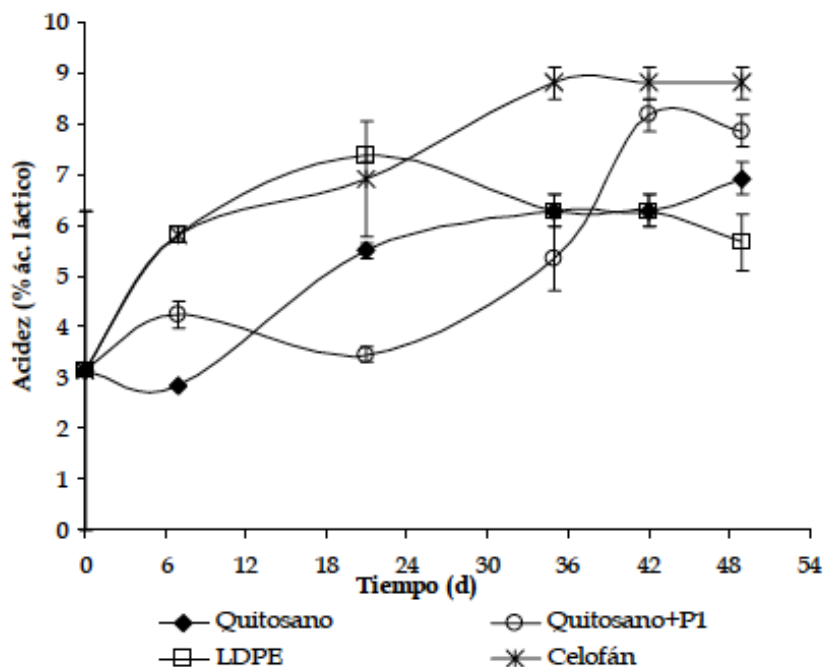


Figura 32. Producción de acidez (expresada como % de ácido láctico) de *Penicillium chrysogenum* en quesos empacados e incubados a <math><10^{\circ}\text{C}</math>.

Tabla 12. Rancidez de los quesos inoculados con *Penicillium chrysogenum*, empacados e incubados a <math><10^{\circ}\text{C}</math>.

Tiempo (d)	Quitosano	Quitosano + PI	Celofán	LDPE
7	-	-	-	Incipiente
14	Incipiente	-	Incipiente	Incipiente
21	Incipiente	-	Incipiente	Incipiente
35	Incipiente	Incipiente	+	Incipiente
42	+	+	+	Incipiente
49	+	+	+	Incipiente

Con base en los resultados obtenidos, el empleo de empaques elaborados con quitosano y sorbitol puede ser un método potencial para incrementar significativamente la vida de anaquel de diversos productos alimenticios, ofreciendo una alternativa al empleo de empaques poliméricos sintéticos, los cuales no son biodegradables. Además de sus propiedades biológicas, los empaques de quitosano son fáciles de elaborar y sus propiedades mecánicas pueden ser manipuladas según se requiera.

## 9. CONCLUSIONES

La novedad de este trabajo es que se logró demostrar que el quitosano es un agente con propiedades fungistáticas efectivas para controlar el crecimiento de hongos filamentosos contaminantes de alimentos como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, tanto en cultivo superficial, como en medio líquido y en películas compuestas.

**Cultivos superficiales.** En cultivos superficiales se demostró que las placas de agar, adicionadas con una concentración de 3.5 mg/cm<sup>3</sup> de quitosano, prevenían en un 50% la germinación de las esporas de *Aspergillus niger*, a 30°C (CQ<sub>50</sub>). Asimismo, se demostró el efecto sinérgico entre la baja temperatura y el quitosano, de forma que a temperaturas de 12 a 18°C, la inhibición de la germinación fue del 80%, con la misma concentración de quitosano (CQ<sub>50</sub>). Lo anterior permite el empleo potencial del biopolímero para sustituir el uso de fungicidas sintéticos, incrementando significativamente el tiempo de conservación de diversos productos alimenticios a temperaturas moderadas de refrigeración.

Cultivo en medio líquido. Se encontró que la presencia de 3.5 g/L de quitosano es capaz de alterar completamente el proceso de formación de septos de las hifas de *A. niger*, impidiendo su crecimiento a 30°C. La evidente deformación, distorsión e hichamiento observadas en las hifas del hongo sugieren que el quitosano afectó la turgencia y la presión de la célula causando estrés fisiológico, lo cual fue más notorio durante la etapa de polarización de las esporas ya que durante dicha etapa la pared celular de la espóra es más delgada con respecto al resto del ciclo de crecimiento vegetativo. Asimismo, el biopolímero fue capaz de reducir la relación área/volumen de las hifas por aumento relativo de los diámetros, disminuyendo la superficie en contacto directo con el medio. Esto parece ser una respuesta a la toxicidad del quitosano presente en el agar.

**Películas compuestas.** Al evaluar la actividad antifúngica de las películas de quitosano preparadas mediante la técnica de evaporación de solventes, se encontró que éstas resultaron ser efectivas para impedir el desarrollo de *Penicillium chrysogenum* inoculado sobre piezas de queso de 2x2x0.5 cm<sup>3</sup>, a temperaturas de refrigeración (6°C). Esto indica que las propiedades biológicas del biopolímero pueden ser aprovechadas en la elaboración de empaques naturales activos, los cuales presentan la propiedad adicional de ser biodegradables. Además, la combinación del biopolímero con atmósferas modificadas

y almacenamiento a temperaturas de refrigeración pudiera proporcionar una buena alternativa para obtener productos alimenticios con mayor resistencia al ataque de los hongos saprófitos.

Por otro lado, considerando las deficientes propiedades mecánicas de las películas elaboradas con 100% quitosano, la combinación de este biopolímero con materiales sintéticos constituye otra alternativa de gran interés en el diseño de nuevos materiales biotecnológicos en donde se combinen las propiedades biológicas del quitosano (i.e. actividad antimicrobiana y su biodegradabilidad) con las características de flexibilidad, elasticidad y maleabilidad que poseen los polímeros sintéticos.

Con base en lo anterior, y tomando en cuenta que el principal resultado fue el fuerte efecto inhibitorio que resulta al combinar el biopolímero con baja temperatura ( $<18^{\circ}\text{C}$ ) (Plascencia y col., 2003), se considera que el quitosano, solo o en combinación con otros métodos de conservación, es una alternativa potencial al empleo de agentes químicos para preservar alimentos contaminados, retardando satisfactoriamente el crecimiento de hongos filamentosos durante su almacenamiento. Asimismo, se podrían buscar otras formulaciones con ceras o emulsiones, como agentes para inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes sobre la superficie de los alimentos almacenados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Agulló, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V. y Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol. Biosci.*, 3(10): 521-530.
- Anderson, J.C., Leaver, K.D., Alexander, J.M. y Rawlings, R.D. (1978). En: Ciencia de los materiales. 1era Edición. Editorial Limusa, S.A. México, D.F.
- Arvanitoyannis, I., Kolokuris, I., Nakayama, A., Yamamoto, N. y Aiba, S-I. (1997). Biodegradable blends based on chitosan and poly(vinyl alcohol) (PVA) with sorbitol and sucrose. Advances in Chitin Science. Vol. II. 7th ICCS. Edited by Domard, A., Roberts, G.A.F. y Varum. K.M. Jaques Andre Publishing.
- Austin, P.R. (1988). Chitin solutions and purification of chitin. En: Methods in Enzimology, 161: 403-407.
- Bégin, A. y Van Calsteren, M.R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *Int. J. of Biological Macromolecules*, 26: 63-67.
- Benhamou, N. (1992). Ultraestructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology*, 82(10): 1185-1193.
- Benhamou, N., Lafontaine, P.J. y Nicole, M. (1994). Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*, 84(12): 1432-1444.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7): 235-240.
- Billmeyer, F.W. (1984). Textbook of polymer science. 3th edition. John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Bosquez, M.E. y Colina, I.M. (1999). Fundamentos y aplicaciones del procesamiento térmico de frutas y hortalizas. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Castillo-Ortega, M.M., Del Castillo-Castro, T., Encinas, J.C., Pérez-Tello, M., De Paoly, M.A. y Olayo, R. (2003). Electrically conducting polyaniline-PBMA composite films obtained by extrusion. *Journal of Applied Polymer Science*, 89: 179-183.
- Chan, V., Mao, H-Q y Leong, K.W. (2001). Chitosan-induced perturbation of dipalmitoyl-snglycero-3-phosphocholine membrane bilayer. *Langmuir*, 17(12): 3749-3756.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. y Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3): 1162-1169.
- Cox, P.W., Paul, G.C. y Thomas, C.R. (1993). Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology*, 144: 817-827.

