



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México D.F. a 10 de febrero del 2021

ASUNTO: CAMBIO TÍTULO Y OBJETIVOS

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO N, UAM XOCHIMILCO

Mtra. María Elena Contreras Garfias

Directora de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comentarle algunos cambios en el servicio social del estudiante **Ángel Manuel Flores Jiménez** con matrícula **2123056308**, de la carrera de QF.B., quien se vio precisado a modificar el nombre del título y de algunos objetivos de su proyecto de servicio social (CSS/DCBS/I-193/2019, oficio de la Coordinación de Sistemas Escolares UAM-X con fecha del 16 de julio de 2019). Lo anterior obedeció a la situación actual en la que estamos y que es ajena a nuestro control. Derivado de esto, se tomó la decisión de cambiar la parte experimental por revisión bibliográfica, con la finalidad de no poner en riesgo la salud de nuestro estudiante. Dichos cambios quedaron de la siguiente manera:

1. Cambio de nombre del proyecto: "Determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, por cromatografía en capa fina y HPLC" se cambió a "**Revisión bibliográfica de la determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, por cromatografía en capa fina y HPLC**"
2. Cambio de nombre del objetivo general: "Determinar el tipo de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, mediante cromatografía en capa fina y por HPLC", se cambió a "**Realizar una revisión bibliográfica sobre la determinación del tipo de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, mediante cromatografía en capa fina y por HPLC**".

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Laboratorio de Biotecnología

Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud. Delegación Coyoacán, México, D.F, CP 04960,

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

3.- Cambio del primer objetivo: “Llevar a cabo un cultivo sólido a partir de varias cepas de hongos entomopatógenos: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Isaria fumorosoae*, *L. lecanii* y *Trichoderma harzianum*”, se cambió a “**Describir las condiciones de cultivo sólido para la producción de oligoquitosanos, a partir de los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Isaria fumorosoae*, *L. lecanii* y *Trichoderma harzianum*”.**

4. Cambio del segundo objetivo: “Obtener oligoquitosanos a partir de la actividad quitinolítica y quitin desacetilasa”, se cambió a “**Identificar con base en la literatura a los oligoquitosanos obtenidos a partir de la actividad quitinolítica y quitin desacetilasa**”.

5. Cambio del tercer objetivo: Establecer las condiciones de operación para el análisis de oligoquitosanos por cromatografía de capa fina”, se cambió a “**Realizar una investigación bibliográfica sobre las condiciones de operación para el análisis de oligoquitosanos por cromatografía de capa fina**”.

6. Asesora interna DSB UAM -X (**sin cambios**) Dra. Luz María Zenit Tovar Castro, número económico 32252.

7. Asesor externo Departamento de Biotecnología UAM-I (**sin cambios**) Dr. José Antonio Martínez Ruiz, número económico 30046.

Así mismo, anexo número de oficio de la Coordinación de Sistemas Escolares UAM-X, con fecha del 16 de julio de 2019; CSS/DCBS/I-193/2019.

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Laboratorio de Biotecnología

Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud. Delegación Coyoacán, México, D.F, CP 04960,



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Sirva la presente para los fines que así convengan al interesado

A T E N T A M E N T E

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro
Profesor Visitante Tiempo Completo
No. Económico 32252
UAM-Xochimilco

Dr. José Antonio Martínez Ruiz
Profesor Asociado D Tiempo completo
No. Económico 30046
UAM-Iztapalapa

c.c.p. C.D.E. Patricia Enzaldo de la Cruz
Coordinadora Divisional del Servicio Social del CBS
c.c.p. Q.B.P. Angélica María Hernández Fernández

Datos contacto:

Celular: 5556407296

ltovar@correo.xoc.uam.mx

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Laboratorio de Biotecnología

Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud. Delegación Coyoacán, México, D.F, CP 04960,

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Ángel Manuel Flores Jiménez	
Matrícula : 2123056308	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Rosario Castellanos 187-B. Col. CTM IX Culhuacán. Alcaldía Coyoacán. C.P. 04909, CDMX	
Teléfono : 7474741677	Celular : 7471630376
Correo Electrónico : man.fg11@gmail.com	CURP : FOJA391211HGHRLMN05

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : "Revisión bibliográfica de la determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, por cromatografía en capa fina y HPLC" (inicialmente titulado: Determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, por cromatografía en capa fina y HPLC")							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Revisión bibliográfica llevada a cabo a distancia							
Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad : Coyoacán						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	4	7	2019		4	1	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 6.- Educación y Comunicación	

FIRMAS

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro No. ec. 32252

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Ángel Flores Jiménez

Alumno
Nombre, firma

Dr. José Antonio Martínez Ruiz No. ec. 30046

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

M en C. Felipe Mendoza Pérez

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México, CDMX, a 12 de junio del 2021

Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos

Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicarle que el alumno Ángel Manuel Flores Jiménez, con matrícula 2123056308, de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, concluyó el Servicio Social **“Revisión bibliográfica de la determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, por cromatografía en capa fina y HPLC”**, inicialmente registrado como: “Determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, por cromatografía en capa fina y HPLC”. Lo anterior obedeció a la situación actual en la que estamos y que es ajena a nuestro control. Derivado de esto, se tomó la decisión de cambiar la parte experimental por revisión bibliográfica, con la finalidad de no poner en riesgo la salud de nuestro estudiante. El Servicio Social se realizó del 4 de julio del 2019 al 4 de enero del 2020, bajo nuestra asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

Sin más por el momento, aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Dr. José Antonio Martínez Ruiz

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfías
Directora de la División de CDB.
UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud Deleg. Coyoacán CP 04960 México CDMX, Tel. 5483-7000 ext. 3445.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA DETERMINACIÓN DE OLIGOQUITOSANOS OBTENIDOS ENZIMÁTICAMENTE, POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y HPLC”

Correspondiente al proyecto genérico:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

PRESENTA

Ángel Manuel Flores Jiménez

Matrícula

2123056308

ASESORES:

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Dr. José Antonio Martínez Ruíz

No. Económico: 32252

No. Económico: 30046

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con dirección: Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P 04960, Cd. De México, México.

Periodo: 4 de julio del 2019 al 4 de enero del 2020

Ciudad de México a 12 de junio de 2021

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. BIOINSECTICIDAS.....	2
2.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	2
2.2.1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.....	3
2.3. DESCRIPCIÓN DE ESPECIES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	5
2.3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.3.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
2.3.3. <i>Isaria fumosoroseus</i>	6
2.3.4. <i>Lecanicillium lecanii</i>	7
2.3.5. <i>Trichoderma harzianum</i>	8
2.4. QUITINA Y QUITOSANO.....	8
2.4.1. Quitina.....	8
2.5. OLIGOQUITOSANOS.....	11
2.6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	15
2.6.1. Clasificación de los métodos cromatográficos (Corzo, 2019).....	15
2.6.1.1. Análisis químico con métodos cromatográficos (Corzo, 2019).....	16
2.6.2. Cromatografía de capa fina (CCF).....	17
2.6.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).....	17
3. OBJETIVO GENERAL.....	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1. CONDICIONES DE CULTIVO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.....	20
6.2. IDENTIFICACION DE OLIGOQUITOSANOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y QUITIN DESACETILASA.....	25
6.2.1. Identificación de oligoquitosanos por CCF.....	25
6.2.2. Identificación de oligoquitosanos por HPLC.....	26
6.3. CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE OLIGOQUITOSANOS 28	
6.3.1. Condiciones de operación en CCF para el análisis de oligoquitosanos.....	28

6.3.2. Condiciones de operación en HPLC para el análisis de oligoquitosanos	29
7. CONCLUSIONES.....	30
8. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS.....	31
9. REFERENCIAS	31
10. RESUMEN.....	39

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha permitido el desarrollo de productos mejorados, elaborados con sistemas que involucran el empleo de organismos vivos o sus productos bajo procesos que permiten su comercialización, todo esto utilizando principios de ingeniería e investigación científica (Tamez, 2001).

Existen muchas áreas de aplicación de la biotecnología, y una de ellas es el área agrícola, en la cual, una de las maneras actuales de resolver problemas con plagas es mediante el control biológico, que consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control de sus poblaciones incluyendo competencia, prefación, parasitismo y patogenicidad (Cantú, 2017).

Los hongos entomopatógenos (HE) tienen una gran importancia dentro del control biológico de plagas y son responsables de causar enfermedades y la muerte de los insectos (Mustafa y Kaur, 2009).

Estos microorganismos se han cultivado a través de fermentación sólida, obteniéndose conidios y algunos otros metabolitos secundarios que mantienen su patogenicidad y virulencia y han mostrado su actividad insecticida, insectistática y fungicida (de Faria y Wraight, 2007).

Dichos microorganismos pueden utilizar como vía de control la degradación de la cutícula del exoesqueleto de los insectos, dando como producto secundario oligoquitosanos (Monzón, 2001). El quitosano es el derivado desacetilado de la quitina; es un copolímero lineal de unidades $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa (Peniche, 2006). Existe una gran cantidad de métodos reportados para estimar a los oligoquitosanos como pueden ser: titulación potenciométrica, espectrofotometría UV-Vis, resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infrarrojo (FTIR), espectroscopia, cromatografía en capa fina y HPLC (Jiang, 2003).

En la presente investigación se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre la determinación de oligoquitosanos producidos por hongos entomopatógenos, empleando técnicas analíticas como la Cromatografía en capa fina y HPLC.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. BIOINSECTICIDAS

El control biológico aplicado puede llevarse a cabo mediante métodos diversos, que, de forma esquemática, pueden ser divididos en dos grupos. Por un lado, existen los métodos de control macrobiológico, basados en la utilización de entomófagos que pueden ser parasitoides, o de predadores. Los otros métodos son los microbiológicos, consistentes en la utilización de microorganismos entomopatógenos que se desarrollan sobre el insecto plaga y le originan la expresión de una enfermedad que puede eventualmente provocar su muerte (Padilla, 2017).

Actualmente se está buscando la manera de desarrollar otras medidas de control de plagas que permitan el desarrollo de una agricultura sostenible y la conservación del medio ambiente. Una de las alternativas más prometedoras y realista es el desarrollo de bioinsecticidas basados en los microorganismos (bacterias y hongos) y virus entomopatógenos (Padilla, 2017).

El término bioinsecticida, también llamado biopesticida o bioplaguicida, se utiliza para designar a muchos agentes del control de plagas como: microorganismos, nemátodos entomófagos, pesticidas de origen vegetal, metabolitos secundarios de microorganismos, feromonas de insectos que se utilizan para interrumpir el apareamiento o para combinarlas con productos insecticidas (Padilla, 2017).

Los bioinsecticidas a base de HE (*B. bassiana*, *M. anisopliae* y *I. fumosoroseus*) han demostrado efectividad para el control de diversas plagas que atacan diversos cultivos (Tamez, 2001).

