

Actividad inhibitoria de quitosano como alternativa orgánica para el control de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*

Inhibitory activity of chitosan as an organic alternative for the control of *Pythium aphanidermatum* and *Sclerotium rolfsii*

Omar Jiménez-Pérez¹ , Gabriel Gallegos-Morales^{1*} , Francisco Daniel Hernández- Castillo¹ , Erika Nohemí Rivas-Martínez² , Hortensia Ortega-Ortiz³ , Miriam Desiree Dávila-Medina⁴ 

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México.

²Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

³Departamento de Materiales Avanzados, Centro de Investigación en Química Aplicada, Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos, 25294, Saltillo, Coahuila, México.

⁴Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Avenida Venustiano Carranza 935, 25280, Saltillo, Coahuila, México.

*Autor de correspondencia: ggalmor@uaaan.edu.mx

Fecha de recepción:

22 de junio de 2023

Fecha de aceptación:

3 de agosto de 2023

Disponible en línea:

1 de diciembre de 2023

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



Reconocimiento-

NoComercial-

CompartirIgual 4.0

Internacional

(CC BY-NC-SA 4.0)

RESUMEN

Los efectos tóxicos que causan los agroquímicos han conducido a la generación de alternativas inocuas para el control de fitopatógenos como el quitosano, un biopolímero inocuo y con efecto fungicida. Por consiguiente, se planteó extraer quitosano de cáscara de camarón para el control de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*. Se logró obtener quitosano con 100 por ciento de desacetilación y $457,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ de peso molecular, con el cual se preparó un medio de cultivo suplementado a distintas concentraciones (50, 100, 150 y 200 ppm). Se evaluó su efecto antagónico *in vitro* en contra de los fitopatógenos mencionados. Los análisis estadísticos de los datos de inhibición muestran que las distintas concentraciones de quitosano tuvieron un efecto inhibitorio. La concentración de 200 ppm presentó el mayor porcentaje de inhibición (63.82 y 91.67%) en contra de *P. aphanidermatum* y *S. rolfsii*, respectivamente. Por ello, se podría considerar al quitosano como una alternativa orgánica en el manejo de estos fitopatógenos.

PALABRAS CLAVE

Antagonismo, bioalternativa, biopolímero, fitopatógenos, inocuo.

ABSTRACT

The toxic effects caused by agrochemicals have led to the generation of innocuous alternatives for the control of phytopathogens, such as chitosan, a harmless biopolymer with fungicidal effect. Therefore, it was proposed to extract chitosan from shrimp shell to control *Pythium aphanidermatum* and *Sclerotium rolfsii*. It was possible to obtain chitosan with 100% deacetylation and $457,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ molecular weight, with which we prepared a culture medium supplemented at different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm). Its antagonistic effect against the mentioned phytopathogens was evaluated *in vitro*. The statistical analysis of the inhibition data showed that the different concentrations of chitosan had an inhibitory effect. The 200 ppm concentration was the one that presented the highest percentage of inhibition (63.82 and 91.67%) against *P. aphanidermatum* and *S. rolfsii*, respectively. Therefore, chitosan could be considered as an organic alternative in the management of these phytopathogens.

KEYWORDS

Antagonism, organic alternative, biopolymer, phytopathogens, innocuous.

INTRODUCCIÓN

Pythium aphanidermatum y *Sclerotium rolfsii* son dos de los fitopatógenos más importantes para el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.), los cuales causan pudriciones de raíces individualmente o en asociación con otros fitopatógenos, tales como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp., con quienes, en conjunto, causan la enfermedad del “Damping off” (Pérez-Acevedo et al. 2017; Jiménez-Pérez et al. 2023). En campo, la enfermedad se conoce como la marchitez del chile (Velásquez-Valle y Reveles-Torres 2017; Gómez-Hernández et al. 2018), que llega a ocasionar pérdidas hasta de 100 por ciento de la producción (Pérez-Acevedo et al. 2017; Gómez-Hernández et al. 2018).

Para controlar estos fitopatógenos, los agricultores se basan en la aplicación de fungicidas químicos. El uso irracional de esa clase de productos ha ocasionado consecuencias en el medio ambiente y en la salud de las personas, así como desequilibrio en la biodiversidad del suelo y resistencia de los fitopatógenos hacia estos compuestos, lo que encarece la producción del cultivo, debido a sus constantes aplicaciones (Sánchez-García et al. 2019). Existen alternativas para control de estos fitopatógenos, por ejemplo, la utilización de microorganismos antagonistas, la biofumigación (Pérez-Acevedo et al. 2017) y compuestos con propiedades antifúngicas como el quitosano (Pérez-Madruga et al. 2019).

