



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

---

---



**“Obtención de nanopartículas de quitosano mediante  
tratamiento ultrasónico y su aplicación antifúngica en  
*Colletotrichum gloeosporioides* presente en el mango  
Ataulfo de Guerrero”**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:**

**Ivana Solis Vizcaino**

**Director de Tesis:**

**Dr. Efraín Rubio Rosas**

**Asesor de Tesis:**

**Dra. Eva Águila Almanza**

**BUAP**

**H. PUEBLA Z., SEPTIEMBRE 2023**



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA



ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Nombre del (de la) estudiante: Ivana Solis Vizcaino

Matrícula: 221470293

Nombre del director: DR. EFRAIN RUBIO ROSAS

Nombre del codirector: DRA. EVA ÁGUILA ALMANZA

Título de la Tesis:

“OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO MEDIANTE TRATAMIENTO ULTRASÓNICO Y SU APLICACIÓN ANTIFÚNGICA EN *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* PRESENTE EN EL MANGO ATAULFO DE GUERRERO”

Comisión Revisora:

Presidente: Dr. Heriberto Hernández Cocoletzi

Secretario(a): Dra. María Elena Ramos Cassellis

Vocal (1): Dr. Efraín Rubio Rosas

Vocal (2): Dra. Eva Águila Almanza

Firma: 

Firma: 

Firma: 

Firma: 

Los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de maestría que presenta el (la) estudiante arriba indicado, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el (la) estudiante presente su defensa y examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.

Fecha de examen: día de mes de año

22-09-2023

Hora: 11:00am

Día de la semana: Viernes

Lugar: FIQ 7/105



Revisa y Autoriza: Sello de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado - FIQ - BUAP

# ÍNDICE

<b>CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO</b> .....	10
<b>1.1. Mango Ataulfo</b> .....	10
<b>1.1.1. Área estudiada</b> .....	11
<b>1.1.2. Antracnosis</b> .....	12
<b>1.1.3. Etapas de desarrollo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i></b> .....	13
<b>1.1.4. Taxonomía del hongo</b> .....	13
<b>1.1.5. Etiología del hongo</b> .....	14
<b>1.1.6. Control de la enfermedad</b> .....	14
<b>1.2. Quitosano</b> .....	15
<b>1.2.1. Propiedades fisicoquímicas</b> .....	16
<b>1.2.2. Actividad antifúngica del quitosano.</b> .....	17
<b>1.3. Nanotecnología</b> .....	18
<b>1.3.1. Nanopartículas</b> .....	18
<b>1.3.2. Nanopartículas del quitosano</b> .....	19
<b>1.3.3. Ultrasonido</b> .....	19
<b>1.3.4. Estado del arte.</b> .....	20
<b>CAPITULO 2. METODOLOGÍA</b> .....	22
<b>2.1. Quitosano</b> .....	23
<b>2.2. Caracterización de quitosano</b> .....	23
<b>2.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	23
<b>2.2.2. Grado de desacetilación</b> .....	23
<b>2.2.3. Peso molecular</b> .....	23
<b>2.3. Obtención de nanopartículas de quitosano.</b> .....	24
<b>2.4. Caracterización de nanopartículas de quitosano.</b> .....	26
<b>2.4.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	26
<b>2.4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)</b> .....	27
<b>2.4.3. Microscopia de fuerza atómica (AFM)</b> .....	27
<b>2.5. Aislamiento del hongo <i>Colletotrichum gloeosporoides</i>.</b> .....	27
<b>2.6. Caracterización de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>.</b> .....	28
<b>2.6.1. Microscopia óptica.</b> .....	28
<b>2.6.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)</b> .....	29

2.7. Pruebas <i>in vitro</i> .....	29
2.7.1. Preparación de soluciones.....	29
2.7.2. Inoculación del hongo. ....	32
2.7.3. Pruebas de inhibición.....	33
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Quitosano .....</b>	<b>34</b>
3.1.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). ....	34
3.1.2. Grado de desacetilación.....	36
3.1.3. Peso molecular promedio en viscosidad.....	36
<b>3.2. Nanopartículas de quitosano.....</b>	<b>39</b>
3.2.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). ....	39
3.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	40
3.2.3. Microscopia de fuerza atómica (AFM).....	40
<b>3.3. Identificación del patógeno.....</b>	<b>41</b>
3.3.1. Microscopia óptica. ....	42
3.3.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	43
<b>3.4. Pruebas <i>in vitro</i> .....</b>	<b>44</b>
3.4.1. Crecimiento del micelio radial .....	45
3.4.2. Velocidad del crecimiento del hongo .....	47
3.4.3. Análisis estadístico.....	50
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mango Ataulfo .....	10
<b>Figura 2.</b> Antracnosis en el árbol de mango.....	13
<b>Figura 3.</b> Reacción de desacetilación de la quitina. ....	15
<b>Figura 4.</b> Diagrama general de la metodología.....	22
<b>Figura 5.</b> Medición de viscosidad específica del quitosano. ....	24
<b>Figura 6.</b> Soluciones de quitosano/Tween 20/ CH <sub>3</sub> COOH.....	25
<b>Figura 7.</b> Baño ultrasónico. ....	25
<b>Figura 8.</b> Solución de ChNP después de centrifugación.....	26
<b>Figura 9.</b> Solución ChNP/agua destilada. ....	26
<b>Figura 10.</b> Mango Ataulfo con síntomas de antracnosis.....	27
<b>Figura 11.</b> Campana de flujo laminar. ....	28
<b>Figura 12.</b> Portaobjetos con hongo.....	29
<b>Figura 13.</b> Soluciones ChNP/PDA. ....	30
<b>Figura 14.</b> Soluciones ChNP/PDA/Agua destilada.....	30
<b>Figura 15.</b> Esterilización. ....	31
<b>Figura 16.</b> Llenado cajas Petri. ....	31
<b>Figura 17.</b> Discos de Colletotrichum gloeosporoides.....	32
<b>Figura 18.</b> Inoculación de hongo en los distintos tratamientos.....	33
<b>Figura 19.</b> FTIR de quitosano.....	35
<b>Figura 20.</b> Viscosidad reducida en función de la concentración.....	38
<b>Figura 21.</b> FTIR de nanopartículas de quitosano.....	39
<b>Figura 22.</b> Imágenes SEM de las ChNP en aumento de 2000x (a) y 5000x (b).....	40
<b>Figura 23.</b> Imágenes AFM de las ChNP. ....	41
<b>Figura 24.</b> Imagen de la morfología de C. gloeosporioides in vitro en medio agar PDA a 25°C. ....	42
<b>Figura 25.</b> Morfología colonial de Colletotrichum gloeosporioides. ....	43
<b>Figura 26.</b> Micrografía SEM de Colletotrichum gloeosporioides. ....	43
<b>Figura 27.</b> Micrografía SEM de conidios de Colletotrichum gloeosporioides.....	44
<b>Figura 28.</b> Actividad antifúngica de Prueba A (0.25% ChNP/PDA), en el día 7. ....	44
<b>Figura 29.</b> Actividad antifúngica de Prueba B (0.5% ChNP/PDA), en el día 7. ....	44
<b>Figura 30.</b> Actividad antifúngica de Prueba C (1% ChNP/PDA), en el día 7. ....	44
<b>Figura 31.</b> Actividad antifúngica de Prueba D (0.25 % ChNP/PDA-H <sub>2</sub> O), en el día 7. ....	45
<b>Figura 32.</b> Actividad antifúngica de Prueba E (0.5% ChNP/PDA-H <sub>2</sub> O), en el día 7.....	45

<b>Figura 33.</b> Actividad antifúngica de Prueba F (1% ChNP/PDA-H <sub>2</sub> O), en el día 7.....	45
<b>Figura 34.</b> Actividad antifúngica de nanopartículas de quitosano después de 7 días de incubación. .....	47
<b>Figura 35.</b> Cinética del crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> durante 7 días de incubación con y sin ChNP. ....	49
<b>Figura 36.</b> Prueba de Tukey para los tratamientos durante 7 días.....	50
<b>Figura 37.</b> Gráfica de caja del efecto inhibitorio de las ChNP al séptimo día. ....	51
<b>Figura 38.</b> Gráfica de caja de la velocidad de crecimiento de las ChNP al séptimo día.....	52
<b>Figura 39.</b> Prueba de Tukey para los tratamientos durante 7 días.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Clasificación taxonómica del Mango Ataulfo.</i> .....	11
<b>Tabla 2.</b> <i>Superficie, producción y valor de la producción de mango ataulfo en Guerrero, 2022.</i> .....	12
<b>Tabla 3.</b> <i>Clasificación taxonómica Colletotrichum gloeosporioides.</i> .....	14
<b>Tabla 4.</b> <i>Bandas características del quitosano del espectro FTIR.</i> .....	35
<b>Tabla 5.</b> <i>Grado de desacetilación del quitosano.</i> .....	36
<b>Tabla 6.</b> <i>Tiempos de caída de disolución a cada concentración de quitosano.</i> .....	36
<b>Tabla 7.</b> <i>Viscosidad específica a cada concentración de quitosano.</i> .....	37
<b>Tabla 8.</b> <i>Viscosidad reducida cada concentración de quitosano.</i> .....	37
<b>Tabla 9.</b> <i>Peso molecular promedio viscoso del quitosano.</i> .....	38
<b>Tabla 10.</b> <i>Efecto de los distintos tratamientos de ChNP sobre el crecimiento micelial de Colletotrichum gloeosporioides.</i> .....	46
<b>Tabla 11.</b> <i>Velocidad de crecimiento de Colletotrichum gloeosporioides frente a los distintos tratamientos de ChNP.</i> .....	48

## RESUMEN

*Colletotrichum gloeosporioides* es uno de los principales hongos que ataca a distintos frutos provocando la enfermedad conocida como antracnosis. Este hongo provoca daños severos a la producción de mango Ataulfo en la etapa de cosecha y postcosecha en México, principalmente en el estado de Guerrero el cual es el mayor productor en el país. Para combatir al fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, se han utilizado fungicidas químicos de amplio espectro, que no están permitidos por su toxicidad por lo cual son dañinos para el medio ambiente y la salud humana. A partir de esta premisa, es importante proponer métodos alternativos a los fungicidas químicos para el control de la enfermedad, con la seguridad suficiente de que no causarán daño, sean de menor costo y de nulo impacto ambiental. El quitosano ha surgido como una estrategia ambientalmente amigable y eficaz para tratar la antracnosis. El presente trabajo tiene como objetivo principal elaborar nanopartículas de quitosano a distintas concentraciones utilizando ultrasonido y verificar su efecto antifúngico en un modelo *in vitro*. Se obtuvieron nanopartículas de quitosano de un tamaño promedio de 50 nm. Se utilizaron tres distintas concentraciones de nanopartículas de quitosano. Los resultados señalan que, las nanopartículas de quitosano a la concentración de 0.5 % inhibió significativamente el crecimiento del patógeno (97%). En conclusión, el porcentaje de inhibición y la cinética de crecimiento del tratamiento frente al hongo evidencian el efecto antifúngico de las nanopartículas sobre la membrana y pared del hongo y por la composición es posible que lleguen a generar una respuesta de resistencia.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las frutas y hortalizas son organismos vivos que después de la cosecha obtienen su energía mediante el proceso de respiración, provocando su madurez y eventualmente la senescencia. Las características positivas que hacen que las frutas sean aptas para su consumo, también las hace susceptibles a enfermedades. Durante la maduración postcosecha, la fruta está propensa al ataque de microorganismos que pueden causarle mal olor, daños internos y externos, además, producen micotoxinas y contaminan los productos adyacentes. El estado de Guerrero aporta el 22% de la producción nacional de mango ataulfo, el cual es de suma importancia en la agricultura de México. Dentro de las grandes problemáticas que presentan este cultivo se encuentra la enfermedad llamada antracnosis causada por el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, siendo la enfermedad más importante en la etapa de pre y postcosecha, ya que, provoca pérdidas del 3-60% de la producción. Para el manejo de dicha enfermedad se utilizan fungicidas químicos, los cuales en un 98% no llegan a su especie objetivo provocando contaminación ambiental y daños severos a la salud humana. El uso excesivo de químicos para el control de la antracnosis ha generado que distintos factores tanto ambientales como productivos se vean afectados, propiciando la búsqueda y el estudio de alternativas orgánicas, debido a la inexistencia de estos en el mercado agrícola.

## **JUSTIFICACIÓN**

El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina, considerado un material biodegradable, biocompatible, sin toxicidad o efectos secundarios. En la actualidad, el uso del quitosano ha sido justificado tecnológicamente en programas de agricultura sostenible, ya que no genera problemas de salud y de seguridad alimentaria (Bautista, et al., 2017). Su carga positiva y la presencia de grupos amina en su estructura química proporciona al quitosano propiedades únicas que lo hacen útil en distintas aplicaciones; incluyendo la agricultura. Para controlar la contaminación por hongos, se han buscado alternativas comercialmente viables al uso de fungicidas sintéticos. Actualmente, el uso de quitosano ha sido justificado tecnológicamente en programas de agricultura sostenible; con la finalidad de mejorar sus propiedades y evitar el uso de solventes tóxicos, en este trabajo se propone obtener nanopartículas de quitosano mediante tratamiento ultrasónico, para evaluar su funcionalidad antifúngica.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

La aplicación de un tratamiento de ultrasonido sobre las partículas de quitosano permitirá reducir su tamaño lo que provocará un mayor efecto antifúngico sobre el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, ya que contará con mayor disponibilidad de grupos amina protonados y por ende mayor bioactividad logrando la mitigación del hongo.

