

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Obtención, identificación y evaluación de quitosano para la inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum***

**Diana Vanessa Pusedá Cuestas**

**Antonio León, Ph. D., Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Agroempresas

Quito  
Mayo 2014

**Universidad San Francisco de Quito**  
**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

Obtención, identificación y evaluación de quitosano para la inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*

**Diana Vanessa PUSDÁ CUESTAS**

Antonio León, Ph. D.  
Director de Tesis .....

Raúl de la Torre, Ph. D.  
Miembro de Comité de Tesis.....

Carlos Ruales, Msc  
Miembro de Comité de Tesis.....

Mario Caviedes C, Ms. Dr.  
Coordinador de Agroempresas .....

Ximena Córdova, Ph.D.  
Decana de la Escuela de Ingeniería.....

Quito Mayo 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----

Nombre: Diana Vanessa PUSDÁ CUESTAS

C. I.: 1719507806

Fecha: Quito, mayo 2014

## *Agradecimientos*

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas las cuales estuvieron dispuestas a ayudarme en cualquier duda que se presentó durante la elaboración de la misma.

Agradezco a todo el departamento que conforma el colegio de Agroempresas de la Universidad San Francisco de Quito, en especial a Antonio León por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. A Mario Caviedes por haberme ayudado en la evaluación estadística del presente estudio y haber sido una de las personas que me brindo constante asesoría para la elaboración del mismo. Y finalmente a mis profesores Eduardo Uzcategui, Raúl de la Torre y Carlos Ruales por todos los conocimientos impartidos durante mi formación profesional.

Al departamento de química de la Universidad San Francisco de Quito por haber permitido realizar una parte de la investigación en los laboratorios del respectivo colegio, en especial a Alexis Hidrobo y David Egas quienes estuvieron siempre dispuestos a contribuir con sus conocimientos para el desarrollo del tema.

Al equipo de tesistas que conforma parte del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos, ya que cada día dentro de los laboratorios además de ser un aprendizaje profesional continuo, es nuestro “segundo hogar” donde compartimos junto con ellos nuestras vivencias, gracias por todos esos ánimos y apoyo que nos brindamos constantemente.

## **Dedicatoria**

*Dedico a mi querida abuelita “Mi Ángel” con su ejemplo valeroso logro relucir y transformar el invierno en otoño, las tinieblas en luz, el trabajo arduo en fortaleza y satisfacción, por haberme inculcado el amor al campo y al magnifico mundo de la agricultura; por haber sido la persona quien creyó que una buena educación marca la diferencia. Gracias por todas esas lecciones de vida que aprendí junto a ti.*

*A mis padres, Rodrigo y Aida por haberme tenido confianza y permitirme terminar esta etapa; siendo un apoyo constante durante mi tiempo de formación profesional.*

*A mi hermana por ser un gran apoyo en todo este tiempo, habiendo estado conmigo en esos momentos de llanto, frustración y alegría.*

## Resumen.

Ecuador es uno de los principales países exportadores de camarón los cuales en su mayoría son procesados previo a la exportación. Los desechos de camarón generados por la industria camaronera es uno de los principales problemas de contaminación de aguas residuales. El objetivo principal de esta investigación fue usar los exoesqueletos de camarón desechados para la elaboración del quitosano, el cual es un biopolímero natural, biodegradable que dentro de la agricultura es usado para el control de ciertas enfermedades en cultivos como de vid, tomate, manzana, etc. En este estudio se desarrolló un método para la extracción de quitosano adecuado a las condiciones del laboratorio, a partir de los exoesqueletos del camarón crudo. De la misma manera, por medio de un espectro de absorción de luz infrarrojo se realizó una comparación entre los espectros obtenidos del quitosano comercial marca Aldrich y el quitosano obtenido, con el fin de evaluar la presencia de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano. Por otro lado, se procedió a realizar un ensayo *in vitro* para evaluar la inhibición en el crecimiento micelial de los fitopatógenos *Botrytis* y *Fusarium*, observándose que el quitosano obtenido en el laboratorio, sí interviene en el crecimiento micelial de los hongos previamente mencionados

**Abstract.**

Ecuador is one of the principal country's that exports shrimps; most of them are processed previous to export. The shrimps waste generated by the shrimp industry is one of the main problems of sewage contamination. The main objective of this investigation was use the shrimp exoskeleton discarded for the elaboration of chitosan, which is a natural, biodegradable polymer, in agriculture is used for the control of certain diseases in crops such as vine, tomatoes, apples, etc. In this study a method for the chitosan extraction suited to laboratory conditions was developed from the raw shrimp exoskeletons. Similarly by an infrared absorption spectrum of a comparison of the spectra obtained from Aldrich chitosan and chitosan obtained to evaluate the presence of the characteristic functional groups of the molecule was made chitosan. Also we proceeded to perform an in vitro assay to assess inhibition in micelial growth of *Botrytis* and *Fusarium* pathogens, it was observed that the chitosan obtained in the laboratory, does intervene in the micelial growth of fungi mentioned above.

## **I. INDICE**

I. ANTECEDENTES:	1
II. JUSTIFICACION:	9
III. OBJETIVOS	14
IV. HIPOTESIS	14
V. MATERIALES Y METODOS	15
Materia prima utilizada	15
Localización del experimento	15
VI. METODOS DE LABORATORIO	15
Extracción de quitina y quitosano	15
Acondicionamiento.	15
Desmineralización.	16
Desproteínización.	16
Obtención de quitosano a partir de quitina	16
Caracterización del quitosano mediante espectroscopia de IR	17
Análisis in vitro de la inhibición de los fitopatógenos frente a quitosano.	17
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
Método Estadístico	19
Tratamientos y valoración del crecimiento micelial	19
VIII. RESULTADOS	20
Caracterización e identificación del quitosano obtenido	20
IX. DISCUSION	35
X. CONCLUSIONES	38
XI. RECOMENDACIONES	39
XII. BIBLIOGRAFIA	40
XIII. ANEXOS	45
Obtención de la quitina	45
Obtención de quitosano a partir de la quitina	46
Método espectro IR	47
Análisis in vitro de la inhibición de los fitopatógenos frente a quitosano	48
Fusarium vs quitosano comercial Aldrich	49

Botrytis vs quitosano commercial Aldrich .....	51
Fusarium vs quitosano obtenido .....	53
Botrytis vs quitosano obtenido .....	55

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la quitina y quitosano .....	2
Figura 2. Ciclo de vida de Botrytis cinerea .....	7
Figura 3. Ciclo de vida Fusarium spp. en papa. ....	9
Figura 4. Comparación de los espectros de absorción obtenidos mediante espectroscopia de infrarrojos. Espectro verde es de la muestra comercial. Espectro rojo es de la muestra obtenida en el laboratorio. ....	20
Figura 5. Espectro de absorción de quitosano comercial aldrich (A) y quitosano obtenido (B). ....	21
Figura 6. Crecimiento micelial del F. oxysporum sobre diferentes concentraciones de quitosano comercial aldrich T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml. ....	24
Figura 7. Separación de medias de Tukey para la variable de crecimiento micelial de F. oxysporum en medios con quitosano de la marca comercial Aldrich. ....	25
Figura 8. Crecimiento micelial del F. oxysporum sobre diferentes concentraciones de quitosano obtenido en el laboratorio, T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml. ....	27
Figura 9. Separación de medias de Tukey para la variable de crecimiento micelial F. oxysporum en medios con quitosano obtenido. ....	28
Figura 10. Crecimiento micelial B. cinerea sobre diferentes concentraciones de quitosano comercial aldrich, T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml. ....	30
Figura 11. Separación de medias de Tukey para la variable Crecimiento Micelial B. cinerea en medios con quitosano de la marca comercial aldrich .....	31
Figura 12. Crecimiento micelial Botrytis sobre diferentes concentraciones. de quitosano T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml. ....	33
Figura 13. Separación de medias de Tukey para la variable Crecimiento Micelial B. cinerea en medios con Quitosano de la marca aldrich. ....	34

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales usos del quitosano dentro de la agricultura .....	10
Tabla 2. Grupos funcionales característicos del quitosano en las muestras control y obtenidas mediante extracción a partir de exoesqueleto de camarón. ....	22
Tabla 3 . ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial <i>F. oxysporum</i> en medios con quitosano de la marca comercial Aldrich. ....	25
Tabla 4. ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial <i>F. oxysporum</i> en medios con quitosano obtenido en el laboratorio. ....	28
Tabla 5. ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en medios con quitosano de la marca comercial Aldrich. ....	31
Tabla 6. ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en medios con quitosano obtenido en el laboratorio. ....	34

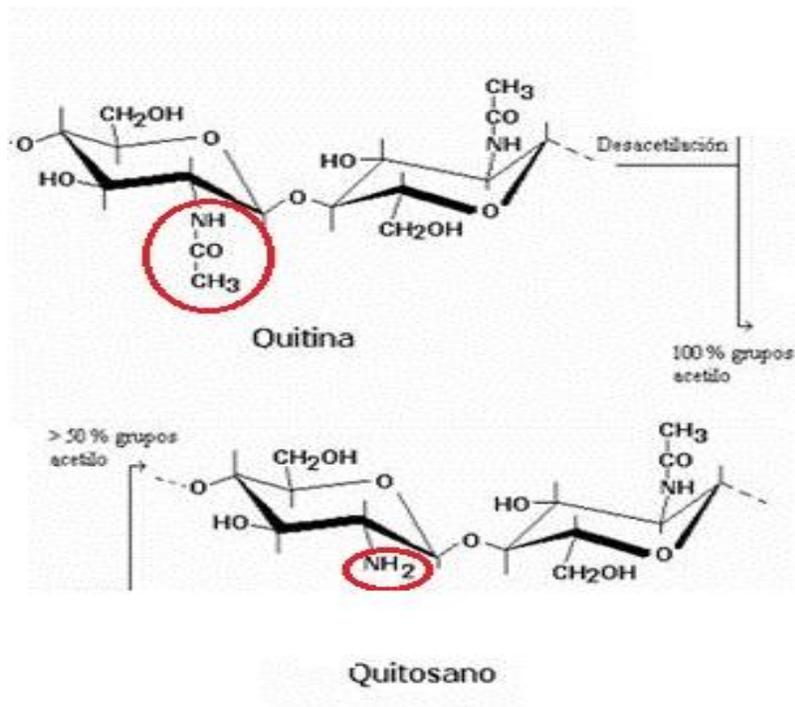
## **I. ANTECEDENTES:**

La quitina al igual que el quitosano son polímeros de origen natural que se clasifica dentro del tipo de polisacáridos. Estos son compuestos formados por la unión de muchos monosacáridos, los cuales se unen mediante enlaces glucosídicos, siendo muy característico de estos compuestos, el presentar un peso molecular muy elevado el cual depende del número de residuos o unidades de monosacáridos que participen en su estructura. Los polisacáridos cumplen funciones tanto de reserva energética como estructurales. La quitina forma parte del grupo de polisacáridos estructurales, los cuales participan en la construcción de estructuras orgánicas. Entre las más importantes tenemos a la celulosa, que es el principal componente de la pared celular en las plantas y a la quitina, que cumple el mismo papel en los hongos, además de ser la base del exoesqueleto de los artrópodos y otros animales emparentados [1].

La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, sólo superada por la celulosa. Se caracteriza por presentar una elevada tasa de regeneración natural; se estima que alrededor de  $1 \times 10^9$  toneladas de quitina se sintetizan y degradan cada año en la biosfera. La quitina pura es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro e insípido. La quitina tiene una estructura muy similar a la celulosa. La diferencia se encuentra en el carbono 2 que contiene un grupo acetamida en lugar de un grupo hidroxilo que presenta la celulosa (Figura 1). Otra característica importante es su elevada masa molecular, junto con su estructura porosa que le permite absorber mucha agua.

El quitosano es un subproducto obtenido a partir de un proceso de desacetilación de la quitina, el contenido de nitrógeno (N) en el quitosano es mayor al 7 %, y presenta una distribución regular de los grupos aminos libres, los cuales pueden ser adicionados de un protón por ciertos ácidos convirtiéndose en policationes. La diferencia entre ambos compuestos tal como se observa en la Figura 1 radica en la presencia del grupo amina en el quitosano y en la quitina la presencia de un grupo amida.

Esto le brinda la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras. De igual manera influye esta característica sobre su comportamiento floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de los aminos.



Fuente: (González, 2011)

Figura 1. Estructura de la quitina y quitosano

Otra propiedad importante del quitosano es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces de puentes de hidrógeno, lo cual le confiere una buena estabilidad térmica. De acuerdo a Sugimoto (1999), el quitosano se descompone aproximadamente a 170° C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces de puentes de hidrógeno [2].

En el quitosano el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98 % [3]. Sin embargo, también se ha reportado que para lograr una mayor actividad biológica, el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de un 40 % [4].

Las principales fuentes de quitina son múltiples ya que forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Cabe mencionar que los organismos en los que se encuentran en mayores cantidades, son en los exoesqueletos de crustáceos tales como camarones, cangrejos y langostas [5].

En múltiples estudios realizados se ha encontrado que el quitosano obtenido a partir de los hongos muestra múltiples ventajas desde la facilidad de obtención de materia prima hasta la estandarización de métodos. La quitina se encuentra principalmente distribuida en hongos Basidiomicetos, Ascomicetos, Zigomicetos y Ficomiceticos. La pared celular fúngica ocupa aproximadamente el 40% del volumen de la célula y es una capa gruesa, la cual rodea al protoplasto. Son pocos los polisacáridos presentes en la pared celular de los hongos, el glucano se encuentra en un 29% y la quitina entre un 25-30%. La función de la quitina en los hongos es dar una delineada y gruesa conformación a las células, así como dar una fuerza mecánica a la pared celular. Las cepas que han mostrado ser altamente eficientes

como fuente de quitosano son las especies *Mucor rouxii*, *Aspergillus niger*, y *Rhizopus orizae* [6].

