

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**EL QUITOSAN COMO AGENTE DE INHIBICION MICOTICA EN
PATOGENOS DE PEPINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN GALVEZ VAZQUEZ

ASESORES:

M. EN C. NIDIA ARAGON SALGADO

M. EN C. PATRICIA MIRANDA CASTRO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

El quitosán como agente de Inhibición micótica
en patógenos de pepino

que presenta la pasante: María del Carmen Gálvez Vázquez
con número de cuenta: 8507711-1 para obtener el título de :
Ingeniera en alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx a 10 de Julio de 2001

PRESIDENTE I.B.Q. Norma B. Casas Alencaster

VOCAL M.enc. Nidia Aragón Salgado

SECRETARIO Q.F.B. Carolina Moreno Ramos

PRIMER SUPLENTE I.B.Q. María de la Luz Zambrano Zaragoza

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Ma. Guadalupe Anaya León

[Handwritten signatures and initials of the board members]

Agradezco para la consecución de este trabajo

A mi Madre

Porque cultivar es tan importante como sembrar

A Juan Carlos

Porque se necesita amor, cuidado y paciencia para ser compañero en un camino con corazón

A Nidia

Porque su labor de guía traspasa las esferas de su disciplina académica

A Paty

Porque una actitud positiva y de apoyo es su forma de instruir.

A mis hermanos y amigos

Porque de todas las maneras me han apoyado y cooperado para llegar a este resultado
Ale, Conny, Armando, Angel, Guadalupe, Uriel, Alicia, Estrella.

INDICE

Resumen	I
I Introducción	III
1 Antecedentes generales	
1.1 Pepino (cucumis sativus)	
Página	
1.1.1 Antecedentes botánicos	1
1.1.2 Variedades en México	1
1.1.3 Composición Química y aporte nutricional	2
1.1.4 Indices de cosecha	3
1.1.5 Cosecha	3
1.1.6 Centro de acopio	4
1.1.6.1 Limpieza	5
1.1.6.2 Selección	5
1.1.6.3 Clasificación y calidades	6
1.1.6.4 Envasado	7
1.1.7. Operaciones especiales	
1.1.7.1 Películas y/o cubrientes	8
1.2 Quitosán	11
1.2.1 Origen del quitosán	
1.2.2 Características del quitosán	13
1.2.2.1 Solubilidad	13
1.2.2.2 Propiedades funcionales	13
1.2.2.3 Propiedades de enlace	14
1.2.2.4 Propiedades biológicas	14
1.2.2.5 Control de microorganismos en frutos postcosecha	14
1.3 Daños causados por enfermedades fúngicas	
Hongos	16
1.3.1 Descripción general de los agentes fungicos causantes de enfermedades en pepino	16
1.3.2 Efecto de quitosán en hongos	21
1.4 Antecedentes económicos de pepino	
1.4.1 Producción y exportación	24
1.4.2 Quitosán	25
2. Objetivos	26
3. Metodología	27
4. Resultados y discusión	33
5. Conclusiones	50
Bibliografía	76

APENDICES

Apéndice 1 Sitio físico de la lesión	51
Apéndice 2	
Inoculación directa "in vivo"	52
Inoculación con lesión "in vivo"	52
Apéndice 3	
Métodos para evaluar la susceptibilidad a agentes antimicrobianos	53
Apéndice 4	
Método de conteo de células	56
Apéndice 5	
Observaciones al microscópio	61
Apéndice 6	
Cálculo de inóculos	63
Apéndice 7	
Diferencia de medias de radios de difusión	67
Apéndice 8	
Efecto funguicida y fungistático	69

TABLAS

Tabla 1 Clasificación de calidades de pepino (NMX-FF-023-1982)	5
Tabla 2 Resumen de signos de lesiones en fruto y morfología colonial	34
Tabla 3 Resultados de la confirmación de signos de lesión y morfología colonial de cepas patógenas	35
Tabla 4 Características macroscópicas (coloniales) y microscópicas de las cepas patógenas	37
Tabla 5.-Resumen de cepas identificadas con generos	40
Tabla 6 Contenido de esporas de las diferentes cepas	42
Tabla 7 Difusividad del quitosán en PDA expresado el diámetro en milímetros a los ph 5.0 y 5.5	43
Tabla 8 Resumen de resultados de pruebas de sensibilidad de las diversas cepas al quitosán a diferentes concentraciones	44

Tabla 9 Evaluación del tamaño colonial de las cepas (cm) y porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de quitosán	46
Tabla 10 Resultados de aplicación de películas de quitosán previa inoculación de cepas "in vivo"	47

FIGURAS

Figura 1	Estructura de quitosán	12
Figura 2	Producción anual de pepino en toneladas.	24
Figura 3	Sitio físico de lesión en fruto	51
Figura 4	Camara cuentaglobulos de Neubauer.	56
Figura 5	Cámara cuentaglobulos de Neubauer (vista transversal)	56
Figura 6	Cámara cuentaglobulos de Neubauer (vista de cuadrícula).	57
Figura 7	Area de conteo en ampliación.	57
Figura 8	Llenado de cámara.	58
Figura 9	Ejemplo de observación en cámara.	60

RESUMEN

El objetivo general de esta investigación fué valorar "in vitro" e "in vivo" la acción del quitosán en cepas patógenas de pepino para lo cual se obtuvieron 10 cepas de microorganismos provenientes de pepinos con daño.

Se utilizaron frutos con infecciones de campo para aislar los microorganismos patógenos a diferencia de cepas de catálogo para hacer más factible la extensión de los resultados.

Se aislaron en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) a pH 5.5; se purificaron y obtuvieron cepas pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, y *Pythium* para posteriormente probar su sensibilidad al quitosán "in vitro", aplicando el polímero en una capa sobre placas de agar.

El quitosán se dejó difundir en el PDA antes de inocular con las distintas cepas en diferentes concentraciones de esporas, dependiendo de los distintos microorganismos. Los niveles de concentración de quitosán evaluados fueron 1.5% (p/v), 2.0 % (p/v) y 2.5% (p/v), de esta valoración "in vitro", se obtuvo una concentración inhibitoria.

Con la concentración obtenida (2.0%) se procedió a evaluar el efecto "in Vivo" utilizando frutos sanos, lavados y desinfectados. Esperando una desviación al pasar al sistema "in vivo" se decidió probar también la concentración siguiente (2.5%) que presentaba un control de más del 60%. Ambas concentraciones dieron mejores resultados de los obtenidos para la condición "in vitro" pues la concentración de 2.0% controló un total de 7 cepas y el de 2.5% a todas en el nivel "in vivo"

Los resultados obtenidos posibilitan la utilización de quitosán en pepino, pero al igual que en la aplicación de otro tipo de películas cubrientes, solo es recomendable a frutos con una calidad adecuada y con un acondicionamiento previo en el centro de acopio.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de alternativas para la utilización de materiales naturales con actividad biológica para el control de microorganismos, hoy por hoy es un reto, ya que en contraparte el uso indiscriminado de sustancias químicas genera problemas de acumulación, gastos para su remoción antes del consumo, daños fitotóxicos (en el fruto), así como residuos que imparten olores o sabores extraños impartidos al producto etc. Así el hecho de saber que el quitosán, polisacárido lineal catiónico derivado de la quitina, relativamente soluble a pH ácido y que ha sido aplicado para evaluar su actividad antifúngica en algunas cepas patógenas que atacan especies frutícolas, abre la posibilidad de utilizarlo en un fruto que en nuestro país tiene un aumento de producción de más de un 30% en los últimos años (1997) y que se exporta en más de un 90% en un mercado (Estados Unidos y Canadá) que sabemos que es muy especial y cuidadoso de las condiciones antes expuestas. En el caso de esta investigación se trata de su aplicación al pepino *Cucumis sativus*, y la limitante en la calidad es principalmente el ataque de microorganismos.

Los microorganismos fúngicos causantes de la mayor cantidad de daños en esta especie son *Botrytis*, *Fusarium*, *Phyium*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rizoctonia*, *Rhizopus*, y *Sclerotinia*. reportadas bibliográficamente como de mayor incidencia, todos ellos responsables de deterioro de la calidad a diferentes niveles, desde cambios de coloración y textura hasta aparición de micelio y pérdida total de fruto.

Así el Objetivo de este trabajo es probar el quitosán como agente de inhibición micótica en patógenos de pepino.

ANTECEDENTES GENERALES

1.1 PEPINO (*Cucumis sativus*)

El pepino es una especie de la familia de las cucurbitáceas (*Cucumis sativus*), se consume en fresco, adicionado de sal como acompañante de carne o pescado, o bien encurtido como los llamados "pickles".^(1,2)

La mayoría de los autores ^(1,4) coinciden en que es originario de Asia o Africa, ya que en estos continentes existen cerca de 30 especies diferentes ⁽⁴⁾.

1.1.1 ANTECEDENTES BOTANICOS

Proviene de una planta herbácea, anual y rastrera provista de zarcillos. Sus flores de color amarillo suelen ser femeninas o masculinas ^(1,5); la polinización se lleva a cabo por insectos cruzando variedades de la misma especie. El fruto es carnoso de forma mas o menos cilíndrica y alargada lo cual depende de la variedad de que se trate pudiendo ser del orden de 13 a 20 cm,^(1,2,4) generalmente de cáscara verde oscuro aunque existen variedades de color verde claro⁽⁶⁾, en ocasiones alcanza la coloración amarilla cuando se deja madurar en la planta, siendo ésta cubierta de pequeños mamelones espinosos que la hacen ligeramente áspera; cuando el pepino es tierno⁽⁵⁾ sus semillas se hayan en 3 compartimientos siendo ovaladas, planas y blancas o crema pero también existen variedades sin semilla⁽¹⁾ y por lo tanto no necesitan la polinización para formar sus frutos.

1.1.2 VARIEDADES EN MEXICO

Las variedades son diferentes dependiendo del mercado al que se destinan, pero la mayoría provienen de material mejorado, con características deseables para el consumidor, lo que se conoce como variedades hortícolas.

En general se clasifican como rebanables (slicers) y para encurtido (pickles), aunque en ocasiones en estos últimos puede ser la misma variedad solo que cosechada antes de la madurez fisiológica.

Las variedades se han obtenido a través de años de cruza y experimentación, generando que algunas sean más resistentes a las enfermedades o bien a condiciones de determinada región como alcalinidad o salinidad.

Entre las variedades que se producen en el norte del país destacan: la Dasher II, Slice King, Poinsette 76, Sprint 440, Marketer, Hibrid Ashley⁽⁷⁾, cuya demanda se destina para los mercados de exportación.

A diferencia de la producción en el centro-sur donde resultan de mayor importancia: Poinsette, Stone, Sprint 4405, Dasher⁽⁷⁾ las cuales también tienen una amplia aceptación para el mercado Nacional⁽⁸⁾.

1.1.3 COMPOSICION QUIMICA Y APORTE NUTRICIONAL

Químicamente está constituido por más del 95% de agua^(1,2) por lo que es un envase delicado del preciado líquido, mientras que su contenido de carbohidratos oscila entre el 2 y 4 % ⁽²⁾, lo que implica sobre todo fibra, su pulpa y cáscara contienen vitaminas como A y C ⁽⁹⁾, minerales ^(1,2,10) entre los que destacan K, P, Ca y Mg⁽¹¹⁾.

Los aminoácidos que principalmente se encuentran constituyendo sus proteínas son: ácido glutámico, aspártico, alanina, serina, y treonina. ^(9,12)

Existen las llamadas cucurbitacinas las cuales son triterpenos y esteroides, que le imprimen sabores amargos, mediante las cuales los insectos identifican las especies y contribuyen a la polinización.⁽¹²⁾

El olor del pepino se debe a aldehídos insaturados en particular al trans-2,cis-6-nonadienal que es el que da el aroma característico, aunque existen otros aldehídos que también contribuyen pero necesitan cantidades mayores para ser percibidos.⁽⁹⁾

1.1.4 INDICES DE COSECHA

Una vez que ha transcurrido un periodo de aproximadamente 2 meses⁽¹⁾, el fruto entra en la etapa de madurez fisiológica la cual se evidencia a través de los llamados índices de cosecha, los cuales establecen el estado fisiológico del producto a través de apreciaciones de color, tamaño, aroma, textura, o composición; en general los índices se han establecido de manera empírica, como son:

- Coloración verde en todo el cuerpo dado que la coloración amarilla es signo de senescencia.⁽¹⁾
- Semillas de color blanco-cremoso.

Los índices objetivos más aplicados sin descartar que existen diferencias respecto a las variedades que se utilizan son:

- Longitud de 15-20 cm en promedio lo que constituye 2/3 partes de su completo desarrollo antes de mostrar signos de maduración en la planta.
- Actividad de la poligalacturonasa en el tejido de la cavidad en donde se encuentran las semillas, ya que esta aumenta durante la maduración⁽¹²⁾.
- El valor de pH en la cavidad que contiene a las semillas disminuye cuando la actividad de la poligalacturonasa aumenta⁽¹²⁾ variando de 6.2 a 4.6.

1.1.5 COSECHA

Consiste en la recolección del producto una vez alcanzada la madurez requerida y de acuerdo al destino del mismo. Esta especie puede ser cosechada mecánicamente mediante el sistema destructor de la enredadera^(1,13) sin embargo se generan múltiples daños (golpes, rasgaduras o punciones) que a menudo

disminuyen su calidad; cuando se trata de material para consumo en fresco la cosecha preferentemente se hace a mano con navaja^(1,5,6), en lugar de torcer el pedúnculo y correr el riesgo de rasgar el fruto lo cual facilita la invasión de microorganismos por la lesión producida.

Cabe considerar que las condiciones económicas que privan en el país, como la abundante y barata mano de obra favorece la cosecha manual.

Es importante que los cortadores o cosechadores tengan experiencia ya que los índices de cosecha usados por ellos, varían dependiendo de las distintas variedades que se manejan en la República; además que estos índices están directamente relacionados con los criterios de calidad que se consideran en este producto.

Esta operación se realiza a lo largo de casi 3 semanas, efectuando de 2 a 4 cortes por semana para asegurar la calidad requerida.

1.1.6 CENTRO DE ACOPIO

Es el lugar en que se brindan las operaciones básicas o de acondicionamiento incluyen: limpieza, selección, clasificación y envasado del producto.

Es recomendable que el centro de acopio se encuentre lo más cercano posible de la huerta ya que el pepino al igual que otras hortalizas, requiere de un manejo adecuado para mantener la calidad que alcanzó en campo.

Para el transporte del campo al centro de acopio destacan el cajón de 300 Kg, las góndolas de fibra de vidrio con descarga por medio de agua. En cualquiera de los casos se sugiere mantener los recipientes de transporte libres de basura y evitar una altura excesiva de la carga para no tener compresiones⁽¹⁴⁾

Sin embargo en nuestro país la modalidad, el orden y aún la practica de estas operaciones dependen del mercado al que se destina el producto, ya que si se comercializa en el ámbito nacional para centrales de abasto o mercados locales, en ocasiones ni el lavado se lleva a cabo, ya que implica gastos adicionales que, si el productor es además el transportador, no esta dispuesto a pagar; en cambio si el producto se compra a pie de huerta por los almacenes o supermercados, estos se encargan de brindar al pepino estas operaciones. Cuando el producto se orienta a la exportación el mismo productor se encarga de los gastos o bien los intermediarios hasta la puesta en frontera.

1.1.6.1 LIMPIEZA

Consiste en la remoción de suciedad y materias extrañas como tierra, hojas, insectos o incluso residuos de fertilizantes o insecticidas.(6)

Se recomienda sea húmeda, frecuentemente en tanques de recepción con agua y cloro (60 ppm)₍₆₎ para reducir la carga microbiana mediante agitación, se recomiendan los cambios de agua. O bien se usan bandas con aspersores y cepillos suaves.

Es conveniente un secado rápido en túnel para eliminar el exceso de agua.

1.1.6.2 SELECCION

Esta operación tiene como objetivo eliminar aquellos productos dañados por el sol, insectos, ataques de microorganismos o que no tienen la forma y/o características, atribuidas a alteraciones genéticas, deficiencia nutricional e incluso el estado de madurez especificado por el mercado al que se dirige.

Son necesarios los seleccionadores capacitados para poder distinguir aún los más ligeros daños porque en las etapas posteriores estos pueden ser motivo de contaminaciones o rechazo.

1.1.6.3 CLASIFICACION Y CALIDADES

Implica categorizar en grupos de acuerdo a las características y especificaciones de la Norma así como los criterios de calidad, mismos que se establecen para proteger al consumidor y estandarizar los precios en el mercado, en base a ellos se realiza la clasificación en los diferentes grupos las cuales tendrán un destino y costo definido de acuerdo a su calidad.

Se consideran color, tamaño, peso o alguna otra característica medible, la Norma de calidad para el pepino en nuestro país NMX-FF-023-1982 establece los siguientes criterios, mostrados en la tabla 1 considerando la cantidad y tipo de defectos para cada grupo.