Los HE tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fúngicas a poblaciones de artrópodo (Motta, 2011).

2.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Entre esos está la capacidad de regular las plagas para mantenerlas en niveles adecuados (Motta, 2011).

Según Pucheta Diaz *et al.* (2006), los HE tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos; para López & Hans (2001), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium*.

2.1.1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

El potencial que tienen los HE como agentes de control, al constituir un grupo con más de 750 especies de casi 100 géneros que pueden infectar insectos, ha sido reconocido. La mayoría de estos hongos pertenecen a las divisiones Zigomicota, Deuteromicota y Ascomicota y se encuentran comúnmente en la naturaleza (Pucheta, 2006).

2.1.1.1. Relación patógeno-hospedero

Los HE son de gran importancia dentro de los agroecosistemas por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero.

El insecto hospedero tiene una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero (Maurer *et al.*, 1997; St. Leger *et al.*, 1997). Para que la manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos tenga lugar, los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia.

Los HE, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo, pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales (Carruthers y Hural, 1990).

2.2.1.2. Características de la pared de los hongos entomopatógenos

La pared celular de los hongos está constituida por polisacáridos (80%), proteínas (3-20%), lípidos, pigmentos y sales inorgánicas en cantidades menores. La quitina forma microfibrillas y es el polisacárido característico de la pared celular en hongos, pero también existe en los insectos. Este polímero es un polisacárido no ramificado, constituido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), donde los monómeros están unidos por enlaces β -1,4 y existen tres tipos de quitina: α , β y γ (Pucheta, 2006).

En la pared celular ocurren cambios durante las diferentes etapas de desarrollo de los hongos, cambios que ocurren mediante el ensamblaje de los componentes celulares como polisacáridos microfibrilares, la asociación de polisacáridos de reforzamiento y de complejos de proteínas (glicoproteínas) (Pucheta, 2006).

2.2.1.3. Mecanismo patogénico

Los hongos entomopatógenos inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie y forman los túbulos germinales y a veces el apresorio, que facilitarán la invasión del hongo (Milner, 2000).

Se ha sugerido que iones divalentes como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie de la del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión pared celular fúngica-cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero (Barnes y Moore, 1997).

2.2.1.4. Toxinas de hongos entomopatógenos

Varias especies de HE son capaces de producir ácidos orgánicos y algunos de ellos han sido implicados en el proceso infectivo. Por ejemplo, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria* spp., *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae* (Asaff et al., 2006).

También se han reportado toxinas peptídicas cíclicas y lineales. A las primeras pertenece una familia de péptidos conocidos como depsipéptidos. Otros depsipéptidos son las eniatinas aisladas de *Fusarium*, que son tóxicas contra larvas de *Choristoneura fumiferana*. Otro metabolito aislado de *B. bassiana* y *L. lecanii*, conocido como basianólido, mostró una fuerte acción insecticida tanto por ingestión como por inyección contra larvas de gusanos de seda *Bombix mori* (Pucheta, 2006).

2.3. DESCRIPCIÓN DE ESPECIES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

2.3.1. *Beauveria bassiana*

B. bassiana es un patógeno natural de insectos. Sus esporas reconocen la cubierta del insecto plaga penetrando en su interior, dentro del cual liberan sustancias que lo digieren y lo destruyen. Si las condiciones ambientales son adecuadas, el hongo produce nuevas esporas en el exterior del insecto muerto (Alves, 1998).

Modo de acción

B. bassiana es un hongo imperfecto de la clase Deuteromycetes, capaz de infectar a más de 200 especies de insectos. Es de apariencia polvosa, de color blanco algodonoso o amarillento cremoso. El ciclo de vida de este hongo consta de dos fases: la patogénica y la saprofitica. El desarrollo del hongo se puede dividir hasta en ocho etapas, mismas que se describen a continuación:

- a) Adhesión. El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora (conidio) es depositada en la superficie del insecto.
- b) Germinación. El conidio inicia el desarrollo de su tubo germinativo y un órgano sujetador (llamado apresorio), que le permite fijarse a la superficie del insecto. Para una germinación adecuada se requiere una humedad relativa del 92 % y temperatura de entre 23 a 25 °C.
- c) Penetración. Después de la fijación mediante mecanismos físicos (acción de presión sobre la superficie de contacto) y químicos (acción de enzimas: proteasas, lipasas y quitinasas), el hongo ingresa en el insecto a través de las partes blandas.
- d) Producción de toxinas. Produce la toxina llamada Beauvericina que ayuda a romper el sistema inmunológico del patógeno, lo que facilita la invasión del hongo a todos los tejidos.
- e) Muerte del insecto. Muerte del patógeno y marca fin de la fase parasítica, dando así inicio a la fase saprofitica (INTAGRI, 2021).

2.3.2. *Metarhizium anisopliae*

El hongo *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin es uno de los principales entomopatógenos empleados como bioinsecticida. Este hongo tiene, un amplio

intervalo de insectos hospederos de diferentes órdenes, entre los que se incluyen plagas de lepidópteros de importancia agrícola (Faria y Wraight 2007).

El ciclo biológico de este HE comprende una fase infectiva celular en el interior del insecto y otra saprofita cuando el hongo completa su ciclo al aprovechar los nutrientes del cadáver del insecto (Khachatourians y Qazi 2008). Los insectos muertos por este hongo son inicialmente cubiertos de forma total por micelio de color blanco, el cual se torna verde cuando el hongo esporula (Wraight *et al.* 2007). En cuanto a los mecanismos de acción de los HE presentan una ventaja sobre las bacterias y los virus debido a que éstos deben ser ingeridos por el insecto para actuar. En el caso de los HE pueden ingresar por contacto a través de un proceso de infección en la cutícula del insecto (Jiménez, 2015).

La evidencia del ataque de *M. anisopliae* sobre insectos, en condiciones naturales, ha sido descrita como "muscardina verde" en más de 200 especies de insectos, exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante. Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina) (Horaczeck, 2004).

M. anisopliae se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30 °C, una máxima de 32 a 35 °C y una mínima de 10 a 12°C (Jiménez, 2015).

2.3.3. *Isaria fumosoroseus*

El hongo *I. fumosoroseus*, (Deuteromicotina: Hyphomycetes) es potencialmente útil para el biocontrol de plagas de importancia económica en la agricultura, tal como la mosca blanca (*B. tabaci*). Por otra parte *P. fumosoroseus* es una especie ampliamente distribuida geográficamente que puede infectar diferentes órdenes de insectos en todas las etapas de su desarrollo.

I. fumosoroseus se identifica por la formación de hifas hialinas, amarillentas, septadas y la mayoría de las paredes suaves. Las estructuras conidiógenas en su mayoría consisten en ramales de conidioforos verticales o irregulares, (sinetosas o mononematosas) presentando en la parte terminal cada una de las ramas acumulos de células de conidiógenas (Cupul, 2009).

Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos llevan cadenas de conidias; éstas son hialinas, unicelulares y de forma ovoide (Bustillo, 2001).

Este género tiene dos subdivisiones Paecilomyces e Isarioidea. La primera división se caracteriza por no ser entomopatógenos y telómórficos, mientras que la división Isarioidea se caracteriza por ser entomopatógenos y telómórficos. Dentro de la división Isarioidea existen cinco especies con potencial biocontrolador de plagas, estas son: *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *P. farinosus*, *P. amoenoroseus* y *P. javanicus* (Humber, 1998).

2.3.4. *Lecanicillium lecanii*

L. lecanii es un hongo ampliamente distribuido y en regiones de clima tropical puede causar epizootias de gran magnitud. Esta especie presenta gran afinidad hacia al complejo de mosca blanca, además de la especie de *Thrips palmi* infectando a ninfas y adultos (Varona, 2009). La temperatura óptima para el crecimiento micelial y esporulación es de 25– 29 °C bajo condiciones de laboratorio además de producir conidias en medio sólido (Montilla, 2013).

Se conoce que *L. lecanii* es un patógeno que aparece frecuentemente sobre áfidos y escamas en las regiones tropicales y subtropicales, pero también se informó que infesta, de forma natural, poblaciones de insectos plagas de varios órdenes, entre los cuales se encuentran Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera, Hymenoptera y sobre ácaros (Jackson, 2012).

Este hongo provoca en los insectos pérdida de sensibilidad, descoordinación de movimientos y parálisis; queda momificado cuando muere y puede, además, presentar en determinadas ocasiones zonas de pigmentación localizadas que se corresponden con sitios de penetración de los conidios en el tegumento. Es necesario acotar que la invasión de los tejidos, por parte del micelio del hongo, transcurre entre 2 y 3 días hasta causar la muerte del insecto y que, durante el proceso de invasión del hongo, se produce una gran variedad de metabolitos tóxicos (Cloyd, 2004).

2.3.5. *Trichoderma harzianum*

Las especies de *Trichoderma* spp, son hongos cosmopolitas y típicamente del suelo que pueden ser llevados a sustratos en el cultivo de hongos comestibles (Klein y Eveleigh, 1998). Se han descrito cerca de 40 taxones de *Trichoderma* spp., hasta la fecha. La temperatura óptima para su crecimiento linear en agar y producción de micelio está entre 20 y 28 °C, aunque crece bien entre 6 a 32 °C.

T. harzianum (Rifai), produce enzimas hidrolíticas que degradan componentes de la pared celular de muchos microorganismos, que luego pueden ser utilizados como fuente de nutrientes (Arenas, 2009).

Durante el proceso de micoparasitismo, *Trichoderma* secreta enzimas que hidrolizan la pared celular de los hongos que parasita, siendo las más conocidas las proteasas, las quitinasas y las glucanasas (Marcello *et al.*, 2010; García Espejo *et al.*, 2016), y provocan la retracción de la membrana plasmática y la desorganización del citoplasma. También inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo (Romero-Cortes *et al.*, 2016). El efecto de diversas especies de *Trichoderma* sobre el biocontrol de enfermedades se ha estudiado en cultivos de importancia agronómica como tomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum* sp.), entre otros (Martínez *et al.*, 2013; Diánez *et al.*, 2016).

2.4. QUITINA Y QUITOSANO

2.4.1. Quitina

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. Es el segundo polímero natural más abundante, sólo superado por la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable (fig.1). Se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación, DA, de 0.66, es decir, que una de cada tres de sus unidades se encuentra desacetilada (Piquero, 2010).

