



El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Elaboración de quitosano a partir de desechos de camarón y evaluación
de sus propiedades antifúngicas ante *Aspergillus parasiticus* y su producción
de aflatoxina B1

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Octavio Cota Arriola

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| DEL AUTOR..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| DEDICATORIA..... | vi |
| CONTENIDO..... | vii |
| LISTA DE TABLAS..... | xi |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiii |
| LISTA DE ANEXOS..... | xiv |
| NOMENCLATURA | xv |
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| ANTECEDENTES..... | 5 |
| Importancia del Género <i>Aspergillus</i> | 5 |
| Generalidades de <i>Aspergillus parasiticus</i> | 7 |
| Condiciones de crecimiento | 8 |
| Características morfológicas | 8 |
| Características macroscópicas..... | 8 |
| Características microscópicas..... | 8 |
| Micotoxinas Producidas por <i>Aspergillus</i> | 8 |
| Aflatoxinas..... | 11 |
| Biosíntesis de Aflatoxinas..... | 14 |
| Toxicidad de las Aflatoxinas..... | 15 |
| Producción de Aflatoxinas..... | 20 |
| Especie de hongos | 21 |
| Esporulación | 21 |
| Factores ambientales..... | 21 |
| Actividad de agua..... | 22 |
| Temperatura..... | 22 |
| Potencial de Hidrógeno..... | 22 |
| Fuentes de nutrientes..... | 22 |
| Fuente de carbono..... | 23 |
| Fuente de nitrógeno..... | 23 |

| | |
|--|----|
| Metales..... | 23 |
| Radiación | 23 |
| El estrés oxidativo..... | 24 |
| Control de Aflatoxinas..... | 24 |
| Compuestos naturales..... | 25 |
| Compuestos sintéticos | 26 |
| Control biológico..... | 26 |
| Hongos..... | 27 |
| Bacterias..... | 27 |
| Detoxificación..... | 28 |
| Amonificación..... | 28 |
| Álcalis y nixtamalización..... | 28 |
| Aflatoxinas en Maíz..... | 28 |
| Quitosano..... | 34 |
| Métodos de obtención de quitina..... | 34 |
| Método químico..... | 34 |
| Método biológico..... | 35 |
| Métodos de obtención de quitosano..... | 35 |
| Método químico..... | 35 |
| Método enzimático..... | 36 |
| Actividad fungistática..... | 36 |
| Mecanismo de acción..... | 37 |
| JUSTIFICACION..... | 38 |
| OBJETIVOS..... | 39 |
| Objetivo general..... | 39 |
| Objetivos particulares..... | 39 |
| HIPÓTESIS..... | 40 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 41 |
| Obtención de Quitosano..... | 41 |
| Obtención de la materia prima | 41 |
| Análisis proximal de la materia prima..... | 41 |
| Contenido de ceniza..... | 41 |
| Contenido de proteína..... | 41 |
| Obtención de quitosano ensilado..... | 43 |

| | |
|--|----|
| Preparación del inóculo de <i>Lactobacillus</i> | 43 |
| Obtención de quitina..... | 43 |
| Obtención de quitosano | 43 |
| Obtención de quitosano fresco | 43 |
| Obtención de quitina..... | 43 |
| Obtención de quitosano..... | 43 |
| Caracterización Físicoquímica del Quitosano..... | 44 |
| Contenido de ceniza | 44 |
| Contenido de proteína | 44 |
| Peso molecular | 44 |
| Grado de desacetilación | 45 |
| Preparación de las soluciones de quitosano..... | 46 |
| Solubilidad..... | 46 |
| Bioensayos | 46 |
| Propagación y resuspensión de esporas | 46 |
| Efecto del quitosano sobre la cinética de crecimiento radial..... | 47 |
| Determinación de la concentración media inhibitoria (CQ ₅₀) y Velocidad de Crecimiento | 47 |
| Efecto del quitosano sobre la germinación de esporas..... | 48 |
| Análisis de microscopía de epifluorescencia..... | 48 |
| Número de septos en hifas..... | 49 |
| Número de divisiones mitóticas..... | 49 |
| Parámetros Morfométricos..... | 49 |
| Efecto del quitosano sobre la producción de Aflatoxinas..... | 50 |
| Extracción y purificación..... | 50 |
| Cuantificación..... | 51 |
| Aflatoxinas totales..... | 51 |
| Aflatoxina B1 | 51 |
| Estudio de Mutagenicidad..... | 52 |
| Prueba de mutagenicidad de quitosano en <i>Salmonella</i> | 52 |
| Análisis Estadístico..... | 53 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 54 |
| Análisis proximal del cefalotórax de camarón (<i>Litopenaeus</i> | |

| | |
|--|-----|
| <i>vanameii</i>)..... | 54 |
| Rendimientos de quitina y quitosano | 54 |
| Caracterización Química..... | 57 |
| Peso Molecular y Grado de Desacetilación..... | 59 |
| Solubilidad del Quitosano..... | 62 |
| Efecto del Quitosano sobre el Crecimiento Radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992 | 63 |
| Determinación de las Concentraciones medias inhibitorias (CQ ₅₀) de los Quitosanos | 68 |
| Diámetro y longitud promedio de hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992, a las 72 horas de crecimiento en medio sólido Czapeck | 74 |
| Efecto del quitosano (CQ ₅₀) sobre la Germinación de Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992..... | 76 |
| Diámetro de esporas e hifas en la etapa de germinación de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992 en medio sólido Czapeck | 80 |
| Microscopía de Epifluorecencia | 82 |
| Número de divisiones mitóticas de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992..... | 82 |
| Número de septos en hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992..... | 85 |
| Diámetro de esporas e hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992 en medio líquido Czapeck..... | 88 |
| Efecto del Quitosano sobre la Producción de Aflatoxinas de <i>Aspergillus parasticus</i> ATCC 16992..... | 91 |
| Aflatoxinas totales..... | 91 |
| Aflatoxina B1..... | 95 |
| Mutagenicidad del Quitosano (CQ ₅₀)..... | 101 |
| CONCLUSIONES | 105 |
| RECOMENDACIONES..... | 106 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 107 |
| ANEXOS..... | 121 |