Tabla 1 CLASIFICACION DE CALIDADES DE PEPINO (NMX-FF-023-1982)

TAMAÑO	GROSOR (cm)	LONGITUD (cm)	MEXICO EXTRA	MEXICO 1	MEXICO 2
A	menor 3.5	menor 14.0		A	A
B	3.5-5.0	14.0-16.5	B	B	B
C	5.1-6.5	14.0-16.5	C	C	C
D	mayor 6.5	mayor 16.5		D	D

Fuente: Referencia 43

- 4 tamaños (A,B,C y D) de acuerdo a longitud y grosor, para establecer 3 calidades.
- La cáscara puede ser del verde oscuro al claro.
- Los frutos deben ser firmes sin raspaduras, costras, rozaduras, manchas, quemaduras de sol o enfermedades.
- Las puntas no deben hundirse al presionar sobre ellas.

- El amarillamiento es indeseable, sin embargo una ligera coloración amarilla también puede ser debida a que el fruto estuvo en contacto con el suelo o la planta.
- La rugosidad de la cáscara depende de la variedad.
- Estar bien desarrollados, tener sabor y olor característico.

De acuerdo a nuestra norma se recurre principalmente al tamaño y peso para una clasificación mecánica tomando en cuenta su longitud y grosor, utilizando rodillos inclinados longitudinales (de cerdas, madera o metal) los cuales forman un ángulo que permite la variación de diámetros desde la entrada a la salida, generando que el producto vaya cayendo cuando encuentra el diámetro de su clasificación en canales acolchados colocados debajo de los rodillos. (6,14)

Una variación de este sistema utiliza 2 bandas de rodillos situados una encima de la otra, teniendo una separación fija entre los rodillos que es mayor que el diámetro de la pieza que se vaya a seleccionar. Los rodillos inferiores se colocan de forma que proporcionen una separación escalonada variable entre las dos bancadas de rodillos.

Otro criterio de clasificación es por su peso empleando una banda con una serie de compartimientos que relacionan de manera proporcional la longitud y el diámetro con el peso y mediante vibración previa los acomoda en el centro. Una vez realizada la medición, caen en la banda que los llevará a su contenedor. Este equipo es más adecuado porque al usar bandas la caída se amortigua. (6)

Esta operación también puede hacerse manualmente por personal capacitado.

1.1.6.4 ENVASADO

Puede ser en cajas o bien rejas de madera; en otros casos cajas telescópicas (que se ensamblan adecuadamente) de cartón corrugado, ambas proveen protección al

fruto de daños por compresión y golpes. En ocasiones se prescinde del envasado y se hace a granel, pero no es recomendable por la susceptibilidad al daño. La elección depende una vez más del tipo de mercado al que se dirige.

1.1.7 OPERACIONES ESPECIALES

Existen las operaciones denominadas especiales, dirigidas principalmente por el costo a productos canalizados a exportación, tienen como función mantener la calidad, y mejorar la apariencia, implicando con ello un gasto adicional aparente, pero incrementando el valor del producto al hacerlo atractivo al consumidor incluso por mas tiempo logrando vidas útiles mayores.

1.1.7.1 APLICACIÓN DE PELICULAS Y/O CUBRIENTES

Una gran variedad de frutos poseen naturalmente una capa de cera que les protege de la pérdida de agua, permitiendo una adecuada respiración aún en condiciones relativamente bajas de humedad relativa o alta temperatura. Sin embargo luego de una operación de limpieza en donde se puede tallar o cepillar, ésta se remueve parcial o totalmente, exponiendo al fruto a las condiciones ambientales.(2,13)

El pepino al igual que otros frutos una vez separado de la planta que le proveía agua, comienza a perderla lo cual constituye su principal problema porque ésta ocupa el mayor porcentaje en su composición (95%).(1,2)

Tradicionalmente la aplicación de cera (camauba, abeja, parafina y mezclas o formulaciones expofeso) seguida de un cepillado para proveer brillo y homogeneidad, ha sido utilizada para controlar la pérdida de humedad sobre todo al sellar la cicatriz del pedúnculo, principal ruta de transpiración con lo que se reduce ésta hasta en un 50%.(2,8)

En algunos casos las ceras naturales son mates₍₁₃₎ a diferencia de las artificiales donde el brillo obtenido es un valor agregado por que hace el producto más atractivo comercialmente; la aplicación de este tratamiento no mejora una calidad deficiente por lo que es necesaria una selección adecuada que asegure frutos sanos y una calidad que preservar.

Entre los métodos de aplicación está la inmersión y la aspersión₍₁₅₎, lo que implica el uso de equipo diferente como en el caso de emulsiones, donde es necesario que la superficie se encuentre seca y no permita dilución de la capa₍₁₃₎, en soluciones en solvente o como espumas es necesario mantener una adecuada agitación en el tanque para evitar la separación del agua y la cera, una vez aplicada se recomienda en algunos casos el cepillado acompañado de un secado a contracorriente para fijar la capa_(2, 6, 13)

El equipo más ampliamente usado combina la aspersión con el cepillado. Los frutos son rodados a través de una banda la cual tiene entre 8-12 cepillos rotatorios mientras que la cera se asperja por boquillas que se mantienen aproximadamente a 25 cm. de altura, la cantidad de cera depositada en el producto depende del tamaño del mismo, la presión de la emulsión y la velocidad con que el producto pasa por unidad de tiempo.₍₁₃₎ Para mejores resultados el secado puede hacerse en un túnel a contracorriente, en frío o con alta temperatura._(6, 13)

Varias compañías han desarrollado formulaciones de películas cubrientes en los que incluyen aditivos, con características tipo fungicidas, o incluso inhibidores de senescencia_(2, 13, 15) específicas para los diferentes productos.

Actualmente se pueden aplicar películas de otra naturaleza como polímeros de carbohidratos como pectinas₍₆₎ o emulsiones plásticas derivadas del acetato de vinilo o polietileno, así como resinas sintéticas₍₂₎ sin embargo la mayoría de éstas se encuentran en desarrollo tecnológico y su uso es todavía restringido.

A pesar de su funcionalidad, la aplicación de películas debe ser controlada ya que inadecuadamente dosificada o formulada puede interferir con la respiración normal del fruto (acumulación de CO_2 y deficiencia de O_2) generando problemas específicos como el picado en pepino.^(2,8,15)

Esto es debido a que entre el fruto y la película se forma una micro atmósfera que es necesario monitorear tomando en cuenta que el pepino es un fruto clasificado como no climatérico, debido al comportamiento de su actividad respiratoria luego de la cosecha, no presenta un incremento, sino que se mantiene relativamente constante; es decir que existe el intercambio de gases (requieren O_2 y desprenden CO_2 , calor y vapor de agua). Sin embargo se dan cambios químicos de deterioro hasta llegar a la senescencia de manera similar a los productos climatéricos pero a un ritmo más lento; de lo que se desprende que en una atmósfera modificada propiciada por la aplicación de una película puede mantenerse al pepino por más tiempo atenuando los cambios propios del envejecimiento o senescencia y manteniendo la calidad.

El uso de atmósferas modificadas es una técnica que no deja residuos químicos en los alimentos y se refiere básicamente a cualquier atmósfera con un contenido gaseoso diferente a la del aire normal (20-21% de O_2 , 0.03% de CO_2 , 78-79% de N_2 y trazas de otros gases.) Las atmósferas controladas se refieren a aquellas estrictamente controladas durante todo el periodo de almacenamiento.⁽¹⁶⁾

Es importante el efecto de las atmósferas en el deterioro de los frutos propiciado por las condiciones que les rodea; por efecto de una atmósfera inadecuada se pueden generar cambios composicionales como color, textura y sabor; existen evidencias de que al crear una atmósfera controlada adecuada la pérdida de clorofila y la biosíntesis de carotenoides es reducida, se retarda el ablandamiento y el deterioro del sabor característico porque se mantienen entre ciertos valores de acidez y pH.⁽¹¹⁾

Al retardar la senescencia se genera que el ataque de microorganismos se vea postpuesto. Además que una atmósfera diferente influye directamente en la germinación fungal o bacteriana.

Experimentalmente se ha encontrado que las concentraciones de gases recomendadas para el pepino son: 5% de CO₂ o 5% de O₂ ya que retardan el amarillamiento típico de senescencia. Una concentración mayor de CO₂ propicia la degradación de clorofila (amarillamiento), sin embargo una combinación de ambas condiciones genera un aumento en la susceptibilidad a la baja temperatura.^(6,4) La concentración de CO₂ no debe exceder 10% o el O₂ estar abajo del 2%⁽⁶⁾

El efecto de la baja temperatura en esta especie propicia el daño por frío por lo que se debe mantener en un intervalo limitado. Si se mantiene a 10°C o menos sufren daño por frío, si se someten a 15°C o más se favorece el amarillamiento siendo el óptimo alrededor de 12 a 13°C.^(4,6) El daño por frío se reconoce como picaduras poco profundas generadas por la desecación, el colapso de las células forma estas picaduras las cuales coalescen y se forman depresiones superficiales.^(2,6) La baja de temperatura reduce así mismo la resistencia de las células a la invasión de patógenos⁽⁶⁾

1.2 QUITOSÁN

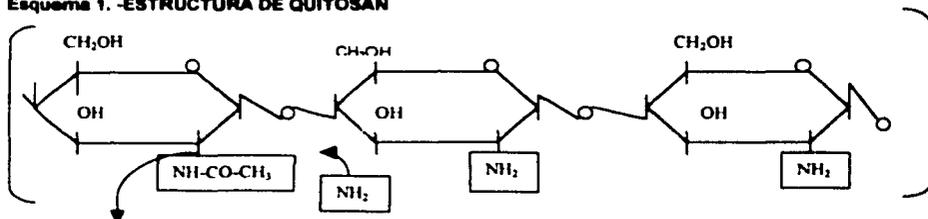
1.2.1 origen del quitosán

El quitosán es un derivado de la modificación química (desacetilación) de la quitina, sustancia natural procedente de el exoesqueleto del camarón, langosta, jaibas y demás crustáceos.

Estructuralmente la quitina es similar a la celulosa, un polímero de unidades de glucosa, en cuanto al enlace intermonómeros 1-4, pero la diferencia entre los dos polímeros es que el grupo hidroxilo en la posición C₂ de la celulosa es remplazado en la quitina por un grupo acetamido (NHCOCH₃)^(17,19)

Cuando la quitina se hidroliza en medio alcalino, esta se desacetila y convierte a "quitosán" utilizando NaOH ó KOH a temperaturas elevadas; modificándose sus grupos funcionales y por ende sus propiedades, como el volverse hidrosoluble en condiciones ácidas. Entonces es conocido como el (1-4)-2-amino-2 deoxi β-D-glucosa.^(17,19) Ver esquema 1 de Estructura del quitosán; este derivado químico ha recibido gran atención tomando cuenta su potencial por ser un buen polication y tener aplicaciones importantes en diferentes áreas.

Esquema 1. -ESTRUCTURA DE QUITOSAN



Obsérvese como los grupos NHCOCH₃ de quitina (acetamido) cambiaron a NH₂ (amido) en quitosán.

- El quitosán es uno de los pocos polielectrolitos catiónicos y esto constituye una excepción porque la mayoría de los hidrocoloides o polisacáridos usados comercialmente son neutros o polianiónicos, esto da grandes posibilidades de acción al interactuar fuertemente con materiales de cargas negativas por ejemplo proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos pudiendo así formar geles con un adecuado contracción.

La higroscopicidad del quitosán es significativamente más alta que la de celulosa microcristalina, debido a diferencias en la cristalinidad de los productos, en la cantidad de los grupos formadores de sal y en el contenido de proteínas de los materiales.⁽¹⁸⁾

La humedad de equilibrio del quitosán está en función de la humedad relativa sin ser afectada aparentemente por el peso molecular del quitosán, el cual es de 1.2×10^5 daltons.⁽¹⁸⁾

1.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL QUITOSÁN

1.2.2.1 SOLUBILIDAD

El quitosán es soluble en HCl diluido, nítrico y ligeramente en fosfórico pero insoluble en solventes acuosos alcalinos o neutros. Es soluble en polioles acidificados sin embargo el mejor solvente encontrado es el ácido fórmico en sistemas acuosos de 2 a 100%.⁽¹⁸⁾

1.2.1.2 PROPIEDADES FUNCIONALES

Presenta propiedades emulsificantes según Furda (1980) con una capacidad de emulsión de 900+/- 47 ml. Aceite/g. de quitina mediante sonicación para producir la emulsión. Los ácidos minerales se unen a los grupos acetamido o amino en caso de quitosán.

El principal origen de afinidad aniónica bajo condiciones ácidas se debe a la atracción física entre los aniones y el agua solvatada con residuos glucosídicos de las cadenas moleculares de quitina.

El quitosán forma, en presencia de contraiones aniónicos, geles ionotrópicos, de estabilidad mecánica similar a la de los geles de alginato de calcio, y sus

características como: la fuerza de fractura, modulo de elasticidad y tiempo de relajación dependen de los procedimientos de preparación.

1.2.1.3 PROPIEDADES DE ENLACE

Entre los usos potenciales debido a su facultad de formar enlaces catiónicos se puede mencionar sus propiedades secuestrantes de colorantes al combinarse probablemente con los grupos amino y carbonil amino_(18,20), en la ayuda de recuperación de proteínas ₍₁₇₎, grasas y carbohidratos.

La viabilidad para la remoción de metales indeseables como el mercurio, plomo, zinc, cobre, cromo, plutonio, y uranio, así como la remoción de elementos traen en agua de mar por cromatografía en quitosán._(17, 18)

1.2.1.4 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Se ha investigado la aplicación del quitosán en el área biomédica debido a que no es tóxico, y fácilmente biodegradable. Se ha encontrado entre otras actividades que reduce los niveles de colesterol en la sangre y estimula el sistema inmune. Cuando se adiciona quitosán a una semilla se tienen incrementos en la producción, aparentemente debido a la protección que da durante la germinación a la semilla por probable interacción con microorganismos patógenos.₍₁₈₎

12.1.5 CONTROL DE MICROORGANISMOS EN FRUTOS POSTCOSECHA

El control químico en frutos postcosecha, se ha vuelto una parte integral del manejo y comercialización. El deterioro se debe en muchos casos al ataque de patógenos como bacterias, virus, parásitos y hongos. En especial los de origen fúngico, provocan pudriciones que fácilmente se pueden extender.

Es necesaria una adecuada selección del producto ya que la aplicación de fungicidas constituye un gasto adicional. Es importante que el fungicida no afecte la superficie del producto, es decir no sea fitotóxico.^(2,15) En realidad los productos químicos pueden clasificarse como fungicidas o fungistáticos, los primeros matan al microorganismo debiendo estar en contacto directo con él para ser efectivos, los segundos inhiben la germinación de las esporas, reducen la proporción de germinación y crecimiento del microorganismo.

La mayoría de los productos en el mercado son fungistáticos. Entre los biocidas efectivos están el cloro y el dióxido de azufre (SO₂) los cuales se han empleado en aguas de lavado y durante o posterior a la limpieza. Otros productos han sido aplicados teniendo como vehículos las ceras y/o películas cubrientes.

Los primeros en usarse fueron el carbonato de sodio y el bórax, en los 50, se desarrollaron los derivados del ortofenilfenato de sodio como el ortofenol ya que aquel causaba lesiones en el tejido a manera de escaldado.

Posteriormente aparece bifenil, efectivo pero dejaba un extraño olor a "hidrocarburo", después aparecieron los de la serie de TBZ tiabendazol, benomil y metil tiofenato.

Estos inconvenientes han generado un desarrollo más cuidadoso, tratando de evitar problemas de tolerancia y normatividad.

Entre las características deseables en un fungicida podrían mencionarse ser soluble al agua, tener un amplio espectro, no ser fitotóxico, ser de uso seguro, no dejar residuos tóxicos en los consumidores, no presentar un sabor extraño y tener un bajo costo.⁽¹⁵⁾

En pepino existe el antecedente del uso de actidione (10 a 12 ppm) o aureofungin (50 a 200 ppm) en dimetil formamida que protegen al fruto por 50 ó 70 horas de

ataque de *Pithium*. También pruebas con ácido bórico (1%) y Borax (4%) han demostrado control de microorganismos.⁽¹⁾

1.3 DAÑOS CAUSADOS POR ENFERMEDADES FUNGICAS

Los hongos en pepino son causantes de diversas afecciones, desde pérdidas de calidad por aparición de manchas, y cambios de coloración hasta marchitamientos, zonas suaves y aparición de micelio que se extienden rápidamente por los frutos provocando pérdidas totales.

Entre los hongos que generalmente atacan al pepino y alguna otra cucurbitácea están *Colletotrichum* causante de Antracnosis, *Cladosporium* identificado como Roña, *Rizoctonia*, *Phytium*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Sclerotinia*. Los cuales se identifican y asocian a los daños provocados en pepino como sigue.

1.3.1 DESCRIPCION GENERAL DE LOS AGENTES FUNGICOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN PEPINO

Colletotrichum (Antracnosis)

Subdivisión Basidiomycotina (basidiosporas), orden Melanconiales. No poseen conidióforos libres, sino íntimamente unidos.