### **Objetivo general**

Elaborar nanopartículas de quitosano utilizando tratamiento ultrasónico y verificar su efecto antifúngico en la antracnosis presente en los cultivos de mango Ataulfo.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el peso molecular del quitosano por medio de viscosimetría capilar.
- Determinar el grado de desacetilación del quitosano por medio de espectroscopía FTIR.
- Obtener nanopartículas de quitosano mediante un proceso de sonicación.
- Caracterizar las nanopartículas de quitosano por espectroscopía FTIR y SEM.
- Realizar el aislamiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* a partir del mango Ataulfo con síntomas de antracnosis.
- Estudiar el efecto inhibitorio micelial de las nanopartículas de quitosano a distintas concentraciones sobre el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

## CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Mango Ataulfo

El Mango Ataulfo es una variedad tropical descubierta en 1963 por el Ing. Héctor Cano Flores en cinco arboles padres ubicados en Tapachula, Chiapas propiedad del Sr. Ataulfo Morales Gordillo. La Declaratoria de Protección a la Denominación de Origen del Mango Ataulfo fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 4 de agosto de 2003. El desarrollo de este producto agrícola como cultivo se llevó a cabo mediante la selección del CLON I.M.C M2. (Gómez & Rodríguez 2019,). El fruto se caracteriza por ser de forma oval de tamaño pequeño, su composición promedio consta de 19% de piel gruesa y firme color amarillo canario, 69% de pulpa color amarilla de textura cremosa con muy poco contenido de fibra, dulce y baja acidez, y 8.5% de hueso o semilla (Figura 1). Contiene vitaminas A y C, es rico en minerales, fibras y antioxidantes, su contenido de calorías, grasa y sodio es bajo (Mendoza et.al, 2020). Los componentes bioquímicos más importantes corresponden a los caracteres de sólidos solubles totales (BX), azúcares reductores totales y acidez.



*Figura 1.* Mango Ataulfo

En la Tabla 1, se describe su clasificación taxonómica según de la Torre (2013):

**Tabla 1.** *Clasificación taxonómica del Mango Aaulfo.*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Magnoliopsida
<b>Clase</b>	Magnoliophyta
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Familia</b>	Anacardiácea
<b>Género</b>	Manguifera
<b>Especie</b>	<i>M.caesia</i>
<b>Nombre binominal</b>	<i>Mangifera caesia</i>
<b>Variedad</b>	Aaulfo

### 1.1.1. Área estudiada

En México, durante el 2022 se cultivaron 209,576.10 hectáreas de mango y se produjeron más de 2.17 millones de toneladas de fruta, con un valor de producción de 12,137,830.57 millones de pesos mexicanos. (SIAP, 2022). La variedad Aaulfo ocupa el 31 % de la producción nacional con 605,489.64 hectáreas sembradas. El estado de Guerrero aporta el 22 % de la producción nacional, lo que lo ubica en primer lugar. La región Costa Grande en la entidad es la que tiene mayor producción y superficie sembrada, siendo el 46 % relativo al Mango Aaulfo (SADER,2022). El municipio de Tecpán de Galeana tiene la mayor superficie, producción y valor, como puede verse en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Superficie, producción y valor de la producción de mango ataulfo en Guerrero, 2022.

Municipio	Superficie sembrada [Ha]	Producción [t]	Rendimiento [t/Ha]	Valor de Producción [miles de pesos]
<i>Atoyac de Álvarez</i>	1397	2618028	18.89	240675.97
<i>Benito Juárez</i>	569	10050.67	18.37	89248.21
<i>Coyuca de Benítez</i>	664	11477.16	17.60	105244.55
<i>La Unión</i>	735	11194.06	16.08	101061.78
<i>Petatlán</i>	975	14998.13	16.21	134287.20
<i>Tecpán de Galena</i>	3076	51932.76	17.66	492890.97
<i>Zihuatanejo</i>	618	9117	16.61	83352.92

### 1.1.2. Antracnosis

Dentro de las grandes problemáticas que presentan los cultivos del mango, se encuentran enfermedades provocadas por agentes bióticos que modifican las funciones fisiológicas de la planta, alterando su comportamiento habitual y reduciendo su rendimiento; pueden incluso conducir a su muerte. La antracnosis es considerada la enfermedad más importante en la etapa de pre y postcosecha del cultivo de mango; es causada por el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* provocando pérdidas del 3 % de la producción. Cuando las condiciones ambientales existentes durante la floración son óptimas para su desarrollo, los daños pueden llegar hasta el 60 %.

Los síntomas se presentan tanto en el árbol como en el fruto, como se observa en la Figura 2. En la hoja surge como puntos necróticos negros de forma irregular en ambos lados, de color grisáceo a negruzco, también puede afectar el tallo donde aparecen lesiones de color gris oscuro alargados y posteriormente se ennegrecen, en las flores esta enfermedad se presenta marchitándolas o dejándoles un aspecto a flor seca, y su color varía de marrón al negro. (Monteon et al., 2017)



**Figura 2.** Antracnosis en el árbol de mango.

Los frutos verdes que se infectan son abortados; los frutos maduros muestran manchas irregulares de color negro, presentándose principalmente en el epicarpio, si estos se unen eventualmente pueden penetrar el mesocarpio.

### **1.1.3. Etapas de desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides***

Según Rodríguez et, al (2013) las etapas de crecimiento del hongo son las siguientes:

1. Deposición en la superficie del hospedante.
2. Fijación del conidio en la superficie.
3. Germinación del conidio.
4. Producción del apresorio.
5. Penetración de la epidermis de la planta.
6. Crecimiento y colonización del tejido del hospedante.
7. Producción de acérvulos y esporulación.

### **1.1.4. Taxonomía del hongo**

El Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (2023) expone la taxonomía del hongo (Tabla 3):

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>Reino</b>	Fungi
<b>Phylum</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase</b>	Sordariomycetes incertae sedis
<b>Orden</b>	Phyllachorales
<b>Familia</b>	Glomerellaceae
<b>Género</b>	<i>Colletotrichum</i>
<b>Especie</b>	<i>gloeosporioides</i>

#### 1.1.5. Etiología del hongo

Dentro de la etiología del *Collectotrichum gloeosporoides* este produce conidios incoloros, de una sola de una sola célula, ovoides cilíndricos, y en ocasiones encorvados o en forma de pesas en acervulos. Las masas de conidios son de color salmón o rosa. Los acervulos son subepidérmicos y brotan a través de la superficie de los tejidos de la planta, tienen forma de disco y cojín y son cerosos, con conidióforos simples, cortos y erectos. (Uddin,2018).

#### 1.1.6. Control de la enfermedad

Para el manejo de la antracnosis, en el municipio de Tecpán de Galeana se utilizan fungicidas químicos como el Captan, sulfato de cobre pentahidratado y tribásico, oxiclورو de cobre, maneb, clorotalonil, ferbam, aplicándose de 8 a 10 veces. (Garrido et al., 2014)

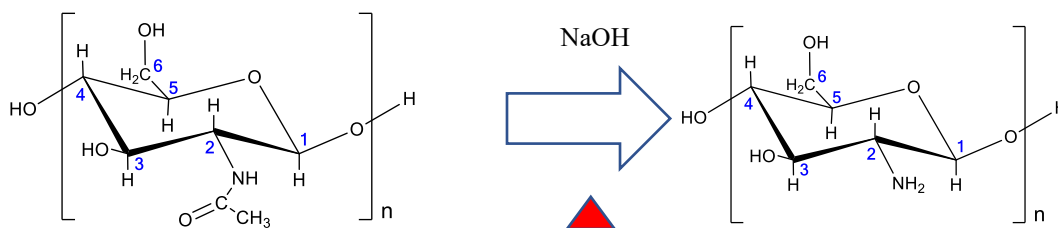
Mucho de estos fungicidas están prohibidos en otros países debido a su alto riesgo en la salud humana, pero están permitidos en México.

El 98 % de estos fungicidas suelen no llegar a la especie objetivo, provocando contaminación ambiental debido al rociado en campos agrícolas enteros, lavado inadecuado de tanques y contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento, residuos descargados y dispuestos en el suelo, derrames accidentales, entre otros factores. Dentro de su repercusión se encuentra la contaminación de los suelos debido a que algunos plaguicidas tardan en degradarse de 5 a 30 años, dependiendo de su origen. El uso de pesticidas representa el 6% de niveles totales de ozono troposférico, el cual se forma cuando los compuestos

orgánicos volátiles que emite el pesticida en el suelo reaccionan con otros químicos. Existen distintos mecanismos mediante los cuales los plaguicidas se incorporan a las aguas provocando que los seres vivos que ahí habitan se contaminen con estos residuos tóxicos. Está comprobado que un 90 % (del Puerto et al., 2014) de los pozos de agua presentan residuos de los pesticidas; estas partículas también se han hallado en aguas subterráneas y de lluvia. Los plaguicidas afectan al ser humano cuando estos entran en contacto a través de todas las vías de exposición posibles: respiratoria, digestiva y dérmica, pues estos pueden encontrarse en función de sus características, en el aire inhalado, en el agua y en los alimentos, entre otros medios ambientales provocando efectos agudos y crónicos de salud según sea la exposición.

## 1.2. Quitosano

El quitosano es un biopolímero obtenido de la quitina, polisacárido encontrado abundantemente en la naturaleza y principal constituyente de hongos, exoesqueleto de insectos y crustáceos como el camarón, el cangrejo y la langosta; se caracteriza por una estructura fibrosa (Kausar, 2017), la cual. Se obtiene al desacetilar con álcalis fuertes los grupos acetamida de la quitina favoreciendo la obtención de grupos amina en la estructura. En la Figura 3, se muestra la reacción termoalcalina de la quitina que deriva en la obtención de quitosano. Se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, no tóxico, de fácil aplicación y ambientalmente amigable. Su grado de desacetilación varía en el intervalo de 60 % a 90 %. Se subdivide a partir de su peso molecular en tres tipos, quitosano de bajo peso molecular de menos de 150 kDa, quitosano de alto peso molecular de 700-1000 kDa, y quitosano de peso molecular medio (Mishra, 2015).



**Figura 3.** Reacción de desacetilación de la quitina.

Las propiedades fisicoquímicas de la quitosano se atribuyen en gran medida al grupo amina, presenta un pH en un intervalo de 4.0-6.0. Además, existen dos propiedades del biopolímero de las cuales dependen las características y comportamiento particular en cada área de aplicación: el peso molecular y el grado de desacetilación. (Barragán, et al., 2016)

### 1.2.1. Propiedades fisicoquímicas

#### *Grado de desacetilación*

Según Guiraldo (2015) este biopolímero adquiere el nombre de quitosano cuando el grado de desacetilación de la quitina es mayor o igual al 50%, reflejando el balance entre las unidades repetitivas 2-Acetilamina-2- desoxi-β-D-(+)-Glucopiranososa y el 2-amino-2-desoxi-β-D-Glucopiranososa.

Durante los últimos años se han empleado diferentes métodos tales como; espectroscopia FTIR, Espectroscopia H-NMR, titulación potenciométrica, espectroscopia-UV, espectroscopia-CD, titulación coloidal y métodos enzimáticos (de Alvarenga, et al., 2010).

A pesar de los distintos métodos reportados, el método más referenciado es la correlación desde el espectro infrarrojo de las bandas de vibración, el cual representa las unidades N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades que tiene el biopolímero, considerándose así una medida de pureza. (Barragán, et.al, 2016)

Para obtener el porcentaje de desacetilación se utiliza como referencia el espectro de infrarrojo, tomando en cuenta el área de las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales amina III y CH<sub>2</sub> (Knidri et.al, 2016), relacionándose a través de la siguiente ecuación [1]:

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.0313 DA \quad (1)$$

Donde

DA= Grado acetilación (%)

Grado de desacetilación= 100-DA

A<sub>1320</sub>= Área bajo la curva de la banda de absorción en el número de onda 1320 cm<sup>-1</sup>

A<sub>1420</sub>= Área bajo la curva de la banda de absorción en el número de onda 1420 cm<sup>-1</sup>

### *Peso molecular*

Para la determinación del peso molecular de los polímeros, existen varios métodos como; viscosimetría, osonometría de membrana, cromatografía de exclusión molecular SEC y dispersión de luz (Márquez 2019).

La viscosimetría capilar es un método simple que se puede aplicar debido a su bajo costo, practicidad y utilidad. Según de la Paz y colaboradores (2013) utilizando la ecuación de Mark–Houwink–Khun-Sakurada se puede determinar la relación entre la viscosidad intrínseca y la masa molecular relativa del polímero, a partir de la siguiente ecuación [2]:

$$[\eta] = kM^a \quad (2)$$

Donde  $k$  y  $a$  son dos constantes empíricas que dependen del sistema de disolvente–polímero.

#### **1.2.2. Actividad antifúngica del quitosano.**

El quitosano es el único polisacárido natural con carga positiva, lo que le confiere características especiales que lo hacen útil en numerosas aplicaciones, como su actividad antifúngica la cual se ha estudiado tanto in vitro como in vivo, esta depende principalmente de su peso molecular, grado de desacetilación, y concentración. El quitosano inhibe a la mayoría de los hongos, exceptuado o siendo menos efectivo en aquellos que lo presenten en su pared celular.

El mecanismo de acción antifúngico del quitosano se da por la inhibición de esporas e hifas, aunque este no está totalmente esclarecido, dentro de los mecanismos propuestos, investigadores coinciden que posee tres posibles acciones.

Una de las principales hipótesis del mecanismo de acción del quitosano sobre hongos asume la interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los componentes fosfolípidos cargados negativamente, mediante atracciones electrostáticas. Lo anterior cambia la permeabilidad de la membrana plasmática, causando a su vez la filtración del contenido celular, lo que conlleva a la muerte celular. (Mejía, et al., 2018)

Otro mecanismo propuesto indica que los oligómeros de quitosano ingresan en el interior de las hifas, impidiendo el desarrollo de estas, ya que inhiben la síntesis de algunas enzimas

presentes en los hongos, además de ocasionar la desorganización del citoplasma y la pérdida del contenido extracelular en las esporas.

Finalmente, el tercer mecanismo descrito por Rodríguez y colaboradores (2021) propone que el quitosano se puede comportar como agente quelante que une, selectivamente, a trazas de metales y, por consiguiente, inhibe la producción de toxinas y el crecimiento micelial.

### **1.3. Nanotecnología**

La idea fue presentada por primera vez en 1959 por Richard Feynman en una charla en el Instituto de Tecnología de California. En su discurso, analizó las posibilidades de construir máquinas con la ayuda de materiales con dimensiones atómicas y moleculares. (James, 2018)

La Real Academia de Ingeniería define nanotecnología como el diseño, caracterización, producción y uso de estructuras, dispositivos y sistemas, mediante el control de la forma y tamaño a escalas nanométricas.

La nanotecnología agrícola ha adquirido un gran interés en los últimos años, ya que puede transformar sectores de la agricultura proporcionando herramientas novedosas para la detección molecular de estrés biótico y abiótico, así como para la detección rápida de enfermedades fitopatógenas y el mejoramiento en la capacidad de las plantas para absorber el agua, los nutrientes y los pesticidas. (Lira, et al., 2018)

Según Lateef y colaboradores (2016) se han mostrado avances de la nanotecnología en la agricultura como encapsulamiento de ingredientes activos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas y nutrientes, utilizando nanomateriales como los nanosensores, nanoemulsiones, nanofibras, nanopartículas, entre otros.