El quitosano es un biopolímero derivado de la desacetilación de la quitina, la cual se encuentra en el exoesqueleto de los artrópodos y las paredes celulares de los hongos, y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Romero-Serrano y Pereira 2020; Rodríguez-Pedroso et al. 2021). La quitina está constituida por poli- β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unida a catecoles y proteínas (Monter-Miranda et al. 2016), mientras que el quitosano está compuesto por unidades de D-glucosamina y, en menor proporción, por N-acetil-D-glucosamina, unidas entre sí por enlaces β -1,4 (Rodríguez-Pedroso et al. 2021).

Este biopolímero se extrae principalmente de los caparazones de camarón (Holguin-Peña et al. 2020); su extracción se puede realizar mediante diversos métodos, en todos ellos primero se debe de extraer la quitina. El método comúnmente utilizado para extracción de quitosano es mediante álcalis (NaOH) o ácidos

fuertes (HCl); sin embargo, este método causa contaminación ambiental e inconsistencia en las propiedades del quitosano. Existen alternativas más amigables para su obtención, como lo es la fermentación bacteriana. En ambas metodologías, el segundo paso consiste en la transformación de quitina a quitosano mediante la desacetilación con NaOH (Gamal et al. 2016).

En la agricultura, el quitosano tiene diversos usos, tales como inducir resistencia en las plantas (Adamuchio-Oliveira et al. 2020), promover el crecimiento vegetal (Reyes-Pérez et al. 2020) e inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Pasotti et al. 2020), como lo son: *Sclerotium rolfsii* (El-Mohamedy et al. 2013), *Phytophthora capsici* (Ramírez-Benítez et al. 2019) y *Colletotrichum* sp (Bautista-Baños et al. 2003). Su capacidad inhibitoria está relacionada con un alto grado de desacetilación (relacionada con la cantidad de grupos acetilo en las cadenas del quitosano que se convierten en grupos amino, estos últimos son los que tienen actividad antimicrobiana) (Rodríguez-Pedroso et al. 2021). Las principales ventajas de su uso en la agricultura se basan en su bajo riesgo de contaminación —al ser un compuesto biodegradable— y de daños a la salud de las personas (González-Peña et al. 2016; Pasotti et al. 2020), esto último debido a que posee una DL_{50} oral en ratones mayor que la de la sacarosa (Pasotti et al. 2020). Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue obtener quitosano a partir de quitina extraída de la cáscara de camarón, para utilizarlo como biofungicida en el control *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología, ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, 25° 21'13" latitud N y 101° 1'56" longitud oeste, a una altura de 1,742 msnm.

Elaboración de quitosano

Se obtuvieron sólidos de quitina de cáscara de camarón mediante fermentación bacteriana, según la metodo-

logía de Gamal et al. (2016), con algunas modificaciones: se utilizó polvo de cáscara de camarón seco, de tamaño de 149 μ obtenido con un molino pulverizador (Modelo 800A[®], Sagaon Tech, México). La fermentación se realizó en medio de cultivo líquido compuesto por 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1 g de fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4), 5 g de polvo de cáscara de camarón y 5 g de sacarosa por litro de agua destilada, a un pH de 7. Se colocaron 350 mL de medio de cultivo en matraces bafleados de un litro y se esterilizaron en autoclave durante 18 min a 15 psi. Una vez enfriados, se inocularon con *Bacillus subtilis*, empleando un asa bacteriológica, y se incubaron por 15 días en agitación constante a 150 rpm a 28 °C. Posteriormente, el caldo de cultivo se filtró a través de papel filtro No 40, para recuperar sólidos de quitina que se transformaron a quitosano mediante la metodología utilizada por Sedaghat et al. (2016), la cual consistió en desacetilar la quitina con NaOH a 50 por ciento, a una relación 1:10 durante 10 h a 100 °C en agitación constante. El quitosano obtenido se obtuvo por filtración, se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secó a temperatura ambiente. El quitosano resultante se disolvió a una concentración de 3 por ciento en agua destilada estéril acidificada con ácido acético.

Caracterización del quitosano

Espectroscopía de infrarrojo por ATR (FTIR-ATR).

Los espectros de infrarrojo de los quitosanos extraídos por fermentación y alcalisis con NaOH se realizaron con un Espectrómetro Nicolet[®] iS50 FTIR (Thermo Fischer Scientific, Madison, Estados Unidos), sobre el rango de longitud de onda de 4,000-400 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} , en la que se tomó como control el espectro obtenido de un quitosano comercial (Sigma – Aldrich CS LMW, Saint Louis, Estados Unidos). Se utilizó un accesorio de muestreo Gemini Smart iTR[®] con ventana de diamante para recopilar la reflectancia total atenuada horizontal (ATR). Las muestras se prensaron con un dispositivo Minigrip para asegurar un contacto uniforme entre las muestras en polvo y el cristal ATR. Los espectros de FTIR fueron registrados por acumulación de 25 escaneos, utilizando el *software* OMNIC[®] (Thermo Fischer Scientific, Drivers versión: 9.7, Firmware versión: 1.14; Waltham, Estados Unidos).