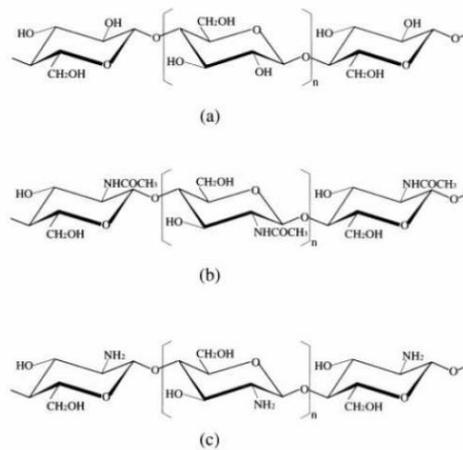


Figura 1. Representación esquemática de las cadenas de (a) celulosa; (b) quitina totalmente acetilada y (c) quitosano totalmente desacetilado. La similitud estructural entre ellas resulta evidente.

La quitina comercial se extrae a partir de desechos de crustáceos de la industria pesquera, siendo las principales fuentes los caparazones de cangrejo, camarón, langostino y langosta. Las técnicas de extracción reportadas son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente, la composición del material de partida varía notablemente de una especie a otra (Piquero, 2010).

Propiedades de la quitina

La quitina es un copolímero aleatorio de β -1,4-N-acetilglucosamina, β -1,4-N-glucosamina (fig. 2) y posee enlaces de hidrógeno ampliamente extendidos a lo largo de toda su estructura semicristalina causantes de su muy reducida solubilidad. La quitina es un importante polisacárido estructural que provee de integridad estructural y protege a insectos y crustáceos (Gonzales, 2015).

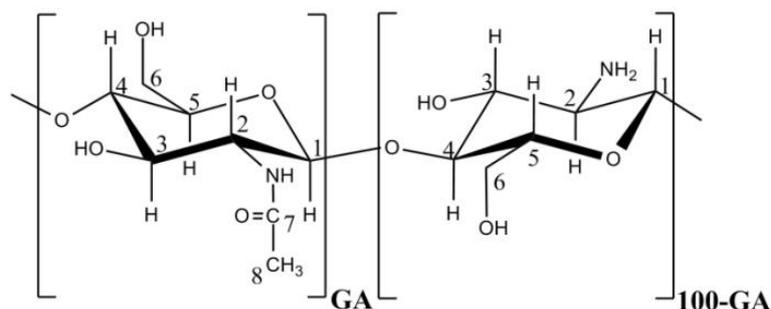


Figura 2. Estructura química de la quitina

2.4.1.1. Caracterización de la quitina y quitosano

Tanto la composición de las cadenas de estos polímeros como sus dimensiones suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención, por lo que la determinación del grado de acetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de estos polisacáridos, ya que ambas tienen una gran incidencia en sus propiedades (Piquero, 2010).

2.4.1.2. Quitosano

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de preparación y estos polímeros difieren entre sí por su distribución, masa molecular y grado de acetilación.

Químicamente, la quitina y el quitosano son poliglucosaminas que son distinguidas solamente por el grado de la acetilación de los grupos amino. Las quitinas típicas tienen generalmente grado de acetilación entre 70-95% que corresponde a un contenido de acetilo de un 15-20.7% mientras que los quitosanos tienen comúnmente un grado de acetilación entre 15-25% que corresponde 3.2 - 5.3 % del contenido de acetilo. Los factores que afectan el grado de desacetilación incluyen: concentración del álcali, tratamiento previo, tamaño de partícula, y la densidad de la quitina (Piquero, 2010).

El quitosano (fig. 3) es el derivado desacetilado de la quitina; es un copolímero lineal de unidades $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa (Piquero, 2010).

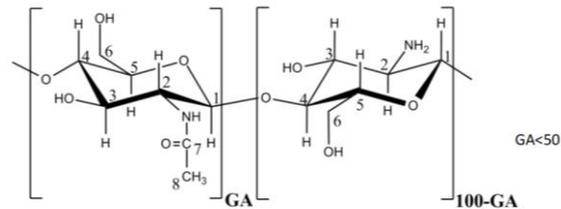


Figura 3. Estructura molecular del quitosano

Peso molecular y viscosidad

Otros parámetros importantes son el peso molecular y la viscosidad asociada. Como el quitosano es obtenido de la quitina por desacetilación alcalina, el peso molecular tiene un promedio más bajo al extenderse generalmente entre 1×10^5 - 3×10^5 Da.

El quitosano es un producto altamente viscoso similar a las gomas naturales. La viscosidad puede variar de 10 a 5000cp. En solución, debido a su comportamiento polielectrolítico, se comporta de manera diferente, lo cual influye notablemente en la viscosidad de la disolución (Piquero, 2010).

2.5. OLIGOQUITOSANOS

El quitosano es un copolímero lineal de unidades de 2-acetamido-desoxi-b-D-glucano (GlcNAc) y 2-amino-2-desoxi-b-D-glucano (GlcN) enlazadas (1-4) en proporciones variables (Trombotto, 2008), dichas variaciones entre sus proporciones, generan los derivados del quitosano, llamados oligoquitosanos (COS), los cuales se han convertido en una alternativa prometedora a los fungicidas sintéticos debido a su carácter natural, actividad antifúngica y provocación de respuestas de defensa en el tejido vegetal (Bautista *et al.*, 2006; Terry & Joyce, 2004).

La diferencia entre la quitina y los oligoquitosanos es que, la quitina se compone predominantemente de unidades acetiladas, mientras que los oligoquitosanos están compuestos de unidades desacetiladas (fig 4). Aparte del peso molecular (MW), los polímeros tienen un grado característico de acetilación (DA) corresponde a la

fracción molar de restos GlcNAc (o el grado de acetilación DDA correspondiente a la fracción molar de restos GlcN). La distribución de grados de polimerización (DP) que van de 2 a 12 y el patrón de nacetilación (PA) o secuencia también se utilizan para describir la estructura de estos polímeros (Mourya *et al.*, 2011).

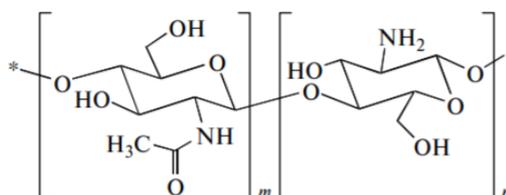


Figura 4. Residuos repetidos para quitina y quitosano. La quitina está compuesta predominantemente por (m) unidades y el quitosano está compuesto predominantemente por (n) unidades distribuidas de manera aleatoria.

La actividad biológica de los quitooligómeros a menudo se ha determinado utilizando mezclas de oligómeros heterogéneas y/o relativamente poco caracterizadas, los requisitos de tamaño y estructura para que estos compuestos tengan una actividad biológica son difíciles de determinar (Trombotto, 2008).

Al parecer, los quitooligómeros generalmente deben tener un DP de al menos 4 para inducir respuestas biológicas, sin embargo, no es posible generalizar sobre las características estructurales esenciales para su actividad biológica. Por tanto, es de creciente interés generar quitooligómeros bien definidos para determinar la relación entre su bioactividad y sus parámetros estructurales (Trombotto, 2008).

La quitina se obtiene como polímeros de PM 30–3000 kDa con DA superior al 90%. Y la mayoría de los quitosanos comerciales son de peso molecular van desde 1500 Da a 50-2000 kDa, con un DA promedio de 50-100% (comúnmente 80-90%) (Mourya *et al.*, 2011).

Un DP y un PM muy altos del quitosano lo hacen insoluble en agua y cuando es soluble, por ejemplo, en los disolventes ácidos acuosos adecuados, se generan soluciones viscosas (Mourya *et al.*, 2011).

La hidrólisis o quitonólisis produce quitosanos con bajo DP y bajo MW. Los quitosanos con DP <20 y de peso molecular medio de hasta 3900 Da (0,2-30 kDa) se denominan oligómeros de quitosano, quitooligómeros o quitooligosacáridos (COS) (Muzzarelli, 1993).

2.5.1. Métodos de producción de quitooligosacáridos

2.5.1.1. Despolimerización bajo la acción de reactivos

La hidrólisis del quitosano puede progresar mediante el uso de ácido como ácido clorhídrico, ácido con electrolitos, ácido nitroso, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico o mediante métodos oxidativos reductores con peróxido de hidrógeno o persulfato (Mourya et al., 2011). Otros ácidos como el ácido láctico (Ilina, 2004), el ácido tricloroacético (Kataoka, 1980), el ácido fórmico (Mourya, 2011) y el ácido acético (Kojima, 1996) también se estudiaron por su efecto degradante sobre la quitina o el quitosano.

2.5.1.2. Métodos enzimáticos de despolimerización de quitosano

La despolimerización enzimática de quitina / quitosano se ha explorado teniendo en cuenta las desventajas de la hidrólisis bajo la acción de los reactivos, a saber, desacetilación parcial de los oligómeros resultantes, dificultad para controlar la despolimerización, bajo rendimiento, aislamiento engorroso de la mezcla de oligómeros y condiciones heterogéneas, rendimientos de producción menores y mayor riesgo asociado a la contaminación ambiental. Las enzimas operan en condiciones más suaves y son muy específicas (Mourya et al., 2011).

La quitina y el quitosano biodegradables pueden ser hidrolizados por varias enzimas específicas como quitosanasas y quitinasas y también enzimas inespecíficas. Se ha revelado que la estructura de los enlaces glicosídicos en el quitosano afecta el proceso de hidrólisis enzimática. Los quitosanos desacetilados diferencialmente tienen cuatro tipos diferentes de enlaces glicosídicos distribuidos aleatoriamente en sus estructuras. Estos incluyen enlaces entre dos unidades acetiladas (A – A), unidades acetiladas y desacetiladas (A – D), unidades desacetiladas y acetiladas (D – A) y dos unidades desacetiladas (D – D). La especificidad de las quitosanasas con respecto a la escisión de cuatro enlaces glicosídicos diferentes en el quitosano parcialmente N desacetilado está determinada por la identidad de los extremos reductores y no reductores y el DD del quitosano (Mourya *et al.*, 2011).

2.5.1.3. Despolimerización bajo alto impacto energético

La absorción de energía por las moléculas de quitosano en cualquiera de los métodos de despolimerización da como resultado la escisión de los enlaces

químicos, y si el enlace roto pertenece a la columna vertebral del polímero (enlace oglicosídico), se producirá una disminución del peso molecular. La reducción del peso molecular bajo un impacto de alta energía es una alternativa simple, que ahorra trabajo y es amigable con el medio ambiente a la hidrólisis ácida o enzimática. Se emplean fuentes de alta energía como microondas, ultrasonidos y gammarays (Yoksan, 2004), pero estos métodos no son óptimos para crear mezclas COS bien definidas. Con la aplicación de irradiación gamma al quitosano, Ulanski y Rosaik en 1992 indicaron que los rendimientos de radiación de la escisión en estado sólido fueron 0.9 en vacío, 1.1 en aire y 1.3 en oxígeno, mientras que el correspondiente los rendimientos de reticulación fueron iguales a cero.