#### **1.3.1. Nanopartículas**

Las nanopartículas tienen un rango de tamaño de 1 a 100 nm. La morfología de las nanopartículas puede ser muy variada y depende de su proceso de producción. Se han encontrado nanopartículas con forma de esferas, cubos, tetraedros, decaedros, hojuelas, entre otros. (Ávila, 2010)

Las nanopartículas se agrupan en orgánicas e inorgánicas. Las nanopartículas inorgánicas están formadas por materiales inertes y metales, mientras que las nanopartículas orgánicas se constituyen de materiales como polímeros, bicapas lipídicas, etc.

Según Caro-León et al., (2019) estas se producen generalmente por estrategias denominadas de construcción (bottom-up), donde el ensamblado polimérico es promovido por distintas interacciones moleculares, también se puede mediante deconstrucción (top-down) basado en la fragmentación de estructuras macroscópicas.

La síntesis de las nanopartículas expone sus propiedades únicas, lo que puede llevar a distintas aplicaciones.

### **1.3.2. Nanopartículas del quitosano**

Las nanopartículas de quitosano fueron descritas por primera vez en 1994 por Ohya y colaboradores, la utilizaron para la administración intravenosa del fármaco contra el cáncer 5-fluorouracilo. (Dyvia & Jisha, 2018)

Prometen ser biocompatibles, no tóxicas y biodegradables, Debido a sus características tienen numerosas aplicaciones en distintas áreas (Malmiri, et al.,2012), tales como, detección de cáncer, administración de drogas, soporte de inmovilización de enzimas, agente antioxidante, encapsulación de compuestos biológicamente activos, tratamiento de aguas, agente antimicrobiano y antifúngico, así como, en la agricultura.

Existen diversos métodos que se emplean para la síntesis de nanopartículas de quitosano, tales como, gelificación ionotrópica, método de microemulsión, emulsificación, método de difusión de solvente, método micelar inverso, desolvatación, sonicación, entre otros.

### **1.3.3 Ultrasonido**

A la aplicación del ultrasonido en la química se le conoce como sonoquímica. En este método, las vibraciones ultrasónicas generadas provocan la compresión y relajación del líquido de manera alternativa ocasionando la aparición de microburbujas de vapor. Estas se expanden en la etapa de descompresión e implosionan violentamente durante la compresión generando millones de ondas de choque (Mănoiu,2010), provocando temperaturas y presiones extremas dentro de las cavidades, a su vez se descomponen las moléculas de solvente y soluto que se encuentran dentro de la cavidad al momento de la implosión. Esta descomposición de

moléculas genera radicales altamente reactivos que participan a su vez en otras reacciones tanto de síntesis orgánica como inorgánica, empleándose en la síntesis de una gran variedad de nanopartículas. (Alvarado,2014).

#### **1.3.4. Estado del arte.**

Las nanopartículas de quitosano han sido utilizadas en la agricultura como agente antifúngico, ya que estas son capaces de control e incluso erradicar distintos patógenos que atacan a las plantas. En los últimos años se han reportado diversos estudios donde las ChNP han tenido efectos beneficiosos, aplicadas individualmente o en combinación con fungicidas naturales.

Constantini y colaboradores (2018), elaboraron nanopartículas de quitosano con extracto de arándano y evaluaron su efecto *in vitro* contra el patógeno *Colletotrichum fragariae* e *in situ* con fresas congeladas a 5 °C. En el control *in vitro* se observó una alta eficiencia en la inhibición de crecimiento a la concentración de 75 µl/mL, mientras que *in situ* no tuvieron efecto inhibitorio.

Ramírez (2019), investigó la efectividad de las nanopartículas de quitosano con timol en la inhibición frente al micelio de *Botrytis cinerea* presente en distintas plantas. Las nanopartículas fueron mezcladas con PDA a concentraciones de 10, 25 y 50 % v/v e incubadas durante 5 días a 25°C. Se observó que el efecto antifúngico dependía de la concentración. El mayor éxito de la inhibición del patógeno se obtuvo en las disoluciones de 25 y 50 %.

Ávila (2019), estudió el efecto inhibitorio de nanopartículas de quitosano con tripolifosfato y polietilenglicol contra el patógeno *Fusarium solani* presente en el tomate chonto. Se realizó una prueba *in vitro* con el tratamiento y se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión con el fin de observar cómo se afectan las estructuras celulares del hongo debido a la exposición. Las nanopartículas contenían 2mg/mL de quitosano, 1mg/mL de TPP y 50mg/mL de PEG. Los resultados mostraron la interacción de las nanopartículas con el patógeno a nivel de la pared celular y la membrana plasmática, donde se afecta la estructura de estas; por tanto, estas tuvieron un efecto antifúngico.

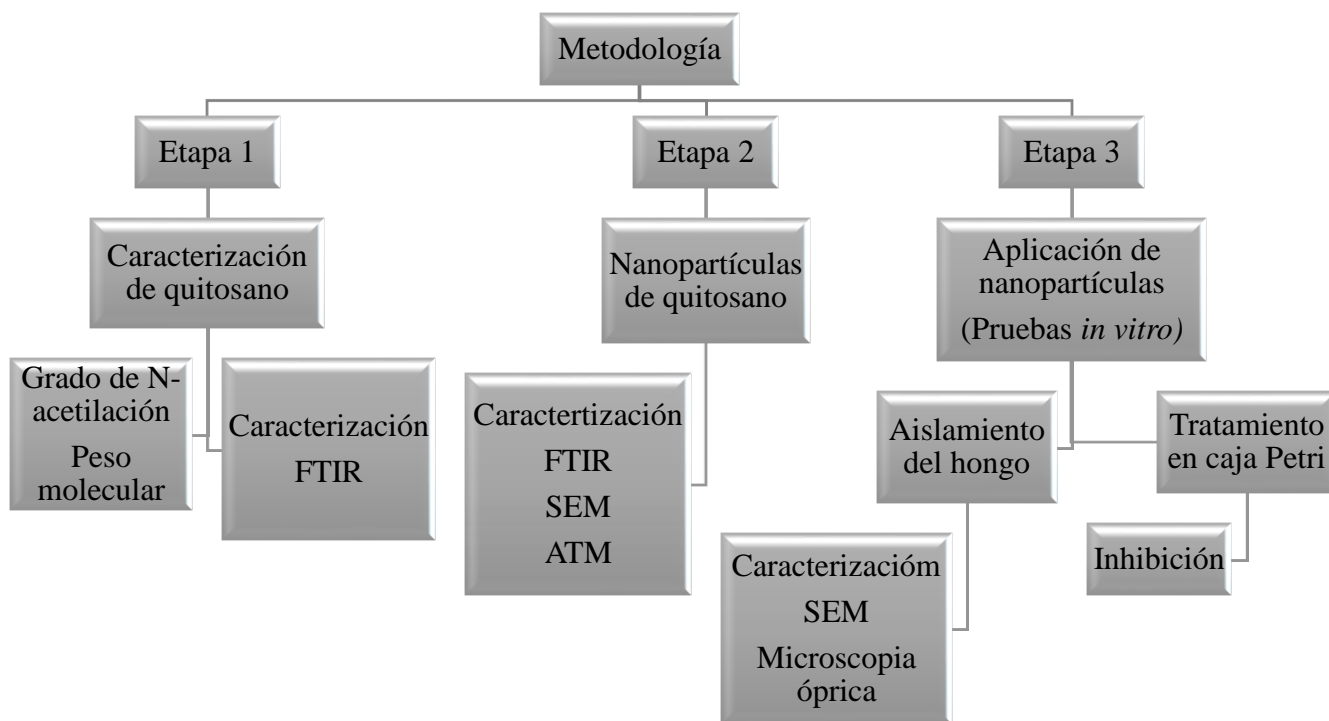
Wook et al (2019) estudiaron el efecto inhibitorio de las nanopartículas de quitosano contra los patógenos *Colletotrichum gelosporidies*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi* presente en tomate de manera *in vitro*. El ensayo se llevó a cabo en cajas Petri con soluciones de PDA con las ChNP a la concentración de 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, y 5.0 mg/mL, se incubaron con los distintos patógenos a 28°C durante 10 días. Las nanopartículas que mostraron ser fungicidas con todos los patógenos, fueron aquellas con concentración de 0.5 mg/mL.

Villegas (2019) desarrolló nanopartículas de quitosano con distintos aceites esenciales como el tomillo, la canela y el eucalipto para medir su actividad antifúngica en *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides* presentes en cultivos de maíz. Las ChNP con tomillo y eucalipto fueron las que demostraron tener inhibición tanto el crecimiento radial como en la germinación de ambos patógenos.

Lipsa y colaboradores (2020) evaluaron la actividad antifúngica de nanopartículas de quitosano con oro contra el hongo *Fusarium oxysporum* el cual es conocido como patógeno vegetal transmitido por el suelo, el cual daña principalmente los cultivos de tomate. El hongo fue cultivado en PDA, el cual contenía infusión de nanopartículas, las cuales tenían una concentración en un intervalo de 25 a 75 µl/mL y se administraron de 1 a 5 mL en las cajas Petri. Se realizó la medición del crecimiento micelial del patógeno después de 7 días, concluyendo que las nanopartículas presentaban una alta actividad fungicida, siendo la concentración de 5 mL la más efectiva.

## CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

La Figura 4 contiene un diagrama general sobre el proceso de obtención y caracterización de las nanopartículas de quitosano, y su aplicación *in vitro* contra el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.



**Figura 4.** Diagrama general de la metodología.

## **2.1. Quitosano**

Para la síntesis de nanopartículas, se utilizó quitosano grado alimenticio obtenido en el Laboratorio de Materiales de la FIQ BUAP, siguiendo la metodología de Hernández y colaboradores (2009).

## **2.2. Caracterización de quitosano**

### **2.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)**

El espectro de infrarrojo se obtuvo en un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca VERTEX 70 con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). Se utilizó aproximadamente 0.05 g de muestra seca y fue colocada en el cristal ATR directamente. El espectro se realizó en la región de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda con 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución.

### **2.2.2. Grado de desacetilación**

Para obtener el grado de desacetilación del quitosano se tomó como referencia el espectro de infrarrojo con transformada de Fourier obtenido, se obtuvo el área de las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales amina III (1420  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $\text{CH}_2$  (1320  $\text{cm}^{-1}$ ), utilizándose así en la ecuación número 1 mencionada anteriormente.

### **2.2.3. Peso molecular**

El peso molecular del quitosano (promedio en viscosidad) se determinó mediante viscosimetría capilar. Utilizando un viscosímetro tipo Ubbelohde a una temperatura de 25 °C. Las muestras de quitosano se prepararon por disolución en una solución buffer de ácido acético (0.3 M) /acetato de sodio (0.2 M). Se procedió a determinar el tiempo de caída de la disolución polimérica quitosano / buffer, Figura 5, para hallar la viscosidad. La viscosidad intrínseca se determinó utilizando la ecuación número dos.



**Figura 5.** Medición de viscosidad específica del quitosano.

Los parámetros establecidos de acuerdo con la literatura son  $k= 7.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$  y  $a=0.76$ .

### **2.3. Obtención de nanopartículas de quitosano.**

Para obtener las nanopartículas de quitosano se siguió la metodología descrito por Berthold, et, al (1996) con algunas modificaciones. El quitosano se disolvió a una concentración de 0.25%, 0.5% y 1% (w/v) en una solución con ácido acético glacial 2% (v/v) y una solución de Tween 20 1% (v/v) como se observa en la Figura 6. La formación de las partículas se logró tras la adición de 3,5 mL de solución de sulfato de sodio 10% (w/v)) a 200 mL de la solución de quitosano, la cual estaba en contante sonicación. La adición se realizó a una velocidad de 1mL/min.



**Figura 6.** Soluciones de quitosano/Tween 20/  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

La sonicación se mantuvo durante 2 horas a temperatura ambiente, en un baño ultrasónico marca Auto Science, modelo AS5150B, con una frecuencia de operación de 20 kHz. Figura 7.



**Figura 7.** Baño ultrasónico.

Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min y el sobrenadante se descarta. Las partículas se suspendieron en agua destilada, Figura 8, y se sometieron a centrifugación nuevamente a 3500 rpm durante 30 min.



**Figura 8.** Solución de ChNP después de centrifugación.

Finalmente, las partículas se suspendieron en 150 mL de agua destilada y se dejaron a temperatura ambiente. Figura 9.



**Figura 9.** Solución ChNP/agua destilada.

## **2.4. Caracterización de nanopartículas de quitosano.**

### **2.4.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)**

El espectro de infrarrojo fue obtenido en un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca VERTEX 70 con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). Se colocó la muestra de nanopartículas de quitosano en el cristal ATR directamente. El espectro se obtuvo en la región de  $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  de número de onda con  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolución.

#### **2.4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido se utilizó para estudiar la morfología superficial de las nanopartículas de quitosano. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-6610LV. Las muestras fueron recubiertas de oro en un pulverizador catódico marca Denton Vacuum, modelo DEESK V. El campo magnético del microscopio permitió enfocar los rayos catódicos y se obtuvo una imagen.

#### **2.4.3. Microscopia de fuerza atómica (AFM)**

Para determinar el tamaño de las nanopartículas de quitosano se utilizó un microscopio de fuerza atómica. El modelo del microscopio es JEOL JSPM-5200. Se colocó una gota de la solución de ChNP en una placa de sílice y se dejó secar a temperatura ambiente, para su posterior análisis.

#### **2.5. Aislamiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.**

La toma de muestra de material infectado con *Colletotrichum gloeosporioides* fueron frutos de mango Ataulfo, recolectados de una huerta ubicada en el municipio de Tecpán de Galeana, en el estado de Guerrero, en madurez fisiológica con síntomas de antracnosis. (Figura 10).



**Figura 10.** Mango Ataulfo con síntomas de antracnosis.

Se utilizó el método de siembra de tejido enfermo descrito por Lemes y colaboradores (2014) del total de las muestras de mangos enfermos se seleccionaron los tejidos más dañados de cada muestra, con ayuda de una navaja previamente esterilizada, se cortaron pequeños

fragmentos de tejido enfermo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, posteriormente, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, transcurrido este tiempo se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente estéril durante 3 minutos. El material se llevó a la campana de flujo laminar, Figura 11, y se colocó el tejido en cajas Petri con medio de cultivo PDA, Se replicó el procedimiento en 5 placas de Petri con PDA, al finalizar las cajas se sellaron, rotularon y se incubaron a 25 °C ± 3, durante 5 días. Una vez observado el crecimiento micelial en las placas, el hongo se volvió a aislar en PDA fresco para obtener cultivos puros.