- de Capdeville, G., Wilson, C.L., Beer, S.V. y Aist, J.R. (2002). Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'red delicious' apple fruit. *Phytopathology*, 92(8): 900-908.
- Dodane, V., Amin Khan, M. y Mervin, J.R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. of Pharmaceutics*. 182: 21-32.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. y Boulet, M. (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *J. Food Sci.*, 56(6): 1618-1620.
- El Ghaouth, A., Arul, J. Y Asselin, A. (1997). Potential use of chitosan in postharvest preservation of fruits and vegetables. Advances in chitin and chitosan. Proceedings from the 5th International Conference on chitin and chitosan held in Princeton, New Jersey, USA, 17-21 October 1991. Edited by Brine, C.J. Elsevier Applied Science.
- Fang, N., Chan, V., Mao, H-Q y Leong, K.W. (2001). Interactions of phospholipids bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules*, 2(4): 1161-1168.
- Felse, P.A. y Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*. 20: 505-512.
- Finney, D.J. (1952). Probit analysis. Cambridge University Press, second edition.
- Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. (1993). Microbiología de los alimentos. 4a edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Hansen, M.E. y Llanes, A. (1994). Applications of crustaceans wastes in Biotechnology. Fisheries processing: Biotechnological applications. Edited by A.M. Martin. Chapman & Hall. Londres, pp: 174-205.
- Haran, S., Schickler, A., Oppenheim, A. y Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9): 980-985.
- Harris, S.D., Morrell, J.L. y Hamer, J.E. (1994). Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics*, 136: 517-532.
- Harris, S.D. (1999). Morphogenesis is coordinates with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Microbiology*, 145: 2747-2756.
- Hirano, S. y Nagao, N. (1989). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.*, 53(11): 3065-3066.
- Hirano, S., Inui, H., Kosaki, H., Uno, Y. y Toda, T. (1994). Chitin and chitosan: ecologically bioactive polymers. En: Biotechnology and bioactive polymers. Edited by Charles G. Gebelein y Charles E. Carraher. Plenum Press, New York, USA, pp: 43-54.
- Hirano, S. (1997). Applications of chitin and chitosan in the ecological and environmental fields. En: Applications of chitin and chitosan. Edited by Mattheus F.A. Goosen. Technomic Publishing Company, Inc. USA.

- Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer. Int.*, 48: 732-734.
- Holmes, G.J. y Eckert, J.W. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89(9): 716-721.
- Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K. y Kubo, T. (1990). Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose. *Ind. Engineer. Chem. Res.*, 29(5): 800-805.
- Huis in't Veld, J.H.J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 1-18.
- Infante, G.S. y Calderón, A.L. (1994). "Manual de analysis probit. Colegio de Postgraduados". Centro de Estadística y Cálculo, Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana, 107pp.
- Inoue, K., Yoshizuka, K. y Baba, Y. (1994). Adsorption of metal ions on chitosan and chemically modified chitosan and their application to hydrometallurgy. En: *Biotechnology and bioactive polymers*. Edited by Charles G. Gebelein y Charles E. Carraher. Plenum Press, New York, USA, pp: 35-41.
- Islas-Rubio, A.R., Quintero-Ibarra, M., Vásquez-Lara, F. y Granados-Nevárez, M.C. (2002). Efecto del material de empaque sobre la rancidez incipiente en frituras de maíz. *Tecnología de Alimentos*, 37(4): 21-24.
- Janisiewicz, W.J. y Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40: 411-41
- Khan, T.A., Peh, K.K. y Ch'ng, H.S. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J. Pharm. Pharma. Sci.*, 3(3): 303-311.
- Kirk, R.S., Sawyer, R. y Egan, H. (1996). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. 2da edición. Editorial Continental, S.A. de C.V. México. Pp: 662.
- Knaul, J., Hudson, S.M. y Creber, K. (1999). Improved mechanical properties of chitosan fibers. *J. App. Polymer Sci.*, 72 : 1721-1732.
- Krochta, JM., Baldwin, EA. y Nisperos-Carriedo, MO. (1994). *Edible coatings and films to improve food quality*. Published by Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, U.S.A. 357pp.
- Kweon, D.K. y Kang, D.W. (1999). Drug-release behavior of chitosan-g-poly(vinil alcohol) copolymer matrix. *J. App. Polymer Sci.*, 74: 458-464.
- Laflamme, P., Benhamou, N., Bussiéres, G. y Dessureault, M. (1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot.*, 77: 1460-1468.
- Larralde, C.C., López, I.F. y Viniegra, G.G. (1997). Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnol. Bioeng.*, 56(3): 287-294.

- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. y Mendgen, K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87(11): 1103-1110.
- Leslie, F. y Hart, A.M. (1991). Análisis moderno de los alimentos. 2da reimpression, editado por Harry Johnstone Fisher. Editorial Acribia, España. Pp: 364-365.
- Li, H. y Yu, T. (2000). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 269-274.
- Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. y Goosen, M.F.A. (1997). Applications and properties of chitosan. En: Applications of chitin and chitosan. Edited by Mattheus F.A. Goosen. Technomic Publishing Company, Inc. USA.
- López, F., Larralde, P. y Viniegra, G. (1997). Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. *Chem. Engineering Sci.*, 52(15): 2629-2639.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R., Tronsmo, A., Woo, S.L. y Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 721-728.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K. y Harman, G.E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140(3): 623-629.
- Lydan, M.A. y Cotter, D.A. (1995). The role of Ca<sup>2+</sup> during spore germination in Dictyostelium: auto activation is mediated by the mobilization of Ca<sup>2+</sup> while amoebal emergence requires entry to external Ca<sup>2+</sup>. *J. of Cell Science*, 108(5): 1921-1930.
- Mari, M. y Guizzardi, M. (1998). The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*, 26(1): 59-66.
- Momany, M. y Taylor, I. (2000). Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology*, 146: 3279-3284.
- Nerín, C. y Batlle, R. (1999). Assessing the suitability of recycled plastics used as agricultural soil covers: migration study and experimental harvest. *J. Agric. Food Chem.*, 47(1): 285-293.
- Niño, K.A., Imam, S.H., Gordon, S.H. y Wong, J.G. (1999). Extruded plastics containing starch and chitin: physical properties and evaluation of biodegradability. En: Biopolymers utilizing nature's advanced materials. Edited by Iman, S.H., Greene, R.V. y Zaidi, B.R. American Chemical Society. Washington, USA.



- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A. y Holley, R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.*, 62: 139-148.
- Ockerman, H.W. (1992). Fishery by-products. En: Fish processing Technology. G.M. Hall (editor). Blackie Academic & Professional. Londres, pp: 155-199.
- Park, S.Y., Marsh, K.S. y Rhim, J.W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, 67(1): 194-197.
- Paul, G.C., Kent, C.A. and Thomas, C.R. (1993). Viability testing and characterisation of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 11-23.
- Piekielna, J., Mucha, M. y Szwarc, M. (1997). Morphology and physical properties of biodegradable chitosan blends containing PVA and PEO. Advances in chitin science. Vol. II. 7<sup>th</sup> ICCS. Edited by Domard, A., Roberts, G.A.F. y Varum, K.M. Jaques Andre Publishing.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M., Larralde, P. y Shirai, K. (2001). Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation. (2001). Chitin and Chitosan. Chitin and chitosan in life science. Edited by Uragami, T., Kurita, K. and Fukamizo, T. Kodansha Scientific. Japan. Pp: 256-259.
- Plascencia-Jatomea, M. Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M. y Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on the spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10): 582-586.
- Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E. y Barea, J.M. (1998). Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *Journal of Experimental Botany*, 49(327): 1729-1739.
- Ratajska, M. y Boryniec, S. (1999). Biodegradation of some natural polymers in blends with polyolefines. *Polymers for Advanced Technologies*, 10: 625-633.
- Reddy, B., Arul, J. Angers, P. y Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. & Food Chem.*, 47(3): 1208-1216.
- Rhoades, J. y Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *App. and Env. Microbiol.*, 66(1): 80-86.
- Roller, S. y Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 67-77.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., y Salerno, M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67(5): 1862-1867.

- Salas, J.A., Guijarro, J.A. y Hardisson, C. (1983). High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. *J. of Bacteriology*, 155(3): 1316-1321.
- Seo, H., Mitsuhashi, K. y Tanibe, H. (1991). Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan. *Advances in chitin and chitosan*. Edited by Brine, C.J. Elsevier Applied Science.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. y Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 37-51.
- Shin, Y., Min, K. y Kim, H.K. (1997). Antimicrobial finishing of polypropilene nonwoven fabric by treatment with chitosan. *Advances in chitin science*. Vol. II. 7th ICCC. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on Chitin Chitosan and Euchis '97, held in Lyon, France, September 3-5, 1997.
- Shin, Y., Yoo, D.I. y Min, K. (1999). Antimicrobial finishing of polypropilene nonwoven fabric by treatment with chitosan oligomer. *J. App. Polymer Sci.*, 74: 2911-2916.
- Shin, G.H., Lee, Y.H., Lee, J.S., Kim, Y.S., Choi, W.S. y Park, H.J. (2002). Preparation of plastic and biopolymer multilayer films by plasma source ion implantation. *J. Agric. Food Chem.*, 50(16): 4608-4614.
- Shirai, C.K., M.I. Guerrero, S. Huerta, G. Saucedo y G.M. Hall. (1996). Fermentación Láctica de Cabeza de Camarón. *Avances en Ingeniería Química*, 6(3): 239-241.
- Shogren, R.L. y Bagley, E.B. (1999). Natural polymer as advanced materials: some research needs and directions. En: *Biopolymers utilizing nature's advanced materials*. Edited by Iman, S.H., Greene, R.V. y Zaidi, B.R. American Chemical Society. Washington, USA.
- Shyu, Y.T. y Foegeding, P.M. (1991). *Calmodulin antagonists* inhibit germination of *Bacillus cereus* T spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 233-238.
- Simpson, B.K., Smith, J.P., Haard, N.F. (1994). Marine enzymes. *Encyclopedia of food science and technology*. New York: wiley.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. y Chung, Y.R. (1999). Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, 89(1): 92-99.
- Smilanick, J.L., Hartsell, P.I., Henson, D., Fouse, D.C., Assemi, M. y Harris, C.M. (1990). Inhibitory activity of sulphur dioxide on the germination of spores of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 80(2): 217-220.
- Struszczyk, H. y Pospieszny, H. (1997). New applications if chitin and its derivatives in plant protection. En: *Applications of chitin and chitosan*. Edited by Mattheus F.A. Goosen. Technomic Publishing Co. Inc., pp: 171-184.
- Tharanathan, R.N. y Kittur, F.S. (2003). Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1): 61-87.

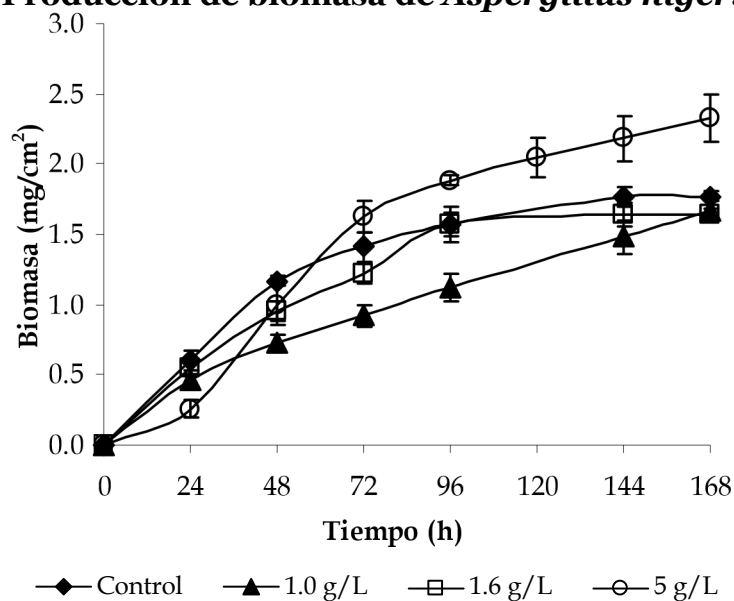
- Tombs, M. y Harding, S.E. (1998). An introduction to polysaccharide biotechnology. Taylor & Francis Publishers, U.K., pp: 145.
- Torres, J.A., Dewitt-Mireles, C. y Savant, V. (1999). Two food applications of niopolymers: edible coatings controlling microbial surface spoilage and chitosan use to recover proteins from aqueous processing wastes. En: Biopolymers utilizing nature's advanced materials. Edited by Imam, S.H., Greene, R.V. y Zaidi, B.R. Published by the American Chemical Society, USA.
- Trinci, A.P.J. (1971). Exponential growth of the germ tubes of fungal spores. *Journal of General Microbiol.*, 67: 345-348.
- Tsai, G.-J., Liau, W.-Y. Y Chen, C.S. (1997). Antimicrobial activities of shrimp chitosan and chitosan derivates and their application on food preservation. Advances in chitin science. Vol. II. 7th ICC. Proceedings of the 7th International Conference on Chitin Chitosan and Euchis '97, held in Lyon, France.
- Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E. y Moerschbacher, B.M. (1998). Comparison of the ability of partially N-acetilated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 118: 1353-1359.
- Warwar, V. y Dickman, M.B. (1996). Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolli*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 62(1): 74-79.
- Wieczorek, A, y Mucha, M. (1997). Applications of chitin derivates and their composites to biodegradable paper coatings. Advances in chitin science. Vol. II. 7th ICC. Proceedings of the 7th International Conference on Chitin Chitosan and Euchis '97, held in Lyon, France, September 3-5, 1997.
- Weng, Y-M., Chen, M-J. y Chen, W. (1997). Benzoyl chloride modified ionomer films as antimicrobial food packaging materials. *Int. J. Food Sci. & Technol.*, 32(3): 229-234.
- Wu, F.C., Tseng, R.L. y Juang, R.S. (1999). Role of pH in metal adsorption from aqueous solutions containing chelating agents on chitosan. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38: 270-275.
- Wu, L.Q., Embree, H.D., Balgley, B.M., Smith, P.J. y Payne, G.F. (2002). Utilizing renewable resources to create functional polymers: chitosan-based associative thickener. *Environ. Sci. Technol.*, 36(15): 2446-3454.
- Yahia, E.M. e Higuera, Ciapara, I. (1992). Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas. 1era edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México.
- Young, R.J. y Lovell, P.A. (1991). En: Introduction to polymers. 2th edition. Published by Chapman & Hall. UK.