Constituyendo un (Acervulo o pequeñas almohadillas), céreo, subepidémico, típicamente con espinas o setas en la orilla, en ocasiones los conidióforos son negros, simples, incluso alargados; conidios transparentes, ovoides u oblongos. Estados imperfectos de glomerella. Este género difiere de *gleosporium* en que tienen espinas.^(21,22)

En pepino los signos de ataque son: Los frutos jóvenes mueren y los maduros desarrollan depresiones oscuras en el borde y con un centro llagado y con apariencia de polvo naranja o rosa claro. Finalmente Las lesiones viejas son negras y pueden tener centros blancos cubiertos de puntos negros, la pulpa se seca y vuelve quebradiza, amarga o insabora.

Forma de ataque: No necesita heridas ya que es de los denominadas enfermedades latentes, esto implica que el microorganismo arriva después del amarre del fruto. Se desarrolla a 21-27°C (1,23,24)

Cladosporium (Roña)

Subdivisión Ascomycotina, orden moniliales, familia dermatiaceae. Micelio oscuro o ahumado (negro, gris, castaño u oliváceo), en el reverso de la colonia el color varía de negra-azulado opalescente a negro verdoso. En acercamientos las hifas pueden parecer con escasa coloración, septadas con conidióforos altos, oscuros, verticales ramificado cerca del ápice, apiñado o simple; generalmente los conidios son oscuros, (blastosporas), variables en forma y tamaño, de ovoide a cilíndrico e irregular, algunos típicamente con la forma de limón, formados por gemación, frecuentemente cadena de acropétalos simple o ramificada, parásito de otras plantas o saprofito monocelulares de jóvenes y pueden ser bicelulares al alcanzar el desarrollo. (21,22)

En pepino se forman: Manchas pequeñas grisáceas ligeramente húmedas, cambian a oscuras y emiten goma. Al final Manchas secas de aspecto corchoso, en condiciones húmedas se forma una capa verde olivo que cubre el tejido dañado. (1,23,24)

Rizoctonia

Clase Hyphomycetes, orden moniliales, familia Agonomycetaceae; sin cuerpos asexuales y esporas, esclerotia café a negra, variable en forma, entreformando y conectando con fibras miceliales, hifas café, con largas celdillas de rama septada que sale de la hifa principal en ángulo recto, parásito, principalmente en raíces y otras partes de la planta bajo la tierra. (21,22)

En pepino se denota por: desarrollo en la cara de base (contacto con el suelo). En los frutos jóvenes da decoloración amarillo-café con manchas irregulares sumidas. En los frutos maduros las manchas son grandes depresiones

En alta humedad un moho denso se desarrolla en las manchas

Forma de ataque: Suciedad y temperaturas arriba de los 27°C. (1,23,24)

Phytium

Es de la subdivisión Zygomycotina (todos los que se presentan en alimentos son no septados), clase oomicetes; sus esporas sexuales son oosporas del orden peronosporales, familia pythiaceae. Micelio cenocítico abundante. Algunas especies son las responsables de las pudriciones de hortalizas; otras son patógenas para las raíces. Los esporangios producen 4 zoosporas móviles.

Esporangios filamentosos inflados de tamaño muy variable, oogonios esféricos, terminales raramente intercalares, anteridios generalmente mocinios, los diclinios típicamente intercalares, de 1 a 2 por oogonio en forma de barril o de cúpula, cilíndricos o ampliamente claviformes; oosporas apleróticas. (21,22)

En pepino se evidencia por Manchas verdes oscuras reblandecidas. En puntas aparecen partes podridas cubiertas de crecimiento algodonoso. Posteriormente puede escapar savia de las zonas dañadas

El ataque es por: Frutos dañados o abiertos, partes viejas de la flor o salpicaduras sucias. (1,23,24)

Rhizopus

Subdivisión zygomycotina, clase zygomycetes, orden micorales, familia micoraceae, género Rhizopus. Participa en la alteración de muchos alimentos: fresas y frutos similares, hortalizas, frutas diversas, pan, etc. Las características más típicas son: Hifas no septadas, posee estolones rizoides y se oscurecen frecuentemente al envejecer, los esporangios son grandes y generalmente negros se originan en nódulos en los que también se forman rizoides, culumela hemisférica y apófisis (base del esporangio) en forma de copa, micelio abundante, algodonoso, y carece de esporangiolos. (21,22)

En pepino lo encontramos como: Grandes manchas blandas con márgenes definidos, luego se vuelven suaves y hundidas, moho gris suele crecer en la cavidad de las semillas. (1,23,24)

Botrytis

Subdivisión Ascomycotina, orden moniliales, clase fungi imperfecti, familia moniliaceae, género Botrytis. Es un moho septado, lanoso, pálido, pardo grisáceo carece de esporas sexuales. Conidióforos libres que surgen del micelio irregularmente, bastante largos, rígidos, irregularmente ramificados; los dicótomos cerca del ápice, las células apicales son alargadas o redondeadas formando racimos de conidios en esterigma corto, conidios (botryoblastosporas) son hialinos a coloreados como ceniza, en una masa gris, una célula ovoide, esclerotia negra

irregular se produce frecuentemente en su parte distal llevan conidios agrupados en forma de racimos, pequeños ovales, esclerocios verde sucio que más tarde se vuelven negros. (21,22)

Primeros signos: Las puntas del fruto se cubren con un crecimiento gris. (1,23,24)

Fusarium

Subdivisión Deuteromycotina, orden moniliales, familia Tuberculariaceae conidióforos cortos, en manojos o haces, en forma de almohadilla. Son difíciles de identificar y el aspecto del cultivo es variable. Cadena de micelio extensivo y algodonoso en cultivo, rosa, púrpura o amarillo en el micelio o medio. Conidióforos variables, escasos y simples o fuertes, cortos ramificados irregularmente, apariencia de verticilo de filídes, simple o agrupada en la esporoquia conidia (halosporas) hialina variable, principalmente de 2 tipos, frecuentemente sostenida en cabezas pequeñas y húmedas, macroconidios septada, ligeramente curvada o inclinación en las puntas, típicamente en forma de canoa. La característica más importante es el macroconidio falciforme de varias células que pueden ser ligeramente coloreado; frecuentemente presenta también microconidios monocelulares, ovoides u oblongos, unas veces crecen independientemente y otras en cadenas. Algunos conidios intermedios, de 2 o 3 células oblongas o curvadas, parásito en plantas superiores o saprófito en material marchito. Un gran y variable género a veces colocado en las tuberculariaceae porque varias especies producen esporodochia. (21,22)

En pepino los primeros síntomas son: áreas circulares que al desarrollarse producen una pudrición seca y presentando a manera de anillos concéntricos.

(1,23,24)

Sclerotinia

Orden moniliales, familia Agonomycetaceae, Clase ascomycetes. Sus esporas sexuales son ascosporas. Algunos géneros sobresalen como éste son responsables de algunas descomposiciones en su fase conidial. Los conidios, en forma de limón están en cadenas, teniendo un disyuntor que los separa. (21,22)

En pepino los primeros síntomas son: Frutos infectados que se cubren de un crecimiento blanco, rápidamente se vuelve suave y acuoso. (1,23,24)

1.3.2 EFECTO DE QUITOSAN EN HONGOS

La pared celular de muchas especies de hongos a excepción de oomicetos y levaduras contienen quitina. (26,27,28) aprox en un 1%, y existe la evidencia de que en la naturaleza al encontrarse hongos como zigomicetos (29) o Actinomicetos (27,28) en presencia de quitosán muestran un favorecimiento hacia la forma latente del organismo, es decir éste deja de ser patógeno o de plano se inhibe, además que la concentración de quitosán en él aumenta. Por ejemplo se ha encontrado quitosán acumulado en clamidosporas dormidas, las cuales al germinar reducen los niveles de quitosán. (26)

La explicación de este efecto la definen en términos de que el quitosán con sus grupos amino, cargados positivamente interactúan con los grupos fosfato negativos de los ácidos nucleicos del material genético de los hongos (13,27,28), en especial cuando los polímeros de quitosán tienen 7 unidades inhibiendo el crecimiento de los hongos. Por otro lado parece que en las plantas se induce a la expresión de genes (13,26,27), ya que se detectó un aumento en la producción de proteínas y de enzimas como las fitoalexinas, pisatin, incluso enzimas antifúngicas así como enzimas hidrolíticas entre las que destacan quitinasas, quitosanases (27) y β -glucanasas (13,26,27,28) además que se incrementan los compuestos fenólicos asociados a la pared induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana (26,27,29)

En pepinos se ha encontrado que existe la presencia de quitosanas en diferentes órganos, del tipo ácidas en todos y básicas en semillas, frutos, flores y raíces jóvenes₍₂₉₎. Estas formas moleculares han sido encontradas en hojas de pepino estresadas químicamente o por patógenos, así se cree que juegan un rol de defensa contra la invasión de patógenos al hidrolizar la pared de hongos, ₍₂₉₎

La actividad de quitosán decrece ligeramente en hojas y raíces durante el crecimiento₍₂₈₎. Lo que sugiere que la actividad puede ser una función de degradación del tejido de colenquima ***

Los patógenos entonces pueden ser inhibidos o estar bajo la acción tanto de su propio quitosán como de las fitoalexinas del huésped, inducidas por el quitosán liberado ₍₂₇₎

La forma en que puede estar actuando el quitosán a nivel de genes es al acoplar sus unidades positivas con las cargas negativas en la hélice de DNA del hongo. Induciendo cambios conformacionales del DNA (hélice de forma B) a (Hélice de forma Z)₍₂₆₎

Una explicación de la diferente acción del quitosán en el material genético de plantas y hongos, puede ser debido a los diferentes tamaños de genoma por ej. *Fusarium* es de 2.4×10^7 bases contra 4.7×10^9 bases de los chicharos, así el material disponible para interactuar es menos en *Fusarium* que en chicharos y puede afectar distintas funciones en cada caso₍₂₆₎

Se ha aplicado quitosán a la superficie de chicharos antes de infectarlos y posteriormente se han utilizado radioisótopos que muestran que las enzimas en la cáscara, rompen la pared celular de hongos e intervienen en la síntesis de RNA y en el crecimiento del hongo_(26,28) mientras que en el mismo chicharo los fragmentos activan la producción de enzimas y proteínas _(26,28) selectivamente

sintetizadas como respuesta de resistencia inducida, al tiempo que hay un incremento en la actividad de enzimas de rutas secundarias, por ende se inicia la producción de antifúngicos como la fitoalexina y pisatum así como enzimas hidrolíticas quitinasas y B-glucanasas^(27,28) todos con potencial de atacar y liberar oligómeros de carbohidratos de las paredes celulares de los hongos⁽²⁷⁾

Esto es probable porque una pequeña cantidad de quitosán puede penetrar en el núcleo de la planta, conteniendo una gran cantidad de cromatina y puede más fácilmente alterar la conformación de la cromatina en regiones selectas causando así cambios de transcripción preferentemente que suprimiendo la síntesis de RNA como es posible con los hongos, los cuales contienen mucho menos DNA.

Sin embargo no todos los hongos se ven inhibidos de igual manera ya que esto depende de su composición, así el crecimiento de hongos enfrentado al quitosán y que tienen éste como mayor componente, no se inhiben con él ya que parece que tienen mecanismos de eliminación o degradación ; algunas especies de fusarium pueden incluso regular sus niveles de quitosán, pues al crecer en exceso no crecen, pero al eliminar el exceso de quitosán del medio éste, reanuda su crecimiento.^(26, 27)

También se ha aplicado el quitosán a trigo y lenteja aumentando la producción en un 10 a 30%⁽²⁸⁾ al disminuir las pérdidas por pudrición. En plantas de tomate quitosán puede incrementar la producción de proteinasas.

Estimular la producción de monoterpenos en pinos y junto con quitina inducir la lignificación de hojas de trigo y proteger del deterioro de patógenos⁽²⁸⁾ En frijol y rábanos disminuye la pudrición de raíz por Fusarium⁽²⁷⁾

1.4 ANTECEDENTES ECONOMICOS DE PEPINO

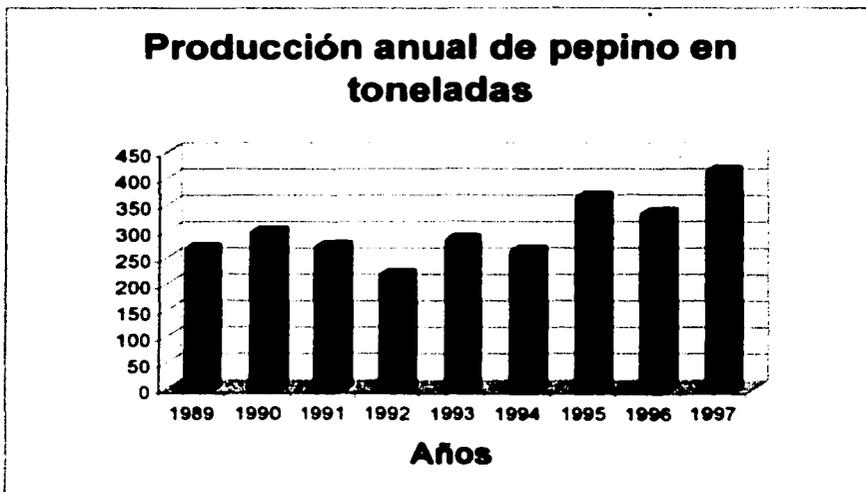
1.4.1 PRODUCCION Y EXPORTACIÓN

PRODUCCION

El pepino es ampliamente consumido en nuestro país, lo cual se refleja en las 301,000 ton que en promedio se han cosechado en los últimos 9 años. La tabla 2 muestra la producción anual de pepino a partir de 1989 a 1997⁽³⁰⁾

Como puede observarse (Figura 2) en el pasado ciclo esta cifra aumentó en un 37% respecto al promedio lo que indica que la comercialización del producto va en aumento

Figura 2



Fuente: Anuarios de la producción SAGAR 89-97

En el país los estados con mayores producciones son Sinaloa, Michoacán y Morelos y se mantienen constantes desde 1989 coincidiendo con los estados que tienen mayor desarrollo tecnológico y organización.

EXPORTACION

En cuanto al mercado externo nuestro país exporta pepino principalmente a Estados Unidos de América y Canadá, siendo el primero, el comprador de más del 90% de las exportaciones, alrededor de 250,000 ton (año de 1997). Sin embargo en los últimos 4 años ha sido importante la apertura de nuevos compradores como Francia, Afganistán, Reino Unido e Irlanda entre otros, los cuales a pesar de no tener demandas tan altas como las de E.U. son indicadores de que el mercado de este producto tiene amplias posibilidades de expansión.⁽³¹⁾

1.4.2. QUITOSÁN

En nuestro país, la mayor producción de camarón corresponde al Golfo de México, en la zona de Yucatán y Campeche, siendo este último el productor de casi el 70% del volumen total.⁽⁴⁴⁾

En la última década la captura fue de entre 60 y 80 mil toneladas anuales en peso fresco.

Actualmente, México es uno de los principales proveedores mundiales de camarón y ocupa el 7º lugar en volumen capturado, del cual entre 20 y 30 mil toneladas se destinan al mercado de exportación de Canadá, España, Estados Unidos, Inglaterra y Japón principalmente el resto a consumo nacional. Esto da una idea del potencial para extraer quitina de la cáscara de camarón, de manera que después se desacetilara este para obtener quitosán, que tiene nuestro país sin embargo todavía no se hace esto comercialmente.