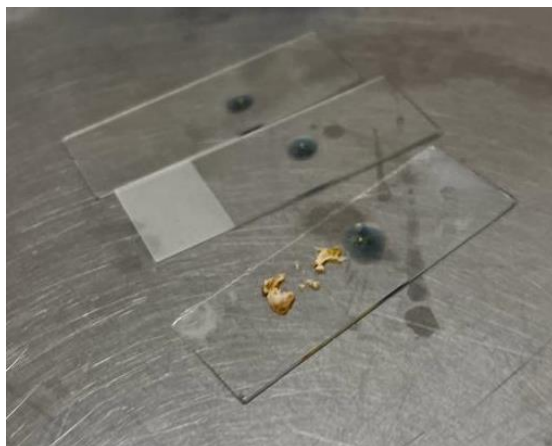


**Figura 11.** Campana de flujo laminar.

## **2.6. Caracterización de *Colletotrichum gloeosporioides*.**

### **2.6.1. Microscopia óptica.**

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se tomó una pequeña porción de los acérvulos presentes, y se colocó en un portaobjetos previamente con una gota de azul de lactofenol, Figura 12, se cubrió con el cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico marca Karl Zeiss modelo Scope A1.



**Figura 12.** Portaobjetos con hongo.

### **2.6.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).**

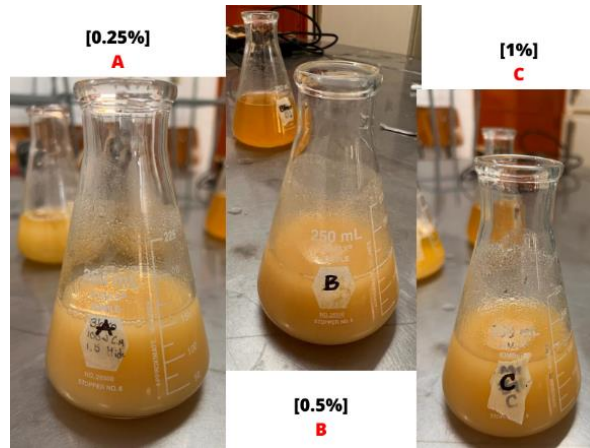
El microscopio electrónico de barrido se utilizó para estudiar la morfología superficial del hongo. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL USM-6610LV.

Se les dio un tratamiento previo a las muestras, cortando pedazos del inóculo previamente incubados y colocándolo en un desecador durante 24 horas. Las muestras fueron recubiertas de oro en un pulverizador catódico marca Denton Vacuum, modelo DEESK V.

## **2.7. Pruebas *in vitro*.**

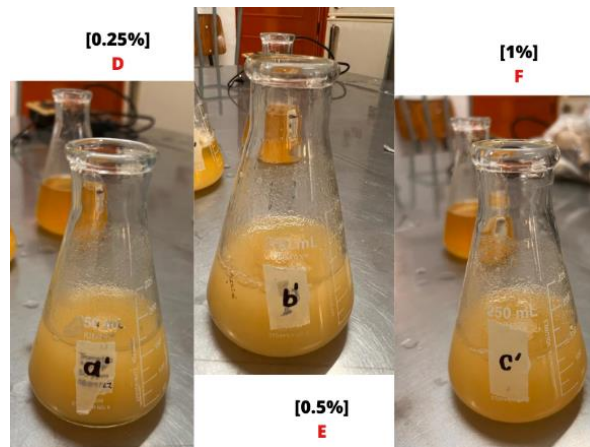
### **2.7.1. Preparación de soluciones.**

Se utilizó el método propuesto por Oh, et. al. (2019) con algunas modificaciones. Se implementaron dos variables, en primer lugar, se tomaron 150 mL de cada una de las soluciones de nanopartículas de quitosano a las concentraciones de 0.25%, 0.5% y 1% y se les agregó 5.9 gramos de agar papa dextrosa, posteriormente se pusieron en agitación constante. (Figura 13).



**Figura 13.** Soluciones ChNP/PDA.

Las siguientes soluciones se prepararon mezclando 100 mL de agua destilada con 50 mL de las soluciones de nanopartículas de quitosano a las concentraciones de 0.25%, 0.5% y 1%, posteriormente, se les añadió 3.9 g de agar papa dextrosa y se colocaron en agitación constante. (Figura 14). Se realizó una última solución, la cual consistió en 150 mL de agua destilada y 5.9 g de agar papa dextrosa.



**Figura 14.** Soluciones ChNP/PDA/Agua destilada.

Las siete soluciones se esterilizaron en una estufa de esterilización, Figura 15, durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y a una presión de 15 lb. Pasado el tiempo, las

soluciones se trasladaron a la campana de flujo laminar, donde se realizó el llenado de cajas Petri (Figura 16), las cuales se dejaron en la campana durante 48 horas. Se consideraron tres repeticiones para cada concentración de quitosano.



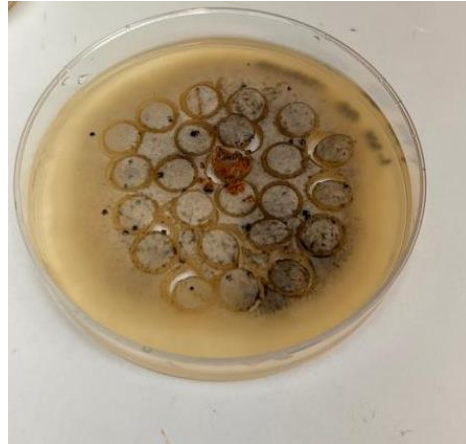
*Figura 15. Esterilización.*



*Figura 16. Llenado cajas Petri.*

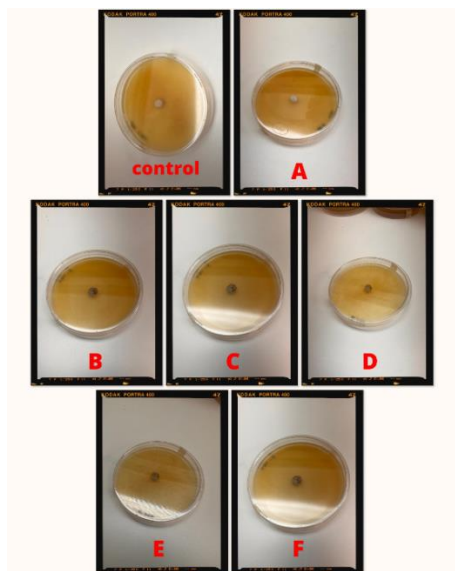
### 2.7.2. Inoculación del hongo.

Discos de agar PDA de 1 cm de diámetro con patógeno en crecimiento activo se cortaron con un tubo estéril en los cultivos. (Figura 17)



**Figura 17.** Discos de *Colletotrichum gloeosporioides*.

En cada una de las cajas Petri se colocó un disco de micelio del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* de 1 cm de diámetro, exactamente en el centro, como se observa en la Figura 18, donde A, B y C son los tratamientos a 0.25, 0.5 y 1% con PDA respectivamente, mientras que D, E y F son los tratamientos con concentraciones de 0.25, 0.5 y 1% con PDA disuelto en agua destilada. Las cajas Petri se incubaron a  $25 \pm 3$  °C durante 7 días. El tratamiento control consiste en cajas Petri con medio de cultivo sin quitosano.



**Figura 18.** Inoculación de hongo en los distintos tratamientos.

### **2.7.3. Pruebas de inhibición.**

#### *Crecimiento del micelio radial*

Se realizaron mediciones del crecimiento micelial con un acetato desde el día 3 hasta el día 7, estas mediciones se tomaron cada 24 horas, hasta que se registró que las placas de Petri control tuvieron un crecimiento completo.

Se restó el diámetro del disco sembrado y se determinó el Índice Antifúngico siguiendo la metodología propuesta por Arceo y colaboradores (2019), a través de la siguiente ecuación. [3]:

$$AI(\%) = (1 - [DC_{tratada}/DC_{control}]) * 100 \quad (3)$$

Donde:

$DC_{tratada}$  = Diámetro de las colonias en las cajas con tratamiento.

$DC_{control}$  = Diámetro de las colonias en las cajas del control.

#### *Velocidad del crecimiento del hongo*

Se determinó la velocidad del crecimiento del patógeno, a partir de la metodología propuesta por Rivero, et al., (2008) mediante la razón del crecimiento fúngico relativo (incremento del diámetro de la colonia en un intervalo de tiempo) sobre el intervalo de tiempo transcurrido.

#### *Análisis Estadístico.*

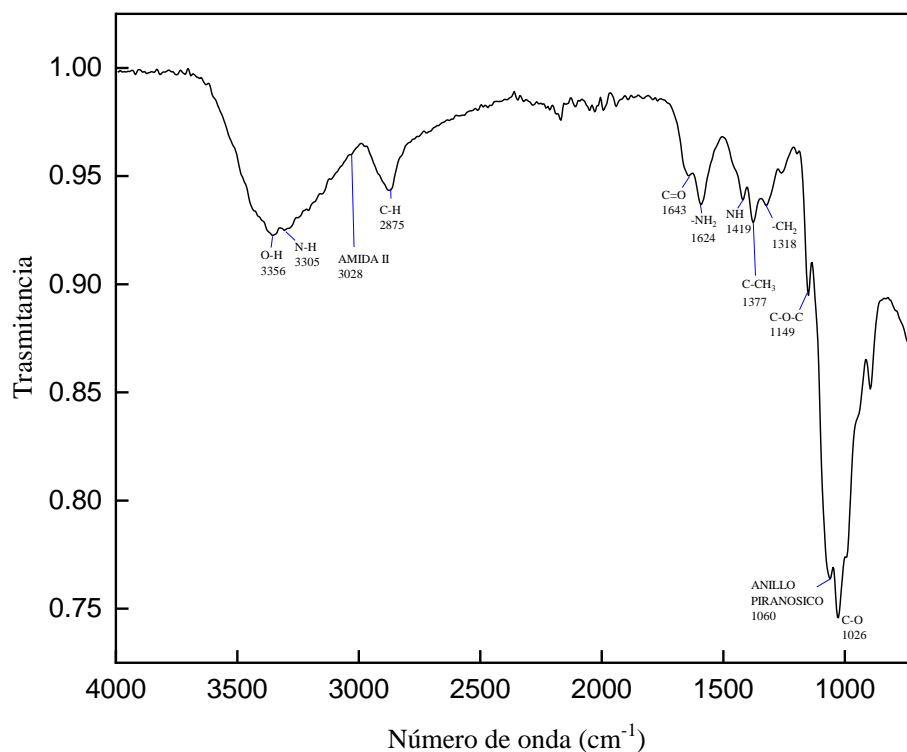
Se utilizó un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones. Los resultados del crecimiento micelial fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA. La velocidad de crecimiento se analizó mediante un ANOVA simple. Las medias se compararon mediante la Prueba Turkey ( $p < 0.05$ ). El programa estadístico utilizado fue Minitab.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Quitosano

#### 3.1.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

En la Figura 19, se muestra el espectro FTIR de la muestra de quitosano y en la Tabla 4 se presenta la asignación de las bandas de absorción. El espectro contiene las bandas de absorción características de quitosano reportadas en la literatura, (Barragán et al,2016). La banda de vibración que se ubica en  $3356\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del grupo -OH, así como el estiramiento del -NH en  $3305\text{ cm}^{-1}$ . El estiramiento simétrico del CH se encuentra en  $2875\text{ cm}^{-1}$ . También se observa la banda debido a la vibración de flexión del grupo amina NH-R (amida II) en  $3028\text{ cm}^{-1}$ ; la señal en  $1624\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del grupo amida NH<sub>2</sub>. La banda en  $1643\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace C=O con el grupo amida. En la huella dactilar nos encontramos la banda correspondiente al estiramiento asimétrico del puente C-O-C en  $1149\text{ cm}^{-1}$  y el estiramiento simétrico de C-CH<sub>3</sub> en  $1377\text{ cm}^{-1}$ . Encontramos la presencia del anillo piranósico correspondiente a la banda  $1060\text{ cm}^{-1}$ , así como la banda característica de C-O en  $1026\text{ cm}^{-1}$ . Se observa también las bandas correspondientes a los grupos NH y CH<sub>2</sub> en  $1419$  y  $1318\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 19.** FTIR de quitosano.

**Tabla 4.** Frecuencias de absorción características del quitosano del espectro FTIR.

Grupos funcionales	Banda de absorción [cm <sup>-1</sup> ]
OH	3356
NH	3305
CH	2875
NH-R	3028
NH <sub>2</sub>	1624
C=O	1643
C-OC	1149
C-CH <sub>3</sub>	1377
Anillo piranósico	1060

C-O	1026
NH, banda característica	1419
CH <sub>2</sub> , banda característica	1318

### 3.1.2. Grado de desacetilación.

El grado de desacetilación (GD) se muestra en la Tabla 5. Este parámetro se obtiene a partir del espectro de IR del quitosano, reportado en la Figura 19. Se utilizó la relación entre las bandas de absorción en 1419 cm<sup>-1</sup> y 1318 cm<sup>-1</sup>, que corresponden a los grupos funcionales NH y CH<sub>2</sub>, respectivamente; la relación A<sub>1419</sub>/A<sub>1318</sub> presenta el error más bajo.

**Tabla 5.** *Grado de desacetilación del quitosano.*

<b>Grado de desacetilación [%]</b>	<b>78</b>
------------------------------------	-----------

### 3.1.3. Peso molecular promedio en viscosidad.

A partir de las disoluciones de quitosano a distintas concentraciones con la solución buffer de ácido acético (0.3M) /acetato de sodio (0.2M), se toman los tiempos de caída tal cual se muestra en la Tabla 6. Estos tiempos son el promedio de cinco mediciones.

**Tabla 6.** *Tiempos de caída de disolución a cada concentración de quitosano.*

Concentración [g/ml]	t1 [min]	t2 [min]	t3 [min]	t4 [min]	t5 [min]	Promedio t [min]
0.08	12.58	12.52	12.49	12.1	12.14	12.366
0.12	12.53	12.88	12.97	12.53	12.82	12.746
0.16	13.24	13.34	13.1	13.08	13.13	13.178
0.2	13.51	13.79	13.64	13.34	14.29	13.714

Posteriormente, se procede a calcular la viscosidad específica a partir de la siguiente ecuación [4]:

$$\eta_{esp} = \frac{t-t_0}{t_0} \quad (4)$$

En la Tabla 7, podemos observar el valor de la viscosidad específica para cada concentración.