LISTA DE TABLAS

| | | Pág. |
|-----------------|---|------|
| Tabla 1 | Principales micotoxinas y especies fúngicas que las producen..... | 10 |
| Tabla 2 | Toxicidad aguda de aflatoxina B1 expresada como dosis oral simple DL ₅₀ | 18 |
| Tabla 3 | Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz..... | 30 |
| Tabla 4 | Contenido de minerales del maíz..... | 31 |
| Tabla 5 | Composición química de la cabeza de camarón <i>Litopenaeus vanameii</i> | 55 |
| Tabla 6 | Rendimientos de quitina y quitosano a partir de cabezas de camarón <i>Litopenaeus vanameii</i> | 56 |
| Tabla 7 | Porcentajes de proteínas y cenizas residuales en quitina y quitosano | 58 |
| Tabla 8 | Propiedades fisicoquímicas de los quitosanos..... | 60 |
| Tabla 9 | Porcentaje de solubilidad a diferentes concentraciones de quitosano..... | 64 |
| Tabla 10 | Velocidad de extensión e índice fungistático de <i>Aspergillus parasiticus</i> a los 122 horas en medio sólido Czapeck, a 28°C..... | 67 |
| Tabla 11 | Velocidad de extensión e índice fungistático del quitosano (CQ ₅₀) sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio sólido Czapeck, a 28°C..... | 72 |
| Tabla 12 | Diámetro y longitud promedios de las hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> a las 72 horas de crecimiento en medio de cultivo sólido Czapeck a 28°C..... | 75 |
| Tabla 13 | Efecto del quitosano (CQ ₅₀) sobre la velocidad de germinación de esporas e índice fungistático sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> | 78 |
| Tabla 14 | Diámetros promedio de esporas e hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> e la etapa de germinación en medio sólido | |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| | Czapeck, a 28°C..... | 81 |
| Tabla 15 | Diámetro de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio líquido Czapeck, a 28°C..... | 89 |
| Tabla 16 | Diámetro promedio de hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio líquido Czapeck, a 28°C..... | 90 |
| Tabla 17 | Efecto del quitosano sobre la producción de aflatoxinas totales por <i>Aspergillus parasiticus</i> | 92 |
| Tabla 18 | Producción de aflatoxina B1 por <i>Aspergillus parasiticus</i> | 97 |
| Tabla 19 | Producción de aflatoxina B1 por <i>Aspergillus parasiticus</i> (repetición)..... | 99 |
| Tabla 20 | Potencial mutagénico de quitosanos usando <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98, con y sin activación enzimática en la prueba de Ames..... | 102 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1 Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> . A-B: conidióforos; C-D: cabezas conidiales..... | 6 |
| Figura 2 Estructuras químicas de aflatoxinas..... | 13 |
| Figura 3 Esquema general de la biosíntesis de aflatoxinas..... | 16 |
| Figura 4 Diagrama de flujo de la metodología utilizada..... | 42 |
| Figura 5 Efecto del quitosano obtenido sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> e medio sólido Czapeck, a 28°C | 65 |
| Figura 6 Porcentaje de inhibición del quitosano sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio sólido Czapeck, a 28°C..... | 69 |
| Figura 7 Efecto del quitosano (CQ ₅₀) sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio sólido Czapeck, a 28°C.. | 71 |
| Figura 8 Porcentaje de inhibición del quitosano (CQ ₅₀) sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio sólido Czapeck, a 28°C..... | 73 |
| Figura 9 Efecto del quitosano sobre la germinación de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> , a 28°C..... | 77 |
| Figura 10 Presencia de núcleos en esporas e hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> a) control agua, b) quitosano..... | 83 |
| Figura 11 Número de divisiones mitóticas de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio líquido Czapeck | 84 |
| Figura 12 Presencia de septos en hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio líquido Czapeck, a las 15 h, a) septos en control agua con luz violeta, b) septos en quitosano con luz violeta, c) septos con quitosano con luz violeta y blanca... | 86 |
| Figura 13 Número de septos en hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio líquido Czapeck, a 28°C..... | 87 |
| Figura 14 Efecto del quitosano en la producción de aflatoxinas totales por <i>Aspergillus parasiticus</i> | 93 |
| Figura 15 Cromatogramas obtenidos de aflatoxina B1..... | 96 |
| Figura 16 Curva de aflatoxina B1 usado como control positivo en la prueba de Ames..... | 104 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Anexo 1 Efecto del quitosano obtenido por método químico (fresco) sobre el crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> , a 28°C..... | 121 |
| Anexo 2 Efecto del quitosano obtenido por método biológico (ensilado) sobre el crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> , a 28°C..... | 122 |
| Anexo 3 Efecto del quitosano comercial de baja viscosidad sobre el crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> , a 28°C..... | 123 |
| Anexo 4 Porcentaje de inhibición del quitosano sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> , a 28°C..... | 124 |
| Anexo 5 Porcentaje de inhibición del quitosano fresco sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> | 125 |
| Anexo 6 Porcentaje de inhibición del quitosano ensilado sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> | 126 |
| Anexo 7 Porcentaje de inhibición del quitosano comercial sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> | 127 |
| Anexo 8 Concentraciones medias inhibitorias (CQ ₅₀) de los quitosanos a diferentes tiempos a partir del análisis probit del crecimiento radial..... | 128 |
| Anexo 9 Porcentaje de inhibición del quitosano (CQ ₅₀) sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> , a 28°C..... | 129 |