Para realizar la extracción del quitosano a los exoesqueletos del camarón se debe someter a diferentes fases. La primera de acondicionamiento que consiste en la preparación y desinfección de la materia prima. Para esto se utiliza hipoclorito de sodio (debido a su mecanismo de acción sobre microorganismos y su acción como solvente de materia orgánica especialmente de ácidos grasos, a los que transforma en sales de ácidos grasos y en glicerol. De esta manera se reduce la tensión superficial de la solución. Además, neutraliza los aminoácidos formando agua y sales. De la misma manera mediante la reducción de iones de hidroxilo (OH) y la formación de agua, se reduce el pH estimulando de esta manera la presencia del ácido hipocloroso como solvente de materia orgánica [7]. Debido a que el principal componente inorgánico de los caparzones de los crustáceos es el carbonato de calcio, y en menor proporción está presente el fosfato de calcio, se hace necesario una fase de desmineralización mediante la cual son eliminados estos compuestos, empleando soluciones diluidas de ácido clorhídrico (0,3 a 2 M) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCOOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas altas, que provocan la degradación del polímero [8]. Por último, para la obtención de la quitina, se somete a una fase de desproteización, la cual puede ser química o enzimática. En el proceso químico los exoesqueletos de los crustáceos son tratados normalmente, con soluciones de hidróxido de sodio en concentraciones de 1 a 10%, a temperaturas entre los 65 y 100 ° C por períodos de 1 a 24 horas con el fin de remover la proteína. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos

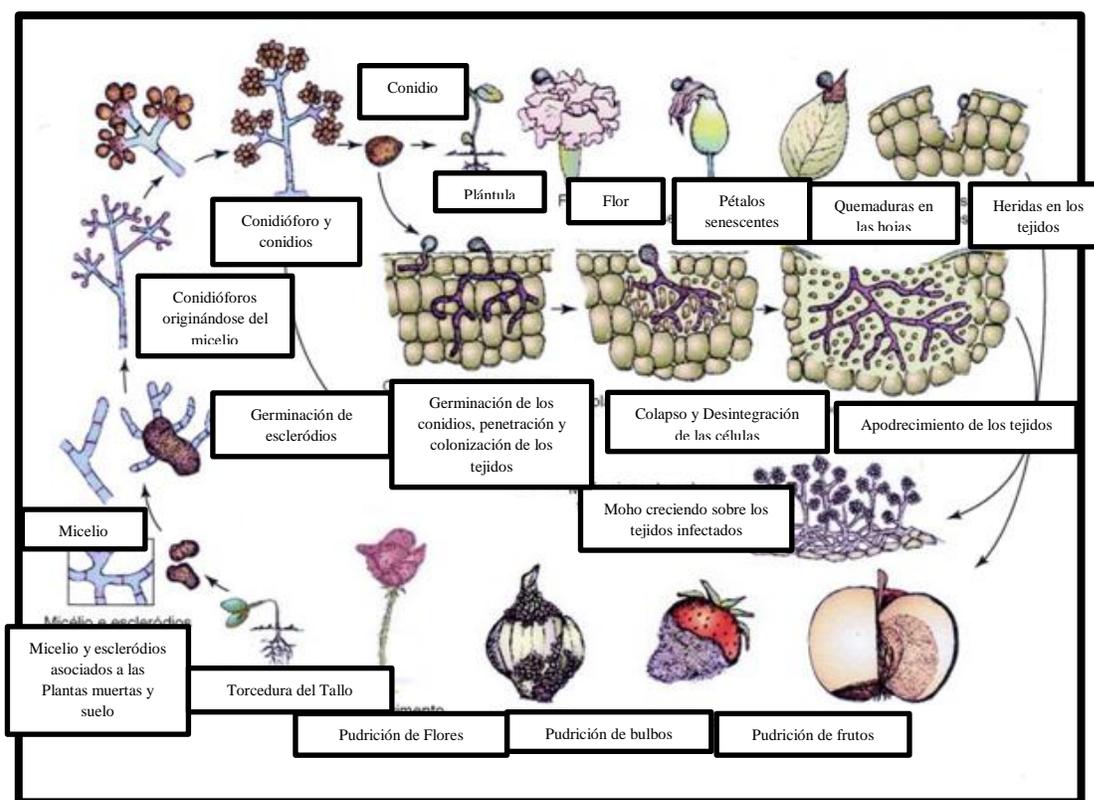
consecutivos por tiempos cortos. Se debe tener en cuenta que tratamientos en los cuales se necesita largos tiempo o temperaturas muy altas, pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero [8].

Actualmente se ha encontrado múltiples aplicaciones del quitosano en diferentes áreas, como lo son en Química analítica las aplicaciones en cromatografía, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc [5]. En Biomedicina se usa para las membranas de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc. En la Agricultura y ganadería se usa para el recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, formulación de pesticidas, etc. Para la industria del papel, textil, alimentaria es usada como soporte para inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, espesante en alimentos, agente de oxidación controlada, agente perseverante, etc. En Tratamiento de aguas se usa como agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas y spas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc [9].

También ha sido reportado el uso del quitosano en la agricultura para el control fitosanitario. Uno de los patógenos que tienen mayor sensibilidad a la aplicaciones de quitosano es el hongo necrotrófico *Botrytis*. Este organismo presenta dos fases, una sexual y otra asexual, siendo la segunda directamente responsable del desarrollo de la enfermedad ya que se encuentra fácilmente en el ambiente. El estado asexual se caracteriza por la proliferación

de hifas sobre el sustrato que coloniza hasta formarse el micelio, del cual se constituyen las tres estructuras básicas que son los macroconidióforos, microconidióforos y esclerocios. A partir de los macroconidióforos o conidióforos se forman cantidades elevadas de macroconidios o conidios, que son los que constituyen la principal estructura de propagación de la enfermedad, los cuales bajo condiciones adecuadas germinan y dan lugar a un nuevo micelio. En los microconidióforos se forman los microconidios, que actúan como gametos masculinos o espermacios en el proceso sexual. Por otro lado, los esclerocios son estructuras de resistencia que permiten soportar las condiciones desfavorables, haciendo que cuando estas son nuevamente adecuadas germinen y así den lugar a un nuevo micelio. El hongo *Botrytis* ataca principalmente a los órganos fructíferos siendo estos flores y frutos, aunque también origina pudriciones en los tallos, ahogamiento de las plántulas, manchas foliares y pudriciones de tubérculos, bulbos y raíces. Bajo condiciones de alta humedad relativa, se produce la germinación de los conidios desarrollándose un abundante micelio gris sobre los tejidos afectados. La infección y proceso de penetración del patógeno depende de varios factores, siendo los más importantes la existencia de condiciones ambientales como humedad y temperatura adecuada, junto con la madurez del tejido vegetal a colonizar. La vía de infección puede ser a partir de las heridas o de las flores. En los frutos conforme los tejidos se pudren, la epidermis se rompe y da lugar a numerosos cuerpos fructíferos, ocasionando de esta manera que los tejidos acaben arrugándose y deshidratándose, produciendo el hongo esclerocios aplanados de color negro sobre la superficie o hundidos en el tejido. El ahogamiento de las plántulas producidas por *Botrytis* ocurre sobre todo en climas fríos y con alta humedad, aunque también suele ocurrir cuando las semillas están contaminadas con esclerocios o bien cuando están presentes en el suelo [10]. El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas

y produce pérdidas considerables en cosechas que se han almacenado durante largos periodos de tiempo en temperaturas entre 0 y 10 °C. Las conidias que han germinado, rara vez penetran a través de las heridas o después de que se hayan desarrollado durante un tiempo y han formado micelio sobre pétalos de flores, follaje moribundo de las plantas, escamas de bulbos muertos, etc. Los esclerocios germinan produciendo filamentos miceliales que infectan al tejido [11].

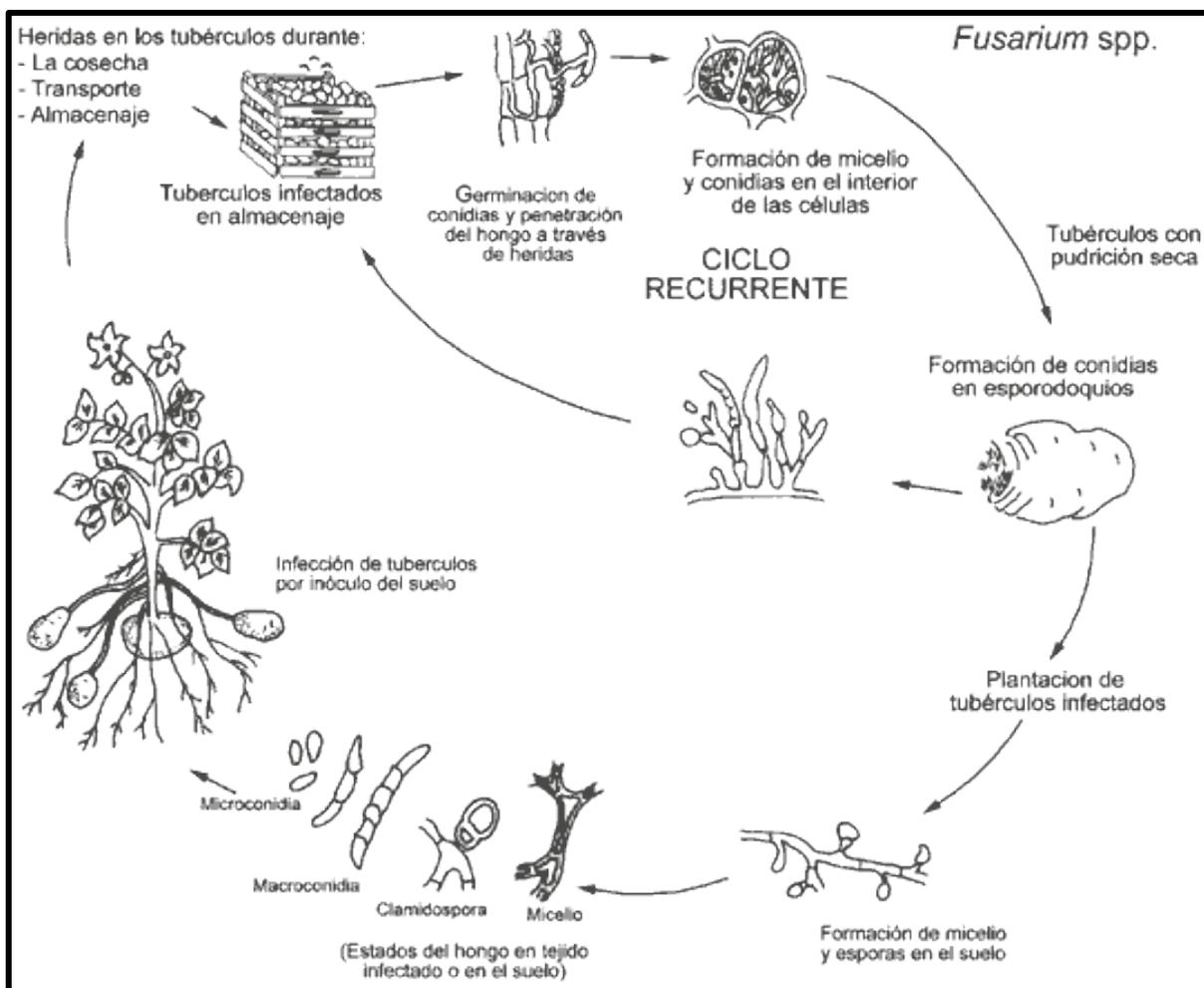


Fuente. (Töfoli, Ferrari, & all, 2011).

Figura 2. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*

Otro patógeno generalista de las plantas es *Fusarium oxysporum*. Las enfermedades debidas a *Fusarium* son enfermedades típicas del suelo, las cuales inician con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en tejidos muertos del hospedante, estos son estimulados por los restos vegetales infectados. Las clamidosporas pueden persistir de forma inactiva durante varios años y germinar al disponer de nutrientes,

por ejemplo en la proximidad de partes jóvenes de raíces. La clamidospora germinada da lugar a inóculo al formar hifas, conidios y nuevas clamidosporas. Las hifas del hongo pueden penetrar a través de las heridas hechas en forma mecánica o por nemátodos, insectos o miriápodos. Sin embargo, el método más común de penetración del patógeno es directo a través de las raíces, debido a esto, en la rizosfera hay una competencia intensa con otros microorganismos y en particular entre varias cepas de *Fusarium*. Una vez dentro de la planta, el hongo se mueve hacia el tejido vascular por colonización intracelular a los vasos del xilema, a los que invade cuando están maduras. La forma de colonización del patógeno puede darse por transporte pasivo de microconidias o por crecimiento del micelio. Las principales fuentes de diseminación del patógeno ocurre a partir de esquejes de plantas madres los cuales pueden estar infectados, a través del suelo contaminado, donde el hongo puede sobrevivir muchos años a través de las clamidosporas. El agua puede ser un agente de diseminación del hongo, debido a la capacidad de sobrevivir en este medio, muchas veces las esporas pueden germinar en ella y contaminar los reservorios. La temperatura es uno de los factores ambientales que tiene una mayor influencia en el desarrollo de la enfermedad, siendo la temperatura óptima para el desarrollo del patógeno entre 25 y 30 °C, una temperatura mínima de 5 °C y una máxima de 37 °C. La esporulación del hongo ocurre en temperatura de 20 y 25 °C, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. El pH óptimo es de 7.7 aunque puede desarrollarse entre 2.2 y 9.0. Una de sus características importantes es ser un hongo aerobio por lo que sus poblaciones se reducen con la saturación de agua en el suelo [3].



Fuente (ANCASH, 2008).

Figura 3. Ciclo de vida *Fusarium spp.* en papa.

## II. JUSTIFICACION:

Dentro de la agricultura las aplicaciones que tiene el quitosano son numerosas como se puede observar en la tabla 1, siendo usado como fungicida, nematocida e inductor de resistencia.

Uso	Bipolímero	Propiedades aprovechadas	Referencias	Cultivo
Películas para recubrimiento de frutos, hojas, semillas y vegetales frescos	Quitosano	Antimicrobiana	Galed <i>et al.</i> , (2004), Srinivasa <i>et al.</i> , (2004), Ratanachinakorn <i>et al.</i> , (2005) Hewajulige <i>et al.</i> , (2007), Devlieghere <i>et al.</i> , (2004)	Cítricos, mango, toronja, lechosa (papaya), fresa, tomate
Clarificación de jugos de fruta	Quitosano	Coagulante-Floculante	Chatterjee <i>et al.</i> , (2004), Boguslawski <i>et al.</i> , (1990), Root y Johnson, (1978), Hongfei y Hesheng, (2003)	Pera, toronja, limón, manzana
Protección de plántulas	Quitosano	Fungicida	Barka <i>et al.</i> , (2004); Lafontaine y Benhamou, (1996)	Uva de vino, tomate
Liberación controlada de agroquímicos	Quitina y quitosano	Formación de hidrogeles, labilidad de derivados	Mc Cormick <i>et al.</i> , (1982), Teixeira <i>et al.</i> , (1990), Hirano, (1978), Palma <i>et al.</i> , (2005)	Arándano
Estimulación del crecimiento	Quitosano	Bioestimulante	Nge <i>et al.</i> , (2006)	Orquídea
Inhibidor del oscurecimiento de frutos y tubérculos	Quitosano	Biocida	Waliszewski <i>et al.</i> , (2002)	Banana, papa
Biocidas	Quitosano	Antimicrobiana	Liu <i>et al.</i> , (2007), Hadwiger y McBride, (2006), Bautista-Baños <i>et al.</i> , (2006)	Tomate, papa, hortalizas
Corrección de sustratos de crecimiento	Quitina y quitosano	Fungicida, nematocida	Sneh y Henis, (1972), Abd-El-Kareem, (2002), Abd-El-Kareem <i>et al.</i> , (2002), Abd-El-Kareem <i>et al.</i> , (2004), Abd-El-Kareem <i>et al.</i> , (2006)	Lupino blanco (altramuz), guisante, tomate, papa, apio
Inductor de mecanismos de defensa	Oligómeros de quitina y quitosano	Inductor de resistencia	Khan <i>et al.</i> , (2003)	Soya

Fuente: (VELÁSQUEZ, 2008)

Tabla 1. Principales usos del quitosano dentro de la agricultura

Según la FAO las pérdidas dentro de cultivos frutales como hortícolas causadas por la presencia de *Botrytis cinerea* se estiman alrededor del 20% de la producción mundial de estos productos, equivalente a \$ 130 billones por temporada [12]. A pesar de que dentro del mercado mundial existen alrededor de 15- 25 millones de productos diferentes para el control de la *B. cinerea* y de los esfuerzos que se realizan tanto en etapas anteriores como posteriores a la cosecha, es insuficiente para el control de la enfermedad [13]. Esto se debe

principalmente a que *B. cinerea* ha desarrollado distintos niveles de resistencia a diferentes productos químicos, como los pertenecientes a los grupos dicarboximidas, anilino-pyrimidinas e hidroxi-anilidas, entre otros, debido a la aplicación indiscriminada de estos productos [14].