Grado de desacetilación (GD). El grado de N-acetilación (GA) de los quitosanos se determinó por espectroscopia de infrarrojo, con base en el método de Brugnerotto et al. (2001), aplicando la ecuación $GA = 31.92 (A_{1320}/A_{1420}) - 12.2$, donde A_{1320} y A_{1420} son las absorbancias a 1,320 cm^{-1} y 1,420 cm^{-1} de los grupos amida I e hidróxilo, respectivamente. Finalmente, se determina el porcentaje GD restando a 100 el GA.

Peso molecular viscosimétrico (Mv). El peso molecular se determinó por viscosimetría, según el método ASTM D2857- 22 (ASTM International 2023), gracias a lo cual se obtuvo la viscosidad intrínseca (η) a 30 °C, con una solución de ácido acético 0.3 M/acetato de sodio 0.2 M, según lo propuesto por Ortega-Ortiz et al. (2010). El peso Mv se determinó utilizando la viscosidad intrínseca y aplicando la ecuación de Mark-Houwink: $\eta = K \cdot Mv^\alpha$, donde $k = 0.076$, $\alpha = 0.76$.

Prueba de inhibición *in vitro* de quitosano contra *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*

Ésta se realizó *in vitro*, empleando la técnica de medio de cultivo suplementado con quitosano, para lo cual se prepararon placas Petri con medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) más quitosano a cuatro concentraciones (50, 100, 150 y 200 ppm), para evaluar su actividad antagonista; el medio se ajustó a un pH de 6.5 y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 psi. Una vez solidificados los medios de cultivo, se transfirió una porción de 5 mm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii* por separado. Se llevó a cabo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (concentraciones de quitosano) y un testigo (medio cultivo sin quitosano), con cuatro repeticiones, para cada fitopatógeno de manera individual. La variable de respuesta fue el crecimiento micelial (mm) observado en cada tratamiento y el testigo, el cual fue medido cada 24 h hasta que se observó un crecimiento total en la caja Petri tratada con el testigo. Los datos obtenidos fueron transformados a porcentaje de inhibición (%Inh), mediante la siguiente fórmula: $\%Inh = C - T/C \times 100$, donde C es el diámetro del testigo y T es el diámetro del tratamiento (Castillo-Reyes et al. 2015).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias, según Tukey ($p \leq 0.05$), bajo un diseño

completamente al azar, en el programa estadístico InfoStat versión 2019.1.2.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de quitosano

Como resultado de la fermentación bacteriana de cáscara de camarón con *B. subtilis*, se logró la obtención de sólidos de quitina insolubles en agua, los cuales, mediante su desacetilación con NaOH a 50 por ciento, generaron quitosano, el cual, a diferencia de la quitina, fue soluble en agua acidificada con ácido acético a pH 5, aparentando una consistencia viscosa (Figura 1). Algunos autores señalan que, para la conversión de quitina a quitosano, debe ocurrir una desacetilación de la quitina mayor a 50 por ciento, y que la solubilidad de éste depende de su porcentaje de desacetilación, además de que la solubilidad de este compuesto está dada por la protonación de sus grupos aminos libres en soluciones ácidas (Vieira et al. 2020; Pasotti et al. 2020), lo cual concuerda con las características viscosas y soluble del quitosano obtenido, como se muestra en la Figura 1. Mediante esta metodología se logra reducir la cantidad NaOH y HCl que se utiliza en el método químico para su obtención, reduciendo la contaminación y el impacto ambiental causados por dichos compuestos químicos.

Análisis físico-químico de quitosano

En la Figura 2 se muestra el espectro de FTIR por ATR del quitosano comercial (CS LMW), donde se observan los picos característicos del quitosano; la banda localizada en $3,355\text{ cm}^{-1}$ corresponde a una vibración longitudinal del enlace O-H, y la banda en la región $2,925\text{ cm}^{-1}$, corresponde al estiramiento del enlace N-H, del grupo amino ($-\text{NH}_2$). De igual manera se distingue una vibración longitudinal en la región $2,872\text{ cm}^{-1}$, que es dada por un enlace del grupo C-H; además, se presenta una banda en la región de $1,589\text{ cm}^{-1}$, perteneciente al grupo $-\text{NH}_2$. Las señales que aparecen en $1,025$ y $1,060\text{ cm}^{-1}$ corresponden a un estiramiento del enlace C-O (Monter-Miranda et al. 2016). También se puede observar que los espectros de infrarrojo del quitosano elaborado en este estudio (QB1) son muy parecidos al quitosano comercial (Figura 2), pues también presentan las mismas señales características que se muestran en el Cuadro 1.

La ausencia de los picos de absorción en $1,540\text{ cm}^{-1}$ y en $1,700\text{--}1,740\text{ cm}^{-1}$ asignado a las vibraciones de estiramiento en proteína confirma que el quitosano extraído está libre de proteína (Hassainia et al. 2018).