2.5.2. Métodos de caracterización de quitoooligosacáridos

Cromatografía por diferentes métodos

La separación y detección de oligómeros de quitosano puede realizarse mediante técnicas cromatográficas. Si están presentes, el monosacárido y los disacáridos pueden detectarse en las muestras de COS mediante TLC o cromatografía líquida en fases estacionarias para intercambio iónico, permeación en gel, fase normal o inversa con una columna amino (Mourya *et al.*, 2011).

Viscometría (determinación de MW)

El peso molecular promedio de viscosidad del quitosano de bajo peso molecular se puede obtener con la determinación de la viscosidad intrínseca y la ecuación de Mark – Houwink: $[\eta] = K M^a$. La viscosidad intrínseca $[\eta]$ proviene de la viscosidad medida por el viscosímetro capilar Ubbelohde ($\varnothing = 0,5 \text{ mm}$) a 25° C . Los valores de K y a se pueden encontrar en varias referencias (Mourya *et al.*, 2011).

Espectroscopia de masas (MS)

El bombardeo de átomos rápidos (FAB) y la desorción láser asistida por matriz con tiempo de ionización de vuelo (MALDI-TOF) se han empleado ampliamente para el análisis de mezclas de homooligómeros de N-acetilglucosamina, homooligómeros de glucosamina y lipochitoooligosacáridos (Bosso, 1992). También se estudiaron y mapearon mezclas de heterochitoooligómeros de $DP \leq 17$ y tan grandes como de $DP \leq 50$ mediante MALDI-TOF MS (Letzel, 2000).

Otros métodos

Entre otros métodos opcionales para la caracterización de oligoquitosanos se encuentran la espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear de H^1 y C^{13} , y difracción de rayos X (Mourya *et al.*, 2011).

2.6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía surgió en el año 1906, gracias a el botánico Ruso M. Tswett, quien realizó un experimento, colocando un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio ($CaCO_3$). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades (Facultad de química, 2007).

Cuando se trata de muestras complejas la separación del analito de las posibles interferencias es una etapa esencial. Aún mejor sería la posibilidad de determinar varios analitos después de una separación previa. Uno de los mejores métodos para conseguir esa separación, y posiblemente, el más utilizado es la cromatografía. Este conjunto de técnicas permite la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas (Corzo, 2019).

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil) (Facultad de química, 2007)

En cromatografía, los solutos se separan en base a la distinta velocidad de desplazamiento cuando son arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene a una fase estacionaria (sólida o líquida) (Corzo, 2019).

2.6.1. Clasificación de los métodos cromatográficos (Corzo, 2019)

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse según diferentes criterios: atendiendo al modo como las fases se ponen en contacto y atendiendo a fundamento del proceso de separación.

Clasificación atendiendo al fundamento de la separación

- **CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (fase móvil líquida)** Fase estacionaria sólida: se trata de sólidos finamente divididos (con gran superficie específica). A su vez esta misma clasificación se divide en: Cromatografía de adsorción, de cambio iónico y de exclusión. Si la fase estacionaria es líquida, se puede a su vez dividir en: cromatografía de reparto y cromatografía de afinidad o de fases enlazadas.
- **CROMATOGRAFÍA DE GASES (fase móvil gaseosa).** Se divide en: cromatografía de adsorción y cromatografía de partición o reparto.
- **CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (la fase móvil es un fluido supercrítico)** Un fluido supercrítico es un fluido calentado a temperatura y presión superiores a las críticas. Posee algunas características propias de un gas y algunas propias de un líquido. La fase estacionaria puede ser líquida o sólida. Se puede dividir en: cromatografía en columna y cromatografía plana.

2.6.1.1. Análisis químico con métodos cromatográficos (Corzo, 2019)

Se puede emplear para identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies separadas.

2.6.1.2. Análisis cualitativo

El parámetro que puede usarse con fines cualitativos en cromatografía es el tiempo de retención. Este es característico de cada componente en cada sistema cromatográfico.

2.6.1.3. Análisis cuantitativo

Se basa en la comparación del área o altura de pico del componente de interés con la de estándares de esta sustancia de concentración conocida, admitiendo que existe una relación lineal entre el área o altura de pico y la concentración en un determinado intervalo de concentraciones. En los análisis basados en altura de pico se requiere que la anchura de los picos no sufra modificación durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y los estándares para obtener resultados exactos.

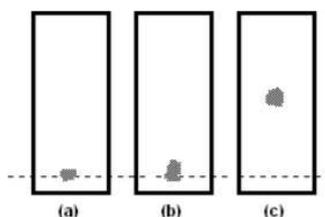
2.6.2. Cromatografía de capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el utillaje que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor.

En la elección del eluyente influyen varios factores: Precio, pureza, no utilizar mezclas de eluyentes (reproducibilidad), no utilizar compuestos muy volátiles, evitar que contengan trazas de metales (catalizadores).

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares.



2.6.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de vidrio. Después se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Para

aumentar la eficiencia en las separaciones, en la cromatografía de alta resolución; el tamaño de las partículas de fase fija se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir.

La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar física y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla, consta de dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido.

3. OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre la determinación del tipo de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, mediante cromatografía en capa fina y por HPLC.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las condiciones de cultivo sólido para la producción de oligoquitosanos, a partir de los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumorosoae*, *L. lecanii* y *Trichoderma harzianum*.
- Identificar con base en la literatura a los oligoquitosanos obtenidos a partir de la actividad quitinolítica y quitin desacetilasa
- Realizar una investigación bibliográfica sobre las condiciones de operación para el análisis de oligoquitosanos por cromatografía de capa fina
- Comparar a través de referencias bibliográficas las condiciones de operación para el análisis de oligoquitosanos por HPLC.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: Se realizó una revisión sistemática de documentos de diferentes fuentes, provenientes de distintas revistas científicas, con un enfoque al tema de condiciones de cultivo sólido para obtener oligoquitosanos; al igual que los métodos para la identificación de estos, obtenidos enzimáticamente; así como condiciones de operación de los métodos de HPLC y cromatografía en capa fina, para su análisis.

Estrategia de búsqueda: Los artículos consultados fueron obtenidos mediante el uso de cinco motores de búsqueda diferentes: Google Scholar, Pubmed, ScienceDirect, BIDIUAM y Redalyc. La búsqueda se basó en encontrar estudios previos, que ayudaran a cumplir con los objetivos de la investigación actual. La búsqueda no se limitó por año de publicación, pero se tomó como límite de la lengua de los estudios en inglés y español. En algunas de las investigaciones presentadas se optó por analizar sus propias referencias bibliográficas con el objetivo de rescatar algunos otros estudios potenciales respecto al tema.

Criterios de inclusión y exclusión: para la obtención de la información recopilada se incluyó todo tipo de documento que contuviera los siguientes términos: oligoquitosano, fermentación sólida, hongos entomopatógenos, quitina, quitosano, cromatografía en capa fina, HPLC, que son aquellas definiciones sobre las que se centra la investigación. El principal criterio de exclusión fue aquellos artículos que utilizaran algún otro método de caracterización diferente a cromatografías.

Extracción de datos: al término de la búsqueda se logró localizar 172 estudios, de los cuales 156 se optaron por descartar, tanto por no tener información o era incompleta para nuestro fin. Para proceder a la selección se revisaron los abstracts y en caso necesario los artículos completos con el fin de decidir si la información que contenían estaba o no relacionada con los objetivos de este estudio.

En total se utilizaron 16 artículos de difusión científica para construir el presente reporte.

Análisis de datos: la información recabada se procedió a estructurar en 4 subapartados: el primero, dedicado a las condiciones de cultivo de fermentación sólida; el segundo, para la identificación de oligoquitosanos obtenidos a partir de la actividad quitinolítica y quitin desacetilasa, y los últimos dos, con la finalidad de conocer las condiciones de operación para el análisis de oligoquitosanos en cromatografía en capa fina y HPLC, respectivamente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CONDICIONES DE CULTIVO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA

La actividad de los hongos entomopatógenos y en general de los hongos filamentosos se ve afectada por las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente. Entre los factores más destacables se pueden mencionar: la humedad, el pH, la temperatura, concentración y disponibilidad del sustrato, aireación, el tamaño de partículas e inóculo.

De acuerdo con la investigación de Juárez en 2012, el crecimiento de *B. bassiana*, *L. lecanii* y *Trichothesium roseum* así como la producción de oligoquitinasas se pudo llevar a cabo a partir de un medio mineral a base de (g/L) 6 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.2 de MgSO_4 , 15 de KH_2PO_4 , 0.1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028 de ZnSO_4 y 60 de cutícula de camarón.

Unas condiciones de cultivo muy similares a las anteriores es lo propuesto por Barranco y col. en 2002 y Navarro en 2017, donde utilizaron las cepas de: *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* para la producción de extractos fermentativos. Se ocupó como soporte bagazo de caña, y un medio cuya composición química fue: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g L⁻¹; MgSO_4 , 1.2 g L⁻¹; NaCl, 1 g L⁻¹, KH_2PO_4 , 15 g L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028 g L⁻¹ y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.032 g L⁻¹ y caparazón de camarón 60 g L⁻¹. Las condiciones del cultivo sólido fueron: humedad inicial de 65%, pH 5 y temperatura de 25° C. Se inocularon con 10⁷ conidios⁻¹. En dicho trabajo se determinó los contenidos de proteína y de actividad enzimática, los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido de proteína y de actividad enzimática de los extractos fermentativos obtenido por Navarro (2017).

Tratamiento	Proteína (mg mL ⁻¹)	Actividad quitinolítica (U.I)	Actividad proteolítica (U.I)
Extracto de <i>B. bassiana</i>	0.1301± 0.082	65.89 ± 5.2	7.9 ± 0.6
Extracto de <i>I. fumosorosea</i>	0.1271± 0.052	84.42 ± 6.7	8.2 ± 2.7
Extracto de <i>M. anisopliae</i>	0.1307± 0.042	16.62 ± 3.1	4.2 ± 1.3

En un estudio llevado a cabo por Jaronski en 2014 acerca de los medios de cultivos o sustratos disponibles para el cultivo de hongos entomopatógenos, observó que, aunque el arroz y la cebada parecen ser los principales sustratos utilizados en los trópicos y el hemisferio norte, respectivamente, se ha realizado un esfuerzo considerable para identificar materiales agrícolas de bajo costo, especialmente subproductos y productos de desecho, como sustratos adecuados (tabla 2). De acuerdo con el autor, las comparaciones, especialmente entre diferentes informes, son muy difíciles debido a las diferentes especies y cepas de hongos, las diferentes condiciones de fermentación y las diferentes suplementaciones. Recalca también la importancia entre las relaciones de C/N. Incluso se menciona que hay un uso de sustratos inorgánicos; tales como: tierra de diatomeas calcinada y gránulos de arcilla de poros abiertos para producir *B. bassiana*.