**Tabla 7.** *Viscosidad específica a cada concentración de quitosano.*

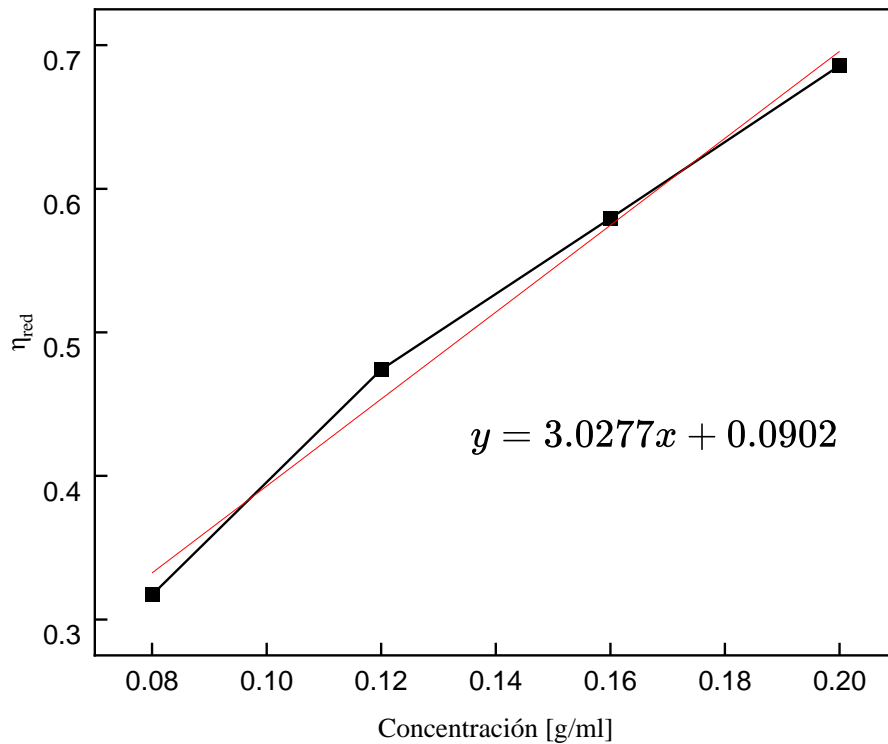
Concentración [g/ml]	t [min]	$\eta_{esp}$
0.08	12.366	0.025
0.12	12.746	0.057
0.16	13.178	0.093
0.2	13.714	0.137

La viscosidad reducida es la relación de la viscosidad específica entre la concentración, la Tabla 8 nos muestra los valores obtenidos.

**Tabla 8.** *Viscosidad reducida cada concentración de quitosano.*

Concentración [g/ml]	t [min]	$\eta_{esp}$	$\eta_{red}$
0.08	12.366	0.025	0.317
0.12	12.746	0.057	0.474
0.16	13.178	0.093	0.579
0.2	13.714	0.137	0.686

La viscosidad intrínseca el valor de la viscosidad reducida extrapolada a concentración cero. Se grafica la viscosidad reducida en función de la concentración.



**Figura 20.** Viscosidad reducida en función de la concentración.

Al aplicar una regresión lineal por mínimos cuadrados, se obtiene una ecuación de la recta, donde la ordenada al origen es el valor de la viscosidad intrínseca  $[\eta]=0.0902$ , el cual se utiliza en la ecuación de Mark–Houwink–Khun-Sakurada.

En la tabla 9, se muestra el resultado del peso molecular promedio viscoso del quitosano, según la clasificación de Zhang et al (2019) se considera de medio peso molecular.

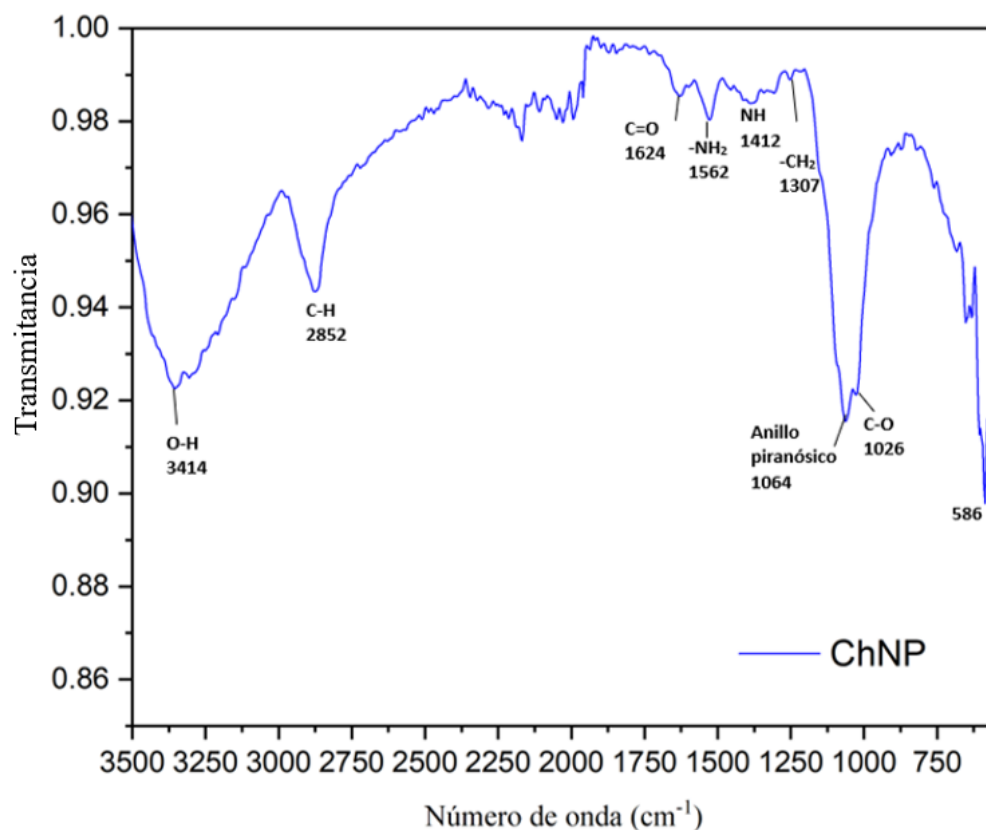
**Tabla 9.** *Peso molecular promedio viscoso del quitosano.*

<b>Peso molecular promedio [kDa]</b>	<b>553.53</b>
<b>Clasificación</b>	Medio

## 3.2. Nanopartículas de quitosano.

### 3.2.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

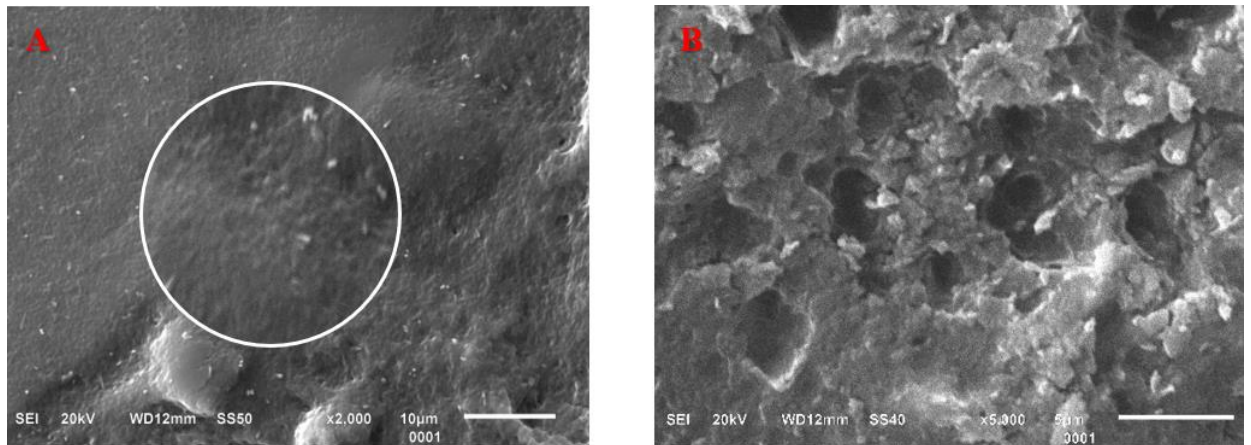
La estructura química de las muestras se evaluó mediante espectroscopía FTIR, como se muestra en la Figura 21. El espectro de las nanopartículas contiene las bandas de absorción características de quitosano, confirmando su origen. La banda de vibración que se ubica en  $3414\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del grupo  $-\text{OH}$ . El estiramiento simétrico del  $\text{CH}$  se encuentra en  $2852\text{ cm}^{-1}$ . La señal en  $1562\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del grupo  $\text{NH}_2$ , la banda en  $1624\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace  $\text{C}=\text{O}$  con el grupo amida. En la huella dactilar nos encontramos las bandas correspondientes a los grupos  $\text{NH}$  y  $\text{CH}_2$  en  $1412$  y  $1307\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Encontramos la presencia del anillo piranosico correspondiente a la banda  $1064\text{ cm}^{-1}$ , así como la banda característica de  $\text{C}-\text{O}$  en  $1026\text{ cm}^{-1}$ . Se muestra una nueva banda en  $586\text{ cm}^{-1}$  la cual se presenta debido a la interacción del quitosano con el Tween 20.



*Figura 21.* FTIR de nanopartículas de quitosano.

### 3.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).

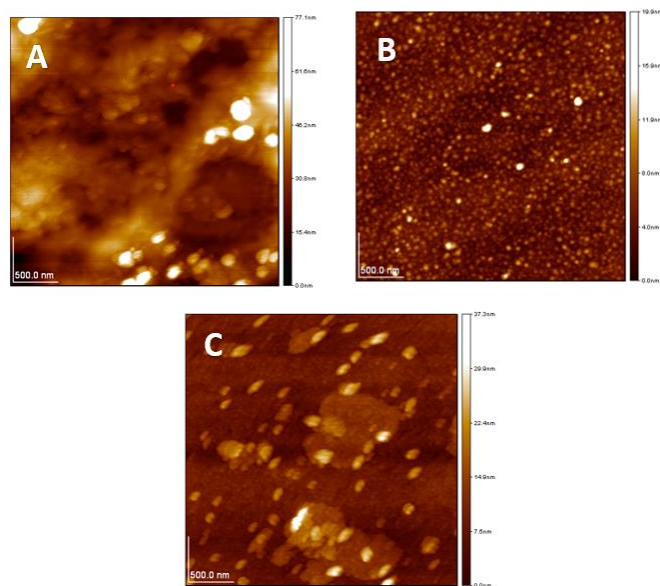
La estructura morfológica de la superficie de las nanopartículas de quitosano fue examinada más a fondo por SEM. Estas imágenes revelaron la morfología superficial, el tamaño y la forma de las nanopartículas derivadas del quitosano (Figura 22). La imagen muestra una superficie lisa con un tamaño de partícula a escala nanométrica en un tamaño promedio de 50-70 nm. Las nanopartículas tienen forma cilíndrica y distribuidas de manera homogénea. Otros estudios confirman la misma morfología, Wook y colaboradores (2019) expusieron nanopartículas de quitosano cilíndricas sintetizadas mediante gelificación iónica; en un estudio sobre nanopartículas de quitosano obtenidas a partir de una solución de tripolifosfato y quitosano Vaezifar et al., (2013) presentaron una morfología redonda con distribución homogénea.



**Figura 22.** Imágenes SEM de las ChNP en aumento de 2000x (A) y 5000x (B)

### 3.2.3. Microscopia de fuerza atómica (AFM).

En la Figura 23 se presenta la imagen AFM de las nanopartículas de quitosano. La morfología es prácticamente cilíndrica y homogénea. Las nanopartículas de quitosano tienen un tamaño promedio de 50 a 60 nm en las distintas concentraciones.



**Figura 23.** Imágenes AFM de las ChNP, a la concentración 0.25% (A), 0.5% (B) Y 1% (C)

### 3.3. Identificación del patógeno.

Tradicionalmente, el género *Colletotrichum* se ha identificado mediante caracteres morfológicos que incluyen: tamaño y forma de conidios, y apresorio; así como características culturales como por ejemplo color de la colonia, textura y tasa de crecimiento.

El aislamiento del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* asociado con los frutos con antracnosis se caracterizó por la formación de colonias con crecimiento micelial de forma radial, de coloración blanco con gris oliváceo, con masa conidial de color salmón en el centro de la colonia (Figura 24). De acuerdo con Rojo, et, al. (2017) el color de las colonias del patógeno en PDA es parecido a lo obtenido (gris con masas conidiales color anaranjado). Otros estudios confirman el patrón de crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en PDA: Domínguez et al., (2012) reportan un crecimiento radial o en círculos concéntricos del patógeno aislado de palma aceitera; Llivicura (2018) observó *in vitro* que los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de frutos de tomate presentaron crecimiento radial y de igual manera una coloración blanca con masas conidiales anaranjadas.



**Figura 24.** Imagen de la morfología de *C. gloeosporioides* in vitro en medio agar PDA a 25°C.

### **3.3.1. Microscopia óptica.**

Para realizar identificación de conidios por microscopía se tomó una pequeña muestra con una espátula micológica esterilizada y se posicionó en un portaobjetos con dos gotas de azul de lactofenol y se observó bajo un aumento de 40x.

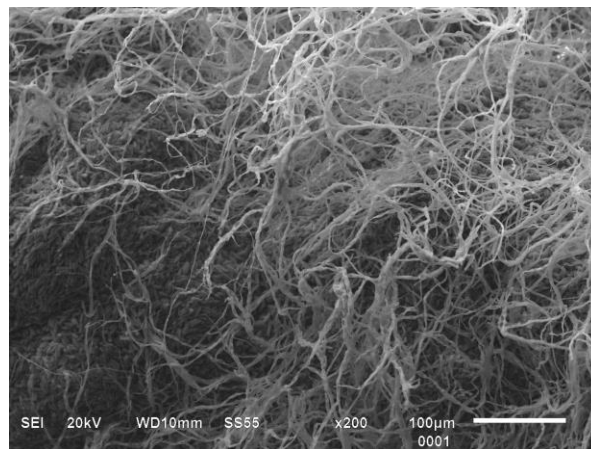
En la morfología microscópica (Figura 25) observamos los conidios características de *Colletotrichum gloeosporioides*, se estableció la morfología dentro de las tres categorías que tiene este género (Contreras,2006) como cilíndricas con lados rectos y extremos redondos en ambos lados. Por esta razón se utilizó una de las réplicas de esta colonia para las pruebas antifúngicas correspondientes con la metodología de este proyecto.