El grado de desacetilación del quitosano obtenido en esta investigación fue del 100 por ciento y el peso molecular viscosimétrico (Mv) de $457,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ o Dalton. El peso molecular Mv y el porcentaje de desacetilación fueron mayores a los reportados por

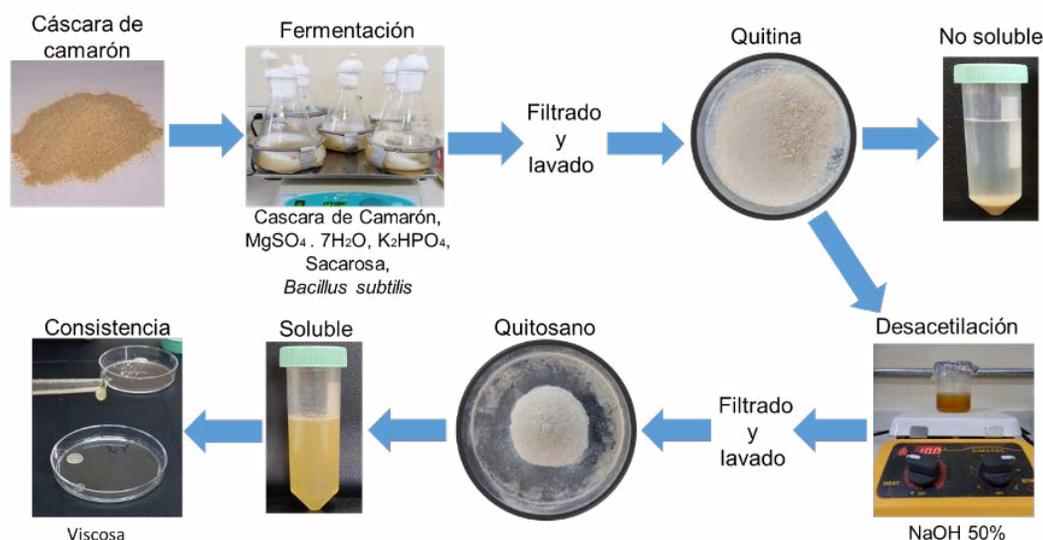


Figura 1. Proceso de obtención de quitosano mediante fermentación bacteriana para la obtención de quitina y su posterior conversión a quitosano mediante desacetilación con NaOH.

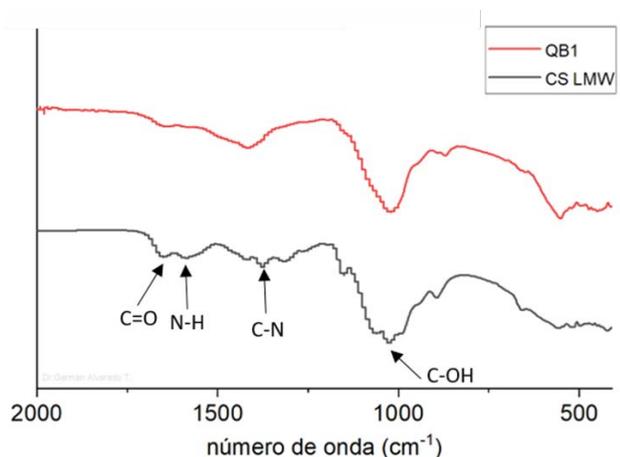


Figura 2. Espectros de FTIR-ATR para quitosano obtenido por fermentación (QB1) y quitosano comercial de peso molecular bajo (CS LMW) como referencia.

Cuadro 1. Asignación de las señales relevantes de los quitosanos extraídos por fermentación (QB1) y la comparación con el quitosano comercial (QA).

Asignación	QA	QB1
Vibración longitudinal O-H	3,355	3,288
Estiramiento del enlace N-H	2,925	2,925
Vibración longitudinal C-H	2,872	2,870
Vibración del grupo NH ₂	1,649, 1,589	1,640, 1,583
Vibración longitudinal CH-OH	1,420	1,416
Estiramiento del enlace C-O	1,025, 1,060	1,020

Francisco-Francisco et al. (2012), quienes determinaron el peso molecular de quitosano comercial marca Marine Chemicals, mediante un viscosímetro tipo Ubbelohde, para obtener un peso molecular Mv de 200,000 y una desacetilación de 87 por ciento mediante espectroscopía de infrarrojo, mientras que Ayala et al. (2014) obtuvieron quitosano con capacidad de inhibir el tubo germinativo de *Mycosphaerella fijiensis* a bajas concentraciones (50 y 100 ppm), con porcentajes de desacetilación de 89.34 y 95.01 por ciento, determinado mediante FTIR, los cuales fueron menores a los obtenidos en este estudio (100 %); sin embargo, obtuvieron altos pesos molecular Mv de 553,880 y 522,050 g·mol⁻¹, respectivamente, los cuales son diferentes al obtenido en esta investigación (457,000 g·mol⁻¹), probablemente debido a que Ayala et al. (2014) utilizaron otras variables de obtención de quitosano, como la extracción de exoesqueletos de cangrejos, uso de químicos para

extracción de la quitina (NaOH a 10%, 1% de sulfito de sodio, HCl 2M y H₃PO₄ 3M) y del quitosano (NaOH al 30% y Sulfito de sodio al 1%), a diferencia de nuestra investigación donde se logró reducir el uso de estos compuestos y, a su vez, se logró obtener un quitosano con buenas características químicas.