Tabla 2. Traducción de la tabla de sustratos sólidos evaluados de Jaronski (2014)

SUSTRATOS SÓLIDOS EVALUADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS PRINCIPALES ASCOMICETOS ENTOMOPATÓGENOS	
Sustrato	Hongos
Cáscaras de arroz, aserrín: salvado de arroz + 2% dextrosa	<i>Beauveria</i>
Cáscara de arroz + 2% dextrosa	<i>Beauveria</i>
Pastel de sésamo	<i>Beauveria</i>
Sorgo	<i>Beauveria, Metarhizium</i>
Soja	<i>Beauveria, Metarhizium</i>
Levadura de bagazo de caña de azúcar, melaza	<i>Beauveria, Metarhizium</i>
Barro de prensa de caña de azúcar	<i>Beauveria</i>
Tubérculos de tapioca	<i>Beauveria</i>
Corteza de tapioca	<i>Beauveria</i>
Trigo	<i>Beauveria, Metarhizium</i>
Salvado de trigo + Al(SO ₄) ₃	<i>Beauveria</i>

Salvado de trigo + nitrógeno orgánico	<i>Nomuraea</i>
Salvado de trigo + 2% dextrosa	<i>Beauveria</i>

De la misma forma Jaronski (2014) observó que, a diferencia de los cereales u otros materiales orgánicos, los portadores minerales tienen la ventaja de permitir un control flexible de los nutrientes adaptados a cada especie y cepas de hongos.

Otro de los estudios realizados fue el de Ghormade (2017), quien menciona diferencias entre metodologías y uso de medios de cultivos para la fermentación de hongos, diferenciando entre los cultivos sólidos y líquidos, o incluso cultivos sumergidos, haciendo hincapié en las condiciones de crecimiento. En la mayoría de las metodologías utilizaron medios minerales con los nutrientes específicos para las especies y cepas de hongos. Como ejemplos menciona lo reportado por Rane y Hoover en 1992, quienes produjeron quitosano cultivando *A. coerulea*, *Absidia blakesleeana*, *G. butleri*, *Mucor rouxii* y *Phycomyces blakesleeanus* en un simple medio de extracto de levadura - peptona - glucosa. La máxima concentración de quitosano fue de 0.51 mg / mL de medio en 48 h, y con un 94% de DDA obtenido con *A. coerulea*. Un detalle para destacar de dicha investigación es que la adición de cobalto en el medio de crecimiento aumentó la producción en un 20%. También emplearon camote como sustrato y urea como fuente de nitrógeno, llegando a obtener 29 g de micelio seco por kg de sustrato, con la cepa de *Gongronella butleri*.

En el caso de la producción de quitina desacetilasa a partir de *Metarhizium anisopliae*, Nahar en 2004 empleó el medio agar papa dextrosa y glucosa al 2%, con tubos inclinados. Para la producción extracelular de quitinasa, quitosanasa y quitina desacetilasa, utilizó el medio YPG (extracto de levadura, 0.3%; peptona, 0.5%; y glucosa, 1%) con agitación a 28 ° C durante 72 h. La composición del medio fue (g/L): KH₂PO₄, 3.0; K₂HPO₄, 1.0; MgSO₄, 0.7; (NH₄)₂SO₄, 1.4; NaCl, 0.5; CaCl₂, 0.5; extracto de levadura, 0.5; bactopectona, 0.5 y quitina, 5.0. Se observaron actividades máximas de quitín desacetilasa (0,26 ± 0.03 U/mL) y quitosanasa (0.31 ± 0,04 U/mL) en 72 h.

En 2012 Logesh obtuvo quitosano a partir de las cepas de *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus oryzae* y *Fusarium oxysporum*, las cuales fueron incubadas en caldo papa dextrosa (PDA), a 25 °C por 12 días a 120 rpm. *A. niger*, que presentó el mayor rendimiento, fue inoculado en PDA con diferentes

concentraciones de glucosa de 2-12%. La mayor concentración de quitosano fue 0.8455 g/L, después de 6 días de cultivo líquido.

Un ejemplo más es el trabajo de Nadarajah (2006), en el cual se utilizó el hongo *Absidia butleri*, realizando una suspensión de esporas en un medio que tenía extracto de levadura, peptona y glucosa, en este caso las concentraciones de dichos nutrimentos no están especificados. Se llevó bajo las siguientes condiciones: una temperatura de 30 °C, con agitación a 150 rpm durante 48 h. Este estudio nos indica que la actividad de la quitina desacetilasa obtenida fue de 17.6 mU/mL. Estos datos nos dan una idea de la actividad enzimática que se pueden alcanzar con el uso de HE.

Jaramillo (2015) para la multiplicación masiva de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* utilizó un medio líquido compuesto por soya (15 g/L), azúcar blanca (10 g/L) (Incauca®), cloruro de sodio (sal común Refisal®) (5 g/L), carbonato de calcio (2 g/L) (Omya S.A.S.) y cloranfenicol (0.05 gr/L) (Sigma®), mezclados homogéneamente en agua destilada. 200 mL del medio se esterilizaron en frascos de vidrio con capacidad de 400 mL durante 15 min a 120 °C y 15 psi. Este trabajo no está centrado en la obtención de oligoquitosanos, sin embargo, si lo está para la optimización de los medios de cultivo para HE, y puede servir de base para nuestro objetivo.

Cortez (2007) para la producción de *Lecanicillium lecanii* utilizó diversos sustratos para probar la producción de conidios con patogenicidad. Los sustratos utilizados fueron conformados por dos componentes: medios nutritivos y soportes en una proporción 1:1. Se utilizó grano de sorgo, arroz entero y sus subproductos industriales, grano de arroz quebrado y polvo de arroz, como medios nutritivos. Y como soporte: “olote” de maíz, “bagazo” de caña de azúcar y “cascarilla” de arroz. La combinación entre medios y soportes dio origen a doce tratamientos. Los resultados se muestran en la tabla 3 y gráfico 1. Las combinaciones de sustrato de arroz + bagazo de caña ($839.67 \pm 1.2 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$) y sorgo + olote ($825.8 \pm 1.7 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$) mostraron la mayor producción conidial.

Tabla 3. Efecto de soporte y medio en producción de conidios del hongo *L. lecanii*

Soporte	Número de conidios (10 ⁶ g ⁻¹)	Medio	Número de conidios (10 ⁶ g ⁻¹)
Bagazo	605.6 ± 154.8 ¹ a	Arroz	563.4 ± 246.8 ¹ a
Olote	589.3 ± 154.3 b	Sorgo	561.9 ± 232.5 a
Cascarilla	278.8 ± 20.6 c	Granillo	453.9 ± 153.4 b
Arroz	248.5 ± 18.5 d	Pulido	385.8 ± 62.6 c
		Arroz	265.4 ± 1.0 d

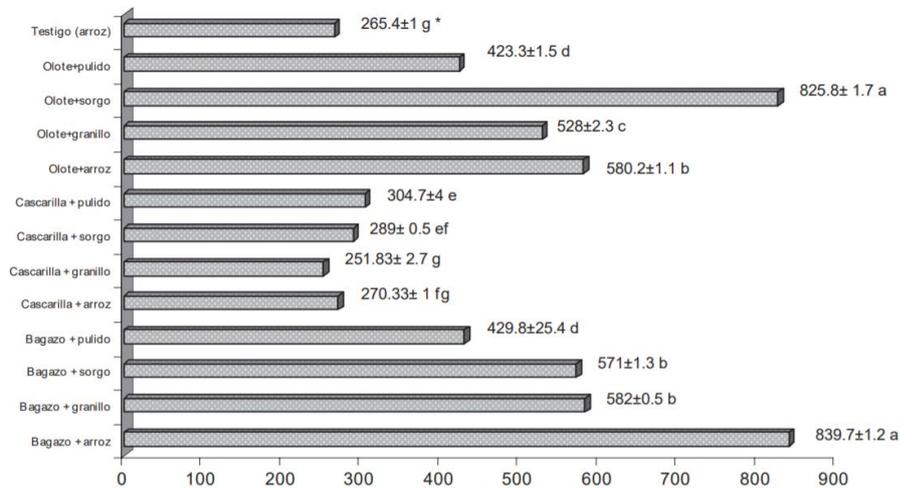


Gráfico 1. Efecto de sustrato (soporte + nutriente) en la producción de conidios del hongo *L. lecanii*.

Como se puede observar, los medios de cultivo y sustratos para la producción masiva de hongos entomopatógenos varían entre las mismas especies y cepas estudiadas, las combinaciones entre medios minerales y sustratos orgánicos son las que proporcionan mayores rendimientos, ya que los hongos completan todos sus requerimientos nutritivos. Esto se puede observar en el trabajo de Navarro, 2017, donde las cepas de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* pudieron alcanzar una actividad quitinolítica de 65.89 y 84.42 U respectivamente, utilizando dichas combinaciones.

6.2. IDENTIFICACION DE OLIGOQUITOSANOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y QUITIN DESACETILASA

6.2.1. Identificación de oligoquitosanos por CCF

En 2010 Pagnoncelli y col. durante su trabajo sobre la producción de quitosanasa por *Paenibacillus ehimensis*, analizaron los productos obtenidos enzimáticamente por CCF. El quitosano se hidrolizó a (GlcN)₂, (GlcN)₃, y (GlcN)₆ a los 20 min de reacción y su concentración máxima se obtuvo entre 20 y 30 min de reacción. Se utilizó un estándar de COS. Los resultados se observan en la figura 5.

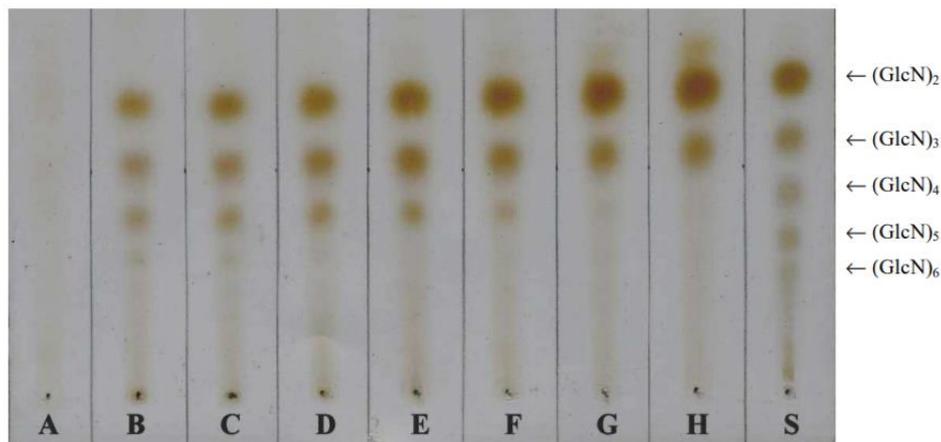


Figura 5. Perfiles de la CCF de quitooligosacáridos producidos en la hidrólisis de quitosano soluble por quitosanasa cruda de *Paenibacillus ehimensis*. Carril A-H, hidrolizados presentes obtenidos después de la reacción enzimática durante 10, 20, 30 min, 1, 2, 3, 6 y 9 h; Carril S, estándar COS.