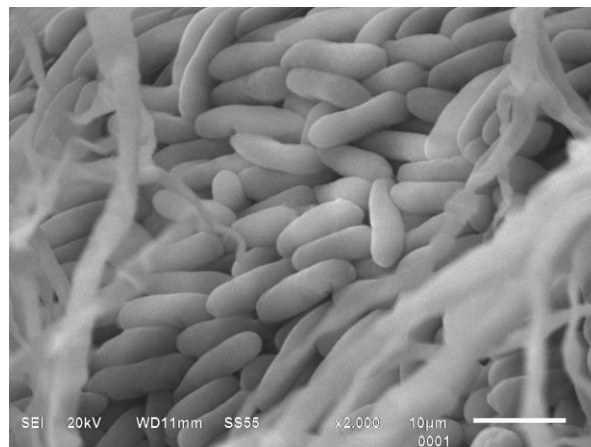
**Figura 25.** Morfología colonial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

### 3.3.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).

Las micrografías del patógeno se muestran a continuación, en la Figura 26 se observó micelio con aspecto sano y sin afectaciones. La Figura 27 muestra una capa conidial regular y lisa mostrando regularidad, suavidad e integridad. Otros reportes en la literatura confirman la morfología señalada con anterioridad: Kim y colaboradores (2006) exponen conidios fúngicos de *Colletotrichum gloeosporioides* de forma cilíndrica, con suavidad y regularidad; Ayón et al., (2022) reportan micrografías SEM del patógeno aislado de papaya con antracnosis, las hifas son de forma alargada.



**Figura 26.** Micrografía SEM de *Colletotrichum gloeosporioides*.



**Figura 27.** Micrografía SEM de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*

### 3.4. Pruebas *in vitro*

Se registró la inhibición de las nanopartículas de quitosano a las distintas concentraciones, todos los cultivos probados mostraron un claro efecto significativo en comparación con el tratamiento de control (X), los cuales tuvieron su máximo crecimiento al día 7 de incubación (Figura 28-33).



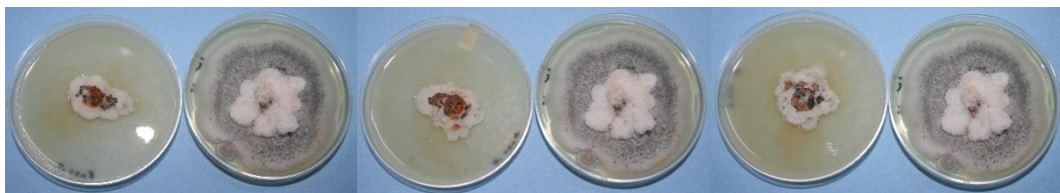
**Figura 28.** Actividad antifúngica de Prueba A (0.25% ChNP/PDA), en el día 7.



**Figura 29.** Actividad antifúngica de Prueba B (0.5% ChNP/PDA), en el día 7.



**Figura 30.** Actividad antifúngica de Prueba C (1% ChNP/PDA), en el día 7.



**Figura 31.** Actividad antifúngica de Prueba D (0.25 % ChNP/PDA-H<sub>2</sub>O), en el día 7.



**Figura 32.** Actividad antifúngica de Prueba E (0.5% ChNP/PDA-H<sub>2</sub>O), en el día 7.



**Figura 33.** Actividad antifúngica de Prueba F (1% ChNP/PDA-H<sub>2</sub>O), en el día 7.

#### 3.4.1. Crecimiento del micelio radial

En todos los tratamientos se obtuvo una reducción del crecimiento micelial del patógeno con respecto al control el cual tuvo un crecimiento de 7 cm al séptimo día incubación (Tabla 10). El efecto inhibitorio de las nanopartículas de quitosano, tanto en PDA como en la disolución de PDA con agua destilada, se alcanza en un porcentaje mayor a 50 en todas las disoluciones. Las soluciones de nanopartículas de quitosano a las tres concentraciones (0.25,0.5 y 1%) en PDA fueron las que tuvieron mayor efecto antifúngico, las concentraciones de 0.25% y 1% no difirieron entre si a partir del quinto día, solo inhiben el 78 y 83% del crecimiento del control respectivamente.

El menor crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides* se presentó a la concentración de 0.5% (0.55 mm) se obtuvo un porcentaje de inhibición del 97%.

Por otra parte, los tratamientos D, E y F los cuales refieren a las soluciones de nanopartículas de quitosano con PDA diluido en concentración 0.25,0.5 y 1% alcanzaron 84,86 y 69 % de control sobre el crecimiento del micelio respectivamente.

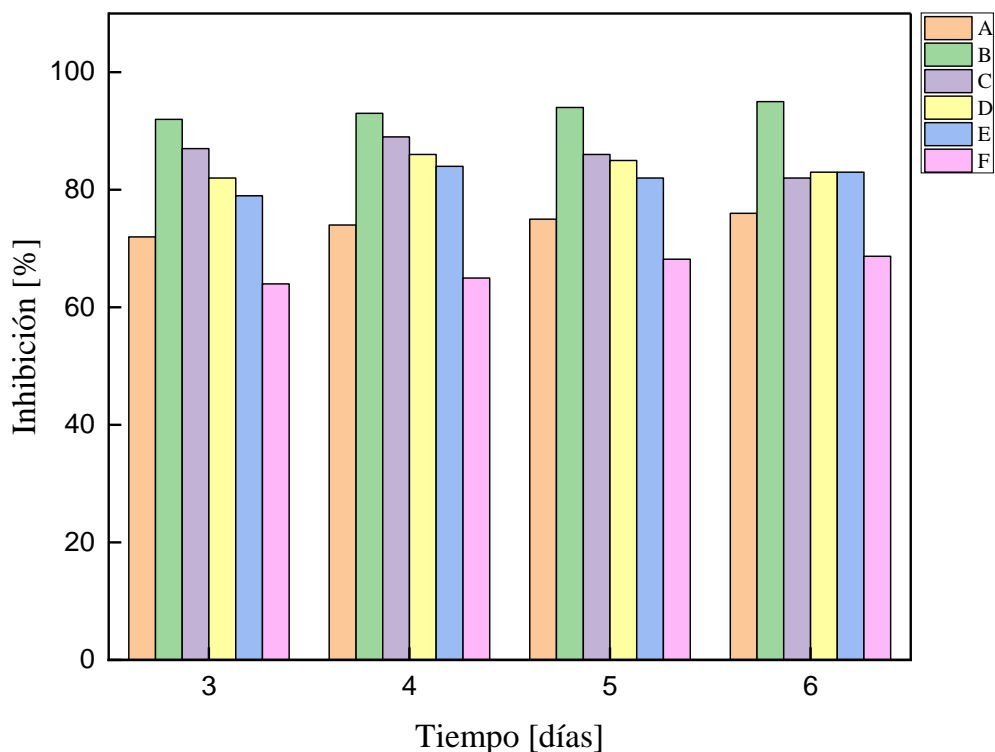
**Tabla 10.** Efecto de los distintos tratamientos de ChNP sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporoides*.

Tratamientos	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial por día				
	3	4	5	6	7
<b>Control</b>	0	0	0	0	0
<b>A</b> 0.25% ChNP/PDA	72 <sup>c</sup>	74 <sup>c</sup>	75 <sup>c</sup>	76 <sup>c</sup>	78 <sup>c</sup>
<b>B</b> 0.5% ChNP/PDA	92 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
<b>C</b> 1% ChNP/PDA	82 <sup>b</sup>	83 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>	87 <sup>b</sup>	89 <sup>b</sup>
<b>D</b> 0.25% ChNP/PDA- H <sub>2</sub> O	82 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	83 <sup>b</sup>	84 <sup>b</sup>
<b>E</b> 0.5% ChNP/PDA- H <sub>2</sub> O	79 <sup>b</sup>	81 <sup>b</sup>	82 <sup>b</sup>	83 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>
<b>F</b> 1% ChNP/PDA- H <sub>2</sub> O	64 <sup>d</sup>	65 <sup>d</sup>	68.2 <sup>d</sup>	68.7 <sup>d</sup>	69 <sup>d</sup>

Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p<0.05)

Como se observa en la Figura 34, se evidencia una diferencia en algunos de los tratamientos tanto intermedio como finales con respecto al control, siendo la concentración del 0.5% la que tiene mayor efecto inhibitorio tanto en solución con PDA, como en PDA diluido.

Aunque en algunos tratamientos hubo una ligera reducción del porcentaje de la inhibición final, todos mostraron la potencialidad de inhibir el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporoides*.



**Figura 34.** Actividad antifúngica de nanopartículas de quitosano después de 7 días de incubación.

#### 6.4.2. Velocidad del crecimiento del hongo

De forma general las velocidades de crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides* en los tratamientos de nanopartículas de quitosano, para cada día, son menores que el tratamiento control (Tabla 11).

El tratamiento F alcanzó la mitad del crecimiento micelial del hongo en el control, los tratamientos D y E alcanzaron la tercera parte del crecimiento sobre el control al igual que el tratamiento C. El tratamiento A logró la cuarta parte del crecimiento micelial respecto al control. Por último, el tratamiento B, tuvo el mayor efecto inhibitorio, alcanzando la quinta parte de la velocidad del crecimiento del hongo en el control. La cinética de crecimiento de patógeno *Colletotrichum gloeosporoides* varió de acuerdo con la concentración aplicada, se

obtuvo una respuesta diferente dependiendo la solución en la que se administraban. Cuando las nanopartículas de quitosano se diluyeron en la solución de PDA con agua destilada el patógeno mostro menor susceptibilidad ante la aplicación, al presentar un mayor valor de la velocidad, debido a la disminución del posible efecto inhibitorio.

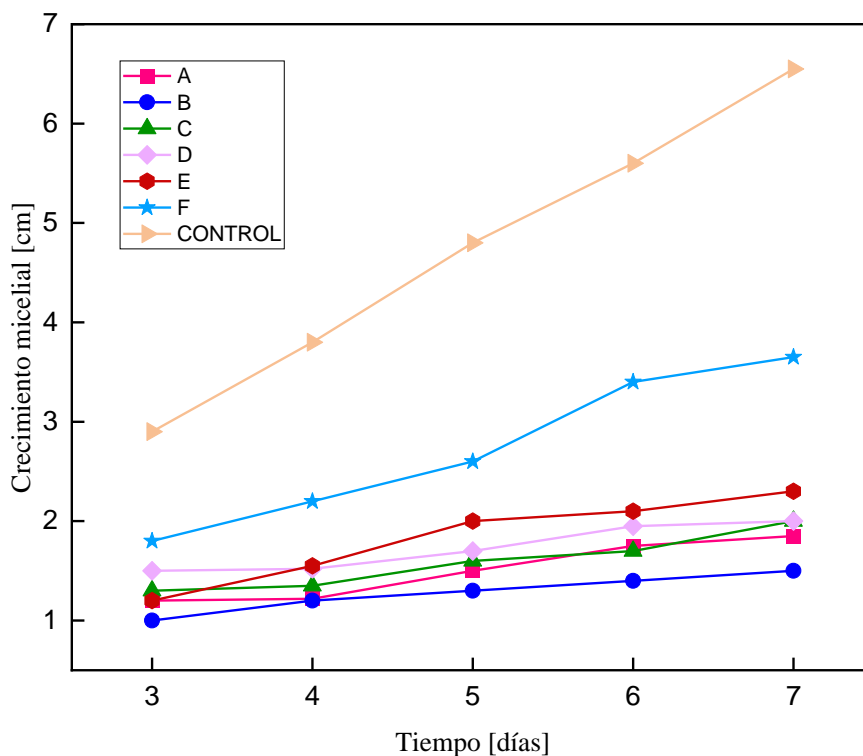
**Tabla 11.** *Velocidad de crecimiento de Colletotrichum gloeosporoides frente a los distintos tratamientos de ChNP.*

Tratamientos	Velocidad de crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> (cm/h)				
	3	4	5	6	7
<b>CONTROL</b>	0.040 <sup>a</sup>	0.039 <sup>a</sup>	0.040 <sup>a</sup>	0.039 <sup>a</sup>	0.038 <sup>a</sup>
<b>A</b> 0.25% CHNP/PDA	0.016 <sup>bc</sup>	0.0125 <sup>bc</sup>	0.0125 <sup>bc</sup>	0.012 <sup>bc</sup>	0.01 <sup>bc</sup>
<b>B</b> 0.5% CHNP/PDA	0.013 <sup>c</sup>	0.0125 <sup>c</sup>	0.01 <sup>c</sup>	0.009 <sup>c</sup>	0.008 <sup>c</sup>
<b>C</b> 1% CHNP/PDA	0.018 <sup>bc</sup>	0.014 <sup>bc</sup>	0.013 <sup>bc</sup>	0.011 <sup>bc</sup>	0.012 <sup>bc</sup>
<b>D</b> 0.25% CHNP/PDA- H <sub>2</sub> O	0.020 <sup>bc</sup>	0.015 <sup>bc</sup>	0.014 <sup>bc</sup>	0.013 <sup>bc</sup>	0.012 <sup>bc</sup>
<b>E</b> 0.5% CHNP/PDA- H <sub>2</sub> O	0.016 <sup>bc</sup>	0.016 <sup>bc</sup>	0.017 <sup>bc</sup>	0.015 <sup>bc</sup>	0.014 <sup>bc</sup>
<b>F</b> 1% CHNP/PDA- H <sub>2</sub> O	0.026 <sup>b</sup>	0.023 <sup>b</sup>	0.021 <sup>b</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.019 <sup>b</sup>

Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (p<0.05)

En la Figura 35, se muestra el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporoides* durante los 7 días de incubación. En relación con el control, todos los tratamientos evaluados

alteraron el crecimiento del hongo. Las nanopartículas de quitosano en PDA a una concentración de 0.5 % inhibió en un 80 % la germinación de los conidios del hongo.