Inhibición *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii* en medio de cultivo suplementado con quitosano

En la prueba de inhibición *in vitro* de quitosano contra *P. aphanidermatum*, todas las concentraciones de este biopolímero mostraron capacidad de inhibir en diferentes porcentajes el crecimiento micelial del oomiceto, tal y como se observa en la Figura 3 y en el Cuadro 2, donde se muestra que todos los tratamientos presentaron diferentes porcentajes de inhibición en contra del fitopatógeno, con las concentraciones de 150 (Figura 3-B) y 200 ppm (Figura 3-A) como las que mostraron el mayor grado de actividad con 63.38 y 63.82 por ciento de inhibición respectiva, y estadísticamente significativos al testigo (Figura 3-E).

Cuadro 2. Inhibición *in vitro* de *P. aphanidermatum* a distintas concentraciones de quitosano.

Tratamientos	% de inhibición (mm ± DS)
T4- Quitosano 200 ppm	63.82 ± 1.01 A
T3- Quitosano 150 ppm	63.38 ± 1.86 A
T2- Quitosano 100 ppm	46.78 ± 3.11 B
T1- Quitosano 50 ppm	20.50 ± 2.56 C
T5- Testigo	0 D

*Medias estadísticas con letras distintas son significativamente diferentes (Tukey; p≤0,05).

Los reportes que demuestran la capacidad inhibitoria del quitosano en contra de *P. aphanidermatum* son escasos; no obstante, existen reportes en contra de otras especies de *Pythium*; por ejemplo, Palma-Guerrero et al. (2008) reportan la inhibición *in vitro* de *Pythium ultimum* mediante tres concentraciones de quitosano (0.5, 1 y 2 mg/mL) de 70 kDa peso molecular y 79.6 por ciento de desacetilación, esta última la concentración más alta en la que *Pythium* presentó menor crecimiento (23.7%). De manera similar, Martín-López et al. (2020) inhibieron en 80 por ciento el crecimiento

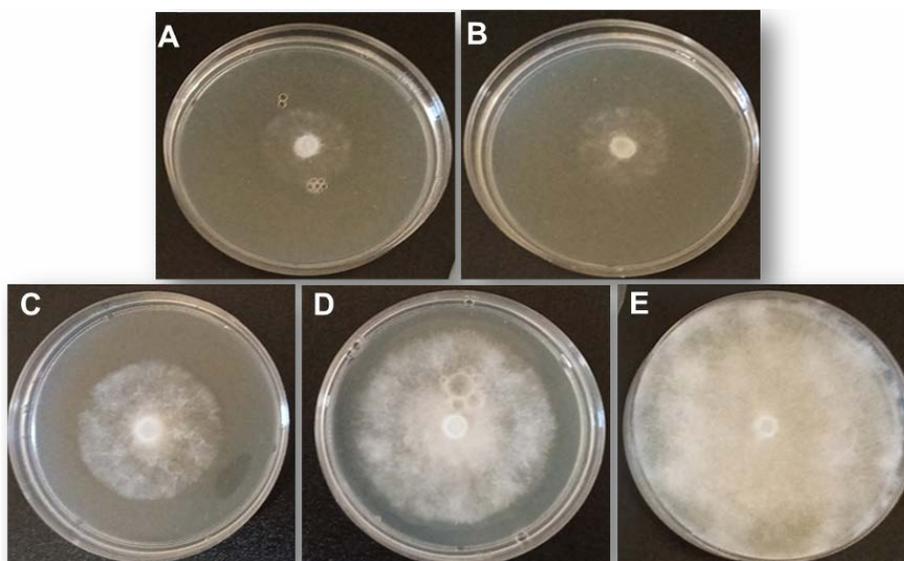


Figura 3. Inhibición *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* en medio de cultivo suplementado con quitosano. A) Quitosano 200 ppm; B) Quitosano 150 ppm; C) Quitosano 100 ppm; D) Quitosano 50 ppm, y E) Testigo.

de *P. ultimum*, utilizando quitosano a dosis de 2.5 g/L, con un porcentaje de desacetilación de 78 por ciento y un peso molecular de 3.928×10^5 g mol⁻¹, porcentajes de inhibición superiores a los obtenidos en este trabajo; sin embargo, utilizaron mayores concentraciones de quitosano.