Zhang, D. y Quantick, P.C. (1998). Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *The J. Horticultur. Sci. & Biotech.*, 76(6): 37-41.

# **ANEXOS**

# ANEXO 1

## Producción de biomasa de *Aspergillus niger*.



Efecto de la concentración de quitosano sobre la producción de biomasa de *Aspergillus niger*, a 30°C.

Análisis estadístico del efecto del quitosano sobre la producción de biomasa, realizado a las 168 h, cuando el hongo cubrió totalmente la superficie de a la placa.

### ANOVA

BIOMASA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.938	3	.313	12.174	.002
Within Groups	.205	8	.026		
Total	1.143	11			

### BIOMASA

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.6 g/L quitosano	3	1.6433	
1 g/L quitosano	3	1.6667	
Control	3	1.7733	
5 g/L quitosano	3		2.3300
Sig.		.757	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## ANEXO 2

### Crecimiento radial de *Aspergillus niger*.

**Efecto del quitosano sobre la velocidad de extensión radial, U, de *A. niger***

Quitosano (g/L)	U (cm/h)	R <sup>2</sup>
0 (control)	0.0212 ± 0.0002	0.9985
1	0.0207 ± 0.0004	0.9947
1.3	0.0205 ± 0.00035	0.9971
1.6	0.0199 ± 0.0003	0.9958
3	0.0158 ± 0.0006	0.9743
5	0.0173 ± 0.0006	0.9717

Los valores de U fueron obtenidos utilizando el programa Statistica (Stat-Soft Inc., USA).

**Análisis estadístico del efecto del quitosano sobre el crecimiento radial (El análisis de Tukey se realizó a las 168 h, cuando el hongo cubrió totalmente la superficie de la placa)**

#### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T24H	Between Groups	.341	5	.068	81.867	.000
	Within Groups	.010	12	.001		
	Total	.351	17			
T48H	Between Groups	.476	5	.095	97.857	.000
	Within Groups	.012	12	.001		
	Total	.487	17			
T96H	Between Groups	1.766	5	.353	82.145	.000
	Within Groups	.052	12	.004		
	Total	1.818	17			
T168H	Between Groups	2.388	5	.478	110.942	.000
	Within Groups	.052	12	.004		
	Total	2.440	17			

**T168H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
3 g/L quitosano	3	2.1500			
5 g/L quitosano	3	2.1833			
1.6 g/L quitosano	3		2.7167		
1.3 g/L quitosano	3		2.8167	2.8167	
1 g/L quitosano	3			2.9000	
Control Sig.	3				3.1333
		.987	.464	.639	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Análisis estadístico del efecto del quitosano sobre la inhibición en el crecimiento radial**

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T24H	Between Groups	16918.666	4	4229.667	180.964	.000
	Within Groups	233.730	10	23.373		
	Total	17152.396	14			
T48H	Between Groups	10650.169	4	2662.542	86.024	.000
	Within Groups	309.511	10	30.951		
	Total	10959.680	14			
T96H	Between Groups	6739.303	4	1684.826	87.400	.000
	Within Groups	192.771	10	19.277		
	Total	6932.074	14			
T168H	Between Groups	2841.727	4	710.432	149.161	.000
	Within Groups	47.629	10	4.763		
	Total	2889.356	14			

**T24H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1 g/L quitosano	3	.0000	
1.3 g/L quitosano	3	4.4133	
1.6 g/L quitosano	3	8.8267	
3 g/L quitosano	3		72.7300
5 g/L quitosano	3	.242	72.7300
Sig.			1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



**T48H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1 g/L quitosano	3	10.3633	
1.3 g/L quitosano	3	13.3500	
1.6 g/L quitosano	3	25.3033	
3 g/L quitosano	3		68.4200
5 g/L quitosano	3		71.0533
Sig.		.050	.975

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**T96H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1 g/L quitosano	3	.9067		
1.3 g/L quitosano	3	4.9600	4.9600	
1.6 g/L quitosano	3		13.9067	
5 g/L quitosano	3			47.3700
3 g/L quitosano	3			50.5267
Sig.		.788	.167	.898

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**T168H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1 g/L quitosano	3	.4600	
1.3 g/L quitosano	3	2.5333	
1.6 g/L quitosano	3	5.9933	
5 g/L quitosano	3	.067	30.3167
3 g/L quitosano	3		31.3833
Sig.			.972

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ANEXO 3

### Análisis estadístico del efecto del quitosano sobre los diámetros y longitudes de las hifas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo sólido.

#### ANOVA

##### DIAMETRO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	430.385	3	143.462	139.333	.000
Within Groups	201.809	196	1.030		
Total	632.194	199			

#### DIAMETRO

##### Tukey HSD <sup>a</sup>

CHITOSAN	N	Subset for alpha .05		
		1	2	3
1.6 g/L	50	5.3938		
control	50	5.8744		
3 g/L	50			
5 g/L	50		7.8274	9.0198
Sig.		.087	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 50.000.

#### ANOVA

##### LONGITUD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	153463.3	3	51154.448	6.856	.000
Within Groups	1760743	236	7460.775		
Total	1914206	239			

#### LONGITUD

##### Tukey HSD <sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.6 g/L	60	116.5237		
3 g/L	60	133.3175	133.3175	
5 g/L	60		173.8072	173.8072
control	60			174.3510
Sig.		.711	.053	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

## ANEXO 4

### Efecto de la concentración de quitosano sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo sólido.

#### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T8	Between Groups	6.350	4	1.588	10.583	.012
	Within Groups	.750	5	.150		
	Total	7.100	9			
T9	Between Groups	170.350	4	42.588	54.952	.000
	Within Groups	3.875	5	.775		
	Total	174.225	9			
T10	Between Groups	2503.400	4	625.850	1001.360	.000
	Within Groups	3.125	5	.625		
	Total	2506.525	9			
T11	Between Groups	5938.400	4	1484.600	362.098	.000
	Within Groups	20.500	5	4.100		
	Total	5958.900	9			
T12	Between Groups	6214.500	4	1553.625	767.222	.000
	Within Groups	10.125	5	2.025		
	Total	6224.625	9			
T13	Between Groups	4928.150	4	1232.038	1408.043	.000
	Within Groups	4.375	5	.875		
	Total	4932.525	9			

#### T13

##### Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
5 g/L quitosano	2	37.2500				
3 g/L quitosano	2	1.000				
1.6 g/L quitosano	2					
1 g/L quitosano	2		60.0000	75.2500	93.0000	97.7500
Control Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