NOMENCLATURA

Abreviaciones

| | |
|---------------------|--|
| Qn. Ensilaje | Quitina obtenida de cabeza de camarón por método biológico |
| Qn. Fresco | Quitina obtenida de cabeza de camarón por método químico |
| Q. Ensilaje | Quitosano obtenido de Qn. Ensilaje |
| Q. Fresco | Quitosano obtenido de Qn. Fresco |
| Q. Comercial | Quitosano Comercial de baja viscosidad (Sigma-Aldrich) |
| C. Agua | Control agua |
| C. Ácido | Control ácido acético pH 5.6 y pH 6.5 |
| C.Sorbato | Control sorbato de potasio pH 6.5 |
| AF | Aflatoxina |
| AFB1 | Aflatoxina B1 |
| AFB2 | Aflatoxina B2 |
| AFG1 | Aflatoxina G1 |
| AFG2 | Aflatoxina G2 |
| PM | Peso molecular |
| DD | Grado de desacetilación |

RESUMEN

Se ha reportado que el quitosano obtenido de desechos de crustáceos posee propiedades antifúngicas, representando una alternativa al uso de fungicidas químicos para el control de hongos toxicogénicos y sus micotoxinas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del quitosano sobre el crecimiento y desarrollo morfológico de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 y producción de AFB1. Se obtuvieron quitinas a partir de cabezas de camarón por método biológico y químico y, posteriormente quitosanos (ensilaje) y quitosano (fresco), respectivamente por desacetilación de las quitinas. Se caracterizaron en cuanto a propiedades fisicoquímicas (proteínas y cenizas residuales, solubilidad, peso molecular y grado de desacetilación).

Se determinó la concentración media inhibitoria (CQ₅₀) por análisis Probit para cada quitosano, a partir del crecimiento radial de *A. parasiticus*. Con las CQ₅₀ obtenidas se prepararon soluciones de quitosanos (pH 5.6) y se evaluó el crecimiento radial y germinación de esporas de *A. parasiticus* en medio sólido Czapeck, así como el número de septos en hifas y divisiones mitóticas por análisis de epifluorescencia en medio líquido Czapeck, evaluando los parámetros morfométricos de esporas e hifas en medio sólido y líquido.

Se realizó la cuantificación de aflatoxinas totales y aflatoxina B1 (AFB1) en maíz y se evaluó el efecto mutagénico con las CQ₅₀ de los quitosanos a pH 6.5 con la prueba de Ames. Para todos los ensayos se utilizaron tres controles: agua, ácido acético pH 5.6 y 6.5 (ensayo de mutagénesis), sorbato de potasio 0.4% a pH 6.5 y un quitosano comercial de baja viscosidad (Sigma-Aldrich).

Las CQ₅₀ determinadas para quitosano ensilaje, fresco y comercial fueron (6.28, 6.71 y 6.24g/L), respectivamente. Se encontró que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial del hongo en presencia de los quitosanos fue mayor al 50% a las 122 h de exposición, siendo más efectivo el quitosano comercial (58.7%), seguido del quitosano fresco (56.9%). El sorbato de potasio fue más efectivo para controlar la germinación de esporas (40.20% a las 24 h), mientras que el quitosano comercial y fresco fueron efectivos antes de las 12 h (19.25 y 14.68%, respectivamente).

Las esporas e hifas de *A. parasiticus* sufrieron alteración por la presencia del quitosano aumentando su diámetro. El número de divisiones

mitóticas en las esporas aumentó también por la presencia de los quitosanos y el número de septos en las hifas disminuyó significativamente ($P < 0.05$). Los quitosanos no fueron efectivos para inhibir la producción de aflatoxinas totales ni de AFB1 en maíz y ninguno presentó efecto mutagénico ante *Salmonella typhimurium*. Lo anterior indica que el quitosano tiene un efecto sobre el crecimiento y desarrollo del hongo, alterando su morfología. Sin embargo, no presenta efecto en la producción de aflatoxinas.

INTRODUCCIÓN

Comer puede ser peligroso, pero no comer es mortal (Park, 2002). Mediante esta frase se puede comenzar cualquier tema relacionado con la inocuidad de los alimentos. El maíz (*Zea mays L*) es originario y ampliamente cultivado en México, siendo considerado el alimento de mayor importancia por ser la base de la alimentación de la sociedad Mexicana. El grano de maíz esta propenso a contaminarse en la etapa de precosecha y poscosecha, por una variedad de hongos toxicogénicos capaces de producir sustancias tóxicas naturales llamadas micotoxinas, ocasionando pérdidas económicas. Entre los principales hongos responsables de dicha contaminación están *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, entre otros.

Las micotoxinas presentes principalmente en alimentos son las aflatoxinas, ocratoxina A, parolina, fumonisinas, zearalenona y algunos tricotecenos, particularmente el deoxinivalenol (Bullerman, 2002; FAO, 2004). Algunas de estas micotoxinas son mutágenas y cancerígenas, otras ocasionan lesiones renales, inmunosupresión y anorexia, entre otros (Bullerman, 1999).

Las aflatoxinas (AF) son compuestos naturales, sintetizadas por la vía de las poliquetidas y desde su descubrimiento han sido objeto de numerosos estudios debido a los efectos tóxicos agudos y crónicos que presentan en animales y humanos; son producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, el cual solo produce AFB1 y AFB2 y, por *Aspergillus parasiticus* que produce AFB1, B2, G1, G2, encontrándose principalmente en granos de oleaginosas y cereales como el maíz. Se conocen alrededor de 18 tipos de aflatoxinas, donde la AFB1 es la de mayor interés debido a sus efectos tóxicos, ya que se ha demostrado que es mutagénica, teratogénica y cancerígena, clasificada por ello dentro del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002).