Entre los principales cultivos afectados por la *B. cinerea* se encuentran el cultivo de la uva, arándanos, fresas, manzanas y ornamentales. Por ejemplo, en el cultivo de uva en Chile produce entre \$252 y \$143 millones anuales de pérdidas por esta enfermedad por conceptos de exportación de uvas y arándanos respectivamente. En la fresa, este patógeno afecta alrededor del 95% de los frutos después de 48 horas de realizada la cosecha [15]. En manzana, la presencia de *B. cinerea* junto con otras enfermedades que se desarrollan ocasionan pérdidas anuales que superan el 5% por temporada[16].

*Fusarium oxysporum* es un hongo el cual parasita a más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas. Entre los principales cultivos que son afectados se encuentran: el banano, tomate, papa, trigo, etc. En el cultivo de banano, *F. oxysporum* también conocido como marchitamiento del banano o Mal de Panamá, es conocida como una de las enfermedades más importantes, las pérdidas económicas pueden llegar a ser de hasta el 100% en la mayoría de los países donde se planta estos cultivares. Debido a esto la variedad 'Gros Michel' (AAA), principal banano de exportación en los años 60 desapareció como consecuencia de esta enfermedad, más de 40000 hectáreas localizadas tanto en centro como en sur América fueron reemplazadas por la variedad del subgrupo Cavendish. En países como Malasia e Indonesia donde está presente la raza 4 de *F. oxysporum f. sp cubense* se ha reportado pérdidas a más de 8 millones de plantas en sistemas tradicionales y

a 500 ha de plantaciones comerciales de Cavendish, presentando pérdidas anuales que superan a los 75 millones de dólares [17]. En el cultivo de tomate la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y otras enfermedades relacionadas a la presencia de esta destruyen anualmente cerca del 35% de las cosechas, causando fuertes pérdidas económicas [18]. La fusariosis de la espiga (FET), causada por *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (*Fusarium graminearum* Schwabe y *Fusarium spp.*) es ocasional y provoca epifitias severas en 1 de cada 8 años aproximadamente. Es así que en Argentina en la provincia de Entre Ríos, se observó en los años 1993, 2000, 2001 y 2002, pérdidas en la producción superiores al 60% en ataques severos. A estas pérdidas debe sumarse la presencia de micotoxinas y la modificación de algunos parámetros que afectan la calidad comercial e industrial de los productos derivados de aquellos granos [19]. En el cultivo de papa la fusariosis es una enfermedad causada por diversas especies del género *Fusarium*, conocida también como marchitez, pudrición seca del tubérculo, pudrición del tallo o del pie. Existen más de 50 especies de *Fusarium* que atacan el cultivo de papa. En los almacenamientos con ambiente controlado, las pérdidas son mínimas, siendo estas (menos del 5%), mientras que en los almacenes comunes las pérdidas por pudriciones pueden alcanzar hasta un 80 % [20]. La fusariosis en la naranjilla también conocida como amarilladora, lancha amarilla o mal seco, es causada por el hongo *F. oxysporum* f. sp. *quitoense*, el cual reduce la vida útil de la planta en 50%. [21]

Debido a la contaminación ambiental ocasionada por el uso indiscriminado, a los daños causados a la salud y la resistencia a los diferentes productos químicos para el control de la *Botrytis* y *Fusarium*, hace que sea necesario desarrollar nuevas alternativas de control. Una alternativa poco explorada es el uso de productos orgánicos. El quitosano al ser un

polímero biodegradable, no tóxico, bioactivo que ha demostrado efectos fungicidas e induce a mecanismos de defensa en tejidos vegetales [22]. En este estudio, se mejoró el método de extracción de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón y se evaluó la actividad fungicida *in vitro* del producto obtenido frente a los fitopatógenos *Fusarium* y *Botrytis*.

### III. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Obtener, identificar y evaluar el quitosano para producir la inhibición de crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

- **Objetivos específicos**

Obtener quitosano a partir de exoesqueletos de camarón en base a protocolos previamente publicados.

Caracterizar el quitosano obtenido de fuentes naturales versus el comercial mediante la técnica de espectro de absorción Infrarroja (IR).

Analizar la inhibición *in vitro* de *B. cinerea* y *F. oxysporum* frente a diferentes dosis de quitosano.

### IV. HIPOTESIS

Los niveles de quitosano obtenidos mediante el protocolo de extracción a partir de los exoesqueletos del camarón presentarán los mismos grupos funcionales característicos del quitosano comercial al ser medidos por espectroscopia de IR.

El quitosano dentro de los diferentes medios de PDA inhibe el crecimiento de *B. cinerea* y *F. oxysporum*

## **V. MATERIALES Y METODOS**

### **Materia prima utilizada**

La materia prima utilizada fue el exoesqueleto del camarón procedente de la provincia de Guayas y Esmeraldas, y cuya recolección se realizó en el mercado de San Roque ubicado en la ciudad de Quito.

### **Localización del experimento**

La extracción del quitosano y el bioensayo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. Mientras que la caracterización y cuantificación química del quitosano se realizó en el Laboratorio de Química de la Universidad San Francisco de Quito.

## **VI. METODOS DE LABORATORIO**

### **Extracción de quitina y quitosano**

Se realizaron tres fases para la obtención de la quitina, previos a la extracción del quitosano.

#### **Acondicionamiento.**

Se limpiaron los exoesqueletos de cualquier resto de materia orgánica. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada. Se los lavó con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %. Finalmente se colocó los exoesqueletos se colocaron sobre papel toalla y se los incubó a una temperatura de 50 °C por un tiempo de 12 horas. Una vez secados los exoesqueletos, se procedió a transformarlos en harina por medio de un molino eléctrico, y se tamizó con el fin de obtener una harina fina.

**Desmineralización.**

Para llevar a cabo la desmineralización de la muestra, se pesaron 100 gramos de harina de camarón y se los colocó en 4 litros de ácido clorhídrico 2 N; la adición se realizó sobre una plancha con agitación constante y lentamente para evitar la efervescencia de la muestra. Se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente, para posteriormente decantar y proceder al lavado de la muestra con abundante agua hasta obtener un pH neutro. Posteriormente, se retiró la mayor cantidad de agua posible de la muestra por medio de decantación y se colocó la muestra sobre platos Petri para llevar a la incubadora a una temperatura de 50 °C por un tiempo de 12 horas.

**Desproteínización.**

Para llevar a cabo este proceso, la muestra se trató con 500 ml de hidróxido de sodio 2 N por 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se colocó la muestra en un rota-vapor por un periodo de 4 horas a una temperatura de 60°C. Por medio de la agitación constante se aseguró una correcta deproteínización. Finalmente, se lavó la muestra con abundante agua hasta que está se vuelva neutra antes de realizar un último lavado con alcohol y proceder a colocarla en la incubadora a una temperatura de 50°C por un tiempo de 12 horas.

**Obtención de quitosano a partir de quitina**

La obtención del quitosano fue basada en los protocolos de Zapata et al. (2008) [23] y Escobar et al. (2013) [24]. Para esto, se pesaron 20 gramos de quitina y se la trató con una solución de hidróxido de sodio al 60 % en una relación 1:10 sólido-líquido, a una temperatura de 100°C por una hora con agitación constante. Finalmente, la muestra obtenida fue filtrada y lavada con abundante agua, para luego ser colocada en una incubadora a una temperatura de 50°C por un tiempo de 12 horas.

### **Caracterización del quitosano mediante espectroscopia de IR**

La medición de los niveles de quitosano presentes en la muestra se realizó por medio del espectro de absorción de IR. Para preparar la muestra se siguió el protocolo establecido previamente [25]. Se tomó la muestra y se la colocó en un mortero donde junto con aceite de inmersión se aplastó hasta formar una masa. Se añadió la muestra dentro de una placa de NaCl, teniendo cuidado de que no se formen burbujas, posteriormente, se procedió a colocar otra placa de cloruro de sodio sobre la que contenía la muestra y a realizar pequeños movimientos para lograr que la muestra se disperse en los platos.

Finalmente, se situó la muestra en el espectro de absorción de infrarrojos para realizar la medición de longitud de onda. Los valores que se usaron fueron de 700 a 4000 nm. Se realizaron 50 lecturas del espectro de absorción con el fin de calcular un promedio con todos los valores obtenidos y de esta manera obtener una imagen más nítida.

### **Análisis in vitro de la inhibición de los fitopatógenos frente a quitosano.**

Para la realización de este ensayo se usó un protocolo ya establecido por Muñoz (2010) [25].

Se realizaron 5 tratamientos con diferentes dosis de quitosano. Se realizó 4 repeticiones por cada tratamiento.

Para la solución madre se pesaron 2 gramos de quitosano los cuales fueron disueltos en 100 ml de HCl al 2 % , La solución fue calentada a una temperatura de 120 ° C hasta que llega la ebullición y se disuelva totalmente el quitosano presente. Las dosis de quitosano usadas fueron, para el tratamiento 1 (1mg/ml) se dispensaron 5,5 ml de la solución madre en 104,5 ml de PDA; para el tratamiento 2 (2 mg/ml) se dispensaron 11 ml de la solución madre en

99 ml de PDA; para el tratamiento 3 (5 mg/ml) se dispensaron 27.5 ml de la solución madre en 82,5 ml de PDA y para el tratamiento 4 (10 mg/ml) se dispensaron 55 ml de la solución madre en 55 ml de PDA.

Se usó 80 cajas Petri, las cuales fueron lavadas en agua y desinfectadas con alcohol, para luego ser autoclavadas a una temperatura de 120°C por una hora.

Se procedió a pesar 58.5 gramos de agar papa dextrosa (PDA) y se colocó en 1500 ml de agua para luego calentarlo en una plancha a una temperatura de 120°C, bajo agitación constante hasta ebullición. Estos medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120°C por 20 minutos. Una vez que el medio PDA se encontró a temperatura ambiente, se agregara las soluciones de quitosano correspondientes a cada tratamiento.

Se colocó en cada caja Petri un volumen final de 25 ml de las soluciones anteriormente preparadas. Se procedió a replicar en cada una de las cajas las dos especies de hongos fitopatógenos de *B. cinerea* y *F. oxysporum* obtenidos del banco del laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. De una caja madre, se tomó una muestra con la ayuda de un bisturí, se cortó y se la a la respectiva caja. Este procedimiento se repitió para cada tratamiento y para cada hongo. Finalmente, se los incubó a una temperatura de 24°C por 4 días, para luego proceder a medir el crecimiento micelial de los hongos (diámetro en cm).

## **VII. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **Método Estadístico**

Para llevar el análisis de la información obtenida se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA). “Cuando las unidades experimentales no son homogéneas, la variación entre estas puede enmascarar los verdaderos efectos de los tratamientos. En estos casos debe utilizarse el modelo conocido como bloques completos al azar, el cual es analizado con el ADEVA” [26]. Se utilizó este diseño para detectar las diferencias como respuesta a los tratamientos en estudio, lo que permitió analizar los resultados acerca de la influencia del quitosano sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *F. oxysporum* respectivamente. Para determinar diferencias entre medias de tratamientos se utilizó la Prueba de Tukey al 5%. El coeficiente de variación (CV), que mide la precisión del experimento realizado, también fue calculado. Este se expresa como porcentaje, y refleja la variación existente respecto a la media. El CV no debe superar el 20% para experimentos en el campo dada la alta variabilidad de los diferentes ambientes. Mientras que en experimentos controlados no debe ser mayor que el 5%. Cuando los valores del CV son más altos que los rangos indicados, estos reflejan una alta variabilidad en los datos, lo que reduce la precisión del experimento [26].

### **Tratamientos y valoración del crecimiento micelial**

La toma de datos del bioensayo se la realizó durante 6 días para la medición del crecimiento micelial de la *B. cinerea*, y durante 6 días para la medición del crecimiento micelial del *F. oxysporum*. Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento. Las

disoluciones usadas fueron de: 1mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, disueltas en PDA (Agar dextrosa papa).

La variable evaluada fue el crecimiento micelial de los hongos utilizados en cada una de las cajas con diferentes concentraciones de quitosano, estos datos fueron cuantificados en cm.

## VIII. RESULTADOS

### Caracterización e identificación del quitosano obtenido

Una vez obtenido el quitosano mediante el protocolo previamente descrito en materiales y métodos, se midió el espectro de absorción del compuesto obtenido mediante Espectroscopia IR como se puede observar en el Figura 4. Aquí se aprecia las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano, como son los grupos aminos e hidroxilos los cuales difieren entre la molécula de quitina y quitosano (Tabla 2). Por tanto se puede concluir que la molécula aislada por el método previamente descrito, es efectivamente quitosano. Al realizar la comparación de los espectros de absorción obtenidos (Figura 5) se observa como el quitosano obtenido en el laboratorio presenta un mayor nivel de grupos funcionales, debido a esto podemos concluir que al omitir el proceso de decoloración estamos contribuyendo a que exista un mayor nivel de grupos funcionales.