## ANEXO 5

### Estimación de la concentración de quitosano que inhibe el 50% de la germinación de esporas de *Aspergillus niger* (CQ<sub>50</sub>) (análisis Probit)

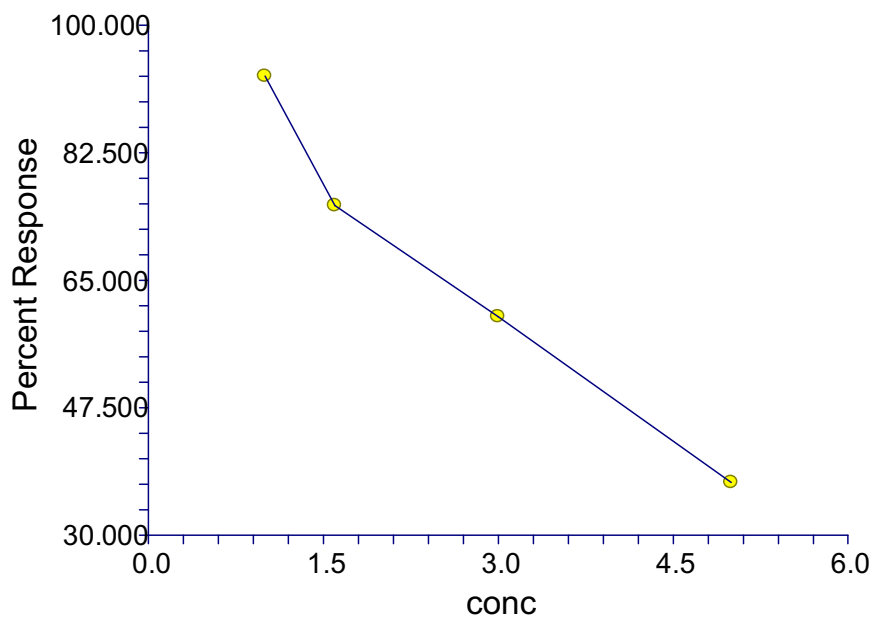
#### Probit Estimation Section

Parameter	Estimate	Std. Error
Alpha	6.318635	0.092912
Beta	-2.351273	0.1960874
LD50	0.5608173	2.479644E-02
Dose50	3.53762	0.2076932

#### Dose Percentile Section

Percentile	Probit	Log(Dose)	Std. Error Log(Dose)	Dose	Std. Error Dose
10	3.7184	1.1059	0.0623	12.7604	1.8318
20	4.1584	0.9188	0.0479	8.2939	0.9155
30	4.4756	0.7838	0.0381	6.0792	0.5338
40	4.7467	0.6686	0.0306	4.6619	0.3281
50	5.0000	0.5608	0.0248	3.5376	0.2077
60	5.2533	0.4531	0.0214	2.8384	0.1397
70	5.5244	0.3378	0.0216	2.1767	0.1084
80	5.8416	0.2029	0.0267	1.5954	0.0982
90	6.2816	0.0158	0.0384	1.0370	0.0917
95	6.6449	-0.1387	0.0497	0.7265	0.0832
99	7.3263	-0.4286	0.0723	0.3728	0.0621

Dose - Response Plot



## ANEXO 6

### Efecto de la concentración de quitosano sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *Aspergillus niger* , a 30°C.

#### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T8	Between Groups	5312.500	3	1770.833	11.333	.020
	Within Groups	625.000	4	156.250		
	Total	5937.500	7			
T9	Between Groups	4947.164	3	1649.055	36.232	.002
	Within Groups	182.055	4	45.514		
	Total	5129.219	7			
T10	Between Groups	4792.375	3	1597.458	608.556	.000
	Within Groups	10.500	4	2.625		
	Total	4802.875	7			
T11	Between Groups	4189.594	3	1396.531	214.975	.000
	Within Groups	25.985	4	6.496		
	Total	4215.579	7			
T12	Between Groups	4319.025	3	1439.675	655.142	.000
	Within Groups	8.790	4	2.198		
	Total	4327.815	7			
T13	Between Groups	3509.510	3	1169.837	1333.147	.000
	Within Groups	3.510	4	.878		
	Total	3513.020	7			

#### T8

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1 g/L quitosano	2	37.5000	
1.6 g/L quitosano	2	87.5000	
3 g/L quitosano	2		87.5000
5 g/L quitosano	2		100.0000
Sig.		.053	100.0000
			.759

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

**T11**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
1 g/L quitosano	2	13.8500			
1.6 g/L quitosano	2	1.000			
3 g/L quitosano	2				
5 g/L quitosano	2		48.5000	63.8000	74.4000
Sig.			1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

**T12**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
1 g/L quitosano	2	7.4000			
1.6 g/L quitosano	2	1.000			
3 g/L quitosano	2				
5 g/L quitosano	2		32.5000	53.4500	69.3500
Sig.			1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

**T13**

Tukey HSD<sup>a</sup>

QUITOSAN	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
1 g/L quitosano	2	4.8500			
1.6 g/L quitosano	2	1.000			
3 g/L quitosano	2				
5 g/L quitosano	2		23.0500	38.6000	61.9000
Sig.			1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

# ANEXO 7

## Efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, a 30°C, en medio control y con quitosano (CQ<sub>50</sub>).

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	Between Groups	17.000	5	3.400	2.092	.198
	Within Groups	9.750	6	1.625		
	Total	26.750	11			
QUITOSAN	Between Groups	7530.500	5	1506.100	331.618	.000
	Within Groups	27.250	6	4.542		
	Total	7557.750	11			

### CONTROL

#### Tukey HSD<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05	
		1	
12.00	2	96.0000	
22.00	2	96.5000	
30.00	2	97.7500	
18.00	2	98.0000	
25.00	2	99.0000	
37.00	2	99.2500	
Sig.		.242	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

### QUITOSAN

#### Tukey HSD<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
12.00	2	19.0000			
18.00	2	1.000			
22.00	2			58.2500	
25.00	2			59.0000	
30.00	2			60.0000	
37.00	2		29.2500		97.0000
Sig.			1.000	.953	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

## ANEXO 8

### Análisis estadístico del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el diámetro promedio de las esporas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo líquido.

#### ANOVA

##### CONTROL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	194.153	12	16.179	36.286	.000
Within Groups	573.859	1287	.446		
Total	768.012	1299			

#### ANOVA

##### QUITOSAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	175.213	12	14.601	35.386	.000
Within Groups	531.043	1287	.413		
Total	706.256	1299			

#### CONTROL

√ HSD<sup>a</sup>

TIEMPO	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
.00	100	3.4686					
3.00 6.00	100	1.000	4.1637				
5.00	100		4.2531	4.2531			
18.00	100		4.2745	4.2745			
8.00	100		4.3503	4.3503			
14.00	100		4.3880	4.3880			
7.00	100		4.4389	4.4389	4.4389		
12.00	100			4.5288	4.5288	4.5288	
11.00	100				4.7356	4.7356	
16.00	100					4.7806	4.7356
10.00	100					4.8160	4.7806
9.00 Sig.	100					4.8242	4.8160
	100						4.8242
			.155	.153	.084	.088	5.0376
							.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 100.000.