La presencia de las aflatoxinas en alimentos representa serios problemas mundiales tanto económicamente como en la salud pública. Por lo anterior, durante muchos años se ha tratado de controlar su producción, ya sea inhibiendo el hongo productor o por degradación de la misma toxina, donde los productos químicos (fungicidas) han sido una alternativa durante muchos años. Sin embargo, el uso excesivo de tratamientos químicos ha presentado inconvenientes como contaminación

al medio ambiente, aumento de las poblaciones de patógenos resistentes, presencia y acumulación de residuos químicos en los alimentos, así como problemas en la salud humana y animal.

Debido a lo anterior, la nueva tendencia de investigación sugiere la utilización de productos naturales como una alternativa para controlar hongos y la producción de aflatoxinas, tal es el caso del quitosano obtenido de desechos de crustáceos. Se ha reportado que el quitosano tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos de importancia económica como *Aspergillus niger* (Plascencia-Jatomea, 2004), *Fusarium verticillioides* (Suárez-Jiménez, 2007) entre otros, debido a su carácter catiónico (responsable de su actividad antimicrobiana), siendo probablemente una alternativa viable para inhibir el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y controlar la producción de aflatoxinas en maíz.

ANTECEDENTES

Importancia del Género *Aspergillus*

Los hongos, después de los insectos, son los principales causantes de la reducción de la calidad de cereales almacenados a nivel mundial, en donde el género *Aspergillus* representa gran importancia (Pitt y Hocking, 1999).

Los hongos del género *Aspergillus* son ubicuos, encontrándose ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Debido a la facilidad de suspensión de sus conidios y a su pequeño tamaño, estos pueden permanecer en el ambiente por largo tiempo, por lo que son un vector importante de contaminación de alimentos y de enfermedades al hombre (Kozakiewicz, 1989). Se encuentran presentes generalmente en el suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición (Razzagh-Abyaneh y col., 2006) y, el medio ideal para su desarrollo son ambientes oscuros, húmedos y cerrados; dichas características han llevado a clasificarlos como hongos de almacén; sin embargo también pueden contaminar productos desde el campo (Kozakiewicz, 1989).

Las características morfológicas generales de *Aspergillus* son: es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre las que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios.

El conidióforo característico de *Aspergillus* es una estructura unicelular con 3 partes diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula), y célula pie (sección final, a veces separada por un septo que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, llamadas fiálides. En muchas especies entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Figura 1). Estas características macro y micromorfológicas de los hongos, principalmente el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o grupos (Kozakiewicz, 1989; Abarca 2000).

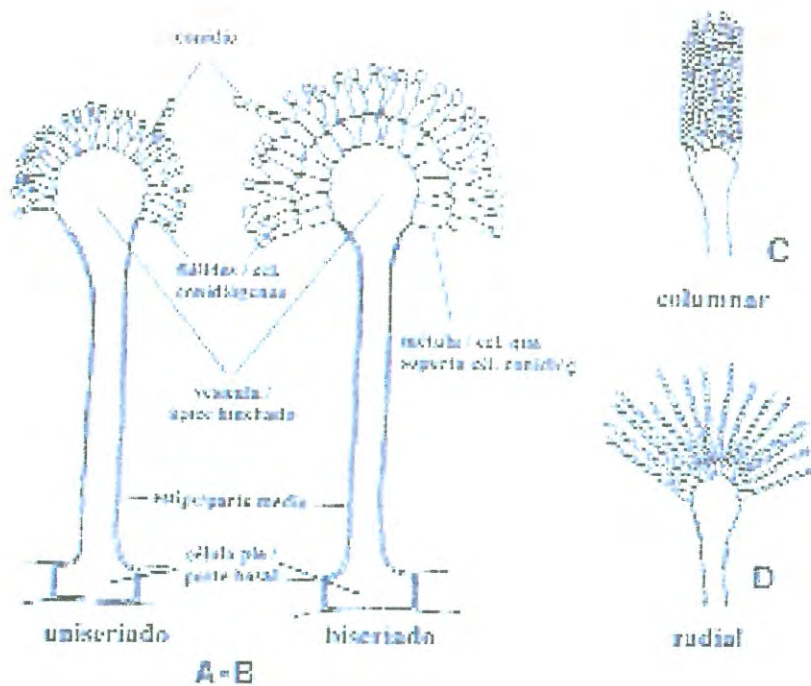


Figura 1. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. A-B: conidióforos; C-D: Cabezas conidiales
Fuente. Abarca, 2000.

Algunos hongos del género *Aspergillus* tienen gran importancia por su capacidad de producir enfermedades nosocomiales fatales a humanos; las especies implicadas son *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans*, siendo las dos primeras las más importantes (Arenas, 2003).

Las especies implicadas en la sección flavi del genero *Aspergillus* son de gran importancia, algunos hongos implicados en dicha sección son tan parecidos (*A. flavus* – *A. orizae* y *A. parasiticus* - *A. sojae*) que son necesarios estudios bioquímicos o moleculares para su identificación (Abarca, 2000), como el polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD) y el polimorfismo de longitud de fragmentos de ADN (AFLP) (Reddy y col., 2009).

Algunos hongos de esta sección son de interés industrial como *A. sojae* y *A. orizae* (Yu y col., 1995; Matsushima, 2001), aunque la gran mayoría suelen ser perjudiciales por ser contaminantes de muchos productos alimenticios principalmente en condiciones de almacenamiento (cereales, oleaginosas, frutas y verduras, etc.) provocando grandes pérdidas económicas, pero el mayor interés es la capacidad de producir metabolitos secundarios (aflatoxinas), los cuales presentan efectos nocivos tanto para animales como en humanos. Las especies más importantes son *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bennett y col., 2007).