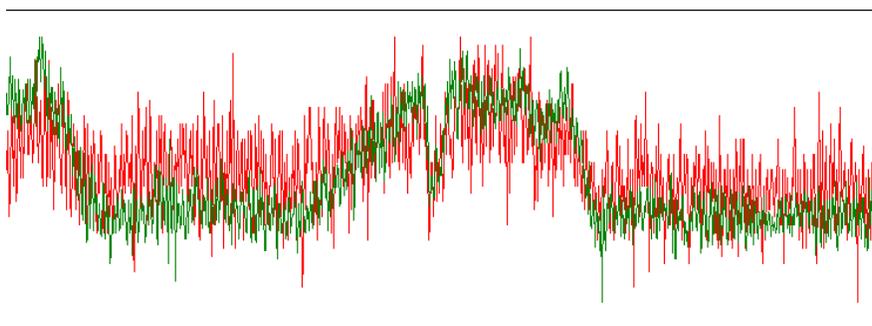
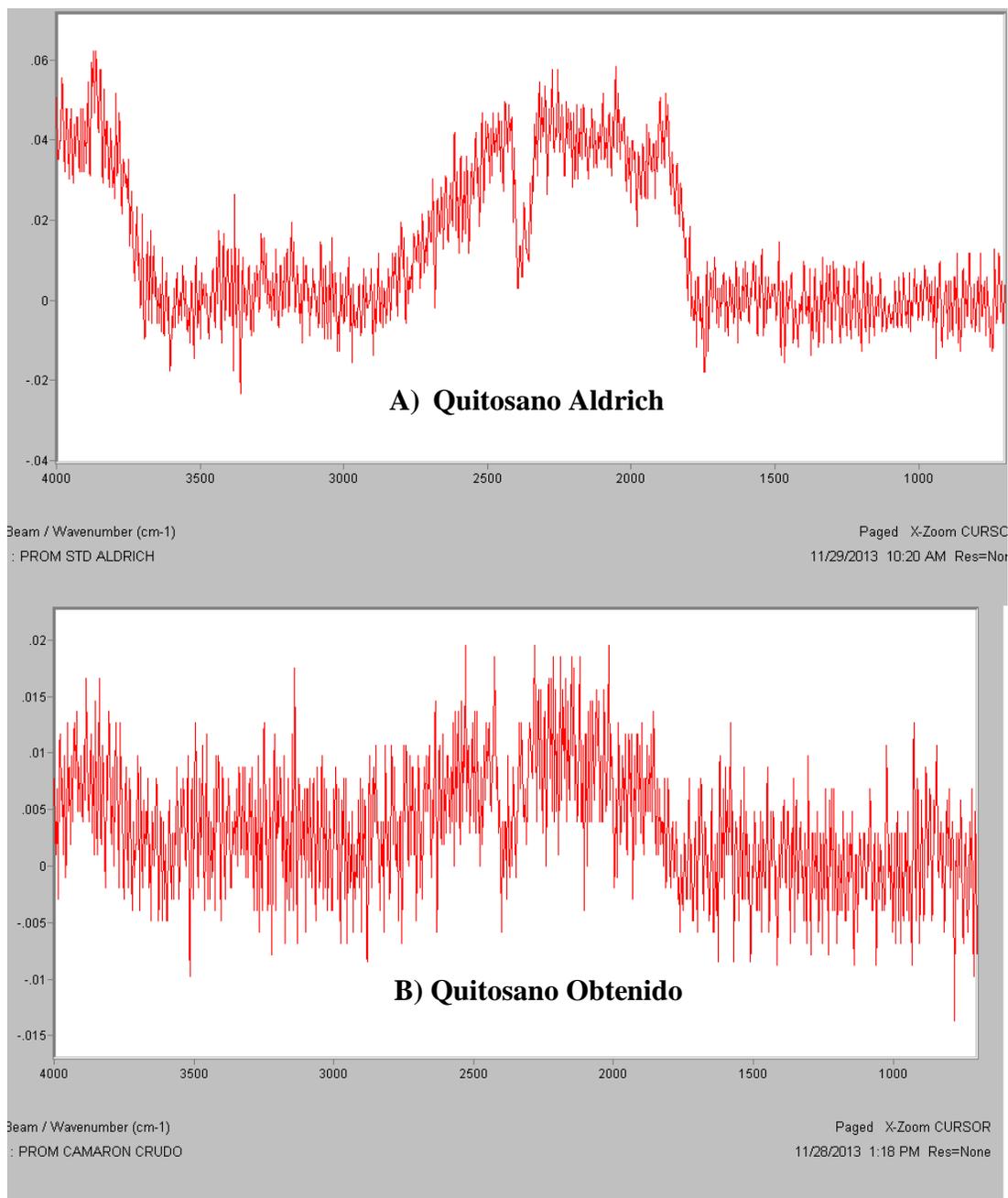


Figura 4. Comparación de los espectros de absorción obtenidos mediante espectroscopia de infrarrojos. Espectro verde es de la muestra comercial. Espectro rojo es de la muestra obtenida en el laboratorio.



**Figura 5. Espectro de absorción de quitosano comercial aldrich (A) y quitosano obtenido (B).**

<b>Grupo Funcional</b>	<b>Longitud de onda. referencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Longitud de onda. Quitosano Comercial Aldrich (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Longitud de onda. Quitosano Obtenido (cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>Grupo –OH</b>	3450	3451,69	3459
<b>Grupo N-H</b>	3292	3293,05	3293
<b>Grupo C-H</b>	2919 y 2862	2913 y 2861,41	2913 y 2861,41
<b>Amida I</b>	1655	1655	1655
<b>Doblaje del grupo –NH<sub>2</sub></b>	1580	1311,94	1588
<b>Amida III</b>	1313	1312	1312
<b>Tensión asimétrica del C -O-C</b>	1154	1157	1153
<b>Vibraciones de su estructura piranósica</b>	1082 y 1032	1086 y 1031	1087 y 1031
<b>Tensión C –H de grupos anoméricos</b>	896	895	899

(Fuente: Rodríguez, et al. 2010)

Tabla 2. Grupos funcionales característicos del quitosano en las muestras control y obtenidas mediante extracción a partir de exoesqueleto de camarón.

### **Efecto del quitosano sobre crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *F. oxysporum***

Para evaluar el efecto de la inhibición de quitosano sobre el crecimiento de *Fusarium* después de 4 días de pasar en la incubadora, se realizó un ensayo *in vitro* donde tanto el quitosano comercial marca Aldrich como el quitosano obtenido del laboratorio fueron distribuidos en medios de cultivo PDA a diferentes concentraciones, y así se midió el

crecimiento radial de este patógeno durante 6 días. Se obtuvo un valor F calculado para tratamientos de 64.29 superiores al valor F tabular de 3.48

Según los resultados del ADEVA obtenidos con el quitosano comercial marca Aldrich, en relación al crecimiento micelial del hongo frente a distintos tratamientos, se encontró que si existen diferencias en la inhibición del crecimiento (Figura 7). Mediante la prueba de separación de medias de Tukey, se determinó que los tratamientos T2 (2 mg/ml), T3 (5 mg/ml) y T4 (10 mg/ml) fueron estadísticamente iguales y mostraron los más altos niveles de inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum*. Sin embargo T1 (1 mg/ml), y Control (0 mg/ml) no mostraran diferencia estadística significativa entre ellos y exhibieron los valores más bajos en la inhibición de crecimiento. De la misma manera se observa que los tratamientos T2, T3, T4 inhiben completamente el crecimiento micelial del hongo, a diferencia de T1 que inhibe parcialmente el crecimiento micelial del mismo. Estos resultados presentan una diferencia significativa  $P \leq 0.05$  entre las dosis de quitosano comercial empleadas mediante Tukey al 0.05% (Grafico 6).

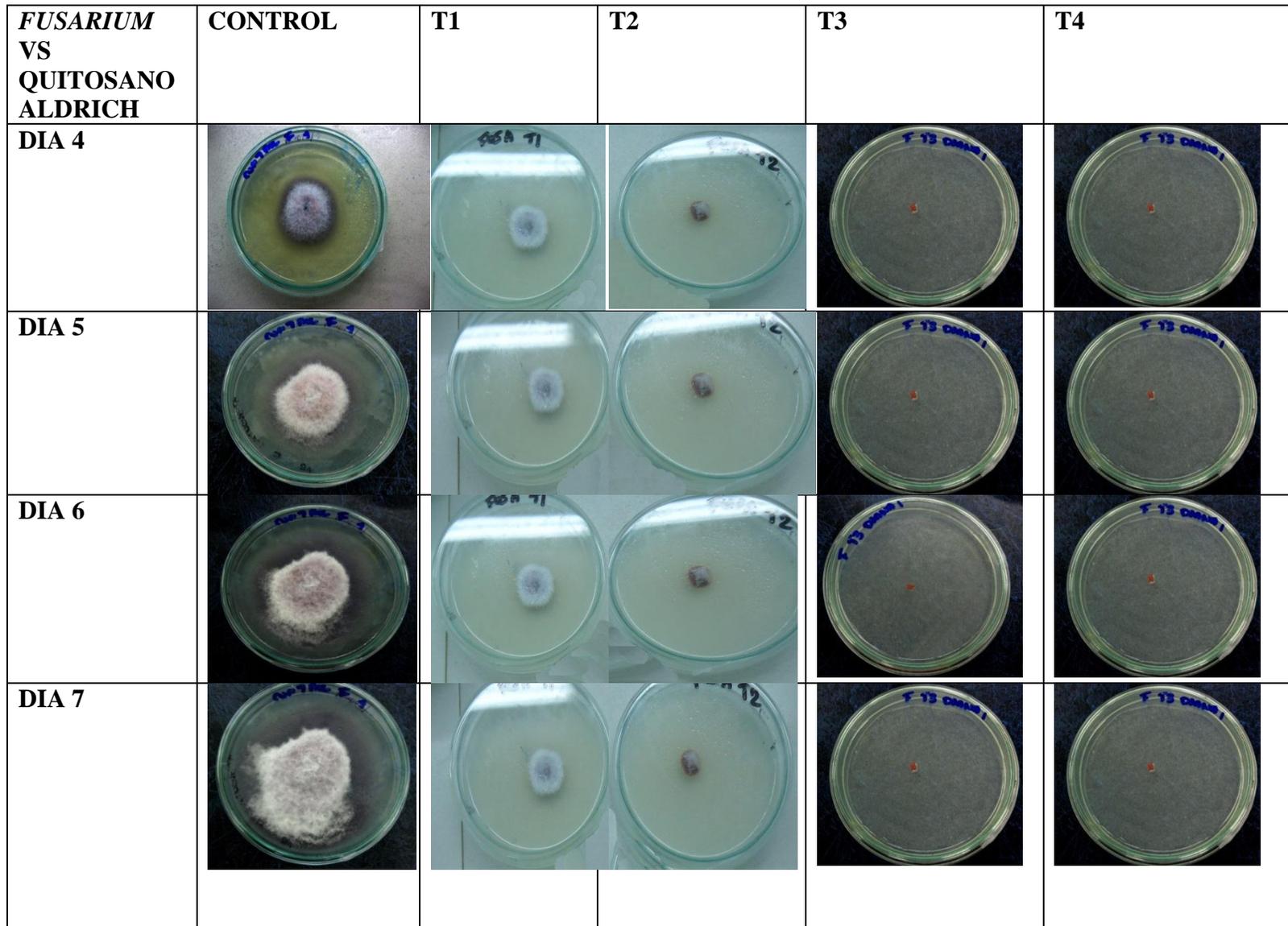
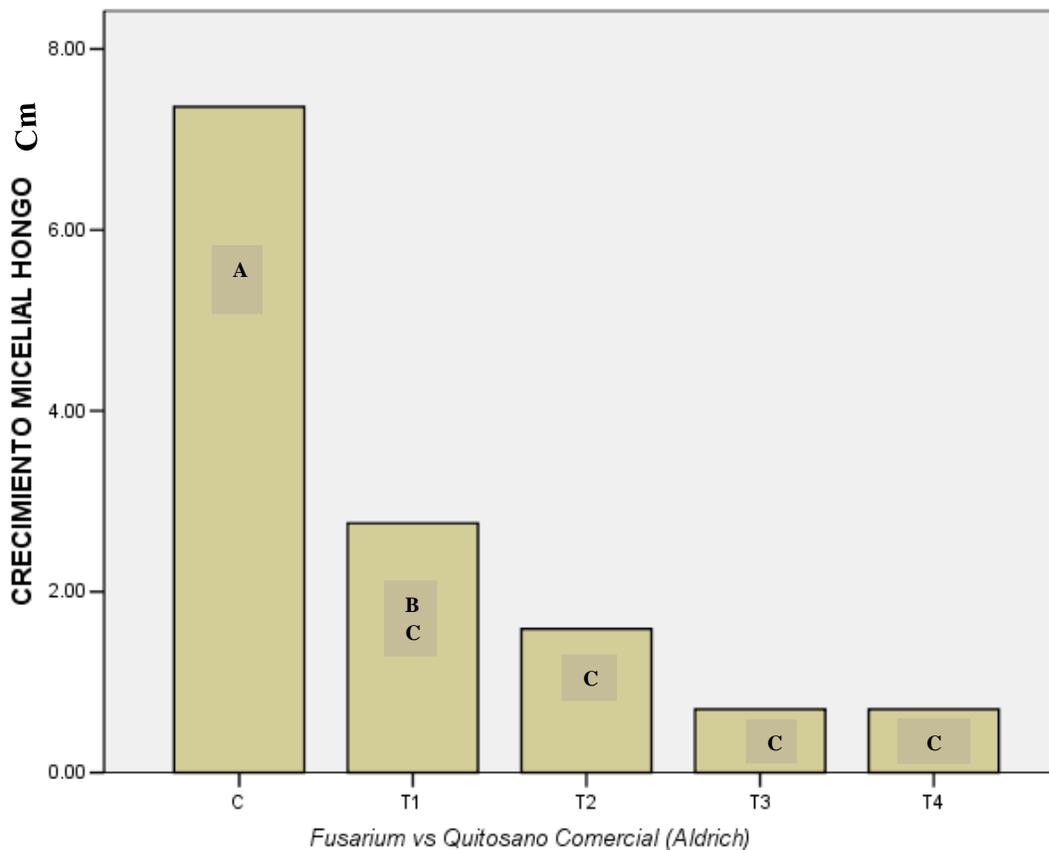


Figura 6. Crecimiento micelial del *F. oxysporum* sobre diferentes concentraciones de quitosano comercial aldrich T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml.

FV	GL	SC	CM	FC	FT
<b>TOTAL</b>	19	162,84	-	-	
<b>BLOQUES</b>	5	3,81	0,76	1,58	
<b>TRATAMIENTOS</b>	5	154,69	30,93	64,29	3,48
<b>ERROR EXP</b>	9	4,33	0,48		

CV= 0,99%      Sy= 2,55      Sd= 2,60

Tabla 3 . ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial *F. oxysporum* en medios con quitosano de la marca comercial Aldrich.



Tukey = 1,4725

Figura 7. Separación de medias de Tukey para la variable de crecimiento micelial de *F. oxysporum* en medios con quitosano de la marca comercial Aldrich. .

Por otro lado, en la valoración de la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* con el quitosano obtenido, el ADEVA reveló una diferencia significativa en la supresión de crecimiento micelial del hongo de los distintos tratamientos (Figura 9). Los resultados obtenidos señala que no existe una diferencia significativa entre las medias de las dosis de quitosano obtenido empleadas, mediante Tukey al 5% (Figura 8). Mediante la prueba de separación de medias de Tukey, se determinó que los tratamientos T3 (5 mg/ml), T4 (10 mg/ml), T2 (2 mg/ml), T1 (1 mg/ml) fueron estadísticamente iguales y mostraron los niveles más altos de inhibición del patógeno. De la misma manera se observa que los tratamientos T4, T3, T2, T1 inhiben completamente el crecimiento micelial del hongo en relación al control.