Un segundo estudio donde se muestra la identificación de COS mediante CCF, es lo reportado en 2017 por Varun, a pesar de que el proceso de dichos metabolitos se realizó por hidrólisis ácida en lugar de métodos enzimáticos, la metodología se puede adaptar al propósito de la investigación actual. Sus resultados se muestran en la fig 6, donde la CCF reveló la presencia de fracciones de COS, siendo C1 (monómero) a C4 (tetramero) lo que confirma la presencia de quitooligosacáridos en el hidrolizado. Las manchas desarrolladas se compararon con la mancha estándar realizada en paralelo a las muestras.

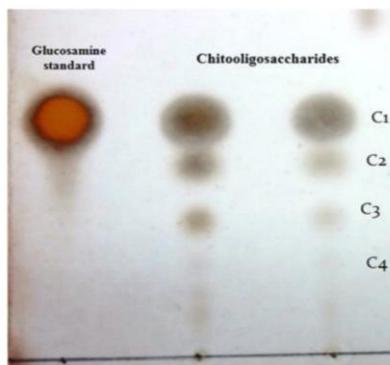


Figura 6. Análisis de cromatografía en capa fina de quitooligosacáridos realizado con un sistema disolvente que contiene n-propanol-agua-agua amoniaca (7: 2: 1, v / v / v) en una placa de gel de sílice. La placa se desarrolló sumergiendo la placa en una solución saturada de nitrato de plata y rociándola con una solución de NaOH 0,5 N en etanol.

6.2.2. Identificación de oligoquitosanos por HPLC

Yan en 2012, reportó un método indirecto para la determinación cuantitativa de oligoquitosanos, realizando una derivación de quitosano a glucosamina. Se lograron dos posibles conformaciones de glucosamina libre (α y β -glucosamina), las cuales fueron detectadas en forma de dos picos, tal como lo muestra la figura 7, mediante análisis de HPLC.

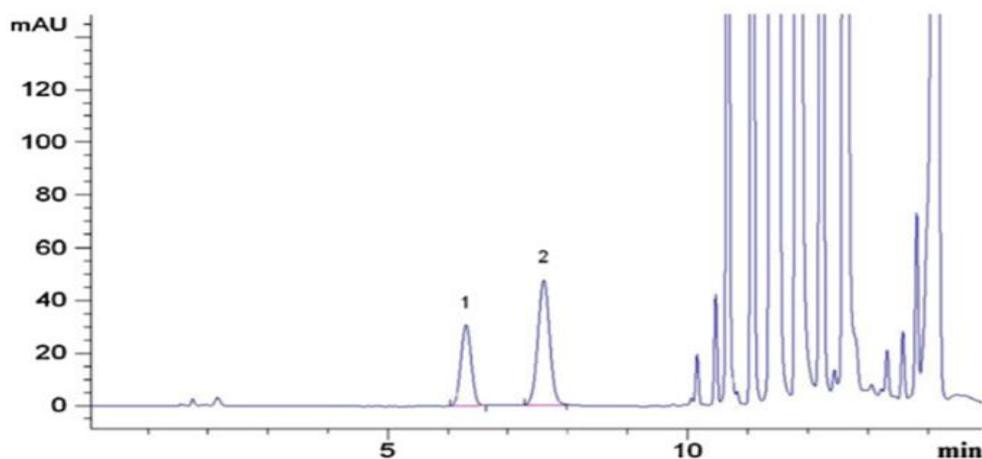


Figura 7. El cromatograma de HPLC de derivados de Fmoc-OSu glucosamina. 1= Derivado de α -Fmoc glucosamina y 2=Derivado de β -Fmoc glucosamina.

La suma de las dos áreas de los picos se utilizó para calcular el contenido total de glucosamina. Con el contenido total de dicha glucosamina, fue posible determinar la concentración de quitosano obtenido, mediante la siguiente ecuación:

$$C\% = \frac{m_g(mg)}{215.7 \times m_o(mg)} [161.2 + DA(\%) \times 42 + (1 - DA(\%)) \times M_A] \times 100\%$$

Dónde: C es el contenido de quitosano (%); m_g es el contenido de glucosamina determinado por HPLC; 215,7 es el peso molecular de glucosamina; m_o es el peso de la muestra para el análisis; 161,2 es el peso molar de la unidad de repetición de glucosamina en el quitosano; DA es el grado de acetilación del quitosano; 42 es el peso molar de un grupo acetilo y M_A es el peso molecular del contraácido en el quitosano. A pesar de proporcionarnos dicha fórmula, el trabajo no menciona la concentración obtenida.

Otro estudio que muestra un análisis de oligoquitosanos por el método de HPLC, fue el llevado a cabo por Kim en 2013, quien logró la detección de polímeros de GlcN compuestos de DP 2-12, expresados como G2-G12, el cromatograma se muestra en la figura 8.

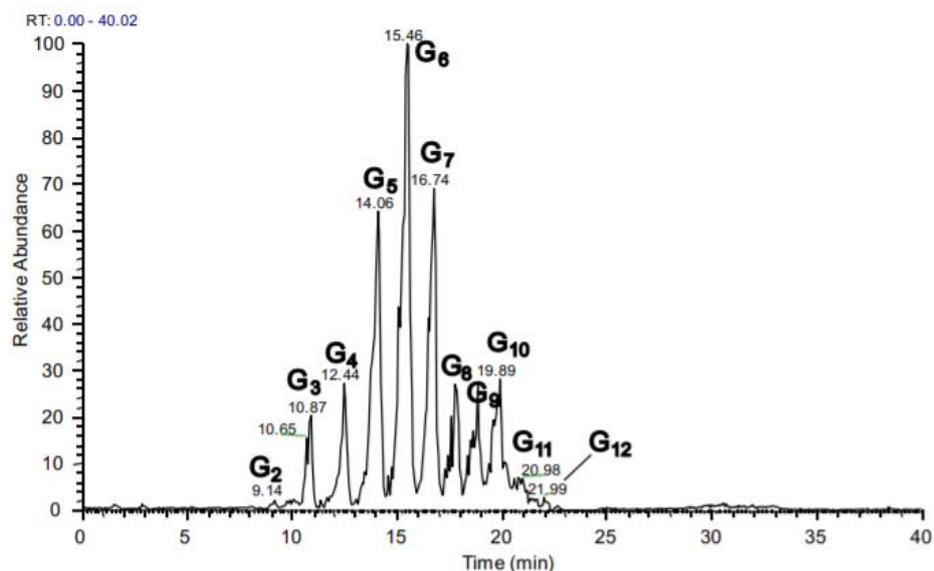


Figura 8. Cromatograma obtenido de Cromatografía líquida-Espectrometría de masas de 3 mg mL^{-1} de quitoooligosacáridos, donde se inyectaron $10 \text{ }\mu\text{L}$ de muestra. Cada pico está etiquetado como G_n , donde "n" es el número de unidades de glucosamina repetidas (DP) en un quitoooligosacárido.

6.3. CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE OLIGOQUITOSANOS

6.3.1. Condiciones de operación en CCF para el análisis de oligoquitosanos

De los estudios reportados en la bibliografía sólo se encontraron dos sobre el empleo de cromatografía en capa fina para la identificación de oligoquitosanos. En este sentido, Pagnoncelli *et al.* en 2010 realizaron un ensayo previo al análisis de COS en cromatografía capa fina, que brevemente consistió en producir las enzimas y evaluar la actividad quitosanasas midiendo los azúcares reductores por el método de DNS, con D-glucosamina como estándar. Para el análisis de COS colocaron $30 \text{ }\mu\text{L}$ de la mezcla en placas de gel de sílice (Merck 60), utilizando como fase móvil un sistema disolvente de n -propanol-agua amoniacal al 30% (2:1, v/v), eluyendo a la par un estándar de COS, compuesto por los derivados de glucosamina, desde (GlcN)₂ a (GlcN)₆. Las placas se secaron con aire caliente y se sumergieron en solución de nitrato de plata ($0.7 \text{ g} / 200 \text{ mL}$ de acetona). La placa se secó con aire

caliente nuevamente y los COS se detectaron rociando la placa con una solución de etanol / hidróxido de sodio 0.5 N y luego calentando a 80 °C durante 20 min.

Otro estudio fue el llevado a cabo por Varun en 2017 en donde empleó la cáscara de camarón e hidrólisis ácida de la quitina, para la obtención de oligoquitosanos, haciendo una previa desmineralización y desproteización de la quitina. Para el método de cromatografía en capa fina utilizaron 1 µL de muestra el cual se colocó en una placa de aluminio de silica gel 60 F254 5×10 (M/s Merck, USA). La fase móvil de este caso es muy similar al anterior, que contenía *n*-propanol: agua: agua amoniacal al 25% (7: 2: 1). El resto de la metodología es igual al anterior. En este trabajo la concentración de COS se cuantificó mediante el método del azúcar reductor Nelson-Somogyi, empleando glucosamina como estándar.

De acuerdo con los reportes anteriores, el procedimiento para la identificación de oligoquitosanos a partir de cromatografía en capa fina es muy similar, se recomienda utilizar ambas soluciones con diferentes relaciones de concentración entre agua, *n*-propanol y agua amoniacal.

6.3.2. Condiciones de operación en HPLC para el análisis de oligoquitosanos

De entre los artículos consultados, básicamente podemos distinguir dos condiciones de operación diferentes para el análisis mediante el uso de HPLC, diferenciándose por el equipo de detección a utilizar: un detector de UV con arreglo de diodos (PDA), y el otro detector utiliza el principio de espectrometría de masas.

Yan en 2012, estableció unas condiciones de operación para el uso de PDA. Indicando el procedimiento para la identificación de oligoquitosanos mediante un método indirecto, en el cual se realizó la hidólisis del quitosano en condiciones ácidas en glucosamina, posteriormente se realizó una derivatización de la glucosamina liberada con Fmoc-OSu. Las condiciones de operación fueron las siguientes: se utilizó un sistema Agilent 1100 equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, muestreador automático y detector de matriz de fotodiodos (PDA). La columna Agilent Zorbax SB-C18, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm. Los eluyentes utilizados fueron agua, ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo (ACN). El gradiente de elución comenzó con 70% de TFA al 0.05% en agua y al 30% de ACN. Después de 6 min, el eluyente B se elevó al 100% de ACN en 5 min. La velocidad de elución fue constante a 0.8 mL/ min y el volumen de inyección fue de 10 µL para muestras como

para estándares. El cromatograma se registró a 265 nm UV. Hay una referencia a este trabajo en (Zhou, 2005), donde se especifica mejor las condiciones de análisis.