Generalidades de *Aspergillus parasiticus*

Aspergillus parasiticus al igual que *A. flavus* son subespecies estrechamente relacionadas y reconocidas como principales contaminantes de productos orgánicos y no orgánicos. Estas especies son consideradas como "hongos de almacenamiento", ya que pueden proliferar y causar una infección durante la conservación de los alimentos, aunque actualmente están teniendo gran interés; ya que se aíslan con frecuencia en productos precosecha (Gorman y col., 1991). Debido a esto han sido objeto de estudio durante varios años, por su importancia tanto en contaminación de alimentos (maíz, trigo, cacahuates, algodón, nueces etc.) como productores de compuestos tóxicos de importancia en la salud pública tanto en animales como humano.

Condiciones de Crecimiento

Aspergillus parasiticus generalmente se aísla en productos de zonas tropicales (alta humedad relativa, temperatura entre 25 y 40°C) (Bailly y Guerre, 2009). Pitt y Miscamble (1995) reportan un valor mínimo de Aw de 0.83 para el crecimiento y una temperatura óptima de crecimiento aproximadamente de 30°C (Bennett y Klich, 2003).

Las condiciones y requerimientos para la producción de aflatoxinas se detallarán más adelante.

Características morfológicas

Esta especie es fácilmente distinguible, ya que presenta características morfológicas bien definidas. Para identificarlo basados en sus características se ha utilizado el medio Agar Czapek-Dox con 20 g de sacarosa (Kozakiewicz, 1989; Abarca, 2000).

Características macroscópicas. Las colonias presentan un diámetro de 40-50 mm, tonalidades amarillentas y verdosas que con el tiempo oscurecen, reverso amarillento, verdoso en la zona marginal (Gao y col., 2007; Kozakiewicz, 1989; Abarca, 2000).

Características microscópicas. Cabezas conidiales uniseriadas radiales de más de 400 mm de diámetro, conidióforo ligeramente rugoso e incoloro de más de 200 mm de longitud, vesículas subglobosas o globosas, conidios globosos, equinulados, de color verdoso amarillento midiendo aproximadamente de 3.6-5 μm de diámetro (Gao y col., 2007; Kozakiewicz, 1989; Abarca, 2000).

Micotoxinas Producidas por *Aspergillus*

Se ha demostrado que un elevado número de hongos producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas (Bennett y Klich, 2003) (Tabla 1).

Las micotoxinas se consideran en general como algo natural e inevitable, atrayendo la atención de todo el mundo científico, político y económico debido a las importantes pérdidas económicas asociadas a los impactos sobre la salud humana, productividad animal y al comercio internacional (Venancio y Paterson, 2007). Se encuentran comúnmente en los alimentos y piensos en todo el mundo, siendo reconocidas como sustancias potencialmente peligrosas para el hombre y los animales desde 1960 (Bullerman, 1999).

Son sustancias químicas tóxicas con estructuras químicas semejantes (Elmholt, 2008), de bajo peso molecular (metabolitos secundarios), producidas naturalmente por la estructura micelial de los hongos principalmente bajo condiciones específicas; y por las esporas. Los metabolitos secundarios son producidos al final de la fase de crecimiento exponencial, y al parecer no tienen repercusión en el desarrollo y crecimiento del hongo.

Cuando las micotoxinas son ingeridas, inhaladas o absorbidas a través de la piel, causan una respuesta tóxica (Venancio y Paterson, 2007) conocida como micotoxicosis. Hasta la actualidad se conocen aproximadamente 400 metabolitos potencialmente toxigénicos producidos por más de 100 hongos, estimándose por parte de la FAO que más de un 25% de los productos agrícolas están contaminados con micotoxinas produciendo importantes pérdidas económicas (Kabak y col., 2006; Bennett y col., 2007). En Estados Unidos se estiman pérdidas por presencia de micotoxinas de \$ 0.5-1.5 mil millones de dólares por año (CAST, 2003, Reyneri, 2006).

Las especies fúngicas micotoxigénicas encontradas comúnmente en productos alimenticios, corresponden a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria* (Overy y col., 2003).

Las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran generalmente como contaminantes en los alimentos durante el secado y el almacenamiento, sin embargo, a partir de los años setenta se encontró que el género de *Aspergillus* también puede contaminar alimentos en precosecha, provocando un mayor interés para ser estudiados (Gorman y col., 1991, Elmholt, 2008). *Fusarium* y *Alternaria* pueden producir micotoxinas antes o inmediatamente después de ser cosechados (Logrieco y col., 2003).

Tabla 1. Principales micotoxinas y especies fúngicas que las producen

| ESPECIE | MICOTOXINAS |
|---|----------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> | Aflatoxinas |
| <i>A. flavus</i> | Ácido ciclopiazónico |
| <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> | Ocratoxina A |
| <i>P. expansum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. paneum</i> . | Patulina |
| <i>P. roqueforti</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. paneum</i> | Roquefortina C |
| <i>P. roqueforti</i> | Toxina PR |
| <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> | Deoxivalenol |
| <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i> | Toxina T-2 |
| <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> | Diacetoxiscirpenol |
| <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> | Zearalenona |
| <i>F. moniliforme</i> , <i>F. nygamai</i> | Fumonisinias |
| <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. cerealis</i> | Nivalenol |
| <i>Alternaria alternata</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. japonica</i> | Ácido tenuazónico |
| <i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i> | Citrina |

Fuente: Magan y col., 2003; Logrieco y col., 2003

El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en un determinado sustrato, están influenciados por factores intrínsecos como actividad del agua, pH y potencial de óxido-reducción y por factores extrínsecos como humedad relativa, temperatura y disponibilidad de oxígeno (FAO, 1998). El efecto tóxico de la ingestión de micotoxinas en humanos y animales depende, entre otros, de la cantidad ingerida, el tiempo de exposición, el tipo de toxina, la edad, el estado fisiológico y de un posible sinergismo entre micotoxinas presentes simultáneamente en el alimento (Galvano y col., 2001). Las micotoxinas son muy resistentes a los tratamientos físicos y químicos, puede decirse que una vez que se forman durante el crecimiento de los hongos en el alimento, permanecen estables en el producto, durante el procesado y el almacenamiento (Jarvis y Miller, 2005).