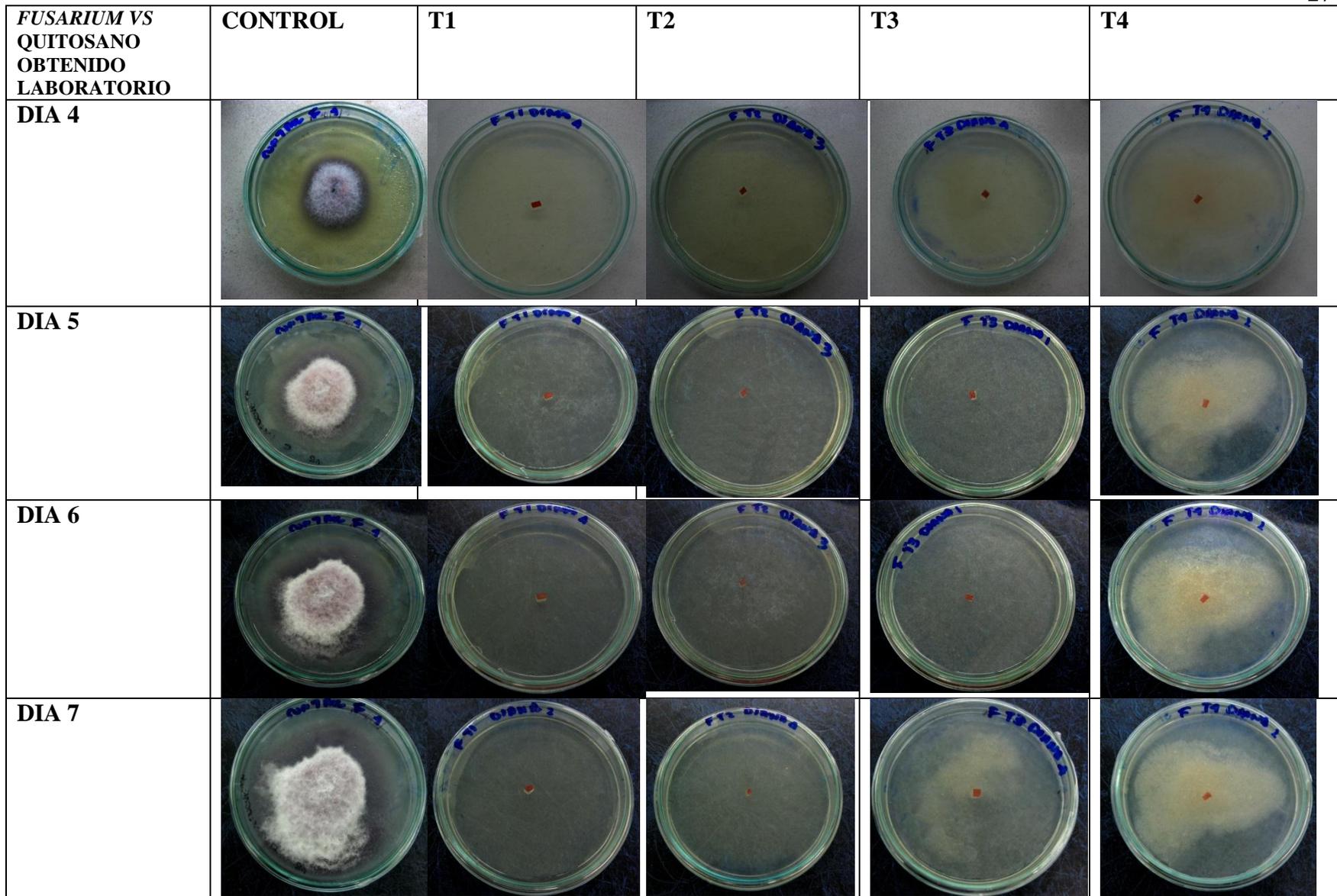


Figura 8. Crecimiento micelial del *F. oxysporum* sobre diferentes concentraciones de quitosano obtenido en el laboratorio, T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml.

FV	GL	SC	CM	FC	FT
<b>TOTAL</b>	19	139,89	-	-	
<b>BLOQUES</b>	5	1,71	0,34	0,45	
<b>TRATAMIENTOS</b>	5	131,33	26,26	34,53	3,48
<b>ERROR EX</b>	9	6,85	0,76		

CV= 1,29%                      Sy= 2,37                      Sd= 2,41

Tabla 4. ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial *F. oxysporum* en medios con quitosano obtenido en el laboratorio.

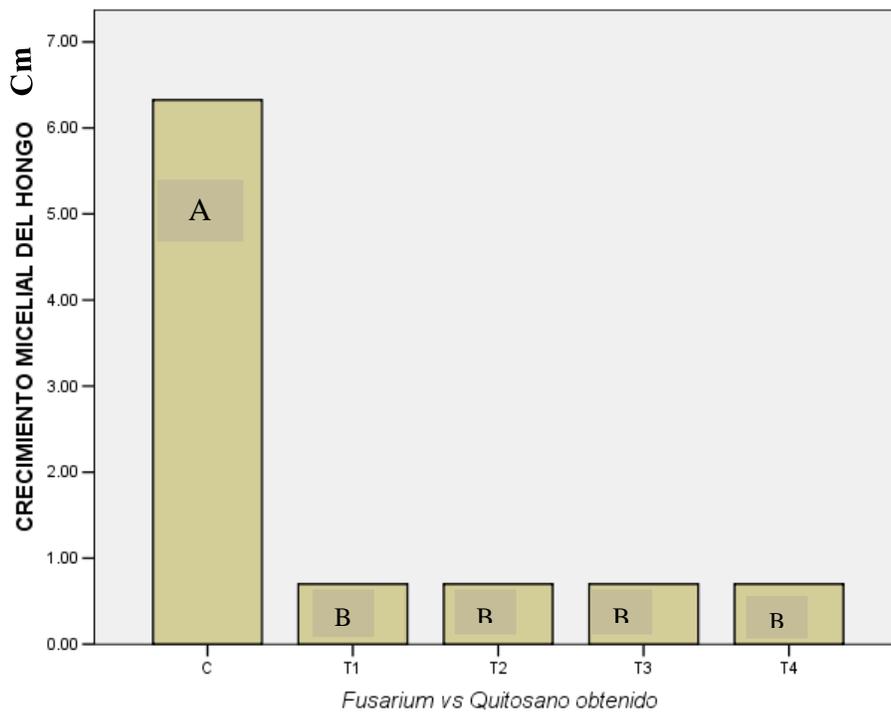


Figura 9. Separación de medias de Tukey para la variable de crecimiento micelial *F. oxysporum* en medios con quitosano obtenido.

Tukey = 1,66

### **Efecto del quitosano sobre crecimiento *in vitro* del fitopatógeno de *B. cinerea***

Para ver el efecto de la inhibición de quitosano sobre el crecimiento de *B. cinerea*, se realizó un ensayo *in vitro* donde tanto el quitosano comercial como el quitosano obtenido del laboratorio, fueron comparados para evaluar el crecimiento radial de este patógeno durante un tiempo de 4 días. Según los resultados obtenidos en el ADEVA (Tabla 5) se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el crecimiento micelial del hongo de los distintos tratamientos (Figura 10). De igual forma, mediante la prueba de separación de medias de Tukey, se determinó que los tratamientos T3 (5 mg/ml), T4 (10 mg/ml) fueron estadísticamente iguales. Sin embargo los tratamientos T1 (1 mg/ml), T2 (2 mg/ml), Control (0 mg/ml) sí presentaron diferencias significativas. De la misma manera, se observa que los tratamientos T3, T4 inhiben completamente el crecimiento micelial del hongo, a diferencia de T1 y T2 que inhiben parcialmente el crecimiento micelial del mismo.

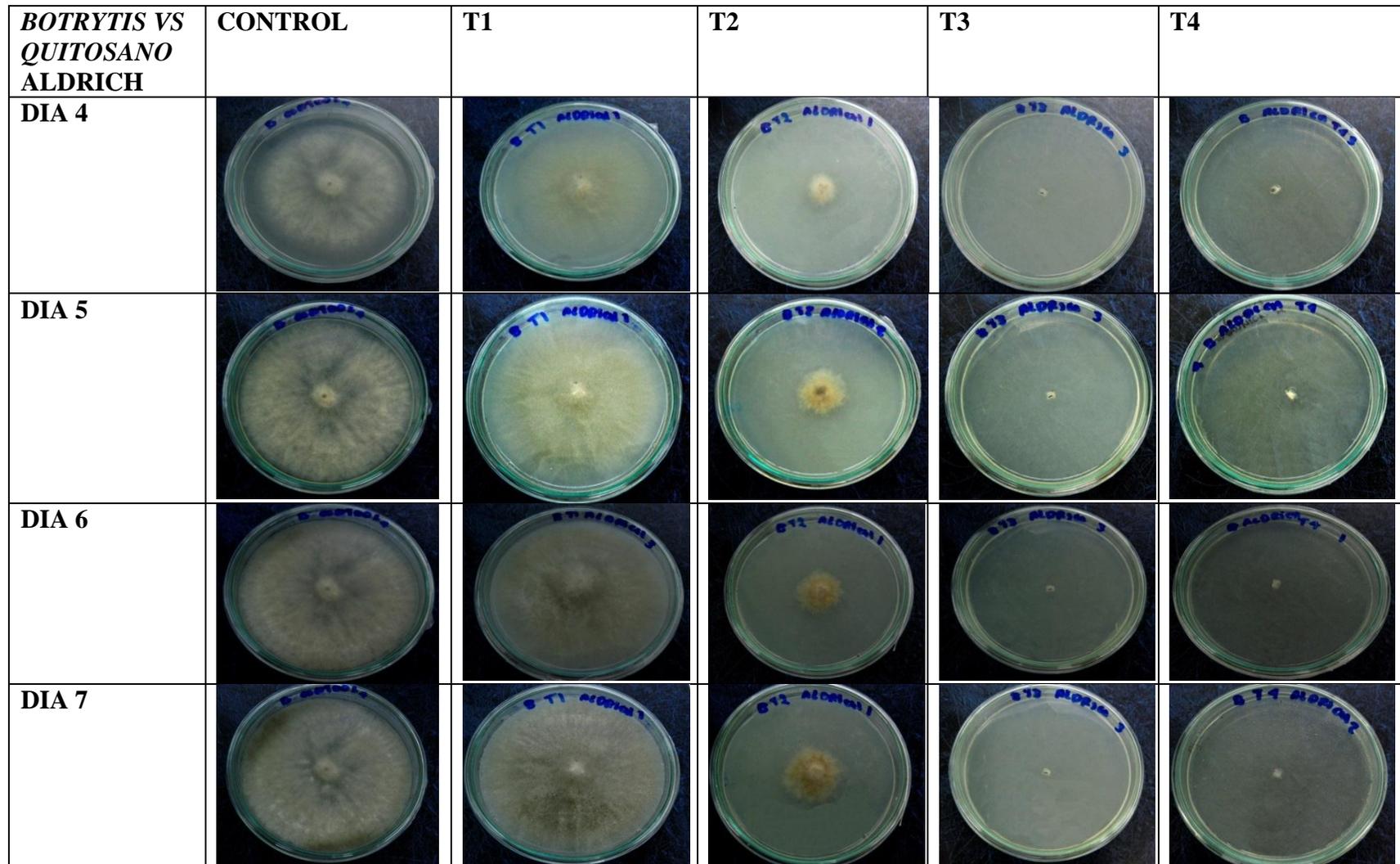


Figura 10. Crecimiento micelial *B. cinerea* sobre diferentes concentraciones de quitosano comercial aldrich, T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml.

FV	GL	SC	CM	FC	FT
<b>TOTAL</b>	19	320,08	-	-	
<b>BLOQUES</b>	5	5,95	1,19	2,03	
<b>TRATAMIENTOS</b>	5	308,85	61,77	105,38	3,48
<b>ERROR EXP</b>	9	5,28	0,58		

CV= 0,86%

Sy= 3,58

Sd= 3,65

Tabla 5. ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial *B. cinerea* en medios con quitosano de la marca comercial Aldrich.

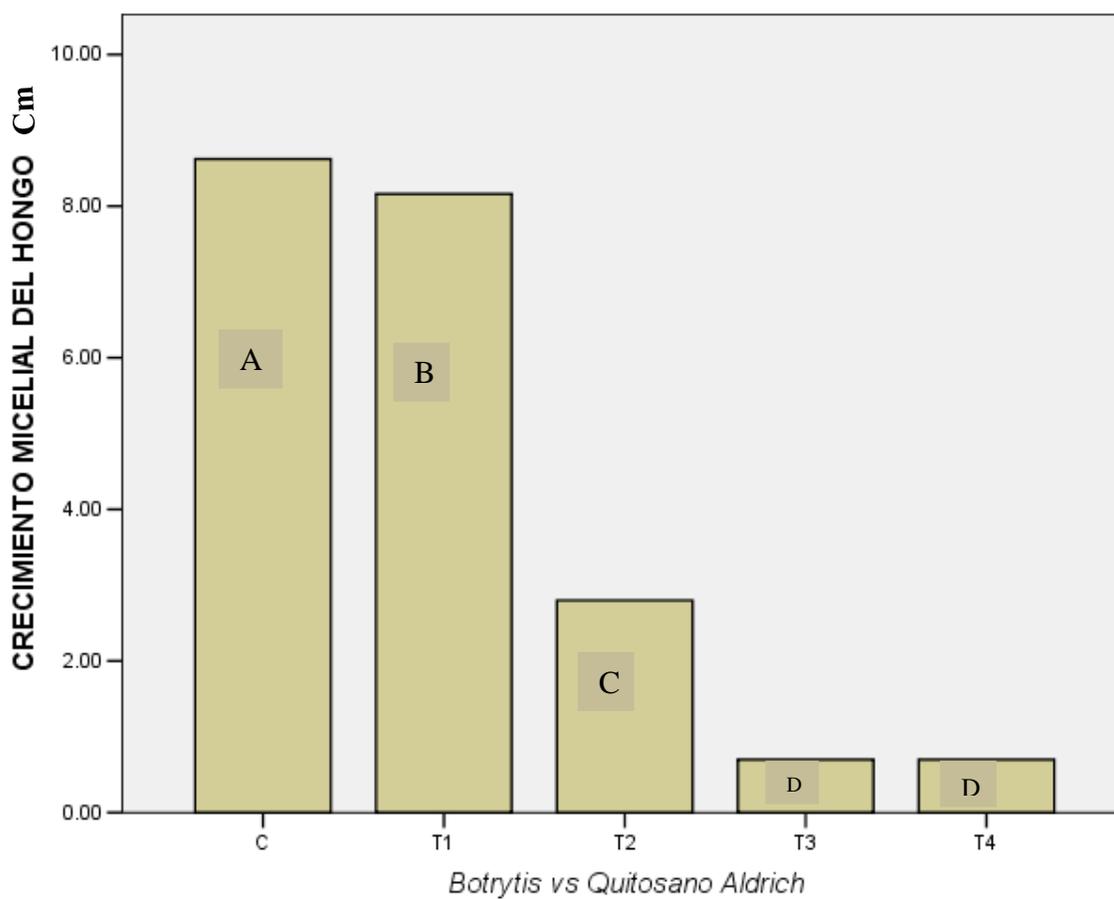


Figura 11. Separación de medias de Tukey para la variable Crecimiento Micelial *B. cinerea* en medios con quitosano de la marca comercial aldrich

Tukey = 1,615

Por otro lado, una vez realizado el ADEVA (Tabla 6), en la valoración de la inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis* con el quitosano obtenido se obtuvo una diferencia significativa en los distintos tratamientos (Figura 13). Mediante la prueba de separación de medias de Tukey al 5%, se determinó que los tratamientos T3 (5 mg/ml), T4 (10 mg/ml) fueron estadísticamente iguales, mientras que T2 (2 mg/ml), T1 (1 mg/ml) y Control (0 mg/ml) si presentaron una diferencia estadística entre ellos. De la misma manera se observa que los tratamientos T4, T3 inhiben completamente el crecimiento micelial del hongo en relación al Control a diferencia de T1 y T2 que inhiben parcialmente el crecimiento micelial del mismo.