Otra propuesta para la identificación de los oligoquitosanos fue mediante el equipo de detección utilizado por Kim (2013), en el cual utilizaron espectrometría de masas. Los eluyentes con los que se trabajó fueron agua y acetonitrilo, formando la fase móvil. Ocupando una velocidad de flujo de 1.0 mL min, y usando el siguiente gradiente de elución: 0-15 min, incremento lineal de 20% B a 33% B; 15-20 min, 33% de B; 20-21 min, disminuir a 0% B; y 21-30 min, 0% B. Utilizaron un equipo modelo NS-4000 Futecs, equipado con un muestreador automático, donde se inyectaron 10 µL de solución de muestra estándar para cada análisis LC-MS y su espectro de masas se obtuvo empleando un espectrómetro de masas con trampa de iones. La separación se logró en una columna de amina (4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm) de Showdex Asahipak.

Debido a la poca información que se tiene respecto del empleo de HPLC para la determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, se recomienda emplear la metodología descrita por Yan en 2012, ya que el detector de espectrometría de masas es menos asequible. Dicha metodología serviría como modelo de estudio, pero estaría sujeta a modificaciones para lograr identificar y cuantificar de mejor manera los oligoquitosanos de interés.

7. CONCLUSIONES

- Las mejores condiciones de cultivo sólido para la producción de oligoquitosanos dependen de las especies y cepas empleadas, sin embargo, el empleo de un medio mineral en combinación con otro sustrato orgánico, como cáscara de camarón y medio mineral favorece este proceso. La temperatura (entre 25 – 30 °C), la agitación y el pH también son factores críticos que dependen de la cepa y especie para la producción de COS.
- Los COS identificados son compuestos derivados de GlcN con unidades de glucosamina repetidas (DP) que van desde 2 a 12.
- Las condiciones de operación para la identificación de COS mediante Cromatografía en capa fina son: el uso de placas de gel de sílice y como fase móvil el n -propanol-agua amoniacal al 30% (2: 1, v/v).

- Las condiciones de operación para la identificación de COS mediante HPLC son: detectores el espectrómetro de masas con trampa de iones y detector de matriz de fotodiodos (PDA), agua y acetonitrilo como eluyentes y columna de amina (4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm) de Showdex Asahipak.

8. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

- Se lograron describir las condiciones de cultivo sólido para la producción de oligoquitosanos, a partir de algunos HE, siendo estas condiciones tan variables como las especies y cepas en estudio.
- Se lograron identificar algunos tipos de oligoquitosanos obtenidos por actividad quitinolítica y quitin desacetilasa, a partir de CCF y HPLC.
- Se obtuvieron los parámetros adecuados para el análisis la Cromatografía en capa fina de los oligoquitosanos producidos por algunos HE.
- Se identificaron las condiciones de operación adecuadas para el análisis de oligoquitosanos por Cromatografía Líquida de Alta resolución.

9. REFERENCIAS

1. Alves, S. 1998. Controle microbiano de insetos. 2ª Ed. Brasil.
2. Arenas, O. R., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernández, F. D., & Victoria, D. A. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.
3. Asaff A., Cerda-García-Rojas C., Viniegra-González G. & de la Torre, M. (2006). Carbon distribution and redirection of metabolism in *P. fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochem.* 41: 1303-1310.
4. Barranco, E. *et al.*, 2002". Criteria for the selection of strains of ento-mopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation", en *Enzyme and Microbial Technology* 30: 910-915.
5. Barnes SE, Moore D (1997) The effect of fatty, organic, or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* 101: 662-666.

6. Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., *et al.* (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25, 108-118.
7. Bosso, C. & Domard, A. (1992). Caracterización de oligómeros de glucosamina y N - acetilglucosamina mediante espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos. *Espectrometría de masas orgánica*, 27 (7), 799-806.
8. Cantú-Ruiz, A. L., Galván-Quintero, A. O. y Mar-Solís, L. M. (2017, enero 01). Aplicaciones biotecnológicas en el control biológico. Artrópodos y Salud. Pág 54-70. <http://artropodosysalud.com/Publicaciones/No7-Jun2017/No8.html>.
9. Carruthers IR, Hural K (1990). Fungi as natural occurring entomopathogens. En Baker RR, Dunn PE (Eds.) *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Liss. Nueva York, EEUU. pp. 115-138.
10. Cloyd R. The Entomopathogen *Verticillium lecanii*. [On line] 2004. Disponible en: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf612.html>-<http://www.laverlam.com.co/espanol/Agricultura/agricultura.htm>. Acceso 20- 9- 2015.
11. Cortez-Madrigal, H. (2007). Production of *Iecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* in different media and pathogenicity. *Agricultura técnica en México*, 33(1), 83-87.
12. Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en Química Orgánica: cromatografía. Cátedra de Química orgánica y Biológica. 1a edición. Santiago del Estero: Universidad Nacional de Santiago del Estero - UNSE. Facultad de Ciencias Forestales
13. Cupul, W. C. (2009). Caracterización fisiológica y molecular de *Paecilomyces fumosoroseus* (wize) Brown & Smith y su patogenicidad en estadios inmaduros de *Bemisia tabaci* (gennadius) (Disertación doctoral, Instituto Tecnológico de Conkal).
14. De Faria M. R. y Wraight S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*. 43, 237-256.
15. Diáñez, M.F., M. Santos, F. Carretero, and F. Marín. 2016. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(6):1934- 1944.
16. Facultad de química. (2007). Química Analítica Instrumental II: Técnicas Cromatográficas Universidad Nacional Autónoma Metropolitana (UNAM). México
17. García-Espejo, C.N., M.M. Mamani-Mamani, G.A. Chávez-Lizárraga, y M.T. Álvarez-Aliaga. 2016. Evaluación de la actividad enzimática de *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1):20-32.
18. Ghormade, V., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. (2017). Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International journal of biological macromolecules*, 104, 1415-1421.

19. González, C., Valbuena, A., Celis, B., Perentena, L., & Colina, M. (2015). Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrógeno. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, 16(1), 43-68.
20. Horaczek A. & Viernstein H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Control*. 31, 65-71.
21. INTAGRI, 2021. Consultado de:
 - 21.1. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>
22. Iliina A. & Varlamov, V. (2004). Hidrólisis de quitosano en ácido láctico. *Appl. Biochem. Microbiol.* 3, 300.
23. Jackson D, Zemenick K, Huerta G. (2012). Occurrence in the soil and dispersal of *Lecanicillium lecanii*, a fungal pathogen of the green coffee scale (*Coccus viridis*) and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15: 389-401.
24. Jaramillo, J. L., Montoya, E. C., Benavides, P., & Góngora, C. E. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista colombiana de entomología*, 41(1).
25. Jaronski, S. T. (2014). Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. *Mass production of beneficial organisms*, 357-413.
26. Jiménez, M. A., Gutiérrez, C. G., García, N. M. R., Meyer, M. L., & Hernández, J. C. S. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (Fabricius). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(3), 219-226.
27. Kataoka, K., Maeda, M., Nishimura, T., Nitadori, Y., Tsuruta, T., Akaike, T., & Sakurai, Y. (1980). Estimation of cell adhesion on polymer surfaces with the use of "column-method". *Journal of biomedical materials research*, 14(6), 817-823.
28. Khachatourians G. G. & Qazi S. S. (2008). Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology. En: Human and animal relationships (A. A. Brakhage & P. F. Zipfel, Eds.). Springer, Berlin, Alemania, pp 33-61.
29. Kim, J., Kim, J., Hong, J., Lee, S., Park, S., Lee, J. H., & Kim, J. (2013). LC-MS/MS analysis of chitooligosaccharides. *Carbohydrate research*, 372, 23-29.
30. Klein D, Eveleigh DE. 1998. Ecology of Trichoderma. In: Kubicek CP, Harman GE, eds. *Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics*. London, UK: p 57-74
31. Kojima, K., Yamamoto, K., Irimura, T., Osawa, T., Ogawa, H., & Matsumoto, I. (1996). Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41: relation with annexin IV, molecular basis of the doublet forms (p33 and p41), and modulation of the carbohydrate binding activity by phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7679-7685

32. Letzel, M., Synstad, B., Eijsink, V. et al. (2000). Libraries of chito-oligosaccharides of mixed acetylation patterns and their interactions with chitinases, *Adv. Chitin Sci.* 4. 545–552.
33. Logesh, A., Thillaimaharani, K., Sharmila, K., Kalaiselvam, M. & Raffi, S. (2012). Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 140–143. doi:10.1016/s2221-1691(11)60208-6
34. López-Llorca, L. V.; Hans-Börje, J. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad, v. 3, n. 6, p. 12 – 15, 2001.
35. Marcello, C.M., A.S. Steindorff, S.P. Silva, R.N. Silva, L.A.M. Bataus, and C.J. Ulhoa. 2010. Expression analysis of the exo- β -1,3- glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165:75-81.
36. Martínez, B., D. Infante, y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28(1):1-11.
37. Maurer P, Couteaudier Y, Girard PA, Bridge PD & Riba G (1997) Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101: 159-164.
38. Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L. M., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 415-429.
39. Milner JR (2000) Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News Inf.* 20: 47-50
40. Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90.
41. Montilla García, D. (2013). Efecto de la concentración de clorpirifos sobre la germinación y el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea* en condiciones de laboratorio.
42. Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 95-103.
43. Mourya, V. K., Inamdar, N. N., & Choudhari, Y. M. (2011). Chitooligosaccharides: synthesis, characterization, and applications. *Polymer Science Series A*, 53(7), 583-612.
44. Muzzarelli, R. A. *Carbohydr. Polym.* 20, 7 (1993). POLYMER SCIENCE Series A Vol. 53 No. 7 2011
45. Nadarajah, K., Lau, B. Y. C., Othman, O., Hasidah, M. S., & Wan-Mohtar, W. Y. (2006). Characterization of chitin deacetylase from fungus *Absidia butleri* dr. *Malaysian Applied Biology*, 35(2), 59.