OBJETIVOS

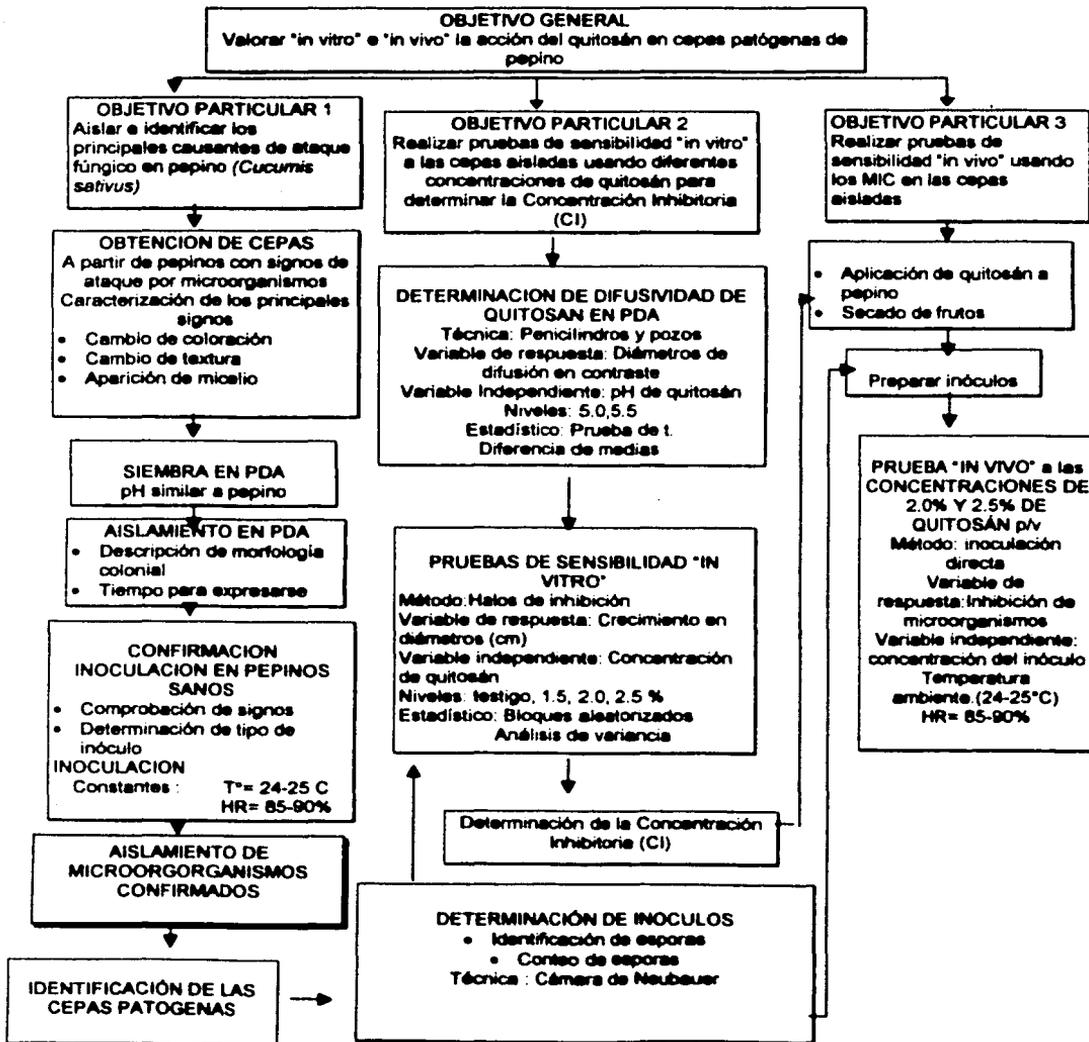
OBJETIVO GENERAL:

Valorar "in vitro" e "in vivo" la acción inhibidora del quitosán en cepas patógenas de pepino.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Aislar e identificar a nivel de género los principales causantes de ataque fúngico en pepino (*Cucumis sativus*).
- 2.- Realizar pruebas de sensibilidad "in vitro" a las cepas aisladas usando diferentes concentraciones de quitosán para determinar la Concentración Inhibitoria (CI).
- 3.- Realizar pruebas de sensibilidad "in vivo" usando la Concentración Inhibitoria (CI) a las cepas aisladas.

METODOLOGÍA EXPRESADA EN CUADRO DE BLOQUES



El objetivo general quedó conceptualizado como "Valorar "in vitro" e "in vivo" la acción inhibitoria del quitosán con cepas patógenas de pepino"; para cubrirlo se plantearon tres objetivos particulares, de tal manera que para el Objetivo 1 "Aislar e identificar los principales causantes de ataque fúngico en pepino" Cucumis sativus se contemplaron en el cuadro metodológico.

Obtención de cepas a partir de frutos enfermos

Primeramente se procedió a adquirir pepinos enfermos apreciando los signos de deterioro por ataque de microorganismos como fueron: coloración anormal de la cáscara, textura, y apreciaciones de crecimiento, como micelio aéreo. Considerando la zona de la lesión, tanto en el extremo distal como en el estilar del fruto (apéndice 1).

El material lesionado fue adquirido en la Central de Abastos y en el mercado de Río Blanco; el producto fue originario de Morelos, Guanajuato y Guerrero. Se realizaron 3 muestreos de aproximadamente 30 individuos cada uno.

Para facilitar la expresión de los signos y/o la aparición de micelio se creó un ambiente con humedad relativa de aproximadamente 95%, temperatura de alrededor de 26°C y el tiempo necesario hasta la expresión de daño o del micelio; utilizando para ello una cámara húmeda propiciada con agua glicerizada al 3%. Se observaron y anotaron las características iniciales así como los cambios posteriores.

Siembra y aislamiento

Una vez evidentes las lesiones se procedió a la siembra de pequeñas áreas en Agar Papa- Dextrosa (PDA) a pH de 5.5, y se mantuvieron a una temperatura de 25 a 26°C para su incubación.

Posteriormente se tomaron datos de las colonias que crecieron, referentes a morfología colonial, características vegetativas del microorganismo y las estructuras reproductivas revisadas al microscopio óptico, así como la apariencia general de las colonias.

Al obtener los microorganismos se procedió a aislarlos con el objeto de asegurar tener solo cultivos puros vía la resiembra. Se hicieron pruebas de siembra en un medio especial, agar-pepino elaborado en el laboratorio. Considerando que éste sería más adecuado para la expresión de los microorganismos.

Confirmación de cepas patógenas

Las cepas puras se inocularon en pepinos sanos para reproducir las lesiones previamente observadas. Para esto los frutos se lavaron y desinfectaron previamente por inmersión en 5% de Hipoclorito de sodio por 3 minutos y se secaron al aire.

Posteriormente se procedió a inocular en forma directa o mediante lesión considerando el área del fruto en que habían sido encontrados; para la directa el inóculo se aplicó en el fruto con un hisopo y fue cubierto con un algodón húmedo, posteriormente aquellos que no desarrollaron los signos, se inocularon mediante lesión con bisturí en la epidermis del pepino (Apéndice 2).

Finalmente los microorganismos que no desarrollaron signos aún bajo lesión y condiciones favorables de humedad relativa del orden del 95%, fueron desechados y considerados atacantes secundarios o saprófitos.

Lo anterior condujo a la confirmación de los agentes responsables de la lesión o patógenos, ya expresados los microorganismos se procedió a aislarlos

nuevamente del fruto, utilizándose para ello PDA a pH de 5.5 y temperatura ambiente.

Identificación de microorganismos

Se realizaron observaciones al microscopio óptico de las cepas confirmadas para identificar sus estructuras, en especial las reproductoras lo cual permitió utilizar claves de identificación.

Con el fin de identificar las cepas se les asignó un número compuesto de tres dígitos, el primero es indicando el grupo de levantamiento de muestra , el segundo se refiere al consecutivo de la cepa encontrada y el tercero al número de resiembras que fueron necesarias para tener la cepa pura.

Posteriormente se prepararon inóculos con azul algodón utilizando cultivos de 4 semanas; para garantizar la esporulación.

Con la información vertida por las observaciones al microscopio y la literatura consultada^(21,22) se intentó la aproximación de las cepas a nivel de género.

Determinación de inóculos

Se realizó el conteo de conidiosporas mediante una modificación del método de conteo de células con la cámara de Neubauer para conteo de células hemáticas. (Ver Apéndice 4) Se realizaron diluciones para estandarizar el número de esporas determinando los inóculos para cada cepa.

DETERMINACION DE DIFUSIVIDAD DE QUITOSAN EN PDA.

Preparación de quitosán obtenido a partir de desacetilación de quitina (Sigma) según la metodología establecida en el laboratorio de Biotecnología de la FES CUAUTITLAN-UNAM.

Tomando en cuenta que la aplicación del quitosán en el fruto sería como una película cubriente, se consideró modelar a través de una película de quitosán sobre un soporte de PDA , de esta manera fue necesario evaluar la difusión del quitosán en el agar considerando el pH de 5.0 y 5.5 de la solución de quitosán.

Para este experimento se empleó la técnica de penicilindros y pozos (Apéndice 3) coloreando la solución de quitosán con azul de metileno para evidenciar la difusividad.

La variable de respuesta se estableció como diámetro y profundidad de difusión en contraste, y la variable independiente correspondió al pH de la solución de quitosán al 5.0 y 5.5 %; para la evaluación de pH de quitosán con mayor difusión se estableció el estadístico: prueba de t "diferencia de medias" (Apéndice 7) , en caso de existir diferencia indicaría la dependencia de la difusividad de quitosán, valorándose a 0h, 48h, 74h y 218h.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD "IN VITRO"

Para las Pruebas "in vitro" se realizaron pruebas de sensibilidad mediante la técnica de halos de inhibición (Apéndice 3), teniendo como variable de respuesta el diámetro de crecimiento (cm) de la cepa de microorganismo a probar y como variable independiente la concentración de quitosán. Se utilizaron 3 niveles de variación: testigo, 1.5, 2.0 y 2.5%. Para la evaluación se empleó el estadístico bloques aleatorios y análisis de variancia.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD "IN VIVO"

Las pruebas de sensibilidad in vivo, implicaron el uso de quitosán al 2 y 2.5 % p/v en una solución de ácido acético diluido, el cuál fue aplicado al pepino utilizando una brocha para asegurar una capa delgada y homogénea, previa a la preparación de inóculos de las diferentes cepas a probar, manteniendo constantes el pH del quitosán, temperatura y la HR,.

La variable de respuesta fue la aparición de signos o lesiones características de cada microorganismo evaluado a través del tiempo. La prueba se llevó a cabo con un pepino control y un sujeto con la película de quitosán para reducir el grado de error. El experimento se realizó por duplicado en experimentos separados.

2.3 RESULTADOS y DISCUSION

Obtención de cepas a partir de frutos enfermos

Para "Valorar *in vitro* e *in vivo* la acción del quitosán en cepas patógenas de pepino", de acuerdo al cuadro metodológico planteado, se aisló e identificó a los principales agentes fúngicos en pepino "*Cucumis sativus*".

Las muestras obtenidas en los 3 levantamientos realizados, entre otros signos presentaban cambios en coloración, en textura de la cáscara o bien la presencia de estructuras reproductivas o indicadoras del ataque de microorganismos siendo más evidentes en la región distal del fruto.

Se encontró que algunos de los microorganismos aislados atacan al pepino a través de aberturas naturales o la cáscara mientras que otras requieren de una lesión para poder introducirse, es decir que no tienen las enzimas necesarias para romper las barreras naturales, coincidiendo con lo establecido por Ulloa (32), y Romero Cova (33)

Respecto al sitio físico del fruto con mayores posibilidades de sufrir un ataque se encontró que preferentemente es en los extremos, y aunque en las cepas confirmadas se observan indistintamente ambos, en el total de las cepas aisladas la incidencia se marcó más en el extremo distal.

Siembra y aislamiento

De la siembra de lesiones de frutos se aislaron 19 cepas a las cuales se les asignó una clave con fines prácticos.

Posteriormente las cepas se inocularon considerando el sitio o localización de la lesión, la descripción de la misma en el pepino, así como la apariencia de la

colonia, sin embargo por manejo de resiembras y acondicionamiento de las mismas, se procedió a evaluar 16 cepas en pepinos sanos. Luego de 4 etapas de experimentación se redujeron éstas a 10 probablemente patógenas, de tal manera que en la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2.-Resumen de signos de lesiones en fruto y morfología colonial

CLAVE	SITIO DE APARICION	SIGNO EN FRUTO	MORFOLOGIA COLONIAL DEL MICROORGANISMO AISLADO
2-3-1	Distal	Mancha negra en el centro.	Blanco con gris algodonoso, reverso gris oscuro.
2-4-1	Estilar	Coloración amarilla, moho gris.	Negro verdoso afelpado, reverso negro intenso.
2-5-1	Distal	Moho blanco algodonoso.	Gris con halo ligeramente nevado, reverso negro.
2-6-1	Estilar	Deshidratado no suave elástico con crecimiento blanco algodonoso.	Blanco con halo amarillo reverso amarillo verdoso oscuro.
2-7-1	Distal	Mancha café irregular, suave con crecimiento de micelio ligeramente gris.	Amarillo algodonoso, reverso amarillo miel pardo oscuro.
2-9-1	Estilar	Area con aparición de Hongo grisáceo.	Coloración rosa mexicano, algodonoso y similares características al reverso más oscuros.
2-11	Distal	Modificación ligera coloración en mancha blanquecina.	Hifas poco elevadas, blancas ligeramente rosadas en el centro.
2-12-1	Estilar	Deshidratado verde oscuro.	Blanquecino algodonoso con halo en amarillo claro y al reverso ligeramente crema.
2-13-1	Distal	Crecimiento mohoso seco como telaraña grisáceo.	Gris afelpado, tendiente a verdoso pardo reverso gris oscuro.
2-15-1	Distal	Zona ligeramente deprimida elástica suave.	Blanco algodonoso posteriormente amarillo, reverso crema.

Confirmación de cepas patógenas

Para la expresión de los resultados de patogenicidad se procedió mediante la comparación de la descripción de los signos tanto en los frutos portadores como en los inoculados, además de la descripción de las características de las cepas encontradas en tales signos.

Al emplear la inoculación directa se confirmaron 4 cepas (fase 1 y 2), posteriormente se generaron lesiones para propiciar la entrada del

microorganismo (fase 3 y 4) lográndose desarrollar los signos de otras 6 cepas lo cual dio el total de 10 cepas que se confirmaron como patógenos, las cuales se resumen en la tabla 3.

Siendo 10 las cepas obtenidas que reprodujeron signos semejantes a las lesiones originales y con características iguales a las cepas aisladas, es decir, que si alguna cepa mutó o cambió luego del aislamiento se eliminó, aunque se sabe que dependiendo del sustrato existen diferencias como lo plantean Romero Cova (33), y Ulloa (32) o bien pudiera tratarse de organismos saprófitos.

Tabla 3.-Resultados de la confirmación de signos de lesión y morfología colonial de cepas patógenas

Clave	Posición	Tipo de Inóculo	Signos de lesión en Frutos enfermos	Morfología colonial de los microorganismos aislados	Signos de lesión en Frutos Inoculados	Cepas en confirmación
2-3-1	Distal lesión Punta	Lesión	Mancha deshidratada suave, verde oscuro.	Blanco con gris algodonoso y oscuro	Suave, ligera aparición de moho blanco y negro.	Blanco algodonoso, reverso gris.
2-4-1 y 2-4-2	Estilar Punta	Lesión y Combinados	Moho gris	Negro- verde algodonoso reverso negro. Polvo Verde olivo reverso negro	Crecimiento ligeramente gris sin cambio de textura ni color	Gris oscuro reverso negro
2-5-1	Distal Punta	Directo	Moho blanco algodonoso	Gris rata con halo algodonoso y reverso negro	Ligero cambio de textura donde estuvo el inóculo	Gris claro reverso negro
2-6-1	Estilar	Directo	AreaDeshidrataada elastica, hongo blanco algodonoso	Blanco con halo amarillo reverso amarillo pardo	Micelios blancos en inóculo,ligero cambio de textura y coloración oscura	Blanco algodonoso con halo amarillo reverso / pardo
2-7-1	Distal Punta	Lesión	Mancha irregular café , elástica deshidratada con moho gris	Amarillo algodonoso reverso pardo oscuro	Ligera suavidad en inoculación	Melón claro y luego amarillo pardo
2-9-1 y 2-9-3	Estilar Punta	Lesión Y Combinados	Hongo grisáceo sin depresión ni cambio de coloración	Fiusha algodonoso reverso más claro Amarillo intenso algodonoso reverso amarillo/naranja	Ligero cambio de color en incubación, sin cambio de textura, crecimiento mohoso	Solo apareció 2-9-1 pero en tono más oscuro
2-9-1	Estilar Punta	Directo	Hongo grisáceo, sin cambio de color / textura	Color rosa mexicano algodonoso, similar al reverso	Ligeramente rosado en zona de inóculo	Color fiusha claro y contaminación
2-11-1	Distal punta	Directo	Zona momificada blanquecina	Hebras blancas ligeramente rosado en el centro	Disminución de coloración enutamiento y mancha blanca	Hebras blancas, ligeramente rosado en el centro
2-12	Estilar	Lesión	Verde oscuro seco deshidratado	Blanco como algodón con halo amarillo al borde reverso crema	Color amarillo suave no elastico crecimiento "azucarado"	Blanco algodonoso con halo crema reverso igual
2-13-1	¼ zona Distal	Directo	Crecimiento mohoso seco como telaraña gris	Gris algodonoso ligeramente verdoso reverso oscuro	Ligera depresión y cambio ligero de color oscuro	Gris rata algodonoso, reverso negro
2-15-1	Distal	Directo	Ligera depresión suave, moho blanco	Blanco algodonoso y amarillo con crema	Moho blanco "azucarado" ligera depresión	Blanco algodonoso ligeramente amarillo, crema

Morfología colonial obtenida al decimo día de cultivo.

Se encontró que 2 cepas solo pudieron aparecer en combinación con otra que se aisló de la misma lesión, la 2-4-1 se obtuvo junto con la 2-4-2 al igual que 2-9-1 con 2-9-3 lo cual indica un efecto sinérgico entre ellas, comprobando que al inocularlas por separado no aparecieron lesiones y al hacerlo por parejas solo se desarrollaban las primeras (2-4-1 y 2-9-1) eliminando así a las otras, esto coincide con lo expresado por algunos autores (22,32) no todos los hongos pueden crecer en cultivo, existen algunas cepas que son saprófitas estrictas y solo pueden atacar una vez que otra les haya franqueado las barreras.

Identificación de esporas de los microorganismos

Una vez confirmadas las 10 cepas se procedió a la identificación utilizando las estructuras reproductivas, para tal efecto dichas estructuras fueron vistas y revisadas al microscopio luego de 4 semanas de maduración, identificando a los géneros *Fusarium*, *Botritis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum* y *Phytium* y las características del tipo de esporas, a la vez que se estableció la concentración de esporas en los inóculos.

Los resultados de las observaciones al microscopio se expresan en la tabla 4.

Se encontró que las características de las cepas dadas como referencia en las primeras observaciones al microscopio corresponden a una etapa todavía no madura para algunos casos, por lo que se siguió el monitoreo hasta encontrar esporas o estructuras reproductivas diferenciadas.