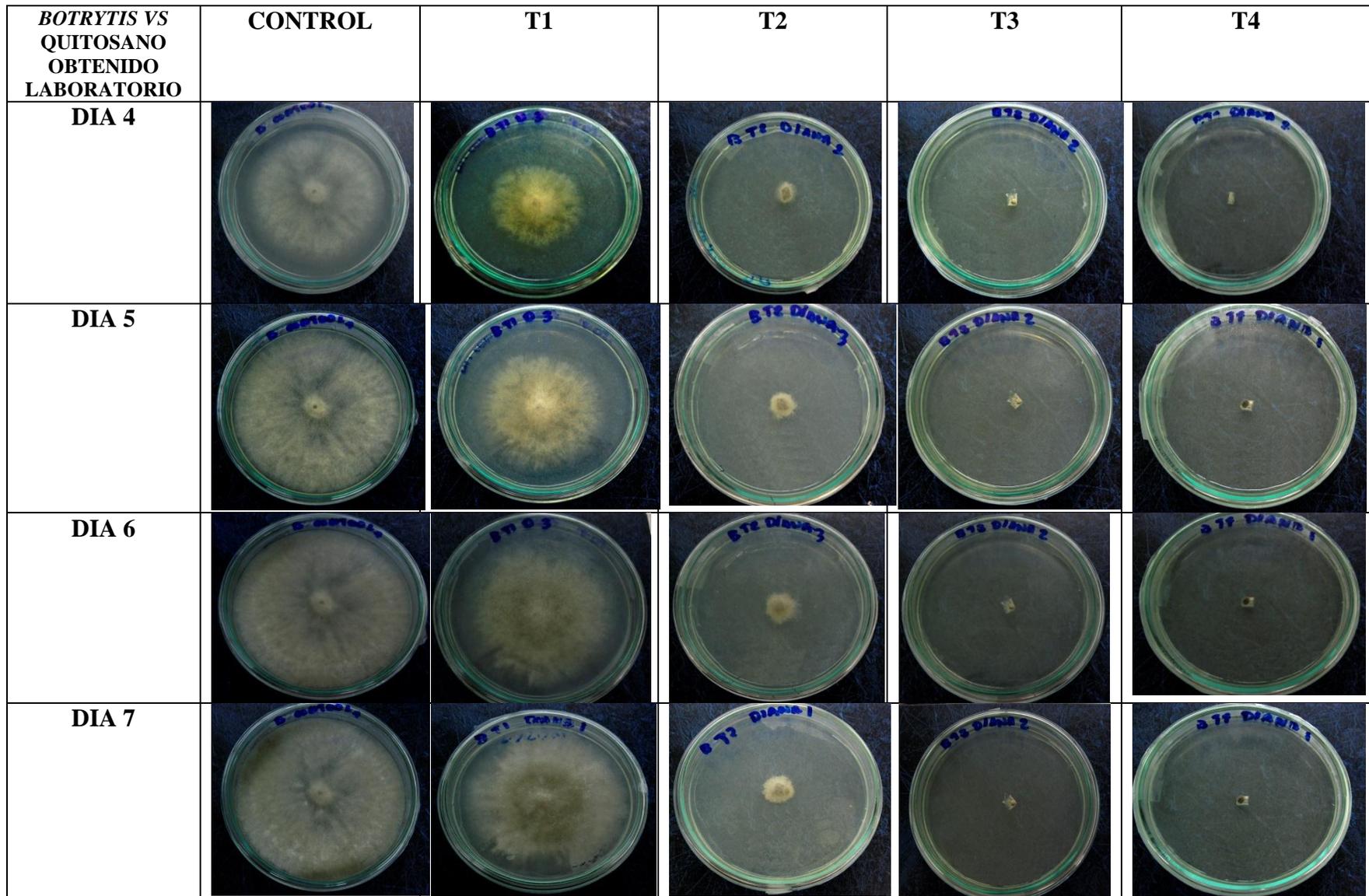


Figura 12. Crecimiento micelial *Botrytis* sobre diferentes concentraciones. de quitosano T1 es igual a 1mg/ml, T2 es igual a 2 mg/ml, T3 es igual a 5 mg/ml y T4 es igual a 10 mg/ml.

FV	GL	SC	CM	FC	FT
TOTAL	19	311,17	-	-	
BLOQUES	5	6,38	1,27	1,48	3,48
TRATAMIENTOS	5	297,03	59,40	68,96	
ERROR EXP	9	7,75	0,86		

CV= 0,94%

Sy= 3,52

Sd= 3,60

Tabla 6. ADEVA correspondiente a la variable crecimiento micelial *B. cinerea* en medios con quitosano obtenido en el laboratorio.

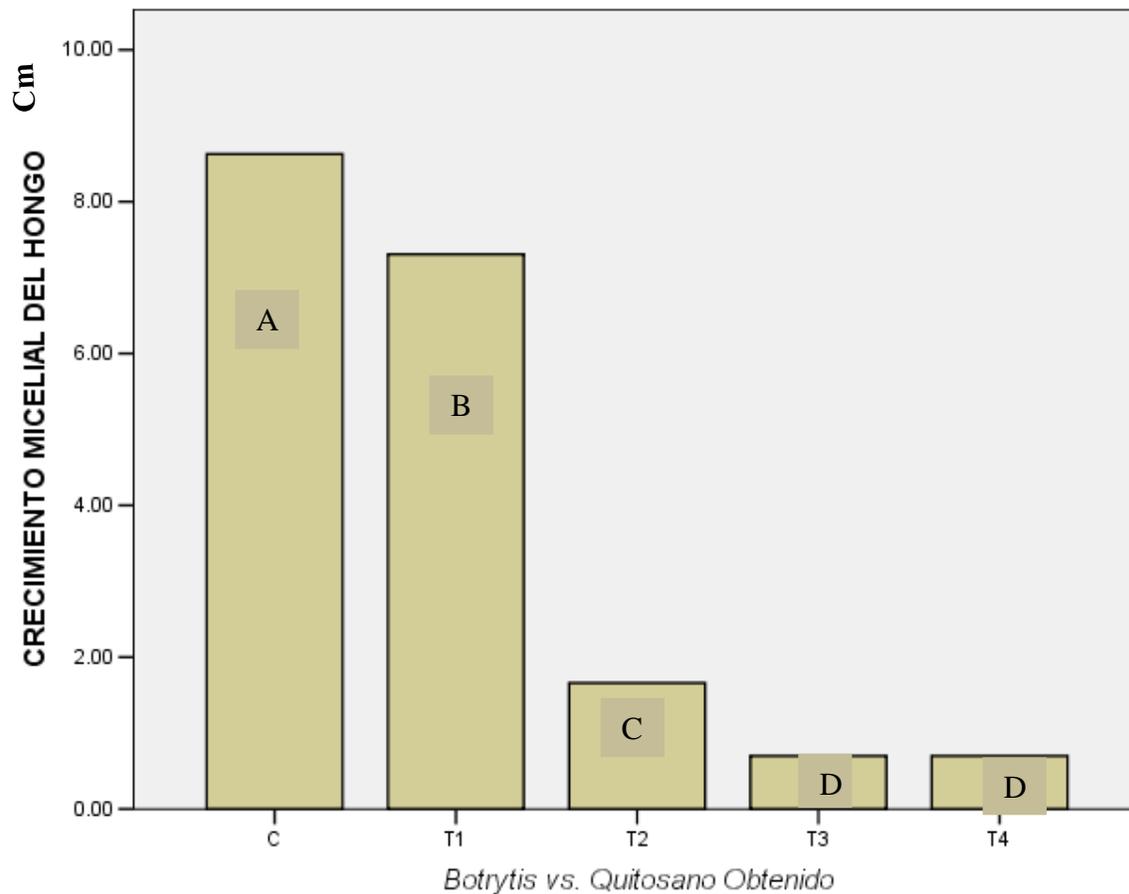


Figura 13. Separación de medias de Tukey para la variable Crecimiento Micelial *B. cinerea* en medios con Quitosano de la marca aldrich.

Tukey = 1,947

## IX. DISCUSION

Actualmente es de gran importancia desarrollar alternativas amigables al ambiente para el control de las principales enfermedades en las plantas, las cuales reemplacen a los agroquímicos que son usados para reprimir, eliminar, prevenir a las plagas de insectos y animales que son los principales vectores en la transmisión de enfermedades [27]. Algunas de estas alternativas pueden surgir como subproducto de desechos de industrias alimenticias, como es el caso del quitosano. El quitosano fue descubierto como polímero biodegradable presente en los exoesqueletos de los crustáceos como el camarón, presentando en estudios previos una acción fungicida. En este estudio se mejoró el método de obtención del quitosano de acuerdo al protocolo establecido por Zapata et al. (2008) [22]. Los cambios se realizaron a fin de adaptó a las condiciones del laboratorio donde se realizó la extracción. Para llevar a cabo la desproteización de la muestra se usó un rotavapor para que la muestra se encuentre en baño María con agitación constante durante 4 horas. El proceso de decoloración se omitió debido a que no se considera que sea importante e influya en la obtención final del quitosano, esto pudo ser comprobado al momento de realizar el espectro de absorción IR en el cual se observa que el quitosano obtenido tiene mayor presencia de compuestos básicos comparados con el quitosano comercial de marca Aldrich. De igual manera, en el proceso de obtención del quitosano a partir de la quitina en lugar de usar un equipo de reflujo se usó una estufa a una temperatura de 100 ° C por 1 hora, siguiendo el protocolo de Escobar et al. (2013) [23]. Según Barron (2012) [24] en la guía práctica para la medición del quitosano donde se señala como alternativas posibles para realizar un espectro de absorción el uso de mull de

nujol o a través de la preparación de pellets, siendo ambas metodologías útiles para realizar la espectroscopia de IR. En el estudio realizado se decidió usar la metodología de IR a partir de la preparación de mulls de nujol en lugar de los pellets debido a que tanto la metodología se adapta bien a la cantidad de materia prima obtenida.

Según estudios realizados por Cocolletzi et al. (2009) [28] sugiriendo que a partir de exoesqueletos de camarón fue obtenido quitosano como producto final, sugiriendo que una buena fuente de quitosano sería el uso de desechos de restaurantes. Sin embargo en el presente estudio se evaluó la extracción de quitosano a partir de desechos previamente sometidos a diferentes tiempos y formas de cocción, al momento de realizar la medición a partir del espectro de absorción por medio de IR se obtuvo que los niveles de quitosano presentes eran nulos, por lo que se pudo concluir que la extracción debe realizarse a partir de desechos crudos que no hayan sido sometidos a ningún tipo de cocción y estén libres de cualquier tipo de residuo de materia orgánica.

Según varios estudios realizados se conocen varias hipótesis sobre el mecanismo de acción del quitosano sobre los patógenos vegetales, es así que se le atribuye características de inducción de una respuesta bioquímica de defensa en el hospedero, formación de barreras estructurales de defensa, conservación de frutas y hortalizas durante el almacenamiento.

Por otro lado el quitosano tiene su efecto fungicida y directo sobre el fitopatógeno. Se ha observado que frente a hongos como *B. cinerea* actúa produciendo daños citológicos en las hifas invasoras, encontrándose que en hifas tratadas con quitosano presentaban varios grados de desorganización celular los cuales ocasionaban una pérdida en la consistencia de la célula la cual llegaba hasta la degradación del citoplasma, a diferencia de las hifas que no

fueron tratadas las cuales conservaron su apariencia normal [9]. En frutas almacenadas como las fresas y cerezas tratadas con recubrimientos de quitosano se observó que existía un incremento en la actividad de las enzimas quitinasas y  $\beta$  1-3 glucanasas, además de observarse una reducción en la enfermedad causada por *B. cinerea*. De la misma manera se ha podido comprobar que la presencia de quitosano en relación a *F. solani* mejora la expresión de los genes involucrados en la resistencia de la planta es así que varios autores han demostrado que el quitosano influye en los cambios morfológicos de las esporas como lo son área, longitud y forma, de acuerdo al tratamiento y/o tiempo de incubación , comparados con las esporas no tratadas, relacionando directamente la concentración de quitosano con el nivel de inhibición del crecimiento micelial[29] . Los resultados obtenidos en el bioensayo *in vivo*, realizado para observar la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y *F. solani* demuestran que el quitosano comercial tanto como el obtenido inducen a la supresión del crecimiento micelial de los hongos en las diferentes concentraciones empleadas, llegando a inhibir completamente el crecimiento micelial del mismo en ciertas concentraciones. En el presente estudio , la inhibición del crecimiento de *Botrytis* con el quitosano comercial fue completo en los tratamientos con una concentración de 5 y 10 mg/ml. Una inhibición parcial se observó en el tratamiento de la concentración de 2mg/ml en relación al control. Para el quitosano obtenido se observa una inhibición completa en concentraciones de 5 y 10 mg/ml y una parcial en el tratamiento de 2 mg/ ml. Sin embargo, el nivel de inhibición del crecimiento micelial en el tratamiento de 2 mg/ ml fue mayor que el evaluado con el comercial. En otros estudios, realizados para evaluar la eficacia de productos alternativos en el control de pudriciones de post-cosecha de manzanas, el producto Biorend SC (ingrediente activo al quitosano) mostró un porcentaje de inhibición del 80,05% a una concentración de 250 ml/L [30]. De igual manera en estudios previos

sobre la inhibición del quitosano sobre *F. oxysporum*, se evaluó el uso de quitosano en diferentes concentraciones para observar si existe o no inhibición en el crecimiento del mismo, obteniéndose resultados de inhibición de un 82.3 % en concentraciones de 2.0 mg/ml al quinto día de incubación [30], En este estudio, en el quitosano comercial se observó una inhibición total del tratamiento de 5 mg/ml, mientras que en el quitosano obtenido, la inhibición fue evidente a partir del tratamiento con la concentración de 1mg/ml, siendo este superior al nivel de inhibición en relación al comercial.