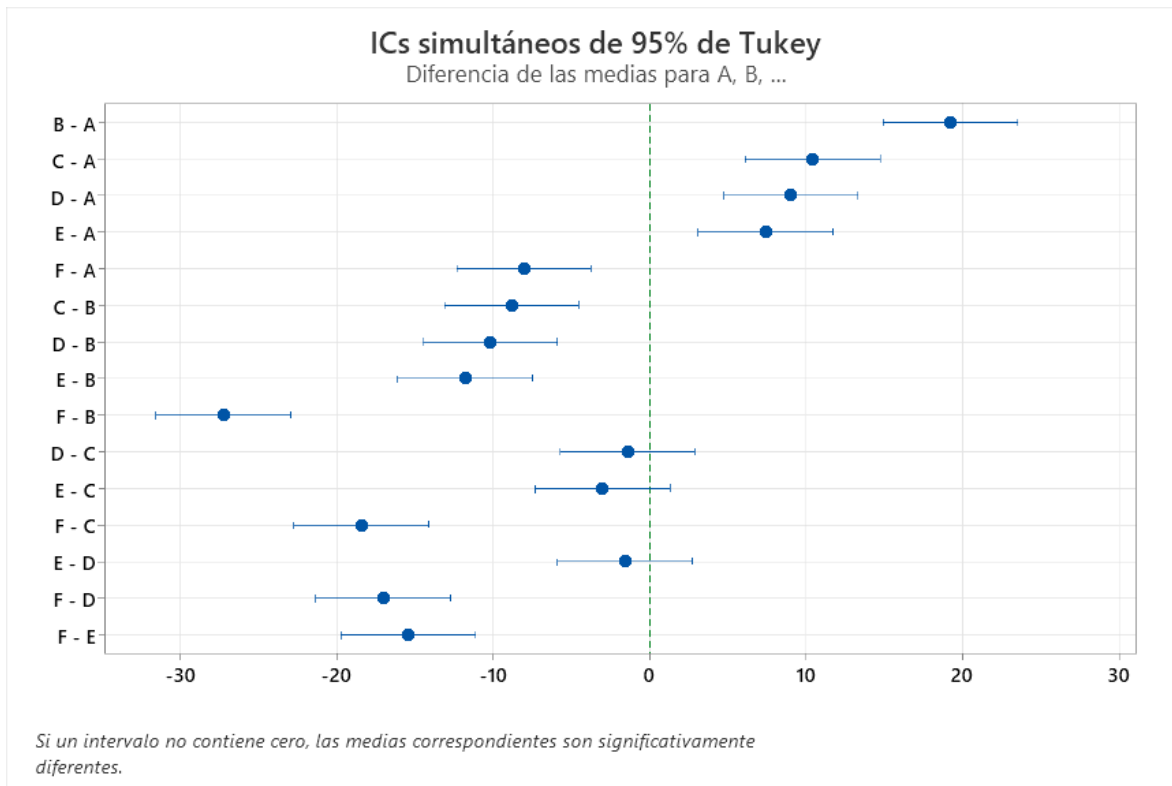
**Figura 35.** Cinética del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* durante 7 días de incubación con y sin ChNP.

El aislamiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* con los distintos tratamientos no presento viabilidad, mientras que el tratamiento control mostro un rápido crecimiento (7 cm de diámetro en 7 días). Esto demuestra que las nanopartículas de quitosano tienen un efecto fungida sobre el patógeno, el mayor efecto surgió a la concentración de 0.5%. De acuerdo con lo obtenido, se puede proponer que las nanopartículas de quitosano actúen como una barrera de las estructuras reproductivas del hongo y puede estar relacionado con la concentración de quitosano. Estos datos concuerdan con los de Chowdappa et al., (2014) quienes encontraron que a una concentración de 0.5% de nanopartículas de quitosano se logró una resistencia del 48% contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

### 3.4.3. Análisis estadístico

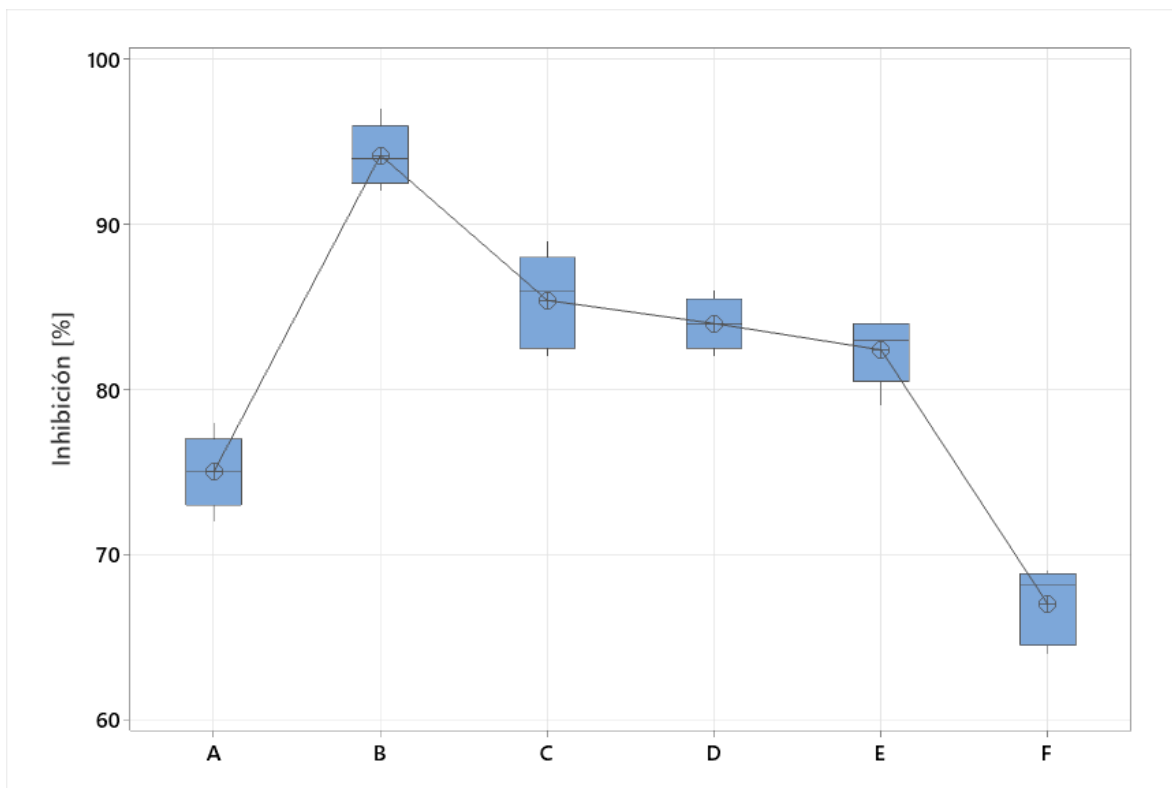
#### *ANOVA para crecimiento micelial*

Primeramente, se analizaron el cumplimiento de supuestos de normalidad y varianza constante, como se muestran en la Figura 36.



**Figura 36.** Prueba de Tukey para los tratamientos durante 7 días.

Posteriormente se analizaron los resultados de la gráfica de caja para todos los tratamientos (Figura 37), donde el eje y corresponde al porcentaje inhibitorio y el eje x corresponde a los tratamientos descritos en la Tabla 10.



**Figura 37.** Gráfica de caja del efecto inhibitorio de las ChNP al séptimo día.

Con lo anterior se muestra que el tratamiento con mayor porcentaje inhibitorio del crecimiento micelial corresponde al tratamiento B (0.5% ChNP/PDA). Se realizó un análisis de varianza y se encontró que  $p=0.000 < 0.05$ , rechazando la hipótesis nula.

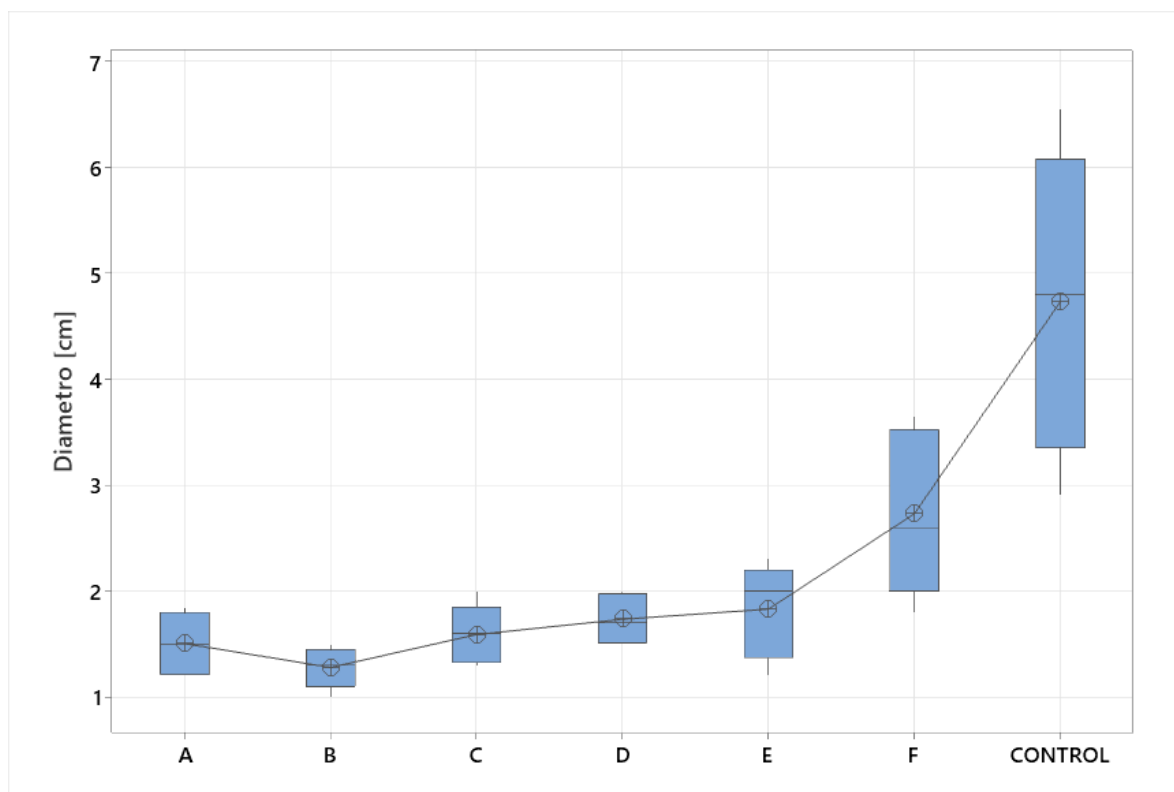
Estos resultados permitieron evidenciar que los tratamientos que fueron significativamente diferentes respecto al control tanto en PDA, como con PDA diluido corresponde a aquel que tienen una concentración de 0.5%, considerándose como una alternativa válida para la disminución del crecimiento del hongo a los 3 días de inoculación.

Es posible concluir que a largo plazo se puede tener mayor poder antifúngico con el uso de nanopartículas de quitosano al 0.5% frente a otros tratamientos.

#### *ANOVA para la velocidad de crecimiento*

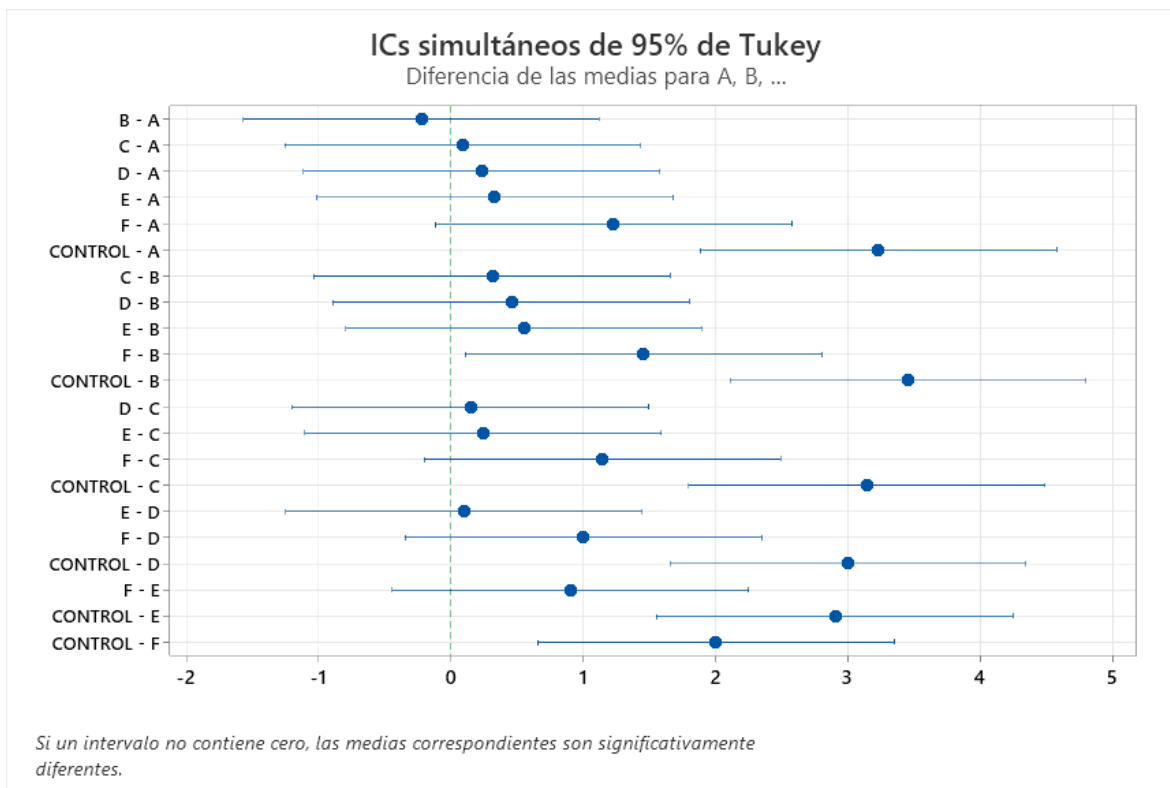
Al realizar el análisis estadístico ANOVA de un factor se corrobora que tanto difieren los datos entre cada tratamiento y si su reducción es significativa frente al control. Se parte con

el análisis del gráfico de caja para las muestras tomadas cada 24 horas, La Figura 38 muestra los resultados obtenidos en este análisis.