QUITOSAN

Tukey HSD<sup>a</sup>

TIEMPO	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
.00	100	3.4686						
3.00	100	1.000	4.2376					
5.00	100		4.2953	4.2953				
10.00	100		4.3371	4.3371	4.3371			
12.00	100		4.4967	4.4967	4.4967	4.4967		
6.00	100			4.5933	4.5933	4.5933	4.5933	
8.00	100				4.6036	4.6036	4.6036	
7.00	100				4.6258	4.6258	4.6258	
14.00	100					4.7151	4.7151	
9.00	100					4.7212	4.7212	4.7151
16.00	100					4.7592	4.7592	4.7212
18.00	100						4.8378	4.7592
11.00	100							4.8378
Sig.			.180	.056	.076	.164	.258	4.9918
								.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 100.000.

# ANEXO 9

## Análisis estadístico del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el diámetro promedio de las hifas de *Aspergillus niger* en medio de cultivo líquido.

### ANOVA

#### CONTROL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.746	9	2.527	17.576	.000
Within Groups	110.580	769	.144		
Total	133.326	778			

### ANOVA

#### QUITOSAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.554	3	1.851	7.610	.000
Within Groups	72.990	300	.243		
Total	78.544	303			

### CONTROL

#### Tukey HSD<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
7.00	34	1.7132			
6.00	6	1.9417	1.9417		
8.00	39		2.0136		
9.00	100		2.1365	2.1365	
16.00	100		2.1764	2.1764	2.1764
12.00	100		2.1797	2.1797	2.1797
14.00	100			2.3246	2.3246
18.00	100			2.3774	2.3774
10.00	100			2.4005	2.4005
11.00	100				2.4353
Sig.		.273	.220	.112	.129

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 34.280.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

### QUITOSAN

#### Tukey HSD<sup>a,b</sup>

TIMEQ	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
12.00	4	2.3675	
18.00	100	1.000	
14.00	100		3.5287
16.00	100		3.5570
Sig.			.999

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 14.286.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

# ANEXO 10

## Análisis estadístico del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el incremento en el diámetro promedio de las esporas de *Aspergillus niger*, a 30°C.

### ANOVA

#### CONTROL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	85.866	11	7.806	16.640	.000
Within Groups	557.294	1188	.469		
Total	643.160	1199			

### ANOVA

#### QUITOSAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	56.844	11	5.168	11.935	.000
Within Groups	514.367	1188	.433		
Total	571.211	1199			

### CONTROL

#### Tukey HSD<sup>a</sup>

TIEMPO	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
3.00	100	.6961				
6.00	100	.7863				
5.00	100	.8071				
18.00	100	.8905				
8.00	100	.9205				
14.00	100	.9780				
7.00	100		.9780			
12.00	100		1.0625			
11.00	100			1.0625		
16.00	100				1.0625	
10.00	100				1.2686	
9.00	100				1.3124	1.2686
Sig.		.138	.160	.110	.098	.081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 100.000.

### QUITOSAN

Tukey HSD<sup>a</sup>

TIEMPO	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
3.00	100	.7706					
5.00	100	.8295	.8295				
10.00	100	.8708	.8708	.8708			
12.00	100	1.0296	1.0296	1.0296	1.0296		
6.00	100		1.1272	1.1272	1.1272	1.1272	
8.00	100			1.1379	1.1379	1.1379	
7.00	100			1.1597	1.1597	1.1597	
14.00	100				1.2492	1.2492	
9.00	100				1.2553	1.2553	1.2492
16.00	100				1.2930	1.2930	1.2553
18.00	100					1.3723	1.2930
11.00	100						1.3723
Sig.		.188	.063	.082	.168	.262	1.5248
							.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 100.000.

## ANEXO 11

### Análisis estadístico del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger* en medio líquido, a 30°C, a las 18 h.

#### ANOVA

GERMINAC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8010.333	2	4005.167	492.944	.000
Within Groups	24.375	3	8.125		
Total	8034.708	5			

#### GERMINAC

Tukey HSD<sup>a</sup>

TRATAM	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Quitosano	2	15.2500		
Conservador	2	1.000		
Control Sig.	2		85.7500 1.000	98.2500 1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

## ANEXO 12

### Análisis estadístico del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el porcentaje de divisiones mitóticas de las esporas de *Aspergillus niger*.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T3	Between Groups	408.333	2	204.167	21.491	.017
	Within Groups	28.500	3	9.500		
	Total	436.833	5			
DM1T3	Between Groups	408.333	2	204.167	21.491	.017
	Within Groups	28.500	3	9.500		
	Total	436.833	5			
DM2T3	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			
DM3T3	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T4	Between Groups	44.333	2	22.167	6.333	.084
	Within Groups	10.500	3	3.500		
	Total	54.833	5			
DM1T4	Between Groups	44.333	2	22.167	6.333	.084
	Within Groups	10.500	3	3.500		
	Total	54.833	5			
DM2T4	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			
DM3T4	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T5	Between Groups	57.333	2	28.667	1.313	.389
	Within Groups	65.500	3	21.833		
	Total	122.833	5			
DM1T5	Between Groups	41.333	2	20.667	.725	.553
	Within Groups	85.500	3	28.500		
	Total	126.833	5			
DM2T5	Between Groups	1.333	2	.667	1.000	.465
	Within Groups	2.000	3	.667		
	Total	3.333	5			
DM3T5	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T6	Between Groups	261.333	2	130.667	71.273	.003
	Within Groups	5.500	3	1.833		
	Total	266.833	5			
DM1T6	Between Groups	219.000	2	109.500	19.909	.019
	Within Groups	16.500	3	5.500		
	Total	235.500	5			
DM2T6	Between Groups	1.333	2	.667	1.333	.385
	Within Groups	1.500	3	.500		
	Total	2.833	5			
DM3T6	Between Groups	.333	2	.167	1.000	.465
	Within Groups	.500	3	.167		
	Total	.833	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T7	Between Groups	296.333	2	148.167	21.167	.017
	Within Groups	21.000	3	7.000		
	Total	317.333	5			
DM1T7	Between Groups	264.333	2	132.167	27.345	.012
	Within Groups	14.500	3	4.833		
	Total	278.833	5			
DM2T7	Between Groups	2.333	2	1.167	7.000	.074
	Within Groups	.500	3	.167		
	Total	2.833	5			
DM3T7	Between Groups	.333	2	.167	1.000	.465
	Within Groups	.500	3	.167		
	Total	.833	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T8	Between Groups	457.333	2	228.667	13.192	.033
	Within Groups	52.000	3	17.333		
	Total	509.333	5			
DM1T8	Between Groups	330.333	2	165.167	7.682	.066
	Within Groups	64.500	3	21.500		
	Total	394.833	5			
DM2T8	Between Groups	2.333	2	1.167	1.400	.372
	Within Groups	2.500	3	.833		
	Total	4.833	5			
DM3T8	Between Groups	5.333	2	2.667	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	5.333	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DM0T9	Between Groups	1262.333	2	631.167	31.298	.010
	Within Groups	60.500	3	20.167		
	Total	1322.833	5			
DM1T9	Between Groups	33.333	2	16.667	.513	.643
	Within Groups	97.500	3	32.500		
	Total	130.833	5			
DM2T9	Between Groups	294.333	2	147.167	67.923	.003
	Within Groups	6.500	3	2.167		
	Total	300.833	5			
DM3T9	Between Groups	506.333	2	253.167	303.800	.000
	Within Groups	2.500	3	.833		
	Total	508.833	5			