No obstante, aunque los reportes de la actividad fungistática de quitosano en contra de *Pythium* son pocos, existen algunos otros que demuestran su efecto en contra de otros oomicetos, como *Phytophthora*, un ejemplo es lo reportado por González-Peña et al. (2016) y Ramírez-Benítez et al. (2019), quienes lograron inhibir *in vitro* el crecimiento de *Phytophthora palmivora* y *Phytophthora capsici* con quitosano a distintas concentraciones. Los autores mencionados señalan que, al aumentar la concentración del quitosano, aumenta el porcentaje de inhibición, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

En las pruebas de inhibición *in vitro* de *S. rolfsii* con quitosano, las concentraciones de quitosano inhibieron al hongo en diferentes porcentajes (Figura 4 y Cuadro 3); al aumentar la concentración de quitosano, aumentó el porcentaje de inhibición, gracias a lo cual se logró obtener la máxima actividad (91.67% de inhibición) en contra de este fitopatógeno a 200 ppm del biopolímero (Figura 4-A) y con un comportamiento estadísticamente diferente a los demás tratamientos (Figura 4).

Estos resultados coinciden con los reportados por El-Mohamedy et al. (2013), quienes lograron inhibir a

Cuadro 3. Inhibición *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* a distintas concentraciones de quitosano.

Tratamientos	% de inhibición (mm ± DS)
T4- Quitosano 200 ppm	91.67± 0.75 A
T3- Quitosano 150 ppm	87.41± 1.43 B
T2- Quitosano 100 ppm	85.26± 1.17 B
T1- Quitosano 50 ppm	79.20± 1.90 C
T5- Testigo	0 D

*Medias estadísticas con letras distintas son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0,05$).

Pythium sp. y *S. rolfsii* utilizando distintas concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 g/L) de quitosano de bajo y alto peso molecular (150,000 y 600,000 Dalton), para lograr porcentajes de inhibición de 88.8 y 100 por ciento para ambos fitopatógenos, y obtener la mayor inhibición con el quitosano de alto peso molecular y la dosis más alta. Dicho resultado señala que el porcentaje de inhibición está relacionado con la concentración del biopolímero, igual a lo obtenido en esta investigación. Sin embargo, el quitosano de este estudio presentó una mayor actividad antagonica contra *S. rolfsii* a dosis más bajas (200 ppm), con un mayor porcentaje de inhibición (91.67%), mientras que en el estudio de los autores mencionados anteriormente, en la concentración de 1 g/L (o 1000 ppm) de quitosano de alto peso molecular, apenas lograron una inhibición de 11.1 por ciento. Quizás este resultado está relacionado con el método de obtención del biopolímero, debido a que en el presente estudio

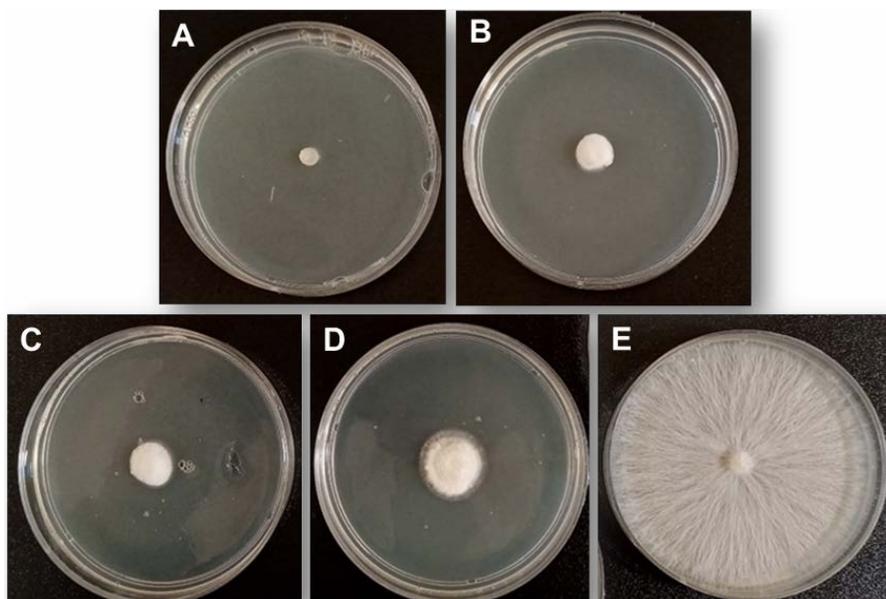


Figura 4. Inhibición *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* en medio de cultivo suplementado con quitosano a distintas concentraciones. A) Quitosano 200 ppm; B) Quitosano 150 ppm; C) Quitosano 100 ppm; D) Quitosano 50 ppm, y E) Testigo.

la quitina fue obtenida mediante degradación bacteriana de la cáscara de camarón, con 100 por ciento de desacetilación y un peso molecular M_v de $457,000 \text{ g mol}^{-1}$, mientras que en el caso de El-Mohamedy et al. (2013) utilizaron quitosanos comerciales de la marca Sigma-Aldrich Chemicals Company.