El quitosano obtenido podrían ser una herramienta importante para el control de enfermedades del campo y postcosecha, además de considerarse una alternativa valiosa para reducir la contaminación de aguas residuales para así utilizar esa materia prima valiosa.

## **X. CONCLUSIONES**

Los espectros de absorción del quitosano obtenidos mediante el protocolo de extracción a partir de los exoesqueletos del camarón si presentan los grupos funcionales característicos del quitosano.

En el ensayo *invitro* realizado se observa que el quitosano dentro de los diferentes medios de PDA si inhibe el crecimiento de *B. cinerea* y *F. oxysporum*

## XI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio para cuantificar la concentración del quitosano obtenido a partir de este protocolo.
- Ejecutar estudios de campo con las mismas concentraciones de quitosano usadas *in vitro* para verificar la inhibición de crecimiento sobre los hongos evaluados.
- Probar el quitosano como inductor de resistencia en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Desarrollar un mejor protocolo que permita una disolución que resulte en una menor cantidad de residuos en el quitosano obtenido en el laboratorio.

## XII. BIBLIOGRAFIA

1. Audersik,T; Audersik,G; Byers, E. 2008. “ Que son los carbohidratos”, en: “*Biología la vida en la tierra*”, G. A. TERESA AUDERSIK, PEARSON: MEXICO, pp. 40-41-42
2. Pedroso, A.T; Ramirez,A.M; Rivero,D; Bosquez,E; Barrera,L.L; Bautista,S. 2009. “Propiedades Quimico- Estructurales y actividad biologica del quitosano en microorganismos fitopatogenos. *Caracteristicas del Quitosano*” *Redalyc*, 15(3): <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912186012>
3. Garcés, E.; Orozco, M; Bautista,R; Valencia, H. 2001. “Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer ” *Acta Biologica Colombiana*, 6(1): <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF's/V6N1/Art1V6N1.pdf>
4. Hernández, H. 2004. “LA QUITOSANA: UN PRODUCTO BIOACTIVO DE DIVERSAS APLICACIONES”. *Redalyc*, 25(3): <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193217916014.pdf>
5. Velásquez, L. C. (2003). “ Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, 4 (2): <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/ABR03/Cristobal2003.pdf>
6. Becerra, J. M., Urdiales, B. V.,Aguilar, N.C; Martinez, L.J; Contreras, C.J; Cuellar, C.A. 2011. “*Quitosán fúngico: fuentes y propiedades*”. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5): <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM5/fuentes.pdf>
7. Estrela, C., Estrela, A; Barbin, L; Spanó, C; Marchesan, A; Pécora, D. 2002. “*Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite*”. *Faculty of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil*, 13(2): [http://www.forp.usp.br/bdj/bdj13\(2\)/v13n2a07/v13n2a07.html](http://www.forp.usp.br/bdj/bdj13(2)/v13n2a07/v13n2a07.html)
8. Machado, A. 2012. “Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservacion de frutillas y moras”, Universidad Central del Ecuador, Tesis de ingeniería Química: Quito
9. Mármol, Z; Páez, G; Rincón, M; Araujo, K; Aiello, C; Chandler, C; Gutiérrez, E. 2011. “*Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones*”. *Revista Tecno científica URU*, 1(Julio-Diciembre): [http://www.researchgate.net/profile/Cateryna\\_Aiello-](http://www.researchgate.net/profile/Cateryna_Aiello-)

Mazzarri/publication/235431334\_Quitina\_y\_Quitosano\_polmeros\_amigables.\_Una\_revisin\_de\_sus\_aplicaciones/file/32bfe51195a2862f9e.pdf

10. Angel, M. 2010. “ *Botrytis cinerea Pers. Bases epidemiológicas y control*”. *Fungicides Andean Region Bayer S.A. 1(5)*: [http://www.metroflorcolombia.com/rev/art/BOTRYTIS%20CINEREA%20BASES%20EPIDEMIOLOGICAS%20Y%20CONTROL%20\(BAYER\).pdf](http://www.metroflorcolombia.com/rev/art/BOTRYTIS%20CINEREA%20BASES%20EPIDEMIOLOGICAS%20Y%20CONTROL%20(BAYER).pdf)
11. La Torre, B.A; Rioja, M.E; Lillo, C. “ *Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por Botrytis cinerea en flores y bayas de uvas de mesa*”. *Departamento de Fruticultura y Enología, Ponticia Universidad Católica de Chile, 6(3)*: [http://www.revistaenologia.com/include/leer\\_pdf.php?id=76](http://www.revistaenologia.com/include/leer_pdf.php?id=76)
12. BIOCENSA. 2013. *Botrytis cinerea*, “Un enemigo presente en nuestros campos. Enlace: <http://controldebotrytis.wordpress.com/2013/04/03/botrytis-cinerea-un-enemigo-presente-en-nuestros-campos/>. Fecha de consulta: 16 marzo 2014
13. Poveda, D. 2006. “ *Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de (Lycopersicon esculentum)*”, Pontificia Universidad Javeriana. Tesis microbiología industrial: Bogotá.
14. Cid, P.; Auger, J; Ramos, C; Esterio, M. 2011. “ *Frecuencia de resistencia multidroga (MDR) de Botrytis cinerea en las principales zonas productoras de uva de mesa en Chile*”. *Depto. de Sanidad Vegetal, Fac. de Cs. Agronómicas, Universidad de Chile. 4 (1)*: <http://www.sochifit.cl/pdf/XX.pdf>
15. Wang, A.; Chaves, N. 2004. “ *Combate del moho gris (Botrytis cinerea) de la fresa mediante Gliocladium roseum*”. *Agronomía Costarricense, 28(2)*: [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v28n02\\_073.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v28n02_073.pdf)
16. Soto, S. 2003. “ *Evaluación de la aplicación en postcosecha del fungicida "PYRIMETHANIL" vía termonebulización en el control de Botrytis Cinerea en Manzana C.V. FUJI*”. Universidad de TALCA, Tesis Ingeniero Agronomo: Chile.
17. Sánchez, G. 2013. “ *Enfermedades de Importancia Cuarentenaria de Bananos y Platanos*”. *Revista Mexicana Fitopatología, 31(1)*: <http://infit.org.mx/socmexfito/suplemento/docs/magistrales/3GilbertoManzoSanchez.pdf>

18. Chacón, J. 2004. “*Aislamiento, selección y preservación del trichoderma como agente de biocontrol de microorganismos que ataca a cultivos de tomate*” Universidad Central del Ecuador, Tesis Ingeniero Agrónomo: Ecuador.
19. Velázquez, P.D.; Formento, A.N. 2012. “*Efecto de la fusariosis de la espiga (Fusarium graminearum y Fusarium spp.) sobre dos genotipos de trigo*”. Enlace: [http://inta.gob.ar/documentos/efecto-de-la-fusariosis-de-la-espiga-fusarium-graminearum-y-fusariumspp.-sobre-dos-genotipos-de-trigo/at\\_multi\\_download/file/Efectos%20Fusariosis%20de%20la%20espiga%20sobre%20dos%20genotipos%20de%20trigo.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/efecto-de-la-fusariosis-de-la-espiga-fusarium-graminearum-y-fusariumspp.-sobre-dos-genotipos-de-trigo/at_multi_download/file/Efectos%20Fusariosis%20de%20la%20espiga%20sobre%20dos%20genotipos%20de%20trigo.pdf) . Fecha de Consulta: 15 mayo 2014
20. Castro, I., Contreras, A. 2011.” *Manejo de Plagas y Enfermedades en el cultivo de Papas*”. Chile: Fondo para la Innovación Agraria (FIA)
21. González, M. A; Muñoz, L.A; Rengifo, R. M; Lobo, M; Vásquez, W. “*Productores de lulo y mora competitivos mediante selección participativa de clones élite, manejo integrado del cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor*”, Enlace: [http://www.fontagro.org/sites/default/files/prop\\_06\\_16.pdf](http://www.fontagro.org/sites/default/files/prop_06_16.pdf), Fecha de consulta: 15 mayo 2014
22. Sánchez, D. D., Bautista, S. B., Castillo, P. O. 2007.” *Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de Alternaria alternata*”. *Anales de Biología*, 29 (23): <http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/29/PDF/03-EFECTO.pdf>
23. Zapata, T; Ortega, J. 2008.” *Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante*”. *Redalyc*, 11(2): <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81619829004>
24. Escobar, D. M; Orozco, P.C; Quintana, M.A; Ospina, W.A. 2013. “ *Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos*” *Redalyc*, 18(1): <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84927487038>
25. Barron, A; Derry, P. 2012. IR Sample Preparation: A Practical Guide. *Preparation of nujol mulls*, 3-7
26. Muñoz, Z; Moret, A. 2010. “*Sensitivity of Botrytis cinerea to Chitosan and acid acibenzolar-S-Methyl*”. *Society of Chemical Industry*, 66(975-979): <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1969/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>

27. Sanchez, J. O. 2009. “*Diseno de Bloques Completos al Azar*”. PUCE: Quito
28. TELLECHEA, F., FONSECA, J., SOSA, A. 2007. “*Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas*” *Tecnociencia*, 1(3): [http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v1n3/data/cientifico\\_sociedad.pdf](http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v1n3/data/cientifico_sociedad.pdf)
29. Cocoltzi, H. H; Almanza, E; Flores, O; Viveros, E.L; Ramos,E. 2009. “*Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón*” *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, 22(3): <http://www.scielo.org.mx/pdf/sv/v22n3/v22n3a12.pdf>
30. Lauzardo, H. A., Bautista, S., Velázquez, G;Rodriguez,L; Corona, L; Solano, A. 2005. “*Potencial del Quitosano en el Control de las Enfermedades*”. *Redalyc*, 23:(2): <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223214.pdf>
31. HERRERA, R., MONTEALEGRE, J., HENRÍQUEZ, S; LÓPEZ, C; GONZÁLEZ, B. 2010. “*Evaluación de eficacia de productos alternativos en el control de pudriciones en post cosecha de manzanas*” *Revista Fruticola*, 2(1): [http://www.cytcd.org/documentos/noticias/doc\\_23.pdf](http://www.cytcd.org/documentos/noticias/doc_23.pdf)
32. Rossy, G. S. 2010. “*Evaluación in vitro del quitosano en isotiocianatos en el desarrollo y morfología de Fusarium oxysporum SHELECHT f. sp. gladioli (MASSEY) SNYDER & HANSEN*” Instituto Politecnico Nacional, Tesis Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades: México.
33. González, L. M. 2011. “Carbohidratos, formas ciclicas” . *Laura.blogspot.com*, Enlace: <http://cb10laura.blogspot.com/2011/05/carbohidratos-formas-ciclicas.html>, Fecha de Consulta: 17 de Abril de 2014
34. Töfoli, J. G., Ferrari, J. T.,Domingues, J.R; Nogueira, E. 2011.” *Mofo cinzento em plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais*” *Instituto Biologico*, 142 (1): [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=142](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=142)
35. Villafuerte, S. 2008.” Principales Enfermedades de la Papa y medidas para su control”, Enlace: <http://www.agroancash.gob.pe/public/articulos/aip2008/temas/enfermedades.htm>, Fecha de Consulta: 10 de Abril de 2014.
36. Rodríguez,N; Valderrama,A; Alarcón,H; López,A. 2010 “*Preparacion de particulas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con*

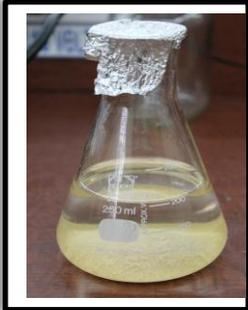
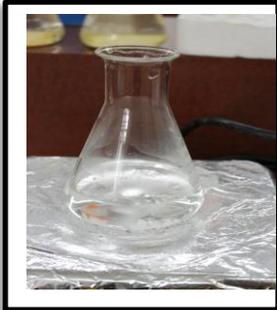
*polietilenglicol” Revista de la Sociedad Química del Perú, 76 (4):*  
[www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v76n4/a05v76n4.pdf](http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v76n4/a05v76n4.pdf)

# OBTENCION DE LA OUITINA

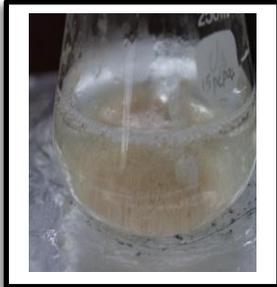
ACONDICIONAMIENTO



DESMINERALIZACIÓN

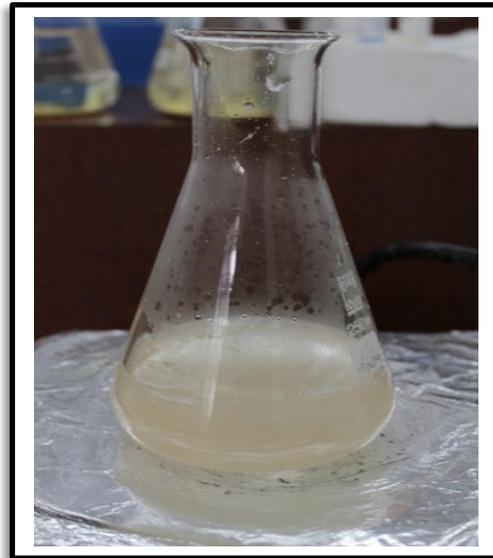


DESPROTEINIZACION



# OBTENCION DE QUITOSANO A PARTIR DE LA QUITINA

## DESACETILACION DE LA QUITINA



# METODO ESPECTRO IR

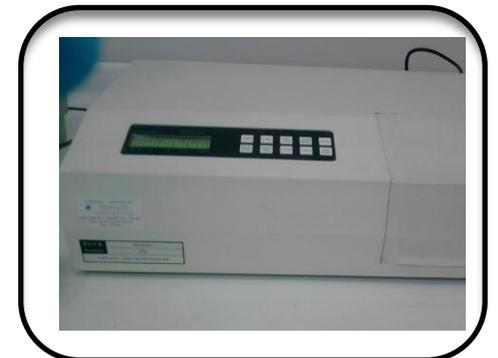
PREPARACIÓN DEL NULL



PREPARACION PLACAS CLORURO DE SODIO

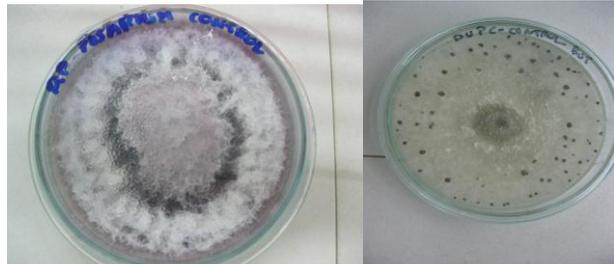


MEDICION ESPECTRO IR



## ANALISIS INVITRO DE LA INHIBICIÓN DE LOS FITOPÁTOGENOS FRENTE A QUITOSANO

SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE LOS HONGOS USADOS PARA REPLICAR