## ANEXO 13

### Análisis estadístico del efecto del quitosano (CQ<sub>50</sub>) sobre el porcentaje de hifas de *Aspergillus niger* con 0, 1, 2, 3 y 4 septos.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SH0T8	Between Groups	2.333	2	1.167	1.400	.372
	Within Groups	2.500	3	.833		
	Total	4.833	5			
SH1T8	Between Groups	2.333	2	1.167	1.400	.372
	Within Groups	2.500	3	.833		
	Total	4.833	5			
SH2T8	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			
SH3T8	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			
SH4T8	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SH0T10	Between Groups	625.333	2	312.667	234.500	.001
	Within Groups	4.000	3	1.333		
	Total	629.333	5			
SH1T10	Between Groups	597.000	2	298.500	358.200	.000
	Within Groups	2.500	3	.833		
	Total	599.500	5			
SH2T10	Between Groups	3.000	2	1.500	9.000	.054
	Within Groups	.500	3	.167		
	Total	3.500	5			
SH3T10	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			
SH4T10	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			



## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SH0T12	Between Groups	1737.333	2	868.667	651.500	.000
	Within Groups	4.000	3	1.333		
	Total	1741.333	5			
SH1T12	Between Groups	1297.000	2	648.500	1945.500	.000
	Within Groups	1.000	3	.333		
	Total	1298.000	5			
SH2T12	Between Groups	21.000	2	10.500	31.500	.010
	Within Groups	1.000	3	.333		
	Total	22.000	5			
SH3T12	Between Groups	1.333	2	.667	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	1.333	5			
SH4T12	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SH0T14	Between Groups	2469.000	2	1234.500	217.853	.001
	Within Groups	17.000	3	5.667		
	Total	2486.000	5			
SH1T14	Between Groups	1697.333	2	848.667	636.500	.000
	Within Groups	4.000	3	1.333		
	Total	1701.333	5			
SH2T14	Between Groups	72.333	2	36.167	21.700	.016
	Within Groups	5.000	3	1.667		
	Total	77.333	5			
SH3T14	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			
SH4T14	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SH0T16	Between Groups	9409.000	2	4704.500	1568.167	.000
	Within Groups	9.000	3	3.000		
	Total	9418.000	5			
SH1T16	Between Groups	1733.333	2	866.667	76.471	.003
	Within Groups	34.000	3	11.333		
	Total	1767.333	5			
SH2T16	Between Groups	1575.000	2	787.500	277.941	.000
	Within Groups	8.500	3	2.833		
	Total	1583.500	5			
SH3T16	Between Groups	312.333	2	156.167	937.000	.000
	Within Groups	.500	3	.167		
	Total	312.833	5			
SH4T16	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.000	5			

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SH0T18	Between Groups	9697.333	2	4848.667	909.125	.000
	Within Groups	16.000	3	5.333		
	Total	9713.333	5			
SH1T18	Between Groups	1644.333	2	822.167	67.575	.003
	Within Groups	36.500	3	12.167		
	Total	1680.833	5			
SH2T18	Between Groups	1561.333	2	780.667	234.200	.001
	Within Groups	10.000	3	3.333		
	Total	1571.333	5			
SH3T18	Between Groups	559.000	2	279.500	13.416	.032
	Within Groups	62.500	3	20.833		
	Total	621.500	5			
SH4T18	Between Groups	5.333	2	2.667	4.000	.142
	Within Groups	2.000	3	.667		
	Total	7.333	5			

# TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis fueron presentados en 3 Congresos Nacionales y 5 Congresos Internacionales. Asimismo, se escribieron 4 artículos de investigación de los cuales 2 están publicados y 2 están en proceso de ser enviados para su publicación.

## Congresos Nacionales.

1. ***“El quitosano y su efecto sobre la germinación de las esporas de hongos: un estudio microscópico”***. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, México, 10-14 de septiembre del 2001.
2. ***“Efecto combinado de quitosanos con diferente peso molecular y enzimas de hongos, sobre la germinación de esporas de *Aspergillus niger*”***. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, México, 8-12 de septiembre del 2003.
3. ***“Elaboración y caracterización de películas de quitosano: evaluación del efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*”***. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, México, 8-12 de septiembre del 2003.

## Congresos Internacionales.

1. ***“Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation”***. 8<sup>th</sup> International Chitin and Chitosan Conference (8<sup>th</sup> ICC) and 4<sup>th</sup> Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium (4<sup>th</sup> APCCS). Yamaguchi, Japón, 21-23 de septiembre de 2000.
2. ***“Growth inhibition of *Rhizopus stolonifer* in superficial cultures with added chitosan”***. VII Simposium Latinoamericano de Polímeros, V Congreso Iberoamericano de Polímeros, I Simposium Latinoamericano de Quitina y Quitosano. La Habana Cuba, 20-24 de noviembre de 2000.
3. ***“Effect of chitosan on fungal growth using scanning electron microscopy and morphometric evaluation”***. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Chitin Enzymology and 4<sup>th</sup> Conference of the European Chitin Society”. Senegallia (Ancona), Italia, 6-10 de mayo de 2001.

4. *"Efecto del quitosano y la temperatura sobre la germinación de esporas de Aspergillus niger: modelamiento matemático"*. VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, VII Congreso Iberoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina, XV Congreso Nacional de Polímeros. Acapulco, México, 10-15 de noviembre del 2002.
5. *"Influencia del quitosano sobre la producción de enzimas de Aspergillus niger, en cultivo líquido y superficial"*. VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, VII Congreso Iberoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina, XV Congreso Nacional de Polímeros. Acapulco, México, 10-15 de noviembre del 2002.

### **Conferencias.**

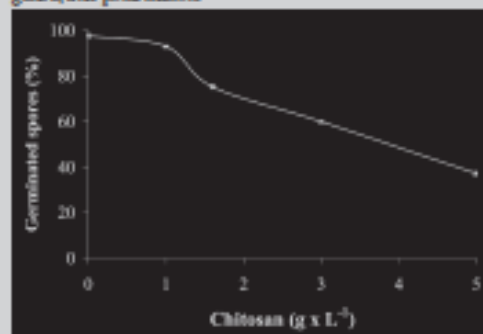
- *"Obtención y aplicación del quitosano"*. Conferencia presentada en la XII Semana de la Investigación Científica. Colegio de Bachilleres Plantel No. 9 Aragón, 8 de mayo de 2001.
- *"Propiedades antimicrobianas del quitosano"*. Seminario presentado en la División de Ciencias Básicas e Ingeniería de la UAM-Iztapalapa, dentro del ciclo Seminario de Polímeros. México, D.F., 24 de abril de 2002.

### **Publicaciones (Artículos anexos).**

1. **Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation.** (2001). *Chitin and Chitosan. Chitin and chitosan in life science*. Edited by Uragami, T., Kurita, K. And Fukamizo, T. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Chitin and Chitosan Conference and 4<sup>th</sup> Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Yamaguchi, Japan. Pp: 256-259.
6. **Effect of chitosan and temperature on germination of *Aspergillus niger*.** (2003). *Macromolecular Bioscience*, 3(10): 582-586.