Se realizaron también siembras en medio líquido con el propósito de favorecer la esporulación y garantizar un inóculo cuantificado mediante dilución.

Tabla 4 .Características macroscópicas (coloniales) y microscópicas de las cepas patógenas (ver dibujos en apéndice 5)

Clave	Morfología		Características del Micelio		
	Colonial	Microscópica	Septados	Vegetativo	Reproductivo
2-3	Blanco con gris	Verde	Si	Si	Posiblemente inmaduro y no diferenciado
2-4-1	Gris oscuro casi negro, reverso negro	Ligero color verde y café	Si	Si	Con estructuras diferenciadas Blastosporas
2-5	Blanco luego gris, reverso negro	Hifas azules y amarillas, o verde claro	Si más apreciable en hifas amarillas	Si	Conidióforos inmaduros en hifas amarillas
2-6	Blanco algodonoso con amarillo en el centro reverso igual	Hifas septadas azules	Si	Si	Artrosporas
2-7	Amarillo algodonoso reverso miel oscuro	Amarillo dorado y hialino	Si	Si	Conidióforos macroconidios
2-9-1	Coloración fucsia algodonoso reverso fucsia claro	Azul hialino pero también producción de color café	Si	Si	Conidióforos con 3 conidios
2-11	Blanco ligeramente rosado en el centro	Hifas hialinas	Si	Si	Esporas
2-12	Blanquesino algodonoso con halo amarillo claro en reverso crema	Hifas amarillas y azules	Si	Si	Artrosporas
2-13	Gris con halo ligeramente "nevado" reverso negro	Hifas verdes cabezuelas de color verde oscuro	Si	Si	Esporangiosporas
2-15	Blanco y amarillo ligeramente algodonoso reverso crema	Esporas como las de 2-7 pero más grandes	Si	Si	Conidióforos macroconidios

Se probó con un medio de agar-pepino con algunas de las cepas y encontrando que todas las cepas mostraban características distintas a las sembradas en PDA, aunque muy parecidas a su desarrollo en el fruto (coloración, abundancia de micelio, forma de expansión), además que aparecieron en este medio sin ningún problema, pero su crecimiento fue muy irregular, por lo que se descartaron. Ulloa (32) comenta que dependiendo de la composición del medio será la expresión del microorganismo. Las cepas soportadas en PDA son más homogéneas porque crecen con un patrón homogéneo de fuente de carbono, y presentan características que las distinguen más entre ellas, además que la bibliografía establece los criterios para estandarizar medios de cultivo.

Identificación de los microorganismos patógenos

De acuerdo a las características de morfología colonial, de las lesiones en fruto, así como a las características microscópicas como color, tipo de esporas y forma de las hifas, se llegó a hacer la aproximación de los géneros de los microorganismos patógenos en el pepino (tabla 5).

Se encontraron 2 cepas, la 2-7 y la 2-15 procedentes de infecciones ligeramente suaves, ambas presentan micelio abundante color crema o ligeramente amarillo y en el reverso de la caja un color más intenso, a nivel micro tienen un suave color azul (2-15) o ligeramente dorado (2-7) las esporas corresponden a macroconidios para ambas, encontrándose de 2 tipos unas pequeñas ligeramente curvas a diferencia de otras más grandes y gruesas tratándose de cepas del género *Fusarium spp.*

La cepa 2-13 se obtuvo de pepinos con ligeras depresiones y cambio de color a más oscuro, con micelio gris; en cultivo, éste es del mismo color, abundante en el reverso de la caja y la coloración es gris oscura, llegando a casi negra. A nivel micro la coloración de las hifas es verde y esporas más oscuras, perteneciendo a la descripción de *Botrytis*, en donde el micelio es septado, lanoso pardo grisáceo.

En cuanto a los conidios son del tipo de las botryobastosporas, son verdes perteneciendo al género *Botrytis sp.*

De áreas, ligeramente deprimidas se aisló un moho gris con clave 2-4, el micelio en cultivo es abundante y del mismo color, al reverso de la caja de cultivo se presenta con una coloración negra. A través del microscopio los conidióforos son verdes y los conidios oscuros como los describen para *Cladosporium sp.*

De la región distal se obtuvo la cepa 2-5 donde se apreciaba ligero cambio de textura y la presencia de moho blanco algodonoso, bajo condiciones de cultivo la cepa presenta micelio primero blanco tornándose a gris. En el reverso es de un color más intenso; a nivel micro se aprecian hifas azules y amarillas con conidios transparentes, como en lo descrito para *Colletotrichum sp.*

La cepa 2-11 proviene de una lesión seca con ligera coloración blanquecina. Al ser observado al microscopio se denotan hifas hialinas no septadas, como *Pythium sp* con oogonios claviformes terminales y con oosporas pequeñas correspondiendo a *Pythium spp.*

Lo que respecta a las cepas 2-12 y 2-6 las cuales se obtuvieron de zonas ligeramente deshidratadas, se parecen entre ellas por presentar un micelio abundante color crema y en las observaciones microscópicas presentan estructuras similares con cadenas de esporas pequeñas sin conidióforos presentes por lo que no fue posible su identificación.

La cepa 2-9 procede de una lesión en el extremo distal blanda con hongo grisáceo sin cambio de color, en cultivo se trata de un hongo con micelio gris.

Por último la cepa 2-3 presenta un micelio blanco algodonoso con tendencia de cambio de color gris claro al microscopio presentaba hifas septadas constituyendo una red compacta, con cabezuelas en las partes terminales que pudieran

considerarse como conidióforos, sin embargo no hubo liberación de conidios a pesar de tratar de provocar la liberación en condiciones de temperatura extrema (30°C y 2°C) y agitación sin éxito por lo que la identificación no se alcanzó.

La tabla 5 muestra un resumen de las cepas con los géneros a que se identificaron.

Tabla 5.-Resumen de cepas identificadas con generos

Clave	Género identificado
2-7 y 2-15	<i>Fusarium</i>
2-13	<i>Botrytis</i>
2-4	<i>Cladosponum</i>
2-5	<i>Colletotrichum</i>
2-11	<i>Phythium</i>
2-12 y 2-6	Nd
2-9	Nd
2-3	Nd

nd = no identificado

Para la identificación de las cepas se recurrió a la observación de las características morfológicas: color del micelio, apariencia y textura, tipos de borde, elevación del micelio, como lo muestran Frazier (22), Ulloa (32) y Cappuccino (34), así como las características microbiológicas dadas por Barnett (21) quien toma en cuenta la morfología de las estructuras de esponulación. En el caso de las cepas identificadas como 2-12 y 2-6, parecidas entre sí tanto en las características de cultivo en agar como en las estructuras microscópicas, sin correspondencia con los géneros esperados mientras que las cepas 2-9 y 2-3 cuyas características entre sí mostraron pequeñas diferencias con respecto a las reportadas en la bibliografía (21,22). Sin embargo se efectuó una comparación entre los microorganismos encontrados experimentalmente y los descritos por la bibliografía para las cucurbitáceas (1,23)

Determinación del volumen de la cámara de recuento de Neubauer

Para determinar la dilución de la suspensión de esporas de inóculo (Ver apéndice 6) de cada cepa se utilizó la cámara de Neubauer, y fué necesario primero determinar el volumen de la cámara, de manera exacta. El requerido fue de 8 μ l de la suspensión de esporas de cada uno de los microorganismos, efectuando el recuento en los cuatro cuadrantes, multiplicado por el factor de corrección y por la corrección de dilución, obteniéndose el número de esporas que varían desde 33.5 hasta 25 756.7 (tabla 6), con lo que se puede apreciar una variación considerable tanto en número como en el tamaño de esporas de los patógenos de pepino.

Evaluación del contenido de esporas en la suspensión y determinación de la dilución necesaria para el inóculo

Tabla 6.- Contenido de esporas de las diferentes cepas

CLAVE DE CEPAS	NÚMERO DE ESPORAS/mm ³	INOCULO	DILUCION
2-13	33 5	8 μ l	Directo
réplica	46 2		
2-7	9090 6	8 μ l	X 10 ⁻²
réplica	10605 7		
2-12	52 8	8 μ l	Directo
réplica	72 6		
2-4	636 3	8 μ l	1/3
réplica	666 6		
2-6	—	8 μ l	1/5
réplica	211 4		
2-11	18181 2	8 μ l	X 10 ⁻²
réplica	18181 2		
2-9	59 4	8 μ l	Directo
réplica	59 4		
2-15	25756 7	8 μ l	X 10 ⁻²
réplica	15151		
2-5	—	8 μ l	Directo
réplica	59 4		
2-3	—	asada	Directo
réplica	—		

La cepa 2-3 no se pudo contabilizar debido a que presentó problemas para desprender esporas. De manera que fue la única que se sembró por asada

Una vez obtenidas las concentraciones de los inóculos se llevaron a cabo las pruebas de sensibilidad *in vitro* de las cepas aisladas usando a su vez diferentes

concentraciones de quitosán para determinar la concentración inhibitoria de este polímero.

Determinación de difusividad de quitosán en Agar papa dextrosa.

Como se expresó metodológicamente, fue necesario establecer cómo el quitosán se comportaba en el medio de cultivo considerando que el fenómeno que se presenta es de difusión por lo que se valoró la difusividad del quitosán en PDA utilizando los penicilindros (Apéndice 3) y considerando el pH de 5.0 y 5.5; transcurridas 48 horas el fenómeno de difusión de la solución de quitosán se completó al observar los valores finales éstos no muestran diferencias significativas como se expresa en la tabla 7.

El hecho de que existiera un aumento del diámetro de quitosán del orden de 8 a 14 mm indica que efectivamente existe el fenómeno de difusión.

Tabla 7.-Difusividad del quitosán en PDA expresado el diámetro en milímetros a los pH 5.0 y 5.5

Q 5.5 M5.5	0 hrs	48 hrs.	74 hrs.	218 hrs	
1	8 mm	14 mm	14 mm	14 mm	$\bar{X} = 13.5$
2	8 mm	13 mm	13 mm	13 mm	$\delta = 1$
Q 5.0 M 5.5					
1	8 mm	10 mm	10 mm	10 mm	$\bar{x} = 10.75$
2	8 mm	11.5 mm	11.5 mm	11.5 mm	$\delta = 1.5$

\bar{X} =media δ =desviación estandar

Se tomó nota de la apariencia del quitosán en cada uno de los intervalos, no habiendo variación en opacidad hasta las 218 hr. En donde esta característica se deriva al color amarillo claro, teniendo las siguientes observaciones

T (tiempo de la observación en horas) Apariencia del quitosán

T₀ sólido opaco

T₇ sólido opaco

T₂₁₈ sólido amarillo opalescente

En cuanto a la determinación de la difusión de la solución de quitosán se encontró que esta se da longitudinal y transversalmente durante las primeras 48 hr, luego

de las cuales la difusión se completa, evidenciado por la coloración blanca opalescente. Al observar este comportamiento se decidió aplicarlo como película delgada de quitosán sobre las placas de agar para favorecer el fenómeno.

No existen diferencias significativas en la difusividad del quitosán en un soporte de PDA utilizando diferentes pH's, coincidiendo con lo encontrado por Ouattara B (37).

Pruebas de sensibilidad al quitosán de las cepas aisladas "in vitro"

Los resultados de sensibilidad al quitosán de las cepas "in vitro" se expresan en las tablas 8 y 9. La tabla 8 muestra el número de colonias formadas a las diferentes concentraciones de quitosán a las que fueron sometidas, testigo (0%), 1.5%, 2.0%, 2.5%. Aquí se observa una marcada inhibición a la concentración de 1.5% (p/v) en las cepas 2-7, 2-12 y 2-11 mientras en la cepa 2-9 se observa desde la concentración 2.0% (p/v), y en las cepas 2-15, 2-5 y 2-3 la inhibición es completa a la concentración de 2.5% (p/v).

Al observar las cepas 2-13 y 2-4 donde aparentemente (por el número de colonias) pareciera que no hay control del microorganismo, fue necesario evaluar a través de otro método, de tal manera se expresan tanto en diámetro como en porcentaje de inhibición el comportamiento de las cepas restantes ver la tabla 9, se explica que al considerar los diámetros de crecimiento de la cepa control contra los de las demás concentraciones de quitosán se obtuvieron diferencias así como el hecho de que la germinación de las esporas fue mucho más lenta que en los testigos, finalmente en la cepa 2-3 que no pudo ser evaluada debido a que no se pudieron separar sus esporas y en la cepa 2-6, resultando en un porcentaje de inhibición del orden del 20%, 40% y 96% para la primera y 5%, 33.7% y 61.2 % para la segunda, se observan incluso cambio de morfología colonial debido al quitosán.

Tabla 8.-Resumen de resultados de pruebas de sensibilidad de las diversas cepas al quitosan a diferentes concentraciones

Clave	Número de esporas/ml	Esporas en el inóculo	No. De colonias formadas a diferentes concentraciones de quitosán			
			[0]%	[1.5]%	[2.0]%	[2.5]%
2-13 •	33.5	33.5	11	6	5	9
	46.2	46.2	16	13	13	29
2-7 •	9090.6	90.90	3	0	0	0
	10605.7	106.05	17	0	0	0
2-12 •	52.8	52.8	5	1	2	0
	72.6	72.6	7	0	0	0
2-4 •	636.3	212.1	—	8	60	20
	666.6	222.2	9	9	—	15
2-6 •	—	—	—	—	—	—
	211.4	105.7	22	13	2	3
2-11 •	18181.2	181.81	74	0	0	0
	18181.2	181.81	40	0	0	0
2-9 •	59.4	59.4	20	8	0	0
	59.4	59.4	7	2	0	0
2-15 •	25756.7	257.56	50	8	6	1
	15151	151.51	4	2	1	0
2-5 •	—	—	—	—	—	—
	59.4	59.4	2	3	1	0
2-3 •	—	Directo	Normal	Reducido	Muy reducido	Pequeño
	—	—	—	—	—	—

• Los resultados son de colonias formadas y diferenciadas

La tabla 9, resume el tamaño colonial como expresión del crecimiento y el porcentaje de inhibición de las cepas con respecto al testigo a las diferentes concentraciones de prueba. (Ver apéndice 8 para fotos)

Todas estas observaciones se realizaron 8 días después de haberse llevado a cabo la siembra para comparar en base a tiempo de crecimiento y porque en este periodo los testigos casi cubrieron la caja.

Tabla 9. Evaluación del tamaño colonial de las cepas (cm) y porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de quitosán

Clave	Control (cm)	Tamaño colonial y porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de quitosán					
		[1.5]	% Inhibición	[2.0]	% Inhibición	[2.5]	% Inhibición
2-3	8	6.4	20	4.8	40	0.3	96.2
2-6	8	7.6	5	5.3	33.7	3.1	61.2
2-5	8	3.6	55	0.8	90	0	100
2-11	6.4	0	100	0	100	0	100
2-15	6.4	1.0	84.3	1.0	84.3	0	100
2-9	8	5.5	31.2	0	100	0	100
2-12	8	0	100	0	100	0	100
2-13	8	5.4	32.5	3.1	61.2	2.8	65
2-7	8	0	100	0	100	0	100

Como puede observarse en todas las cepas hubo diferencias entre el tamaño alcanzado por el diámetro del control y el alcanzado por la menor concentración de quitosán (1.5%) incluso en la cepa 2-6 donde el rango de inhibición es del 5%. Esto indica que existe evidencia del poder del quitosán como regulador del crecimiento de los microorganismos en estudio, esto es que tiene poder fungistático y fungicida.

Se obtuvo que la concentración de 2.0 es la Concentración inhibitoria (CI) ya que inhibe más de un 30% en todas las cepas, sin embargo sabiéndose que al trasladar a las condiciones reales es necesario dar una tolerancia se procedió a trabajar también con la concentración 2.5% debido a que cada cepa se comportó independiente y así se asegura más de un 60% de inhibición en todos los microorganismos de prueba.

Pruebas de sensibilidad al quitosán de las cepas aisladas "in vivo"

En la evaluación de la incidencia de los microorganismos "in vivo" ante la presencia de la película de quitosán a las concentraciones de 2.0 y 2.5, los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 10.

Tabla 10.-Resultados de aplicación de películas de quitosán previa inoculación de cepas "in vivo"

Clave	Concentración de la solución de quitosán	
	[2.0]	[2.5]
2-12	-	-
2-9	-	-
2-4	-	-
2-15	-	-
2-3	+	-
2-5	+	-
2-7	-	-
2-11	-	-
2-6	-	-
2-13	-	-

+ Positivo, aparición de microorganismo
- Negativo, no aparición de microorganismo

Esta tabla resume los resultados de la aplicación de quitosán en pepinos, es decir el sistema "in vivo". se compone de 2 columnas con las 2 concentraciones estudiadas.

Las cepas 2-3 y 2-5 son las que a la concentración de 2% de quitosán parece tener solo carácter inhibitorio, mientras que a la concentración de 2.5 % se manifiesta un control fúngico.