PREPARACIÓN DE MEDIOS Y DISPENSAR EN CAJAS PETRI



SEMBRAR LOS FITOPATOGENOS



## Fusarium vs quitosano comercial Aldrich

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	5	7,3620	1,19709	,53535	5,8756	8,8484	5,69	8,80
2,00	5	2,7575	,72616	,32475	1,8558	3,6592	1,89	3,74
3,00	5	1,5900	,27704	,12390	1,2460	1,9340	1,25	1,90
4,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
5,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
Total	25	2,6219	2,60484	,52097	1,5467	3,6971	,70	8,80

VAR00002

## ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	154,696	4	38,674	94,925	,000
Within Groups	8,148	20	,407		
Total	162,844	24			

## VAR00002

Tukey HSD

VAR00001	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
4,00	5	,7000		
5,00	5	,7000		
3,00	5	1,5900	1,5900	
2,00	5		2,7575	
1,00	5			7,3620
Sig.		,218	,061	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

## Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
VAR00002	25	2,6219	2,60484
Valid N (listwise)	25		

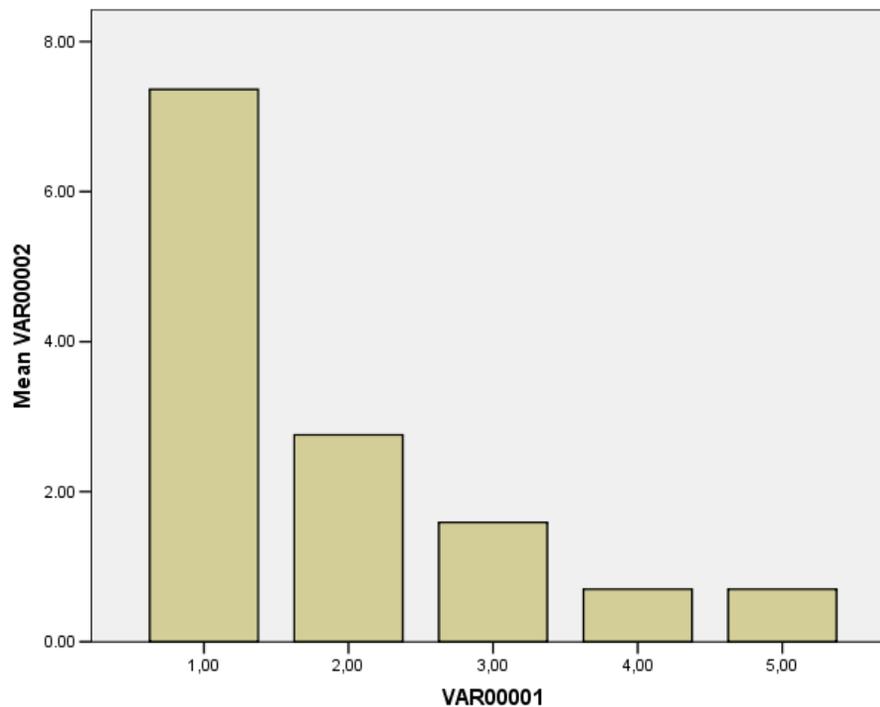
### Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00002

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	4,60450*	,40369	,000	3,3965	5,8125
	3,00	5,77200*	,40369	,000	4,5640	6,9800
	4,00	6,66200*	,40369	,000	5,4540	7,8700
	5,00	6,66200*	,40369	,000	5,4540	7,8700
2,00	1,00	-4,60450*	,40369	,000	-5,8125	-3,3965
	3,00	1,16750	,40369	,061	-,0405	2,3755
	4,00	2,05750*	,40369	,000	,8495	3,2655
	5,00	2,05750*	,40369	,000	,8495	3,2655
3,00	1,00	-5,77200*	,40369	,000	-6,9800	-4,5640
	2,00	-1,16750	,40369	,061	-2,3755	,0405
	4,00	,89000	,40369	,218	-,3180	2,0980
	5,00	,89000	,40369	,218	-,3180	2,0980
4,00	1,00	-6,66200*	,40369	,000	-7,8700	-5,4540
	2,00	-2,05750*	,40369	,000	-3,2655	-,8495
	3,00	-,89000	,40369	,218	-2,0980	,3180
	5,00	,00000	,40369	1,000	-1,2080	1,2080
5,00	1,00	-6,66200*	,40369	,000	-7,8700	-5,4540
	2,00	-2,05750*	,40369	,000	-3,2655	-,8495
	3,00	-,89000	,40369	,218	-2,0980	,3180
	4,00	,00000	,40369	1,000	-1,2080	1,2080

\*. The mean difference is significant at the .05 level.



## Botrytis vs quitosano commercial Aldrich

## Descriptives

VAR00004

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	5	8,6275	,64411	,28805	7,8277	9,4273	7,51	9,00
2,00	5	8,1650	1,09382	,48917	6,8068	9,5232	6,43	9,00
3,00	5	2,8050	1,09329	,48893	1,4475	4,1625	1,51	4,21
4,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
5,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
Total	25	4,1995	3,65192	,73038	2,6921	5,7069	,70	9,00

## ANOVA

VAR00004

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	308,850	4	77,213	137,556	,000
Within Groups	11,226	20	,561		
Total	320,076	24			

## VAR00004

Tukey HSD

VAR00001	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
4,00	5	,7000		
5,00	5	,7000		
3,00	5		2,8050	
2,00	5			8,1650
1,00	5			8,6275
Sig.		1,000	1,000	,863

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

## Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
VAR00004	25	4,1995	3,65192
Valid N (listwise)	25		

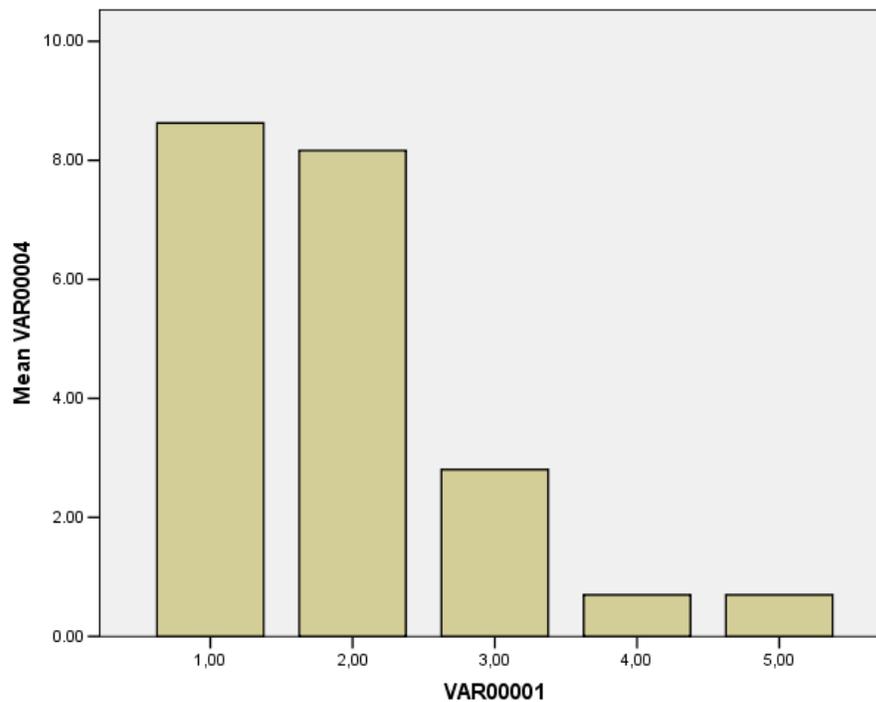
### Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00004

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	,46250	,47384	,863	-,9554	1,8804
	3,00	5,82250*	,47384	,000	4,4046	7,2404
	4,00	7,92750*	,47384	,000	6,5096	9,3454
	5,00	7,92750*	,47384	,000	6,5096	9,3454
2,00	1,00	-,46250	,47384	,863	-1,8804	,9554
	3,00	5,36000*	,47384	,000	3,9421	6,7779
	4,00	7,46500*	,47384	,000	6,0471	8,8829
	5,00	7,46500*	,47384	,000	6,0471	8,8829
3,00	1,00	-5,82250*	,47384	,000	-7,2404	-4,4046
	2,00	-5,36000*	,47384	,000	-6,7779	-3,9421
	4,00	2,10500*	,47384	,002	,6871	3,5229
	5,00	2,10500*	,47384	,002	,6871	3,5229
4,00	1,00	-7,92750*	,47384	,000	-9,3454	-6,5096
	2,00	-7,46500*	,47384	,000	-8,8829	-6,0471
	3,00	-2,10500*	,47384	,002	-3,5229	-,6871
	5,00	,00000	,47384	1,000	-1,4179	1,4179
5,00	1,00	-7,92750*	,47384	,000	-9,3454	-6,5096
	2,00	-7,46500*	,47384	,000	-8,8829	-6,0471
	3,00	-2,10500*	,47384	,002	-3,5229	-,6871
	4,00	,00000	,47384	1,000	-1,4179	1,4179

\*. The mean difference is significant at the .05 level.



## Fusarium vs quitosano obtenido

## Descriptives

VAR00006

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	5	6,4300	1,46257	,65408	4,6140	8,2460	4,41	8,15
2,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
3,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
4,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
5,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
Total	25	1,8460	2,41426	,48285	,8494	2,8426	,70	8,15

## ANOVA

VAR00006

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	131,332	4	32,833	76,744	,000
Within Groups	8,556	20	,428		
Total	139,888	24			

## VAR00006

Tukey HSD

VAR00001	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
2,00	5	,7000	
3,00	5	,7000	
4,00	5	,7000	
5,00	5	,7000	
1,00	5		6,4300
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

## Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
VAR00006	25	1,8460	2,41426
Valid N (listwise)	25		

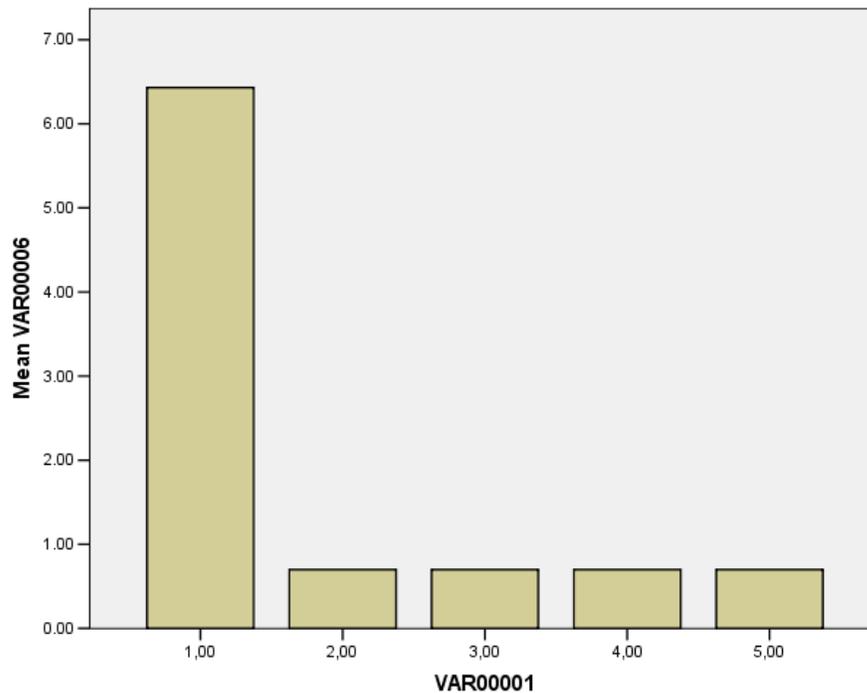
### Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00006

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	5,73000*	,41368	,000	4,4921	6,9679
	3,00	5,73000*	,41368	,000	4,4921	6,9679
	4,00	5,73000*	,41368	,000	4,4921	6,9679
	5,00	5,73000*	,41368	,000	4,4921	6,9679
2,00	1,00	-5,73000*	,41368	,000	-6,9679	-4,4921
	3,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	4,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	5,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
3,00	1,00	-5,73000*	,41368	,000	-6,9679	-4,4921
	2,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	4,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	5,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
4,00	1,00	-5,73000*	,41368	,000	-6,9679	-4,4921
	2,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	3,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	5,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
5,00	1,00	-5,73000*	,41368	,000	-6,9679	-4,4921
	2,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	3,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379
	4,00	,00000	,41368	1,000	-1,2379	1,2379

\*. The mean difference is significant at the .05 level.



## Botrytis vs quitosano obtenido

## Descriptives

cov

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	5	8,6275	,64411	,28805	7,8277	9,4273	7,51	9,00
2,00	5	7,3075	1,66974	,74673	5,2342	9,3808	4,81	9,00
3,00	5	1,6600	,57564	,25743	,9453	2,3747	,95	2,41
4,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
5,00	5	,7000	,00000	,00000	,7000	,7000	,70	,70
Total	25	3,7990	3,60076	,72015	2,3127	5,2853	,70	9,00

## ANOVA

cov

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	297,035	4	74,259	105,056	,000
Within Groups	14,137	20	,707		
Total	311,172	24			

cov

Tukey HSD

VAR00001	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4,00	5	,7000	
5,00	5	,7000	
3,00	5	1,6600	
2,00	5		7,3075
1,00	5		8,6275
Sig.		,398	,135

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

## Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
cov	25	3,7990	3,60076
Valid N (listwise)	25		

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: cov

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	1,32000	,53173	,135	-,2711	2,9111
	3,00	6,96750*	,53173	,000	5,3764	8,5586
	4,00	7,92750*	,53173	,000	6,3364	9,5186
	5,00	7,92750*	,53173	,000	6,3364	9,5186
2,00	1,00	-1,32000	,53173	,135	-2,9111	,2711
	3,00	5,64750*	,53173	,000	4,0564	7,2386
	4,00	6,60750*	,53173	,000	5,0164	8,1986
	5,00	6,60750*	,53173	,000	5,0164	8,1986
3,00	1,00	-6,96750*	,53173	,000	-8,5586	-5,3764
	2,00	-5,64750*	,53173	,000	-7,2386	-4,0564
	4,00	,96000	,53173	,398	-,6311	2,5511
	5,00	,96000	,53173	,398	-,6311	2,5511
4,00	1,00	-7,92750*	,53173	,000	-9,5186	-6,3364
	2,00	-6,60750*	,53173	,000	-8,1986	-5,0164
	3,00	-,96000	,53173	,398	-2,5511	,6311
	5,00	,00000	,53173	1,000	-1,5911	1,5911
5,00	1,00	-7,92750*	,53173	,000	-9,5186	-6,3364
	2,00	-6,60750*	,53173	,000	-8,1986	-5,0164
	3,00	-,96000	,53173	,398	-2,5511	,6311
	4,00	,00000	,53173	1,000	-1,5911	1,5911

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