Rodríguez-Pedroso et al. (2021) mencionan que la capacidad inhibitoria del quitosano está relacionada con el bajo peso molecular y un alto porcentaje de desacetilación, lo cual se diferencia de lo publicado por El-Mohamedy et al. (2013), quienes obtuvieron un mayor porcentaje de inhibición con quitosano de mayor peso molecular (600,000 Dalton). Algunos autores mencionan que este biopolímero cuenta con diversos modos de acción contra los patógenos, como son: su alto contenido de cargas positivas, que le permite unirse a la pared celular del fitopatógeno (carga negativa), para que, posteriormente, sus grupos funcionales interactúen con los fosfolípidos de la membrana del fitopatógeno, lo cual ocasiona la salida del contenido celular (Xoca-Orozco et al. 2018; Martín-López et al. 2020), y causa malformaciones y desorganización de la célula, debido a su naturaleza policatiónica (Xoca-Orozco et al. 2018). Dentro de la célula el quitosano interactúa con el ADN, afectando la síntesis de proteínas (Xoca-Orozco et al. 2018; Martín-López et al. 2020); además, también activa la formación de quelatos con los metales de transición, lo que provoca la falta

de nutrientes, y esto, a su vez, inhibe el desarrollo del microorganismo (Ayala et al. 2014; Martín-López et al. 2020).

CONCLUSIONES

Mediante la degradación bacteriana de cáscara de camarón por *Bacillus subtilis* se logró obtener quitina, la cual, al someterla a desacetilación con NaOH a 50 por ciento, se convierte en quitosano con un rendimiento de 100 por ciento de desacetilación y un peso molecular M_v de $457,000 \text{ g mol}^{-1}$. Este biopolímero presentó actividad antagónica (63.82 y 91.67% de inhibición) *in vitro* a bajas concentraciones (200 ppm) en contra de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*, lo cual permite considerar al quitosano obtenido con esta metodología como una alternativa orgánica para el manejo de estos fitopatógenos en la agricultura actual.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y a la UAAAN por el apoyo para realizar los estudios de postgrado. A Julieta Sánchez Salazar, por su apoyo en la caracterización por FTIR-ATR.

LITERATURA CITADA

- Adamuchio-Oliveira LG, Mazaro SM, Móggor G, Sant' Anna Santos BF, Móggor ÁF. 2020. Chitosan associated with chelated copper applied on tomatoes: Enzymatic and anatomical changes related to plant defense responses. *Scientia Horticulturae* 271: 109431. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109431>
- ASTM International. [internet]. 2023. ASTM D2857-22 Standard Practice for Dilute Solution Viscosity of Polymers. [citado 2023 enero 29]. Disponible en: <https://www.astm.org/d2857-22.html>
- Ayala A, Colina M, Molina J, Vargas J, Rincón D, Medina J, Rosales L, Cárdenas H. 2014. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet que produce la sigatoka negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 15: 312-338.
- Bautista-Baños S, López-Hernández M, Bosquez-Molina E, Wilson CL. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F, Argüelles-Monal W, Desbrières J, Rinaudo M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42: 3569-3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
- Castillo-Reyes F, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Flores-Olivas A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2015. Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 549-562. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i3.638>
- El-Mohamedy RSR, Abdel-Kader MM, Abd-El-Kareem F, El-Mougy NS. 2013. Inhibitory effect of antagonistic bioagents and chitosan on the growth of tomato root rot pathogens *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology* 9: 1521-1533.
- Francisco-Francisco N, Ortega-Ortiz H, Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Fuentes-Lara LO, Robledo-Torres V. 2012. Inmovilización de *Trichoderma harzianum* en hidrogeles de quitosano y su uso en tomate (*Solanum lycopersicum*). *Terra Latinoamericana* 30: 47-57.
- Gamal RF, El-Tayeb TS, Raffat EI, Ibrahim HMM, Bashandy AS. 2016. Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 91: 598-608. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.008>
- Gómez-Hernández D, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C. 2018. Pathogenicity of *Phytophthora capsici* Leon and *Rhizoctonia solani* Khün, on seedlings of 'costeño' pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Bio Ciencias* 5: e356. <https://doi.org/10.15741/revbio.05.01.14>
- González-Peña D, Gómez G, Fernández A, Vaillant D, Falcón-Rodríguez AB. 2016. Actividad inhibitoria de un polímero de quitosana en el crecimiento vegetativo y la reproducción asexual de un aislado de *Phytophthora palmivora* Butler. *Revista de Protección Vegetal* 31: 99-106.
- Hassainia A, Satha H, Boufi S. 2018. Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 117: 1334-1342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.172>
- Holguin-Peña RJ, Vargas-López JM, López-Ahumada GA, Rodríguez-Félix F, Borbón-Morales CG, Rueda-Puente EO. 2020. Efecto de quitosano y consorcio simbiótico benéfico en el rendimiento de sorgo en la zona indígena "Mayos" en Sonora. *Terra Latinoamericana* 38: 705-714. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.669>
- Jiménez-Pérez O, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Espinoza-Ahumada CA, Castro del Angel E, Sanchez-Yañez JM. 2023. Antagonistic activity of *Pseudomonas donghuensis* and *Bacillus subtilis* for the management of "Damping off" phytopathogens of the chile crop. *Revista Bio Ciencias* 10: e1382. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1382>
- Martín-López H, Pech-Cohuo SC, Herrera-Pool E, Medina-Torres N, Cuevas-Bernardino JC, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Ramos-Díaz A, Trombotto S, Pacheco N. 2020. Structural and physicochemical characterization of chitosan obtained by UAE and its effect on the growth inhibition of *Pythium ultimum*. *Agriculture* 10: 464. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100464>
- Monter-Miranda JG, Tirado-Gallegos JM, Zamudio-Flores PB, Rios-Velasco C, Ornelas-Paz JJ, Salgado-Delgado R, Espinosa-Solis V, Hernández-Centeno F. 2016. Extracción y Caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15: 749-761.