A la concentración de 2.0% las cepas 2-12, 2-9, 2-7 y 2-11 presentan control mismas que al ser comparadas con los datos in vitro (tabla 11) se corrobora la acción del quitosán con actividad fungicida

En cuanto a los frutos tratados con quitosán a la concentración de 2.5% todos presentan resistencia al ataque fúngico tal como se observa en la tabla 12, sin embargo en contraste con las pruebas in vitro, las cepas 2-13, 2-4, 2-6 y 2-15, el quitosán se comporta como fungistático.

Al evaluar la sensibilidad de las diferentes cepas en la presencia de quitosán a distintas concentraciones se observa una marcada reducción de los diámetros de crecimiento, como lo reportado por Leuba ⁽²⁷⁾ o Ravi para *Fusarium* procedente de raíces de frijol, lo cual demuestra que las cepas causantes de enfermedades en pepino también son susceptibles al quitosán. Incluso una de las cepas presentó cambio de morfología colonial como lo expresa Ulloa ⁽³³⁾ refiriéndose al rol de las quitinasas en el crecimiento fúngico.

Según Ouattara ⁽³⁷⁾ las interacciones entre el quitosán y los ácidos carboxílicos de los hongos se facilitan cuando ambos están protonados, esto es cuando los valores de pH son menores que el pK del quitosán (6.3) y mayores que el pK del ácido acético (4.8), la liberación del ácido acético se incrementa cuando el pH se acerca a 7.0. en este caso se habla de 5.6

La diferencia en el efecto del quitosán en las cepas probadas puede deberse a la variación en la composición de las estructuras de los hongos para cada cepa ya que según Hardiwer ⁽²⁸⁾ las cepas que tienen más quitina en su composición son más resistentes a la presencia del mencionado polímero.

A diferencia de lo planteado por El Gaouth ⁽³⁸⁾, acerca de la inmersión de los frutos de tomate en la solución de quitosán, en este experimento se decidió barnizar los frutos para asegurar una película uniforme y delgada que no fuera a alterar la respiración y provocara daños por anaerobiosis a diferencia de lo mostrado por Lerdthanangkul ⁽³⁹⁾ que recurre a inmersión ⁽⁴⁰⁾ y esparcido.

El Gaouth ⁽⁴⁰⁾ plantea en su experimentación con fresa que al introducirlas en una solución de microorganismos antes de la aplicación de quitosán a diferencia de lo que se realizó en este trabajo esto en donde se aplicó la solución de quitosán en frutos sanos y limpios para después inocularlos simulando que el fruto se contaminara posteriormente con otros frutos o con materiales y equipo.

En la evaluación de la sensibilidad de los microorganismos "in vivo" se utilizaron las concentraciones de 2.0 y 2.5 la primera concentración reduce a todas las cepas en más de un 30% y la segunda un 60%, se probaron las 2 concentraciones porque se esperaba alguna desviación en la aplicación sobre el fruto.

Una explicación de la diferencia de los resultados "in vitro" y los resultados "in vivo" es que el quitosán induce además la defensa de enzimas quitosanasas presentes en el pepino⁽³²⁾ las cuales degradan las paredes celulares de los hongos según Hirano ⁽⁴¹⁾

Se encuentran resultados similares a los obtenidos sobre chile pimiento al inhibir la infección fungica como lo muestra Lerdthanangkul ⁽³⁹⁾

CONCLUSIONES

- ✓ Los microorganismos aislados comprendieron 19 cepas diferentes de las cuales 10 son patógenas para pepino (*cucumis sativus*).
- ✓ Las cepas soportadas en medio de cultivo PDA son más homogéneas ya que crecen con un patrón constante, y presentan características que las distinguen entre ellas.
- ✓ Se identificaron las cepas pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Phytium*.
- ✓ El conteo de esporas fue necesario para determinar los inóculos utilizando técnicas de otras áreas como la cámara cuenta glóbulos de Neubauer
- ✓ El tamaño de las esporas es una limitante para el uso de la cámara de Neubauer como instrumento de contéo.
- ✓ No existe diferencia significativa en la difusión del quitosán a distinto pH por lo menos en el rango de pH 5.0 a 5.5.
- ✓ El quitosán forma una película sobre el medio de Papa-dextrosa-Agar (PDA) como un adecuado modelo para su aplicación como cubriente.
- ✓ Es recomendable su uso como película cubriente en el fruto al formar una capa continua que se puede aplicar como tratamiento poscosecha.
- ✓ El quitosán aplicado para formar películas constituye un envase primario.

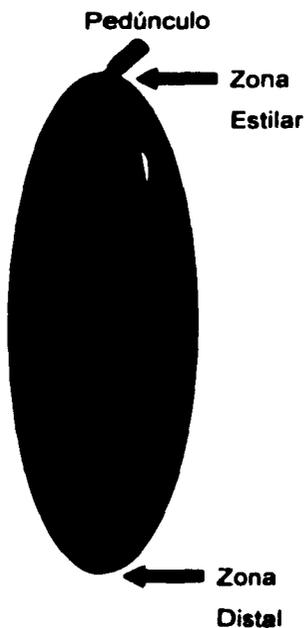
- ✓ El control "in vitro" fue adecuado en las cepas identificadas como *Fusarium*, *Botritis*, *Cladosporium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Phytium* a la concentración de 2.0% y se hizo evidente un mejor control a la concentración de 2.5, ambas referidas al quitosán en dilución de ácido acético al 1%.

- ✓ "In vivo" el control aumenta, esto se atribuye a la interacción con la fisiología del fruto generando una atmósfera modificada.

- ✓ Las películas cubrientes de quitosán prometen una interesante aplicación sobre otros frutos, ya que no solo tienen actividad fungicida y fungistática sino además pueden proveer control sobre la atmósfera propia del fruto, y aumentar su atractivo porque el fruto adquiere una apariencia brillante.

Apéndice 1

Localización física de posiciones en fruto



El pedúnculo se localiza en la zona estilar

Los puntos son reminiscencias de espinas y se llaman mamelones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APENDICE 2

INOCULACION DIRECTA "IN VIVO"

1. Preparación de material

- A. Se lavaron los pepinos con agua y detergente.
- B. Se enjuagaron con agua clorada al 3% para eliminar la posibilidad de interferencia de bacterias.
- C. Se secaron con papel, teniendo cuidado de no friccionar la superficie.

2. Preparación del inóculo

Se agitaron por 1 minuto las preparaciones de la dilución en los tubos "ependorf"

3. Inoculación

- A. Se tomó el inóculo con la micropipeta (8 μ l) y se colocó en la zona predeterminada según la lesión en el pepino portador, en un ambiente estéril.
- B. Se cubrió el inóculo con una motita de algodón humedecida con agua estéril.
- C. Se cubrió con una película plástica (kleenpack) de 1cm²
- D. Se colocó el pepino inoculado en una cámara con una humedad relativa de 95%

INOCULACION CON LESION "IN VIVO"

La preparación del material y del inóculo es la misma

Inoculación

- A. Se realizó una abrasión ligera con un bisturi previamente esterilizado a la llama en la zona predeterminada en el pepino de prueba, en un ambiente estéril
- B. Se tomó el inóculo con la micropipeta (8 μ l) y se colocó en la zona predeterminada según la lesión en el pepino portador, en un ambiente estéril.
- C. Se cubrió el inóculo con una motita de algodón humedecida con agua estéril.
- D. Se cubrió con una película plástica (kleenpack) de 1cm²
- E. Se colocó el pepino inoculado en una cámara con una humedad relativa de 95%

APÉNDICE 3

MÉTODOS DE ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Existen diferentes métodos para determinar el efecto de algunas sustancias antimicrobianas, la elección del método depende del tipo de microorganismo, de la accesibilidad de equipos y reactivos, así como del grado de precisión en la determinación de la susceptibilidad que se requiere en el estudio (45)

Entre los más utilizados sobre la base de su principio y variable de respuesta están:

Difusión en agar, difusión en disco o antibiograma.- El más empleado en la industria y los hospitales para probar casi todo tipo de sustancias, los reactivos son baratos y fáciles de conseguir. Aprovecha la habilidad del agente antimicrobiano para difundir a través del agar y mostrar claramente una zona de inhibición con no-crecimiento de microorganismo. Entre las ventajas están que se pueden probar la mayoría de las sustancias, pueden ser comparadas diferentes cepas en las mismas condiciones contra el mismo antimicrobiano, y en caso de contaminación esta se detecta de inmediato (45, 46)

Entre las desventajas está el que se puede tener un grado de error de arriba del 10% (45)

Enzimáticos.- Los reactivos empleados no son comercialmente disponibles, se necesita material radiactivo y un contador de partículas. El antibiótico es el sustrato de una enzima y el producto de la reacción es medido. Tiene un grado de error de < 5%. (45)

Radioinmunológicos.- los reactivos empleados no son comercialmente disponibles, se necesita material radiactivo y un contador de partículas. En el complejo de un antibiótico radiactivo y un anticuerpo, este es inhibido por un antibiótico no radioactivo en la muestra de ensayo. Tiene un error de < 5%.

Turbidimétrico.- Haciendo diluciones seriales de un fluido nutritivo con concentraciones diferentes de inhibidor, se encuentra la concentración mínima a la que la inhibición es como la del control. Dentro de sus desventajas está que la mayoría de los suplementos para los microorganismos difíciles son opacos. Una desventaja que el efecto antimicrobiano puede detectarse directamente el microscopio (46)

Otra versión de este método es la construcción de una curva de turbidez (densidad óptica) de la muestra a varias concentraciones de inhibidor,

identificando aquellas en las que existe más turbidez que en la de completa inhibición y menos que el control sin antibióticos. Puede medirse con un aparato automático como el Autoturb de Elanco, Indianápolis, Ind.⁽⁴⁵⁾

Potenciométrico.- es similar a la medición turbidimétrica en la construcción de una curva con la variación de diferentes concentraciones de inhibidor, pero el parámetro de medición es el cambio de Ph en el medio en lugar de la turbidez.^(46,47)

Químico.- No son suficientemente sensitivos para detectar adecuadamente la mayoría de los antibióticos dentro del complejo de los fluidos biológicos a las concentraciones que ocurren. (menos de 1µg/ml) ⁽⁴⁶⁾

ELEMENTOS DEL METODO DIFUSIÓN EN AGAR

Agar

El agar es un complejo de sustancias naturales derivadas de algas y contiene 2 tipos de polisacáridos (agarosa y agarpectina) una variedad de cationes metálicos y otros elementos traza, además de la incorporación de nutrientes específicos según los requerimientos del microorganismo, pero en general siempre será un compuesto primeramente de agua, el cual permite la difusión de sustancias de áreas de mayor a menor concentración.

Sustancia inhibidora

La incorporación de la sustancia inhibidora se puede llevar a cabo utilizando discos con una cantidad fija de la droga o por adición de una solución, dentro de un corte en el agar mediante el empleo de cilindros de cristal o metal de forma de pequeños pozos o cubetas en los cuales se colocan las soluciones de los diferentes antimicrobianos⁵³ para facilitar el corrimiento por difusión; esta se da entonces en 2 dimensiones radial y transversal⁵³ y depende de la velocidad de difusión de la sustancia en el agar, a su vez la inhibición del microorganismo depende de esto y de la velocidad de crecimiento propia. Un factor que afecta la observación de los resultados es el tamaño del inóculo, el cual debe ser suficiente para observar su no crecimiento en comparación con su control, pero no excesivo para poder determinar el efecto antes de saturar la caja.

Determinación de la inhibición

Normalmente el crecimiento se mide en milímetros y el óptimo de profundidad del agar se recomienda de 5mm., con concentraciones de 10⁸ UFC

Si la variación del radio entre la prueba y el control con antibiótico es de menos de 3mm. El organismo es llamado sensitivo y si es de más de 3mm el organismo es resistente⁽⁴⁵⁾

Sin embargo para el caso de microorganismos que no puedan ser comparados contra una cepa conocida se pueden hacer adecuaciones o modificaciones ⁽⁴⁵⁾

El diámetro de la zona de inhibición puede ser graficado vs. El logaritmo de la concentración de antibiótico para escoger la concentración más adecuada.

Para determinar el MIC (mínima concentración inhibitoria) el antibiótico puede ser incorporado al agar sólido y preparar una serie de placas conteniendo concentraciones mayores del producto en estudio.⁽⁴⁵⁾

En general el inóculo se aplica como una mancha de aprox. 5mm con 1×10^4 o 1×10^5 de células viables.

El uso del agar a diferentes concentraciones es útil cuando son comparados diferentes microorganismos o agentes nuevos que no se tienen totalmente determinados en cuanto al espectro de acción.

APENDICE 4

METODO DE CONTEO DE CELULAS

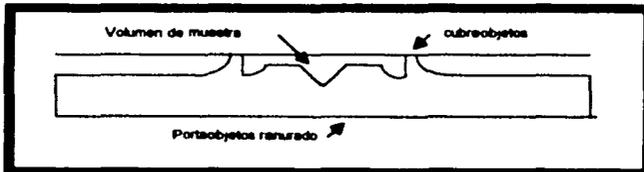
La cámara cuentaglobulos o cámara de recuento es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. (ver dibujo 1) Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen.

Figura 4 Camara cuentaglobulos de Neubauer



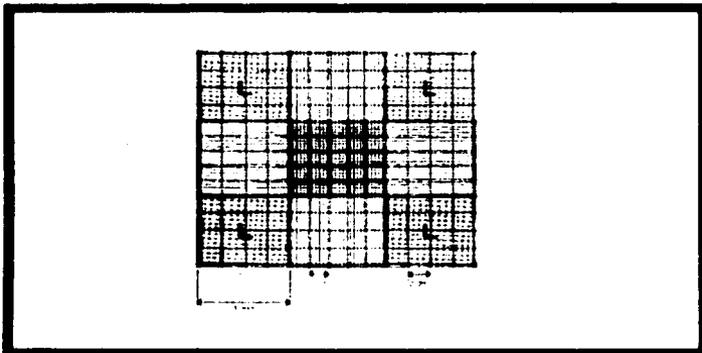
En ambos lados de las 2 plataformas existe una pequeña elevación sobre la que se coloca la tapa de cristal. (ver dibujo 2) Entre la parte superior de la plataforma y la tapa de cristal que la recubre el espacio es de 0.1 mm Cada una de las 2 plataformas contiene un área cuadrículada compuesta por 9 cuadrados grandes de igual tamaño.

Figura 5 Cámara cuentaglobulos de Neubauer (vista transversal)



El área cuadrículada total de la plataforma (9 cuadros grandes) mide 3mm de ancho por 3mm de largo; por tanto, cada cuadrado grande mide 1mm de lado. El volumen de esta área sobre una plataforma es de 0.9mm^3 (ver dibujo 3)

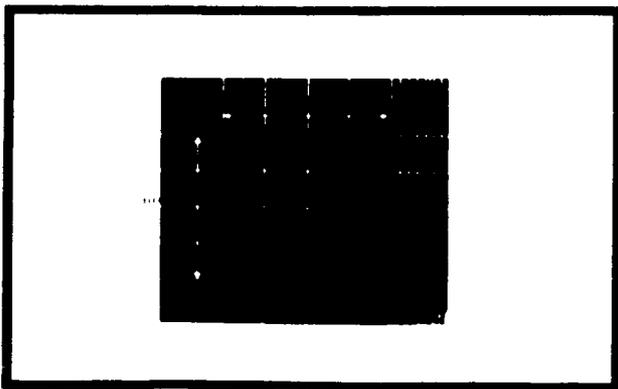
Figura 6 Cámara cuentaglobulos de Neubauer (vista de cuadrícula)



Detalle de la cámara de conteo, con cuatro áreas de 1 mm² (marcadas con L)

El volumen de cada uno de los cuadrados grandes es de 0.1 mm³. Los cuatro cuadrados grandes situados en las esquinas, subdivididos en 16 pequeños cuadrados cada uno, llevan grabada la letra "L" son los que se utilizan para el recuento de leucocitos. (ver dibujo 4)

Figura 7 Área de conteo en ampliación



Detalle de una de las áreas de conteo, tal como se ve con el microscopio de contraste de fases. El área recuadrada en rojo es un cuadrado de 1 mm de lado

Normalmente se utiliza esta cámara para el recuento de corpúsculos sanguíneos pero se decidió emplearla para contabilizar las esporas de las cepas en estudio aprovechando el cuadrículado.

1. Preparación de la muestra

- A. Se corta 1 cm² de la cepa en estudio
- B. Se agrega a 10 ml. De agua estéril
- C. Se hace una lectura y dependiendo del valor se realiza una dilución para tener 50 esporas para sembrar

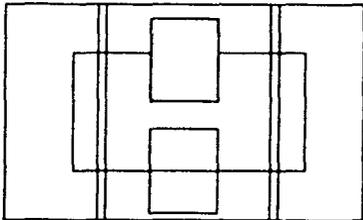
2. Preparación de la cámara

- A. Se limpia la cámara de recuento y la tapa de cristal con un paño limpio que no deje pelusa. También puede utilizarse, para esta operación, etanol a 95% (v/v). Se coloca de nuevo cuidadosamente la tapa de cristal sobre el área cuadrículada de la cámara.