46. Nahar, P., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, *85*(2), 80–88. doi:10.1016/j.jip.2003.11.006
47. Navarro, S. R., Florido, J. E. B., Cruz, V. H. M., & Sierra, R. A. T. (2017). Extractos crudos producidos por fermentación de hongos entomopatógenos para el control de *Macrodactylus infuscatus* bates (coleoptera: melolonthidae): una alternativa hacia la sustentabilidad. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, (33), 17-30.
48. Padilla Martín, V. (2017). Bioinsecticidas. Trabajo de fin de grado. Facultad de ciencias. Sección de Biología. Universidad de La Laguna.
49. Pagnoncelli, M. G. B., Araújo, N. K. D., Silva, N. M. P. D., Assis, C. F. D., Rodrigues, S., & Macedo, G. R. D. (2010). Chitosanase production by *Paenibacillus ehimensis* and its application for chitosan hydrolysis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*(6), 1461-1468.
50. Peniche C (2006). Estudios sobre quitina y quitosana. [Tesis en opción del título de Doctor en Ciencias]. Editorial Universitaria, Universidad de La Habana.
51. Pham T. A., Kim J. J. & Kim K. (2010). Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide. *Mycobiology* *38*, 137-143.
52. Piquero, J., & Gómez, F. N. (2010). Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago. Universidad de Zaragoza.
53. Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, *31*(12), 856-860.
54. Romero-Cortes, T., P.A. López-Pérez, M. RamírezLepe, y J.A. Cuervo-Parra. 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Ciencia* *31*(3):32-45.
55. St. Leger RJ, Roberts DW (1997) Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* *15*: 83-87
56. Tamez G., P., Galán W., L. J., Medrano R., H., García G., C., Rodríguez P., C., Gómez F., R. A., & Tamez G., R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, *4*(2), 143-152.
57. Terry, L. A., & Joyce, D. C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, *32*, 1e13.
58. Trombotto, S., Ladavière, C., Delolme, F., & Domard, A. (2008). Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers. *Biomacromolecules*, *9*(7), 1731-1738.

59. Ulanski, P., & Rosiak, J. (1992). Preliminary studies on radiation-induced changes in chitosan. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 39(1), 53-57.
60. Varona, M. (2009). Efecto "in vitro" de dos detergentes agrícolas sobre la germinación y el crecimiento de *Lecanicillium lecanii*. Tesis para obtener el Título de Biólogo Microbiólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.
61. Varun, T. K., Senani, S., Kumar, N., Gautam, M., Gupta, R., & Gupta, M. (2017). Extraction and characterization of chitin, chitosan and chitooligosaccharides from crab shell waste. *Indian Journal of Animal Research*, 51(6).
62. Wraight S. P., Inglis G. D. & Goettel M. S. (2007). Overview of pathogen groups: fungi. En: Field manual of techniques in invertebrate pathology (L.A. Lacey y H. K. Kaya, Eds.). Springer, Holanda, pp 223-248
63. Yan, X., & Evenocheck, H. M. (2012). Chitosan analysis using acid hydrolysis and HPLC/UV. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1774-1778.
64. Yoksan, R., Akashi, M., Miyata, M., & Chirachanchai, S. (2004). Optimal γ -ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure. *Radiation research*, 161(4), 471-480.
65. Zhou, J. Z., Waszkuc, T., Mohammed, F. *et al.* (2005). Determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(4), 1048-1058.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Dra. LUZ MARÍA ZENIT TOVAR CASTRO



Dr. JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA DETERMINACIÓN DE OLIGOQUITOSANOS OBTENIDOS ENZIMÁTICAMENTE, POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y HPLC”

Correspondiente al proyecto genérico:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

PRESENTA

Ángel Manuel Flores Jiménez

Matrícula

2123056308

ASESORES:

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro
No. Económico: 32252

Dr. José Antonio Martínez Ruíz
No. Económico: 30046

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con dirección: Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P 04960, Cd. De México, México.

Periodo: 4 de julio del 2019 al 4 de enero del 2020

Ciudad de México a 12 de junio de 2021

10. RESUMEN

La biotecnología ha permitido el desarrollo de productos mejorados, elaborados con sistemas que involucran el empleo de organismos vivos o sus productos bajo procesos que permiten su comercialización, todo esto utilizando principios de ingeniería e investigación científica (Tamez, 2001). Un área de aplicación de la biotecnología es la agrícola, que permite resolver problemas de plagas mediante el control biológico, que consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control de sus poblaciones incluyendo competencia, prefación, parasitismo y patogenicidad (Cantú, 2017). El control biológico aplicado puede llevarse a cabo mediante diversos métodos y actualmente se está buscando la manera de desarrollar otras medidas de control de plagas que permitan el desarrollo de una agricultura sostenible y la conservación del medio ambiente. Una de las alternativas más prometedora es el desarrollo de bioinsecticidas basados en los microorganismos (bacterias y hongos) y virus entomopatógenos (Padilla, 2017). En este sentido, los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Entre esos está la capacidad de regular las plagas para mantenerlas en niveles adecuados (Motta, 2011). Según Pucheta Diaz *et al.* (2006), los HE tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos; para López & Hans (2001), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium*.

Los hongos entomopatógenos son capaces de emplear sustratos como la quitina para su crecimiento, la cual es un importante polisacárido estructural que provee de integridad estructural y protege a insectos y crustáceos (Gonzales, 2015). Se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación (DA) de 0.66, es decir, que una de cada tres de sus unidades se encuentra desacetilada. El quitosano es un copolímero lineal de unidades de 2-acetamido-desoxi-b-D-glucano (GlcNAc) y 2-amino-2-desoxi-b-D-glucano (GlcN) enlazadas (1-4) en proporciones variables (Trombotto, 2008), dichas variaciones entre sus proporciones generan los derivados del quitosano, llamados oligoquitosanos (COS). La hidrólisis o quitonólisis produce quitosanos con bajo DP y bajo MW. Los quitosanos con DP <20 y de peso molecular medio de hasta 3900 Da (0,2-30 kDa) se denominan oligómeros de quitosano,

quitoligómeros o quitoligosacáridos (Muzzarelli, 1993). La separación y detección de oligómeros de quitosano puede realizarse mediante técnicas cromatográficas. Si están presentes, el monosacárido y los disacáridos pueden detectarse en las muestras de COS mediante TLC o cromatografía líquida en fases estacionarias para intercambio iónico, permeación en gel, fase normal o inversa con una columna amino (Mourya *et al.*, 2011).

Los oligoquitosanos se han convertido en una alternativa prometedora a los fungicidas sintéticos debido a su carácter natural, actividad antifúngica y de respuestas de defensa en el tejido vegetal (Bautista *et al.*, 2006; Terry & Joyce, 2004). Debido a esto, el presente trabajo tuvo como objetivo llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre la determinación de oligoquitosanos obtenidos enzimáticamente, mediante cromatografía en capa fina y por HPLC, con el propósito de identificar las condiciones importantes para su obtención, así como para su identificación mediante análisis cromatográfico. Para poder cumplir con este objetivo se realizó una revisión sistemática de documentos de diferentes fuentes, provenientes de distintas revistas científicas, con un enfoque al tema de condiciones de cultivo sólido para obtener oligoquitosanos; al igual que los métodos para la identificación de estos, obtenidos enzimáticamente; así como condiciones de operación de los métodos de HPLC y cromatografía en capa fina, para su análisis. Los artículos consultados fueron obtenidos mediante el uso de cinco motores de búsqueda diferentes: Google Scholar, Pubmed, ScienceDirect, BIDIUAM y Redalyc. La búsqueda se basó en encontrar estudios previos, que ayudaran a cumplir con los objetivos planteados. En algunas de las investigaciones presentadas se optó por analizar sus propias referencias bibliográficas con el objetivo de rescatar algunos otros estudios potenciales respecto al tema. Para la obtención de la información recopilada se incluyó todo tipo de documento que incluyera los siguientes descriptivos: oligoquitosano, fermentación sólida, hongos entomopatógenos, quitina, quitosano, cromatografía en capa fina, HPLC, que son aquellas definiciones sobre las que se centró la investigación. El principal criterio de exclusión fue aquellos artículos que utilizaron algún otro método de caracterización diferente a cromatografías. Se localizaron 172 estudios, de los cuales una vez analizados se descartaron 156. Para proceder a la selección se revisaron los abstracts y en caso necesario los artículos completos con el fin de decidir si la información que contenían estaba o no relacionada con los objetivos de este estudio. En total se utilizaron 16 artículos de difusión científica para cumplir con los objetivos planteados en este estudio. La información recabada se procedió a estructurar en 4

subapartados: el primero, dedicado a las condiciones de cultivo de fermentación sólida; el segundo, para la identificación de oligoquitosanos obtenidos a partir de la actividad quitinolítica y quitin desacetilasa, y los últimos dos, con la finalidad de conocer las condiciones de operación para el análisis de oligoquitosanos en cromatografía en capa fina y HPLC, respectivamente.

Como se pudo constatar en esta revisión, las mejores condiciones de cultivo sólido para la producción de oligoquitosanos dependen de las especies y cepas empleadas, sin embargo, el empleo de un medio mineral en combinación con otro sustrato orgánico, como cáscara de camarón y medio mineral favorece este proceso. La temperatura (entre 25 – 30 °C), la agitación y el pH también son factores críticos que dependen de la cepa y especie para la producción de COS. Los oligoquitosanos identificados reportados son compuestos derivados de GlcN con unidades de glucosamina repetidas (DP) que van desde 2 a 12. Las condiciones de operación para la identificación de COS mediante Cromatografía en capa fina son: el uso de placas de gel de sílice y como fase móvil el n -propanol-agua amoniaca al 30% (2: 1, v/v). Las condiciones de operación para la identificación de COS mediante HPLC son: detectores el espectrómetro de masas con trampa de iones y detector de matriz de fotodiodos (PDA), agua y acetonitrilo como eluyentes y columna de amina (4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm) de Showdex Asahipak.

Referencias

Tamez G., P., Galán W., L. J., Medrano R., H. *et al.* (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 4(2), 143-152.

Cantú-Ruiz, A. L., Galván-Quintero, A. O. y Mar-Solís, L. M. (2017, enero 01). Aplicaciones biotecnológicas en el control biológico. *Artrópodos y Salud*. Pág 54-70. <http://artropodosysalud.com/Publicaciones/No7-Jun2017/No8.html>

Padilla Martín, V. (2017). Bioinsecticidas. Trabajo de fin de grado. Facultad de ciencias. Sección de Biología. Universidad de La Laguna.

Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90.

Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.

López-Llorca, L. V.; Hans-Börje, J. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad, v. 3, n. 6, p. 12 – 15, 2001.

González, C., Valbuena, A., Celis, B., Perentena, L., & Colina, M. (2015). Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrógeno. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, 16(1), 43-68.

Trombotto, S., Ladavière, C., Delolme, F., & Domard, A. (2008). Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers. *Biomacromolecules*, 9(7), 1731-1738.

Muzzarelli, R. A. Carbohydr. Polym. 20, 7 (1993). POLYMER SCIENCE Series A Vol. 53 No. 7 2011

Mourya, V. K., Inamdar, N. N., & Choudhari, Y. M. (2011). Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications. *Polymer Science Series A*, 53(7), 583-612.

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., et al. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25, 108-118

Terry, L. A., & Joyce, D. C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Dra. LUZ MARÍA ZENIT TOVAR CASTRO



Dr. JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