**Full Paper:** Inhibition of radial growth and spore germination of *Aspergillus niger* in media with added chitosan were detected. The highest radial growth inhibition (73%) was determined at 24 h with  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of chitosan, and the percent inhibition of spore germination was 40% after 13 h of inoculation. Further, the  $\text{CC}_{50}$ , that is, the concentration at which spore germination is inhibited by 50%, was estimated by probit analysis ( $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The activation energies,  $E_A$ , were estimated by an Arrhenius model in control and amended chitosan media, obtaining 35.6 and  $36.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , respectively. These values were in the same order of magnitude because chitosan as inhibitor was more effective at low temperature ( $\leq 18^\circ\text{C}$ ). Hence synergism of temperature and chitosan were only observed at 12 and  $18^\circ\text{C}$ . Therefore, the maximal percentage of germinated spores,  $S_{\text{max}}$ , was also affected by low temperatures in chitosan-amended media with estimated values lower than 70% at temperatures  $< 37^\circ\text{C}$  whereas in control media  $S_{\text{max}}$  reached values close to 100%. Scanning electron micrographs showed that chitosan produced spore aggregation and mor-

phological anomalies affecting swelling, germ tube emergence, and polarization.



Germinated spores percentages of *Aspergillus niger* in Czapek media at several chitosan concentrations and  $30^\circ\text{C}$ .

## Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*

Maribel Plancencia-Jatomea,<sup>1</sup> Gustavo Vinięra,<sup>1</sup> Roberto Olayo,<sup>1</sup> María Monica Castillo-Ortega,<sup>2</sup> Keiko Shirai\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Itzapalapa, Biotechnology Department, Biopolymer Laboratory, Mexico City, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicente, C.P. 09340, Mexico, D.F.  
Fax: +52 (55) 804 4712; E-mail: smk@xanum.uam.mx

<sup>2</sup> Universidad de Sonora, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Hermosillo, Mexico

Received: June 2, 2003; Revised: August 17, 2003; Accepted: August 19, 2003; DOI: 10.1002/mabi.200350024<sup>†</sup>

**Keywords:** *Aspergillus niger*; biopolymers; chitosan; spore germination; thermal properties

### Introduction

Fungal contamination represents one of the most common causes of food spoilage. The shelf life may be extended by control of the water activity, pH, temperature, oxygen concentration, or by addition of preservatives, if sensorial and nutritional changes might occur. Currently, efforts have been focused on replacing chemical and synthetic preservatives by natural products.

Chitosan and some of its derivatives were reported as potential preservatives for food, such as fruits and vegetables,<sup>[1–6]</sup> pasteurized juice,<sup>[5,6]</sup> and meats.<sup>[3]</sup> In addition to their antimicrobial properties, the use of chitosan in food applications has been encouraged for its biocompatibility, nontoxicity, nondigestibility, and biodegradability.<sup>[7–9]</sup> It was suggested that the antifungal activities

of chitosan are due to the polycationic character of the polyacetaldehyde.<sup>[5,6]</sup> The contact of fungal cells with chitosan causes molecular disorganization and structural alterations of the cytoplasm and plasma membrane, as well as weakening and swelling of the hyphae.<sup>[4,5,10,11]</sup> It has also been reported that this biopolymer elicits the production of defense compounds, such as phytoalexins and enzymes in plant cells.<sup>[12]</sup>

Despite many studies of the antifungal properties of chitosan, there is no information on its action on the initial growth stage of fungi and on the temperature dependence of inhibition. The purpose of our research was to study the effect of chitosan on the spore germination of *Aspergillus niger*, which is one of the most common fungal contaminants of food. Spore germination rates were determined with amended chitosan and control media. Morphological

# CHITIN AND CHITOSAN

CHITIN AND CHITOSAN IN LIFE SCIENCE

Edited by

Tadashi Uragami, Keisuke Kurita and  
Tamo Fukamizo



KODANSHA SCIENTIFIC LTD

## Effect of Chitosan on Fungal Growth Using Morphometric Evaluation.

<sup>1</sup>Plascencia, M., <sup>1</sup>Olayo, R., <sup>2</sup>Larralde, P., <sup>1</sup>Viniegra, G., <sup>3</sup>Castillo, M. and <sup>1</sup>Shirai, K.

(1)Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. Michoacan y Purisima s/n, Col. Vicentina, Mexico, D.F. C.P. 09340; (2)Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autónoma de Mexico. (3)DIPM, Universidad de Sonora. E-mail: [smk@xanum.uam.mx](mailto:smk@xanum.uam.mx)

### ABSTRACT

Several chitosan concentrations (0 to 1.6 g/L) were added to potato dextrose agar. Conidia of *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* were inoculated and incubated at 30°C. The colony rate of radial extension of the fungal growth was compared against a control. The inhibition of growth at various chitosan concentrations was expressed as the inhibition percentage of radial growth related to the control. The results showed that *P. expansum* presented stronger inhibition than *A. niger* and *R. stolonifer*. Microscopic observations showed that chitosan induced morphological changes such as increment of hyphal diameter and length.

**Keywords:** chitosan, phytopathogenic fungi, hyphal morphology.

### INTRODUCTION

Chitosan can inhibit the growth of several pathogenic fungi. It has been applied in fruits and vegetables for extending their storage life due to its ability to induce defence enzymes and form semi-permeable film. Besides, chitosan is non-toxic and biologically safe [1, 2]. The purpose of this work was to study the effect of chitosan on *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* growth by measuring morphometric changes and growth parameters

### EXPERIMENTAL

Several concentrations of chitosan (0 to 0.16%w/w) were added to potato dextrose agar (PDA). Further spores germination of *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* were determined in Czapeck media with added the chitosan levels.

The mycelium grown (biomass) was determined by dried weight and morphometric parameters such as length and diameter of germinal tubes were observed in Zeiss microscope (x400) and measured using image analysis software (IMAGE-Pro Plus, Version 4.1, Media Cybernetics, USA) [3]. Statistical analysis was carried out in SPSS version 8.0 programme (SPSS, Inc., USA 1997).

### RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that *P. expansum* presented stronger inhibition than *A. niger* and *R. stolonifer*. After 48 hours, *P. expansum* and *R. stolonifer* were inhibited 98 and 54%, respectively, whereas *A. niger* only had 18.4% (Figure 1). Chitosan has effect spores germination and exponential phase growth (Figure 1).

The higher percentages of inhibition were observed at 1.3 and 1.6 g/L of chitosan and the fungi lag phase was extended (Figure 1). The radial extension rates (U) were calculated as the slope of colony radial extension in the exponential phase.

The percentages of inhibition were determined for the lag phase with the calculation of intercept (1/h). Besides inhibition was obtained in the exponential phase by U (Table 1). *P. expansum* was more sensitive in lag phase than exponential phase (Figure 1).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00002

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL QUITOSANO EN SOLUCION Y EN PELICULAS.

En México, D.F., se presentaron a las 16:00 horas del día 29 del mes de Junio del año 2004 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MA. MONICA CASTILLO ORTEGA
- DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ
- DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES
- DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA
- DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, a la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA  
DE: MARIBEL PLASCENCIA JATOMEA

De acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*


Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
DIRECCIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES  
Casa abierta al tiempo

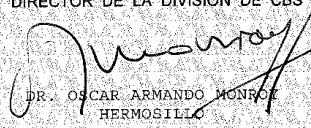
*Maribel Plascencia J.*  
MARIBEL PLASCENCIA JATOMEA  
FIRMA DE LA ALUMNA

REVISÓ



L.C. CARMEN LORENS BABREGAT  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO

PRESIDENTA



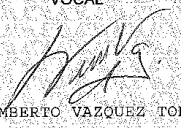
DRA. MA. MONICA CASTILLO ORTEGA

VOCAL



DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

VOCAL



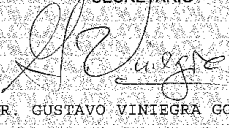
DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES

VOCAL



DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA

SECRETARIO



DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