Las micotoxinas generalmente consideradas como más significativas en alimentos son las aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, zearalenona y algunos tricotecenos, particularmente el deoxinivalenol (Bulleman, 2002; FAO, 2004). Algunas de estas micotoxinas son mutágenas y cancerígenas, otras ocasionan lesiones renales, inmunosupresión, anorexia, entre otros (Bulleman, 1999). Los productos alimenticios más comúnmente contaminados son: cacahuates y granos de cereales (Bulleman, 2002). El maíz, en particular, puede ser simultáneamente contaminado por varias toxinas, mientras que el trigo, cebada, avena y arroz se ven afectados con menos frecuencia (CAST, 2003).

Aflatoxinas

La historia de las aflatoxinas inicia a principios del año 1960 en Inglaterra, cuando más de 100,000 pavos murieron después de comer harina de maní importada de África y América del sur (Brasil), lo que se llamó “enfermedad X de los pavos”, debido al desconocimiento de su causa. Dicha enfermedad se caracterizó por necrosis hepática aguda con hiperplasia del conducto biliar, letargo, pérdida de apetito y muerte. A partir de este suceso, se inició una ardua investigación para conocer las causas de dichas muertes y años más tarde, Philip Calvert Spensley, descubrió que las causantes eran compuestos producidos por el hongo *Aspergillus flavus*, a las que llamó aflatoxinas (toxinas de *Aspergillus flavus*) (Santacroce y col., 2008).

Las aflatoxinas son compuestos poliacétidos producidos por varios hongos del género *Aspergillus* sección flavi, principalmente por cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, aunque también se han encontrado en presencia de *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. pseudotamari* y *A. tamari*, así como de *Emericella astellata* y *E. venezuelensis*, siendo estas últimas de menor importancia, ya que no son predominantes en la naturaleza (Razzaghi-Abyaneh y col., 2006, Bennett y col., 2007).

La contaminación por aflatoxinas se presenta principalmente en productos agrícolas básicos como el maíz, cacahuate, algodón, frutos secos, arroz, higo, tabaco y especias, entre otros (Bennett y col., 2007). La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), ha estimado que al menos el 25% de granos de cereales del mundo está infectados por aflatoxinas (Prieto-Simon y Campas, 2009).

La salud y las consecuencias económicas por la presencia de aflatoxinas han llevado a algunos países a establecer límites sobre los niveles permitidos en los alimentos y piensos. El límite máximo de aflatoxinas permitido en los granos varía según la legislación de cada país, cuyo rango oscila de 1.0 a 20 ng/g en 27 países del mundo. La FAO y la Organización Mundial de la Salud (WHO), establecieron límites de aflatoxinas totales de 15 ng/g, por otra parte la FDA recomienda límites de 10-20 ng/g para aflatoxinas totales y de 2-5 ng/g para AFB1.

En EUA, el límite permitido para aflatoxinas es 20 ng/g, siendo ésta misma reglamentación la usada en México. La comunidad europea impuso un nivel más estricto, de 4 ng/g (Yin y col., 2008); debido a estas restricciones, las pérdidas de los ingresos a partir de maíz debido a la contaminación por aflatoxinas, son aproximadamente de 270 millones de dólares al año en EUA (Bennett y col., 2007).

Se han aislado 18 compuestos, todos ellos designados como aflatoxinas. El término se refiere generalmente a cuatro compuestos del grupo de metabolitos bis-furano-cumarina producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, denominadas B1, B2, G1 y G2 (Figura 2). Estas, al ser expuestas a la luz ultravioleta de onda larga utilizando cromatografía de capa fina, emiten fluorescencia permitiendo detectar estos compuestos en concentraciones bajas (el B corresponde al color azul y G al verde) (Do y Dong-Kung, 2007). Su propiedad fluorescente

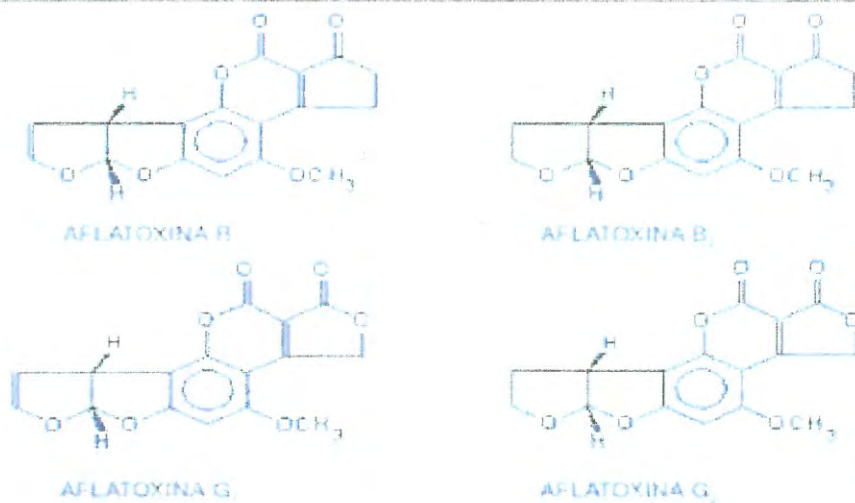


Figura 2. Estructuras químicas de aflatoxinas.

constituye la base de casi todos los métodos fisicoquímicos utilizados para su identificación y cuantificación (Bennett y col., 2007).