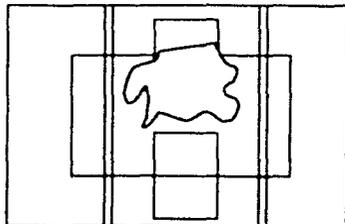
3. Llenado de la cámara de recuento

- A. Se debe procurar hacer que el líquido descienda de forma gradual hasta llenar exactamente el área cuadrículada. (si se retira la pipeta justo antes de que el área parezca del todo llena, el líquido no rebasará)
- B. Se coloca la tapa haciéndola bajar suavemente para que no se formen burbujas o huecos y teniendo cuidado de que no se mueva la tapa de cristal
- C. En el dibujo (5) se muestra como son las formas correcta e incorrecta de llenar la cámara de recuento. Si el llenado no se ha efectuado correctamente, se levanta la tapa de cristal y se limpia todo del conjunto.

Figura 8 Llenado de cámara



Llenado correcto



Llenado incorrecto

D. Se llena el lado opuesto de la cámara de recuento, para tener una réplica.

4. Recuento de células

- A. Se coloca con sumo cuidado la cámara de contaje sobre la platina del microscopio, manteniéndola siempre en posición horizontal.
- B. Utilizando el objetivo de bajo poder (10X), se ajusta la luz del microscopio.
- C. Se enfocan los cuatro cuadrados laterales grandes de la cámara que llevan la mención (W) Ver dibujo 2. Para tener un recuento exacto, es necesario que las células se hallen repartidas de igual forma en estos cuatro cuadrados, con una diferencia no mayor de 10 células entre cada cuadrado.
- D. Comenzando por el cuadrado de la parte superior izquierda, se cuentan todas las células que se hallen en los cuatro cuadrados grandes laterales y se suma el resultado para obtener el total de células observadas. Si existen células que lindan con los bordes exteriores del cuadrado grande, se cuentan solo aquellas que toquen las líneas superior o izquierda. No importa que lados se elijan, aunque para una mejor sistemática se aconseja escoger siempre los 2 mismos lados.
- E. Se cuentan las células del lado opuesto de la cámara sumando las cifras halladas en cada uno de los cuatro cuadrados grandes. Este total debe ser similar al obtenido anteriormente. El número de las células presentes en cada uno de los 8 cuadrantes no debe diferenciarse en más de 15 células.

5. Cálculo del recuento de células

- A. para cada uno de los dos recuentos efectuados, calcúlese el número real de células por mm^3 como se indica a continuación:
- B. $\text{células} / \text{mm}^3 = \text{número de células contadas} \times \text{corrección de volumen} \times \text{corrección de dilución}$
- C. Número de células contado. Es la suma de la cifra obtenida en cada uno de los cuatro cuadrados grandes. Por ejemplo:

Cuadrado 1	25 células
Cuadrado 2	34 células
Cuadrado 3	32 células
Cuadrado 4	31 células
	122

Corrección de volumen el número de células será tomando en cuenta 4 cuadrados como $4(1.0 \times 1.0 \times 0.1) \text{ mm}^3$ o bien 0.4 mm^3 . Para obtener el volumen

de 1.0 mm^3 debe multiplicarse 0.4×2.5 ($1.0/0.4$) el factor de corrección del volumen será pues 2.5

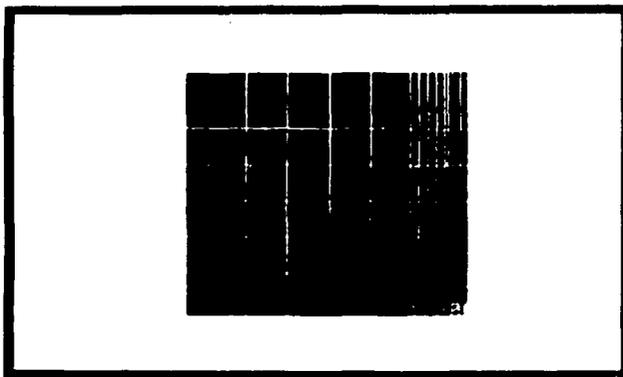
Corrección de dilución: fue distinto para algunas cepas porque requirieron más dilución.

D. Finalmente:

E. $\text{Número de células} / \text{mm}^3 = \text{Número de células contado} \times \text{corrección de volumen} \times \text{corrección de dilución}$.

F. Se calcula la cifra de células del segundo recuento y se efectúa la media entre los 2 resultados.

Figura 9 Ejemplo de observación en cámara



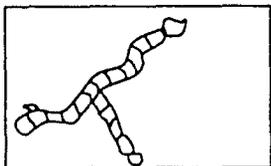
Ejemplo

En la imagen se han representado células vivas como puntos blancos y células muertas (teñidas con azul) como puntos azules. Corresponde a una de las áreas de conteo de la cámara de Neubauer (1 mm^2). El número de puntos blancos en la zona de conteo es de 35 y el de azules de 16. El criterio de inclusión ha sido: están dentro del área y por eso se cuentan los que evidentemente estén dentro además de aquellas que toquen la línea superior o la derecha pero no la inferior o la izquierda.

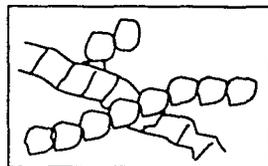
Apéndice 5

Observaciones al microscópio

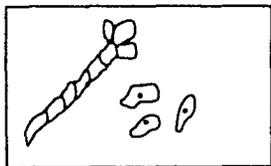
2-3



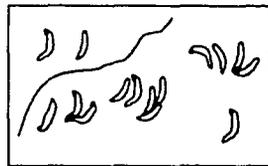
2-6



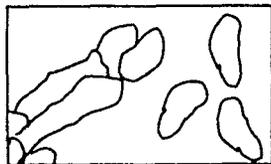
2-4



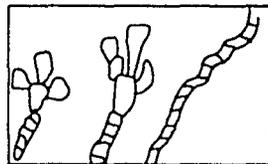
2-7



2-5



2-9



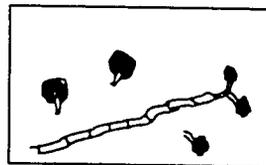
Apéndice 5

Observaciones al microscópio (2)

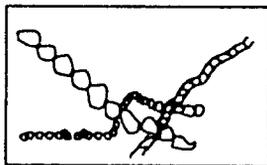
2-11



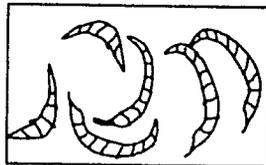
2-13



2-12



2-15



APÉNDICE 6

Calculo de inóculos

CEPA

- 2-13 Se realizó hasta el paso 3 y se encontraron muy pocas esporas fuera del área de contacto por lo que se agregó otro cm^2 de micelio. La distribución dio 2 esporas en un grupo de cuadrantes y 3 en el otro.

Corrección de volumen:

Tomando en cuenta que la cámara se llena con $8\mu\text{l}$ que corresponden a 8 mm^3 y como se contaron 4 cuadrantes, el volumen que esto implica $4 (1.0 \times 1.0 \times 0.1)\text{ mm}^3$ o bien 0.4 mm^3 .

$$\left(\frac{8\text{ mm}^3}{0.4\text{ mm}^3}\right) = 20 \text{ Factor de corrección por volumen}$$

Corrección por dilución:

$60\mu\text{l}$ de solución en $40\mu\text{l}$ de colorante

$$60:40 = 0.66$$

$$3 \times 20 \times 0.66 = 39.6 \approx 40 \text{ esporas / mm}^3$$

$$2 \times 20 \times 0.66 = 26.4 \approx 27 \text{ esporas / mm}^3$$

Repetición

$$X = 33.5 \text{ esporas / mm}^3$$
$$X_R = 23.1 \text{ esporas/mm}^3$$

- 2-7 Se realizó hasta el paso 3 y se encontraron abundantes esporas que impidieron realizar el conteo por lo que se procedió a diluir tomando una parte de la solución por 9 de agua estéril.

$60\mu\text{l}$ de solución en $40\mu\text{l}$ de colorante

y luego tomando $10\mu\text{l}$ de la solución coloreada y agregándola a $90\mu\text{l}$ de agua estéril

$$60:40 = 0.66 \text{ Diluyendo en } 100 \text{ para ajustar}$$

$$0.66:100 = 151.51$$

$$3 \times 20 \times 151.51 = 9090.6 \text{ esporas / mm}^3$$

$$\begin{aligned} X &= 9090.6 \text{ esporas / mm}^3 \\ \text{Repetición } X_R &= 10605.7 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

- 2-12 Se realizó hasta el paso 3 y no se encontraron esporas, por lo que se repitió, se agitó por más tiempo (3 min) y entonces se realizó la medición.

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$60:40 = 0.66$$

$$4 \times 20 \times 0.66 = 52.8 \text{ esporas / mm}^3$$

$$\begin{aligned} X &= 52.8 \text{ esporas / mm}^3 \\ \text{Repetición } X_R &= 72.6 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

Se puso 1 cm^2 en 5 ml porque en las anteriores se tuvo problema para visualizar.

- 2-6 Se preparó en 5 ml , después de varias agitaciones se sometió a una baja de la temperatura porque no se observaban estructuras finalmente se mantuvo a 5°C por 10 minutos seguido de agitación y se obtuvieron resultados.

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$60:40 = 0.66$$

$$0.66:1 = 1.51$$

$$6 \times 20 \times 1.51 = 181.2 \text{ esporas / mm}^3$$

$$8 \times 20 \times 1.51 = 214.6 \text{ esporas / mm}^3 \approx 211.4 \text{ esporas / mm}^3$$

$$X = 211.4 \text{ esporas / mm}^3$$

- 2-11 Se agregó en 5 ml y se diluyó al 10^{-1} se obtuvo

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$60:40 = 0.66$$

$$5 \times 20 \times 151.51 = 15151$$

$$7 \times 20 \times 151.51 = 21211.4 \approx 18181.2 \text{ esporas / mm}^3$$

$$\begin{aligned} X &= 18181.2 \text{ esporas / mm}^3 \\ \text{Repetición } X_R &= 18181.2 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

2-4 Se preparó en 5 ml y se obtuvo:

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$\begin{aligned} 60:40 &= 0.66 \\ 0.66:2 &= 3.03 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 12 \times 20 \times 0.66 &= 727.2 \\ 9 \times 20 \times 0.66 &= 545.4 \approx 636.3 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X &= 636.3 \text{ esporas / mm}^3 \\ \text{Repetición } X_R &= 666.6 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

2-3 Se agregó también en 5 ml, pero al igual que con 2-6 no se pudo observar ninguna espора suelta, se sometió a condiciones extremas de temperatura (5°C y 40°C) y de agitación (5 minutos) pero sin ningún resultado por lo que se procedió a sembrarlo por azada.

2-9 Se agregó en 5 ml y se obtuvo

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$60:40 = 0.66$$

$$\begin{aligned} 5 \times 20 \times 0.66 &= 66 \\ 4 \times 20 \times 0.66 &= 52.8 \approx 59.4 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X &= 59.4 \text{ esporas / mm}^3 \\ \text{Repetición } X_R &= 59.4 \text{ esporas / mm}^3 \end{aligned}$$

*2-15 Se agregó en 5 ml y se obtuvo

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$\begin{aligned} 60:40 &= 0.66 \\ 0.66-1 &= 1.51 \end{aligned}$$

$$10 \times 20 \times 151.51$$
$$7 \times 20 \times 151.51 = 25756.7 \text{ esporas / mm}^3$$

$$\text{Repetición } X = 25756.7 \text{ esporas / mm}^3$$
$$X_R = 15151 \text{ esporas / mm}^3$$

- *2-5 Se sometió a enfriamiento por 10 min hasta congelación y luego se agitó vigorosamente, con lo cual liberó unas estructuras que no son observables en la primera revisión al microscopio.

60 μ l de solución en 40 μ l de colorante

$$60:40 = 0.66$$

$$4 \times 20 \times 0.66 = 52.8$$

$$5 \times 20 \times 0.66 = 66 \approx 59.4 \text{ esporas / mm}^3$$

$$X = 59.4 \text{ esporas / mm}^3$$

APENDICE 7

ESTADISTICOS

RADIOS DE DIFUSION

El diámetro exterior se expresó en [mm], las lecturas se realizaron a diferentes intervalos de tiempo y se tomaron notas sobre la apariencia del quitosan en cada uno de los intervalos.

Datos :

Solución de quitosán al 1.5%

Q 5.5	M5.5	0 hrs	48 hrs.	74 hrs.	218 hrs.	Datos estadísticos	
1		8 mm	14 mm	14 mm	14 mm	x = 13.5	δ ² = 1
2		8 mm	13 mm	13 mm	13 mm	δ = 1	n = 2
Q 5.0	M 5.5						
1		8 mm	10 mm	10 mm	10 mm	x = 10.75	δ ² = 2.25
2		8 mm	11.5 mm	11.5 mm	11.5 mm	δ = 1.5	n = 2

t Apariencia del quitosan

- 0 sólido opalescente
- 74 sólido opalescente
- 218 sólido amarillo opalescente

Estadístico: Inferencias sobre la diferencias de medias, prueba de hipótesis

$$S_p^2 = \frac{(n_1-1)(\delta_1)^2 + (n_2-2)(\delta_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad n_1 + n_2 - 2 = 2 \text{ grados de libertad}$$

$$S_p^2 = \frac{(2-1)(1) + (2-1)(2.25)}{2}$$

$$S_p^2 = 1.625$$

$$S_p = 1.274$$

$$T_0 = \frac{13.5 - 10.75}{1.274 \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2}}}$$

$$T_0 = \frac{2.75}{1.274 \sqrt{1}}$$

$$T_0 = \frac{2.75}{1.274}$$

$$T_0 = 2.158$$

95% de confianza y 2 grados de libertad

$$t_{\text{tablas}} = 2.920$$

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

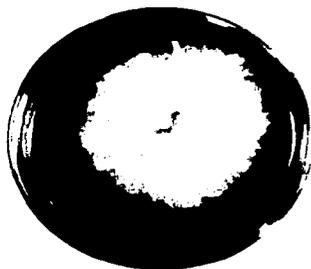
$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

$|t_0| = 2.158 < 2.920 \therefore$ No hay diferencia significativa y se acepta H_0

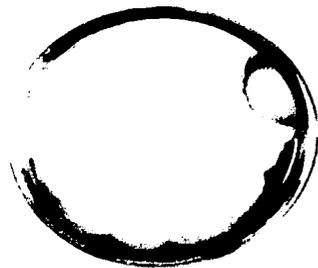
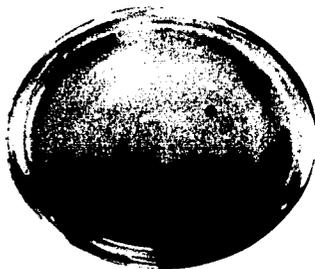
Lo cual se interpreta como que no existe diferencia significativa entre las 2 medias de diámetro, por lo que para saber si el pH es determinante en la difusión es necesario hacer un estudio más a fondo, con más determinaciones, lo cual se sale de los objetivos de esta experimentación ya que lo importante para nuestro objetivo es saber que existe difusión con el quitosán a pH de 5.5 en un medio de igual valor y siendo así se elimina la variable de pH para determinar el efecto del quitosán sobre las cepas.