**Figura 38.** Gráfica de caja de la velocidad de crecimiento de las ChNP al séptimo día.

A partir de lo obtenido se demuestra que el tratamiento B correspondiente a la concentración de 0.5% en PDA, brindó un menor diámetro de crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporoides*, respecto al control haciéndose evidente desde el tercer día de incubación, donde los valores de crecimiento estuvieron en un rango de 1 a 1.5 cm. En la gráfica se observa que la mediana del control es mucho mayor en comparación a los distintos tratamientos, lo que corresponde a que los tratamientos tuvieron actividad antifúngica. Los valores de cada tratamiento demuestran que el micelio del patógeno no tuvo un crecimiento mayor a 4 cm. Se corroboraron nuevamente los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Figura 39). Con el análisis de varianza se encontró que  $p=0.000 < 0.05$ , cumpliendo la hipótesis alterna.



**Figura 39.** Prueba de Tukey para los tratamientos durante 7 días.

Finalmente, con los resultados obtenidos se aprecia que los distintos tratamientos de nanopartículas de quitosano a diferentes concentraciones son significativamente distintos al control concluyendo que cualquiera de estos tratamientos es efectivo para la reducción del crecimiento micelial del hongo. Las nanopartículas de quitosano tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Los tratamientos con PDA/H<sub>2</sub>O inhibieron al hongo en un 84% (0.25%), 86% (0.5%) y 69% (1%). Las nanopartículas de quitosano en PDA a una concentración de 0.5 % llegaron hasta el 97% de inhibición y presentó la menor tasa de crecimiento, teniendo el mayor efecto fungicida. Aunado a lo anterior, el mecanismo de acción de las nanopartículas de quitosano se puede ligar al peso molecular del quitosano utilizado; clasificado en un intervalo medio, la literatura reporta que a este peso se muestra una actividad mucho mayor, es decir una actividad aceleradora. (Liu, et al., 2008). Si bien hay pocos estudios que ligen el peso molecular promedio con la actividad antifúngica, una posible respuesta de la interacción de las nanopartículas de quitosano con *Colletotrichum gloeosporioides* se liga al tamaño de

superficie de las nanopartículas, las cuales pueden absorberse en la superficie de las células fúngicas, alterando su composición, lo que provoca que los nutrientes esenciales no estén a su disposición y evita su crecimiento.

Otros estudios corroboran la efectividad del quitosano aplicado a la nanotecnología contra el género *Colletotrichum*: Constantini y colaboradores (2018) reportaron *in vitro* que las nanopartículas de quitosano con extracto de arándano en PDA retrasaron el desarrollo de *Colletotrichum fragariae*; Correa et al., (2017) observaron *in vitro* el efecto inhibitorio de las nanopartículas de quitosano y aceite esencial TEO a la concentración del 3%, mostrando ser fungicida contra *Colletotrichum gloeosporioides* en un 60%; en un estudio sobre la evaluación de nanoformulaciones de quitosano Correa et al (2018) reportaron que las nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tomillo a la concentración 5% redujeron al 100% el desarrollo de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *fragariae*.

## CONCLUSIONES

Al utilizar espectroscopia de FTIR evidencio una conformación estructural y molecular puta del quitosano que se utilizó, donde se encuentran sus grupos funcionales característicos, como los son el OH, NH, CH. El quitosano presentó un grado de desacetilación de 78%.

La disolución de quitosano en medio ácido exhibe un comportamiento de flujo newtoniano, es por ello por lo que se utilizó un viscosímetro capilar para determinar su peso molecular promedio, se observó que en medida que la concentración aumenta, hay una disminución en la viscosidad reducida. La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo del quitosano y su valor dependió del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el disolvente. En este caso los valores de la constante  $a$  y  $k$ , dependieron del grado desacetilación del quitosano

El peso molecular promedio en viscosidad del biopolímero fue de 553.53 kDa, correspondiente a un peso molecular medio en la escala de peso molecular de la molécula.

Por microscopia de fuerza atómica fue posible confirmar la presencia de nanopartículas de quitosano con morfología esférica con un tamaño promedio de 50 nanómetros. El espectro FTIR de las ChNP mostro las bandas características del quitosano, con algunos desplazamientos que se asocian a la interacción del quitosano con el surfactante.

Se logró la identificación morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporoides*, por medio de la inoculación de fruto de mango contaminado con las características de la enfermedad y posteriores aislamientos y análisis por microscopía.

El protocolo *in vitro* aplicado en este trabajo permitió identificar la acción antifúngica de las distintas soluciones de nanopartículas de quitosano sobre el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporoides*. Las nanopartículas de quitosano fueron altamente eficientes en la inhibición del patógeno, la mejor disolución con una respuesta de inhibición del 97 %, fue el tratamiento B, el cual presentaba una concentración de 0.5 % de ChNP en PDA.

Finalmente, se concluye que las nanopartículas de quitosano tienen una acción antifúngica que le permite actuar sobre las estructuras primarias del hongo, generando una desestabilización. Las nanopartículas se proponen como método alternativo a los fungicidas, enfocado en el mercado de los biofungicidas.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda para posteriores trabajos tener un mayor control y estudiar más a fondo el efecto que tienen las condiciones de operación de sonicación para la obtención de las nanopartículas de quitosano.

Igualmente se propone que se cuantifique la concentración de las ChNP en la suspensión.

Realizar un ensayo *in vivo* donde se pueda identificar la viabilidad del hongo, además de realizar distintas pruebas que indique el nivel antifúngico de las nanopartículas de quitosano.

## REFERENCIAS

Alvarado, R. (2014). Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*.15(3), 134-148.

Arceo T., Jiménez, R., Salgado, R., Santoyo, G., López, J. E., & Loeza, P. (2019). Efecto antifúngico in vitro e in vivo de quitosano sobre patógenos de fresa en postcosecha. *Agrociencia*, 53(8), 1297-1311.

Ávila, J. (2010) *Síntesis y deposición sonoquímica de nanopartículas de plata sobre placas de ABS y evaluación de su actividad antimicrobial*. Tesis de maestría. Centro de investigación en Química aplicada.

Ávila, P. (2019). *Evaluación de un protocolo sobre el efecto de nanopartículas de quitosano+ TPP+ PEG para control de Fusarium solani en condiciones in vitro e in vivo en plantas de tomate chonto Solanum lycopersicum*. Tesis de grado. Universidad del Bosque.

Ayón, L., Uriarte, Y., Camacho, H., Tapia, D., López, M., López G., & Vega, O. (2022). Antifungal activity of a chitosan and mint essential oil coating on the development of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya using macroscopic and microscopic analysis. *Food and Bioprocess Technology*, 15(2), 368-378.

Bautista, S., Ventura I., Correa, Z., & Corona, L. (2017). Quitosano: Un polisacárido antimicrobiano versátil para frutas y hortalizas en postcosecha-una revisión. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 23(2), 103-122.

Barragán, C, Fornué, E., & Ortega, J. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *J. CIM*, 4, 769-776.

Berthold, A., Cremer, K., & Kreuter, J. (1996). Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release*, 39(1), 17-25.

Caro-León, F., López, L, Lizardi, J., Argüelles, W., Goycoolea, F., Carvajal, E., & López Y. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: Una revisión. *Biotecnia*, 21(3), 13-25.

Chowdappa, P., Gowda, S., Chethana, C. S., & Madhura, S. (2014). Antifungal activity of chitosan-silver nanoparticle composite against *Colletotrichum gloeosporioides* associated with mango anthracnose. *African Journal of Microbiology Research*, 8(17), 1803-1812.

Contreras C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum ssp. Obtenidos de frutos de lulo (Solanum quitoense Lam), tomate de árbol (Solanum betacea Sendt), Granadilla (Passiflora ligularis Juss), Mango (Mangifera indica L) y Tallos de mora (Rubus Glacus Benth) con síntomas de antracnosis*. Tesis para Microbiólogo Agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia.

Correa N., Bautista, S., Valle Á., & Hernández, M. (2017). The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth in vitro and on cv Hass avocado and fruit quality. *Journal of Phytopathology*, 165(5), 297-305.

Costantini, R., Ventura, R., Hernández, M., Bautista, S., & Barrera, L. (2018). Potencial antifúngico de nanopartículas de quitosano y extracto de Arándano sobre *Colletotrichum fragariae* en fresa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(1).

De Alvarenga, E., de Oliveira, C., & Bellato, C. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 80(4), 1155-1160

De la Paz, N., Pérez, D., Fernández, M., López, O., Nogueira, A., Paneque, M., & García, C. M. (2013). Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(2), 84-91.

De la Torre, A. (2013). *De los cafetales del Soconusco a la historia del mango Ataulfo*. Colección Soconusco, Libro III. Tapachula, Chiapas

Del Puerto, A., Suárez S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.

Divya, K., & Jisha, M. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16, 101-112.

- Domínguez P., Mohali R., Marín A., & Pino B. (2012). Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*, 37, 108-122.
- Garrido R., Noriega, D., Pereyda, J., Jiménez, R., & Cruzaley, R. (2014). Manejo integrado de la antracnosis y caída de frutos de mango ataulfo en las costas de Guerrero.
- Giraldo, J. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *Appl. Chitosan*.
- Gómez A., & Rodríguez, R. (2019). Creación y comercialización De un licor de crema de mango Ataulfo, pox y anís estrella.
- Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E., & Ramos, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60.
- James, G. (2018). *Introducción a la nanotecnología*. Gilad James Mystery School.
- Kausar, A. (2017). Scientific potential of chitosan blending with different polymeric materials: A review. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 33(4), 384-412.
- Kim, D. G., Jeong, Y. I., Choi, C., Roh, S. H., Kang, S. K., Jang, M. K., & Nah, J. W. (2006). Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 319(1-2), 130-138.
- Knidri, H., El Khalfaouy, R., Laajeb, A., Addaou, A., & Lahsini, A. (2016). Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. *Process Safety and Environmental Protection*, 104, 395-405.
- Lateef, A., Nazir, R., Jamil, N., Alam, S., Shah, R., Khan, M. N., & Saleem, M. (2016). Synthesis and characterization of zeolite-based nanocomposite: An environment friendly slow-release fertilizer. *Microporous and Mesoporous Materials*, 232, 174-183.
- Lemes, I., Vitón, T., & Jiménez, A. (2014). Actividad antifúngica de sales de quitosana in vitro sobre hongos causantes de enfermedades poscosecha en papaya (Carica papaya). *Fitosanidad*, 18(1), 33-40.

- Lipşa, F., Ursu, E., Ursu, C., Ulea, E., & Cazacu, A. (2020). Evaluation of the antifungal activity of gold–chitosan and carbon nanoparticles on *Fusarium oxysporum*. *Agronomy*, *10*(8), 1143.
- Lira, S., Ricardo, H., Méndez, B., Santos, G., & Vera, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria*, *28*(2), 9-24.
- Liu, X., Feng, X. Q., Yang, S., Wang, T. P., & SU, Z. X. (2008). Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Iranian Polymer Journal* *17* (11), 2008, 843-852
- Llivicura A. (2018). *Comparación in vitro de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero (Rosmarinus officinalis) y cola de caballo (Equisetum arvense); frente al hongo Colletotrichum gloeosporioides Penz.* Tesis de grado. Universidad Politécnica Salesiana.
- Malmiri, HJ, Jahanian, M., Berenjian A. (2012) Potential applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. *Am J Biochem Biotechnol* *8*(4),203–219.
- Mănoiu, V., & Aloman, A. (2010). Obtaining silver nanoparticles by sonochemical methods. *UPB Buletin Stiintific. Series B*, *72*(2), 179.
- Márquez, J., & Zúñiga, A. (2019). *Desacetilación termoalcalina de la quitina de cáscara de camarón para depuración de aguas residuales de una industria procesadora de salsas.* Tesis de grado. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química.
- Mejía, R., Martínez, M., & Lara, P. (2018). Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. *e-CUCBA*, (9), 17-23.
- Mendoza, C., Rosas, R., Vázquez, A., & Gálvez, D. (2020). Retos y controversias del mango Ataulfo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *11*(7), 1633-1645.
- Mishra, M. (2015). Handbook of Encapsulation and Controlled Release. CRC Press (1ª. Ed.) *Biodegradable Polymers: Drug Delivery Applications*. (pp. 586-590).
- Monteon, A et al., (2017). Evaluation of tolerance to vegetative antracnosis of new mango germplasms in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *20*(3), 447-456.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2023. *Colletotrichum gloeosporioides*, *TaxBrowser*. Extraído el 23 de julio del 2023 desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Oh, J., Chun, S., & Chandrasekaran, M. (2019). Preparation and *in vitro* characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against phytopathogens of tomato. *Agronomy*, 9(1), 21

Ramírez, D. (2019). *Elaboración de nanopartículas de quitosano-timol mediante el método pulverización-congelación en nitrógeno líquido, evaluación de su capacidad antifúngica frente a micelio de Botrytis cinerea y comparación con nanopartículas obtenidas por gelificación iónica*. Tesis de grado. Universidad de Chile.

Rivero, D, Cruz, A, Martínez, B, Rodríguez, T, & Ramírez, M. (2008). Actividad antifúngica *in vitro* de las quitosanas k1 y SIGMA frente A *Bipolaris oryzae* (B. de Haan) Shoem. *Revista de Protección Vegetal*, 23(1), 43-47.

Rodríguez, S., Cárdenas, E., Hernández, S., Gutiérrez, A., & Mayek, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35, 898-905.

Rodríguez, T., Bautista, S., Ramírez, M. Á., Plascencia, M., & Hernández, L. (2021). Quitosano y sus derivados, polímeros naturales con potencial para controlar a *Pyricularia oryzae* (Cav.). *Cultivos Tropicales*, 42(4).

Rojo, I., Álvarez, B., García, R., León, J., Sañudo, A., & Allende, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums spp.* en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 549-570.

SADER, (2022). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Rural de Guerrero. Extraído el 23 de julio del 2023 desde <https://www.gob.mx/agricultura/guerrero>

SIAP, (2022). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. Extraído el 23 de julio del 2023 desde [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx).

Uddin, M., Shefat, S., Afroz, M., & Moon, N. (2018). Management of anthracnose disease of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*: A review. *Scientific Agriculture*, 2(10), 169-177.

Vaezifar, S., Razavi, S., Golozar, M. A., Karbasi, S., Morshed, M., & Kamali, M. (2013). Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. *Journal of Cluster Science*, 24, 891-903.

Villegas, R. (2019). *Síntesis, caracterización y evaluación antifúngica de nanopartículas de quitosano con aceites esenciales*. Tesis de grado. Universidad de Sonora.

Zhang, W., Zhao, H., Zhang, J., Sheng, Z., Cao, J., & Jiang, W. (2019). Different molecular weights chitosan coatings delay the senescence of postharvest nectarine fruit in relation to changes of redox state and respiratory pathway metabolism. *Food chemistry*, 289, 160-168.