Se han desarrollado numerosos métodos de análisis para la detección de aflatoxinas, utilizando prácticamente todas las herramientas comunes de la química analítica como la cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gases, espectrometría de masas, inmunoensayos, electroforesis capilar y biosensores (Bennett y col., 2007).

Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentan fórmulas químicas muy parecidas: $C_{17}H_{12}O_6$ para aflatoxina B1, $C_{17}H_{14}O_6$ para B2, $C_{17}H_{12}O_7$ para G1 y $C_{17}H_{14}O_7$ para G2. Presentan pesos moleculares bajos y puntos de fusión por arriba de los $230^{\circ}C$; son compuestos no polares, de baja solubilidad en agua y alta solubilidad en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo y acetona; son susceptibles a la hidrólisis alcalina, al amoníaco y a las soluciones de hipoclorito de sodio ($pH > 10.5$), son termoresistentes y establecen un rango de pH entre 3 y 10 (Bogantes y col., 2004).

Las aflatoxinas del grupo B son bifurano cumarinas unidas a un anillo de ciclopentatona, y las del grupo G son bifuranos cumarinas unidos a un anillo lactona. Un doble enlace entre el C-8 y C-9 en forma de vinil éter se encuentra en el anillo furano terminal de la AFB1 y AFG1, pero no está presente en la AFB2 y AFG2. Esta diferencia estructural se asocia con grandes cambios en su actividad, dado que AFB1 y AFG1 son carcinogénicas y considerablemente más tóxicas que AFB2 y AFG2 (Bogantes y col., 2004).

Biosíntesis de Aflatoxinas

Los efectos potenciales en la salud y la magnitud de las pérdidas económicas, han sido el impulso para la investigación de la biosíntesis de las aflatoxinas. Algunos científicos creen que el control puede lograrse mejor mediante la comprensión de su base genética (biosíntesis) y sus elementos reguladores (Yu y col., 2002).

Las aflatoxinas se sintetizan por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación. Los metabolitos se forman primeramente por la

condensación del acetil-coenzima A (proveniente de la glucólisis, de la vía de las hexosa fosfato y de la β oxidación de ácidos grasos) y malonil coenzima A, dando lugar al acetil-S Coenzima A, la cual será la molécula iniciadora de la distintas aflatoxinas. Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB1 que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bisfurano (Guzmán de Peña, 2007).

En *Aspergillus parasiticus* y *A. flavus* se han encontrado un total de 25 genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas, dentro de una región de 70Kb de DNA (Do y Dong-Kung, 2007). La expresión de los genes estructurales para la conversión de aflatoxinas, está regulada por factores de transcripción llamados aflR y aflJ (Chang, 2003; Chang y col., 2007; Bennett y col., 2007), los cuales se regulan a su vez por las señales del medio ambiente y por factores nutricionales y físicos tales como temperatura, humedad, pH, fuente de carbono y de nitrógeno, los factores de estrés, lípidos y sales de metales traza (Yu y col., 2002).

Por lo menos 18 pasos enzimáticos son necesarios para la conversión de acetil Co A a sus productos finales, AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 (Do y Dong Kung, 2007; Yu y col., 2002; Yabe y Nakajima, 2004). En la Figura 3 se muestra un esquema general de la biosíntesis de aflatoxinas; (A) genes agrupados; (B) ruta de biosíntesis de aflatoxinas. Los genes y sus correspondientes enzimas que intervienen en cada paso de la bioconversión se muestran en el panel A. La regla en la izquierda indica el tamaño relativo de estos genes en Kb.

Toxicidad de las Aflatoxinas

La toxicidad de las principales aflatoxinas en orden decreciente es AFB1 > aflatoxicol > AFM1 > AFG1 > AFB2 > AFG2= AFM2 (Bennett y Klich, 2003; Santacroce y col., 2008). La AFB1 ha despertado un gran interés, debido a que