APÉNDICE 8

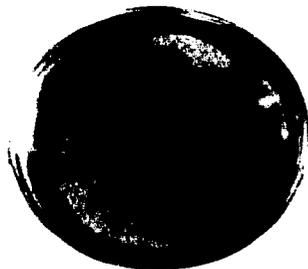
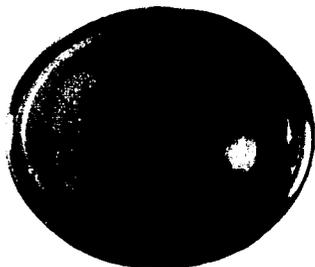
EFFECTO FUNGICIDA
CONTROL A MÍNIMA CONCENTRACIÓN (1.5%p/v)



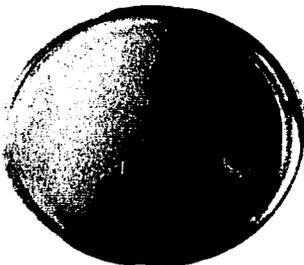
Clave:2-11



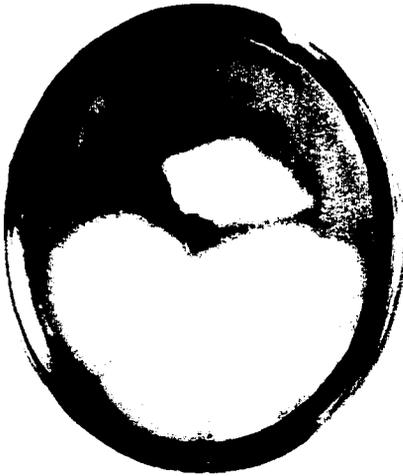
Clave:2-12



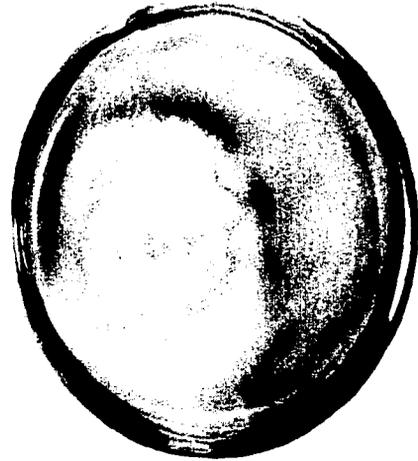
Clave:2-7



EFFECTO FUNGISTÀTICO CONTROL A CONCENTRACIÒN (2.0%p/v)

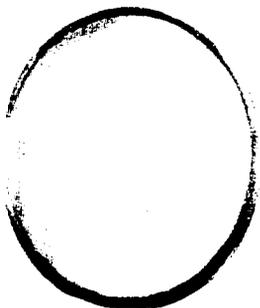


Clave:2-9

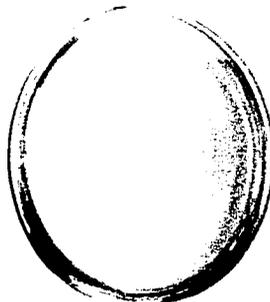


EFFECTO FUNGISTÀTICO CONTROL A CONCENTRACIÒN 2.5%p/v)

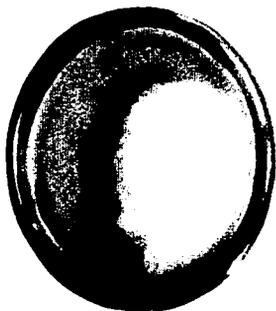
Clave:2-6



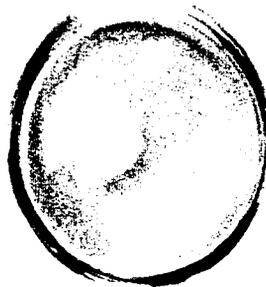
Control



1.5



2.0



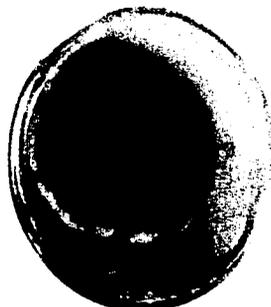
2.5

EFFECTO FUNGISTÀTICO CONTROL A CONCENTRACIÒN 2.5%p/v)

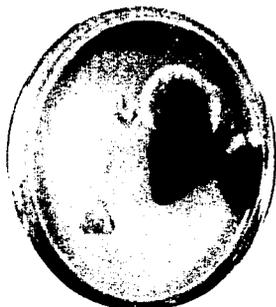
Clave:2-13



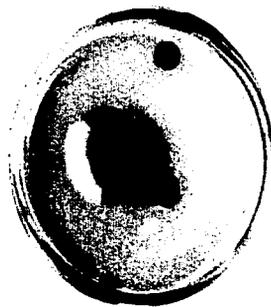
Control



1.5



2.0



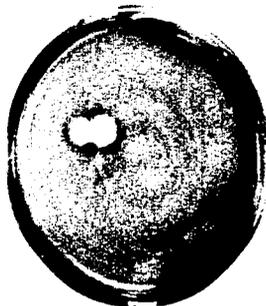
2.5

EFFECTO FUNGISTÀTICO CONTROL A CONCENTRACIÒN 2.5%p/v)

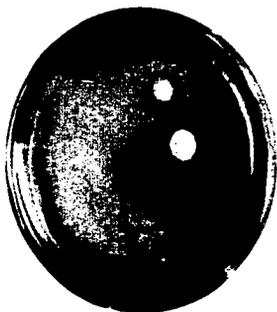
Clave:2-15



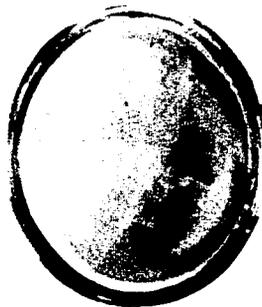
Control



1.5



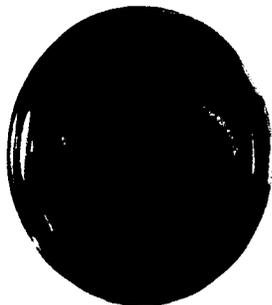
2.0



2.5

EFFECTO FUNGISTÀTICO CONTROL A CONCENTRACIÒN 2.5%p/v)

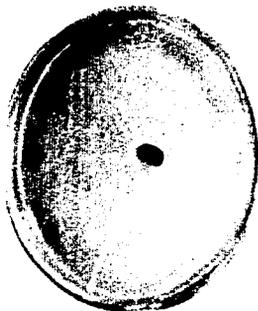
Clave:2-5



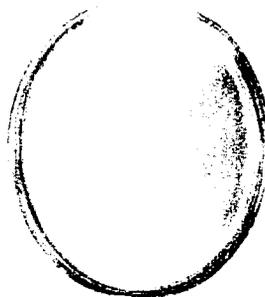
Control



1.5



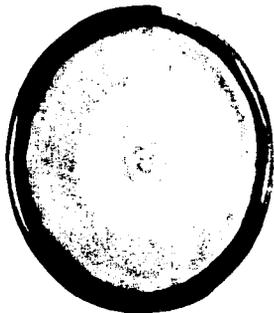
2.0



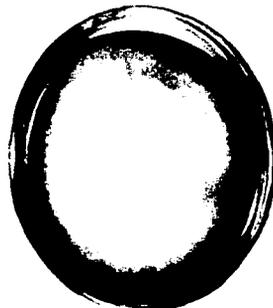
2.5

EFFECTO FUNGISTÀTICO CONTROL A CONCENTRACIÒN 2.5%p/v)

Clave:2-3



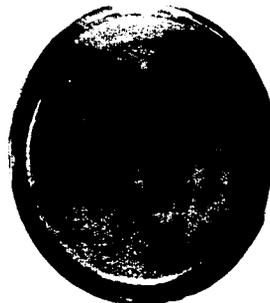
Control



1.5



2.0



2.5

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. SEP. 1981. Cuadernos de cucurbitáceas manuales para la educación agropecuaria. Area de producción vegetal. Trillas. (9-56)
2. Wills R.H.H. 1987. Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas postrecolección. Acribia Zaragoza España. (1-51, 80-121)
3. El Gahauth Ahmed, Arul Joseph et al. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits *Phytopathology*. **82** (398-402)
4. Denison Ervin L. 1987. Cultivo de hortalizas, plantas y flores. Orientación grupo Noriega editores. (354-378).
5. Tiscornia Julio. 1988. Hortalizas de fruto. Buenos Aires albatros. (95-104)
6. Ryall A. Loyd, Lipton Werner. 1983. Handling, transportation and storage of fruit and vegetables AVI Publishing company inc. **1** (67-69, 156-157, 424-429)
7. SAGAR. 1982. Variedades recomendadas de los principales cultivos. (53-60)
8. SAGAR. 1986. Guía para la asistencia técnica agrícola. Valle de Culiacán. (103-115)
9. Belitz Hans Dieter. 1988. Química de los alimentos. Editorial Zaragoza Acribia. (178-179)
10. Calderon Esteban Alcaraz. 1993. Fruticultura general. Uteha (53-76)
11. Gaurth R. Wyse and Sorenson. 1992. Nutritional quality index of foods. AVI Publishing company west port, Conn. *Avi*. (73-75)
12. Pantastico E.R.B. 1975. Postharvest physiology, handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. The AVI Publishing Company. (4-525)
13. Peleg Kalman. 1980. Produce handling packaging and distribution West port, Connecticut AVI (48-51)
14. Brennan, J.R. Butters and others. 1990. Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Zaragoza Acribia (34-56)
15. Desrosier Norman. 1987. Conservación de los alimentos. México continental (336-362)
16. UNAM. 1997. Programa universitario de alimentos preservación de alimentos por atmósferas controladas y modificadas Mayo (12-14)
17. Knorr dietrich. 1984. Use of chitinous polymers in food food technology. *Enero*. (85-96)
18. Knorr dietrich. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management *Food technology*. *Enero*. (114-120)
19. *Biotechnology Vol 7* 1972. Enzyme immobilization (360-441)
20. Allan. G.G. Altman, L. C. Et al. Chitin and chitosan. *Biomedical applications of chitin and chitosan*. (121-131)
21. Barnett H.L. and Hunter. 1977. *Illustrated genera of imperfect fungi* Burgess Publishing Company (1-34)
22. Frazier, William carroll, Westhoff D.C. 1993. *Microbiología de los alimentos* Acribia S.A. Zaragoza España. (16-39)
23. Petoseed. 1982. Cucurbit diseases a practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. (7-47)
24. Mac nab, A.A. Sherf A.F. and John Wiley and Springer J.K. 1983. *Identifying diseases of vegetables*. The Pennsylvania State University (1-60)
25. Petoseed 1991. Fichas técnicas de semilla mejorada para variedades Dasher II, Turbo y Conquistador

26. Hadwiger, Lee A. Fristensky Brian. Chitosan a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions increases crop yields. *Phytopathology* 71 (291-301)
27. Leuba. J.L. And Stossel P. Chitosan and other poliamines antifungal activity and interaction whit biological membranes. Nestle Research Departament, Nestec Ltd. (215-222)
28. Hadwiger I A., Kendra, B. W. Chitosan Both activates genes in plants and inhibits RNA Synthesis in fungi. Department of plant pathology. Washington State University. (209-214)
29. Agios George. N 1991. *Fitopatología* Editorial limusa (23-56)
30. SAGAR Anuario estadístico de la producción de de los años 89-97
31. Anuarios estadísticos de Comercio exterior SAGAR 89-97
32. Ulloa Miguel.1982. Atlas de micología básica. Editorial Pax-México Librería (XVI-XXV 3-23)
33. Romero Cova Sebastian. 1983. Hongos fitopatógenos. México: Universidad Autónoma de Chapingo Dirección del Patronato Universitario. (21-33)
34. Cappuccino, James G. 1992. *Microbiology a laboratory manual*. Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. (51-93)
35. Butler. B. L., Vergano P.J. Et al 1996. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage *Journal of food science* 61, No. 5 (953-955)
36. Vojdani Fakhrich and Torres Antonio. 1990. Potassium sorbate permeability of methyl cellulose and hydroxi propilcellulose coating: effect of fatty acids *Journal of food science* 55, no. 3 (841-846)
37. Ouattara, B. Simard R E. Piette, G Begin A. 2000. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of food science* 65, No. 5
38. El Ghaouth Ahmed, Ponnampalam Rathy. 1992. Chitosan coating to extend the storagelife of tomatoes *Hotscience* 27 2 (1016-1018)
39. Lerdthanangkul Sirichit and Krochta John M. 1996. Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers *Journal of food science* 61 No 1 (176-79)
40. El Ghaouth Ahmed, Ponnampalam Rathy. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of food science* 56 No. 6 (1618-1620)
41. Hirano Shigehiro, Itakura chitoshi, et al 1990. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *Journal Agricultural food chemistry* 38 (1214-1217)
44. SEPESCA. Cuadernos de pesca 1997. (125-128)
45. Washington John A. And barry Arthur I. 1989. Dilution test procedures. The Medical School, University of Birmingham U.K (410-417)
46. Pichardo Reyes Efen Alberto 1982. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos *Infectología* . (215-222)
47. Colvin H.J and Sherris J.C. 1977. Electrical impedance measurements in the reading and monitoring of brith dilution susceptibility test *Antimicrobial agents and chemotherapy*. julio (61-66)

NORMAS

43. NMX-FF-023-1982

Productos alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca-pepino-(cucumis sativus)-especificaciones

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

48. Agnos. George. N. 1991. Fitopatología Edit. Limusa. (282-287)
49. Aiba. S., Fujiwara T. And Hideshima T. Filmogenic Properties of chitin-chitosan Journal of colloids. (389-395)
50. Hosokawa, Jun. Nishiyama Masasshi . 1990. Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose Boller T. Chitinase: A defense of higher plants against pathogens. 29 (223-229)
51. Christensen Clyde Martin. 1988. Los hongos y el hombre. México Interamerican. (184-201)
52. Development in food science .1989. Food emulsifiers chemistry, technology, funtional properties and applications (307-327)
53. Dodd Christine E.R. And Waites W.M. 1992. Development of microscopic techniques for examining microbial growth in situ in food ecosystems. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 73 148-154
54. Doxatakis George 1989. Food emulsifiers. Development in food science Elsevier (307-327)
55. El Ouakfaoui Souad and Asselin Alain .1992. Diversity of chitosanase activity in cucumber plant science . 858 (33-41)
56. Instituto de biología. 1995. Estudios taxonomicos y ecográficos de las cucurbitaceae Latinoamericanas de importancia económica. UNAM México . (12-16)
57. Habig Tara and Kroncta John . 1994. Milk protein - based edible films and coatings Food technology Enero. (97-103)
58. Hoagland Peter and Parris Nicholas 1996. Chitosan -pectin-laminated films. J. Agric Food chem 44 No. 7. (1915-1919)
59. Hogg G.M. Patterson MF Barr JG 1987. Correlation between antibiotic sensitivity testing by conventional and conductivity mesasurements Journal of Applied Bacteriology. 62 (189-195)
60. Hosokawa Jun , Nishiyama Masashi 1990. Biodegradable film derived from chitosan and Homogenized cellulose Ind Eng Chem Res (800-805)
61. Hughes Jonathan h , Biedenbach douglas J. Et al. 1993. E-test as susceptibility test and epidemiological tool for evaluation of Neisseria meningitidis isolates. Journal of clinical microbiology diciembre. (3255-3259)
62. UNAM. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las cucurbitaceae latinoafricanas de importancia económica. México (XI-XXX, 13-19)
63. Jan Knapczyk, Anna Barbara Macura, and Boleslaw Pawlik. 1992. International Journal Pharmaceutics 80 (33-88).

64. Jan Knapczyk. 1992. Antimycotic bucal and vaginal tablets with chitosan *International journal of pharmaceutics* 88 (9-14).
65. Jan Knapczyk. 1993. Exipient ability of chitosan for direct tableting *International journal of pharmaceutics* 89 (1-7).
66. Joint. U.S. Japan. 1997. Seminar on advances in chitin, chitosan and related Enzymes Orlando Academic Zikakis (20-258)
67. Knorr D. And Teutonico R.A. 1986. Chitosan immobilization and permeabilization of amaranthus tricolor cells. *Journal Agricultural Chemistry* 34 (96-97)
68. Kumar, Ravi Reactive & funtional polymers 2000. 46 (1-27)
69. Kone Elmer, M.D. 1988 Diagnóstico Microbiológico buenos aires Argentina Instituto de medicina. (85-92)
70. Marshall Kathy J. Musher Daniel M. Et al 1993. Testing of streptococcus pneumoniae for resistance to penicillium *Journal of clinical Microbiology* may (1246-1250)
71. Murray patrick R. And Jorgensen James.H Quantitative susceptibility test methods in major U.S.medical center Antimicrobial agents and chemotherapy july (66-70)
72. No Hhong. K. , meyers Samuel P. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan a review *Journal of acuatic food product technology* 4(2) (27-52)
73. Ouakfaoui Souad and Asselin Alain. (1992) Diversity of chitonase activity in cucumber *Plant science* 85 33-41
74. Piddock Laura J.V. 1990 Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria *Journal of applied bacteriology* 68 (307-318)
75. Pelczar. Michael J. 1988. *Micologia Mc graw hill* (118-129)
76. Pelczar. Michael J. 1984. *Micobiologia Mc graw hill* (88-117)
77. Rawis, Rebecca. C& EN 1984. Prospects brighten for converting chitin wastes to valuable products. *Washington. Mayo* 14 (42-45)
78. Salunkhe D.K., B.B. Desai 1984. *Postharvest biotechnology of vegetables. Volume II CRC Press, Inc. Boca raton , Florida* (63-70)
79. Senstad C. And Almas K A. 1985 Use of chitosan in the recovery of protein from shrimp processing wastewater. (568-570)
80. Shahidi Fereidoon Kamil Vidana Janak and Jeon you-jin. 1999. Food applications of chitin and chitosans *Trends in food science & technology. Elsevier* 10 (37-51)
81. Sietsma, j.H., Vermeulen C.A. And Wessels 1995. The role of chitin in hyphal morphogenesis *Plant science* 8 (63-67)
82. Smith H. 1984. The biochemical challenge of microbial pathogenicity. *Journal of Applied Bacteriology* 47 (395-404)
83. Sudarshan, Hoover and Knorr 1992. Antibacterial Action of chitosan. *Food biotechnology* 6 num3. (757-272)
84. Talasila, P.C Chau K V And Brecht J.K 1995. Desing of rigid modified atmosphere packages for fresh fruits and vegetables *Journal of food science.* 60 4 (1563-1569)
85. Tamaro D. Edit Gustavo Gil Barcelona 1978. *Manual de Horticultura* (100-108)
86. Ur. A and Brown D.F.J 1975 Impedance monitoring of bacterial activity. *Journal Medical microbiology* 8 (19-28)
87. Venkatrao, a Baradarajan and Sastry C.A. 1991 Adsorption of dyestuffs on chitosan (554-559)

88. Wheat, P.P. Hastings G.M. And Spencer R.C. 1988. Rapid antibiotic susceptibility test on enterobacteriae by ATP bioluminescence. Journal Medical Microbiology 25 (95-99)
89. Wong Dominic W.S. Gastineau francois. 1992. Chitosan-lipid films: microestructure and surface energy . Journal Agric.Food Chem Vol 40 540-543

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**