- Ortega-Ortiz H, Gutiérrez-Rodríguez B, Cadenas-Pliego G, Jiménez LI. 2010. Antibacterial activity of chitosan and the interpolyelectrolyte complexes of poly(acrylic acid)-chitosan. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 623-628. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132010000300016>
- Palma-Guerrero J, Jansson H-B, Salinas J, Lopez-Llorca V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology* 104: 541-553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x>
- Pasotti VS, Avila SAJ, Martinelli M. 2020. Obtención de quitina y quitosán por método sustentable a partir de cáscaras de langostino. *Naturalia Patagónica* 16: 111-131.
- Pérez-Acevedo CE, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C, Enríquez VR, Villegas-Aparicio Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 281-293. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.50>
- Pérez-Madruga Y, Rosales-Jenquis PR, Costales-Menéndez D, Falcón-Rodríguez A. 2019. Combined application of chitosan and MF in corn yield. *Cultivos Tropicales* 40: e06.
- Ramírez-Benítez JE, Arjona RA, Caamal JH, Rodríguez NL, Solís SE, Lizama G. 2019. Inhibición del crecimiento y modificación genética de *Phytophthora capsici* usando quitosano de bajo grado de polimerización. *Revista Argentina de Microbiología* 51: 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.03.003>
- Reyes-Pérez JJ, Rivero-Herrada M, García-Bustamante EL, Beltran-Morales FA, Ruiz-Espinoza FH. 2020. Aplicación de quitosano incrementa la emergencia, crecimiento y rendimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de invernadero. *Biotecnia* 22: 156-163. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1338>
- Rodríguez-Pedroso AT, Bautista-Baños S, Ramírez-Arrebato MÁ, Plascencia-Jatomea M, Hernández-Ferrer L. 2021. Quitosano y sus derivados, polímeros naturales con potencial para controlar a *Pyricularia oryzae* (Cav.). *Cultivos Tropicales* 42: e15.
- Romero-Serrano A, Pereira J. 2020. Estado del arte: quitosano, un biomaterial versátil. Estado del arte desde su obtención a sus múltiples aplicaciones. *Revista Ingeniería UC* 27: 118-135.
- Sánchez-García BM, Ramírez-Pimental JG, Guevara-Acevedo LP, Raya-Pérez JC, Covarrubias-Prieto J, Mora-Avilés MA. 2019. Actinobacterias con potencial antagonico *in vitro* a hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento en plantas de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10: 339-344. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2033>
- Sedaghat F, Yousefzadi M, Toiserkani H, Najafipour S. 2016. Chitin from *Penaeus merguensis* via microbial fermentation processing and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 82: 279-283. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.070>
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR. 2017. Necrosis foliar; nuevo síntoma asociado a la pudrición de la raíz de Chile (*Capsicum annuum*) en Durango y Zacatecas, México. *Scientia Fungorum* 46: 47-53. <https://doi.org/10.33885/sf.2017.46.1176>
- Vieira ER, Antunes AA, Alviano CS, Alviano DS, Bergter EB, Luna MC, Da Silva ARF, Takaki GM. 2020. *Rhizopus arrhizus* ucp1295 como fonte econômica para produção de biopolímeros funcionais quitina e quitosana utilizando substratos renováveis. *Brazilian Journal of Development* 6: 76444-76456. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-170>
- Xoca-Orozco LA, Aguilera-Aguirre S, López-García UM, Gutiérrez-Martínez P, Chacón-López A. 2018. Effect of chitosan on the *in vitro* control of *Colletotrichum* sp., and its influence on post-harvest quality in Hass avocado fruits. *Revista Bio Ciencias* 5: e355. <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e355>