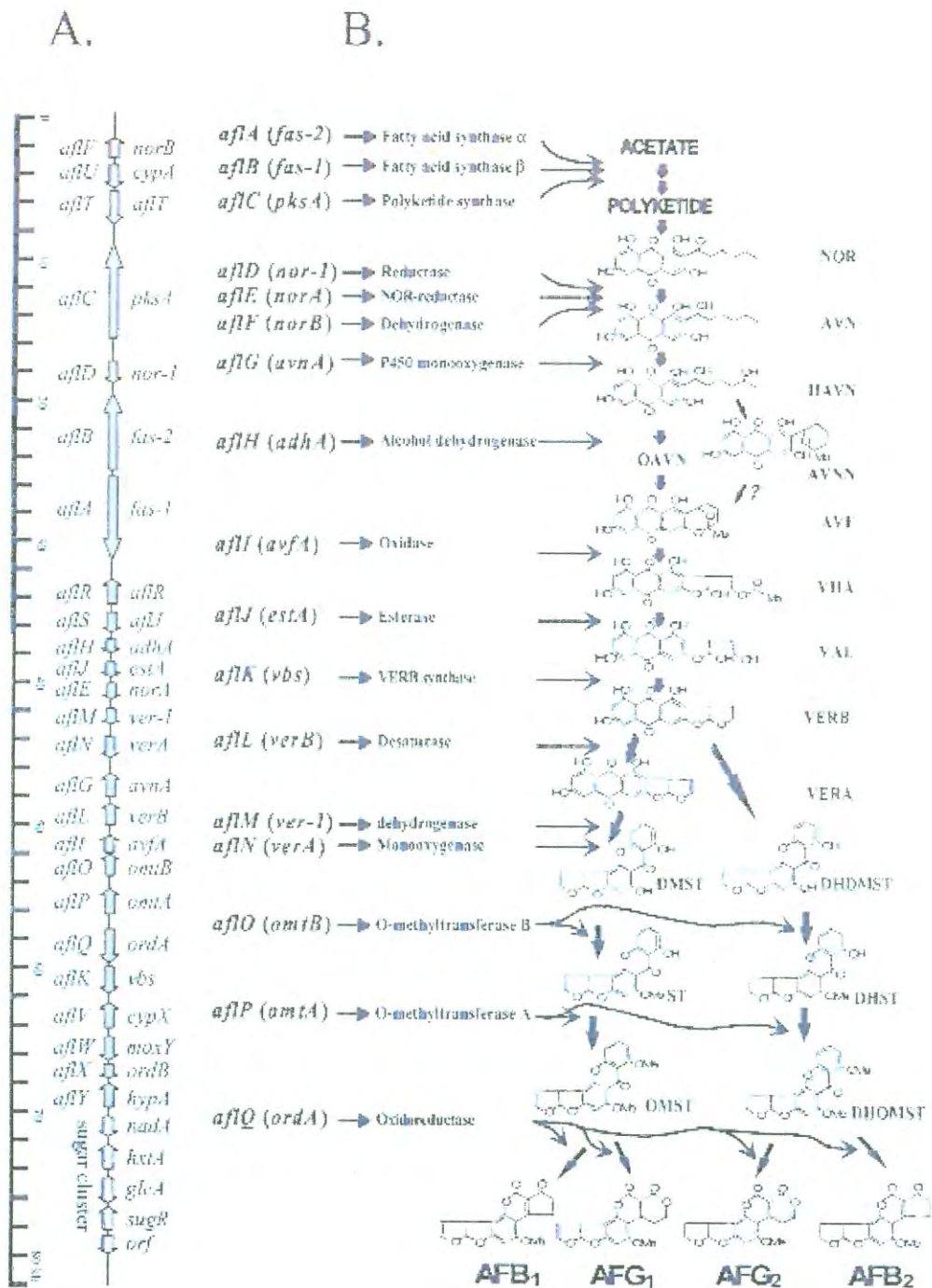


Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de aflatoxinas.

Fuente. Yu y col, 2004

NOR, ácido norsolorinico; AVN, averantin; Havn, 5'-hydroxyaverantin; OAVN, oxoaverantin; AVNN, averufanin; AVF, averufin; VHA, acetato de semiacetal versiconal; VAL, versiconal; VERB, versicolorin B; VERA, versicolorin A; DMST, demethylsterigmatocystin; DHDMST, dihydrodemethylsterigmatocystin; ST, esterigmatocistina; DHST, dihydrosterigmatocystin; OMST, O-methylsterigmatocystin; DHOMST, dihidro-O-methylsterigmatocystin; AFB₁, aflatoxina B₁; AFB₂, aflatoxina B₂; AFG₁, aflatoxina G₁; AFG₂, aflatoxina G₂.

existen suficientes datos experimentales que indican que tiene actividad tóxica, carcinogénica y mutagénica en animales experimentales y en humanos; además, diversos estudios epidemiológicos indican que la AFB1 está involucrada en la incidencia de neoplasias gastrointestinales y hepáticas en países de África, Filipinas y China. En adición el Instituto Internacional de Investigación en Cáncer ha clasificado a la AFB1 como un carcinógeno Clase 1 (IARC, 2002). En este grupo están considerados los agentes que son carcinogénicos para los seres humanos.

Existen datos del importante papel que la aflatoxina B1 tiene en la etiología de cáncer hepático, sobre todo en aquellos individuos que son portadores del antígeno del virus de la hepatitis B (el riesgo de cáncer del hígado por el consumo de aflatoxinas es 30 veces mayor en individuos que han estado expuestos a la hepatitis B) (Bennett y Klich, 2003).

La absorción de la aflatoxina B1 administrada por vía oral es rápida y casi completa. La absorción ocurre en el intestino delgado, principalmente en el yeyuno. En el plasma, la aflatoxina B1 se liga covalentemente a la albúmina, luego pasa por el hígado donde la mayor parte de la toxina va a ser metabolizado, tan solo 1-10% de la AFB1 permanece fijada en las macromoléculas.

AFB1 es una molécula lipofílica que pasa a través de los procesos de Fase I y Fase II de la biotransformación, siendo la excreción de aflatoxinas muy lento, donde la excreción biliar es la ruta más importante (50%) (Bailly y Guerre, 2009).

La enfermedad causada por el consumo de aflatoxinas se denomina aflatoxicosis, siendo el blanco principal el hígado. El efecto tóxico de la aflatoxina en animales superiores es de dos tipos: agudo y crónico. La exposición aguda esta relacionada con el consumo de altos niveles de aflatoxinas sobre períodos relativamente cortos. En la tabla 2 se muestra la DL₅₀ para diversos animales.

Algunos de los signos que se han visto en varias especies animales, especialmente en mamíferos y aves son hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia, asociada con esteatosis hepática y pérdida de peso. Se piensa que la toxicidad aguda se debe a un desbalance en el metabolismo de

Tabla 2. Toxicidad aguda de aflatoxina B1 expresada como una dosis oral simple, DL₅₀

| Especie | DL₅₀ mg/kg peso corporal |
|------------------|--|
| Conejo | 0.30 |
| Pato | 0.43 |
| Gato | 0.55 |
| Cerdo | 0.60 |
| Trucha Arco iris | 0.80 |
| Perro | 0.50 - 1.00 |
| Oveja | 1.00 - 2.00 |
| Cerdo de Guinea | 1.40 - 2.00 |
| Babuino | 2.00 |
| Pollo | 6.30 |
| Rata macho | 5.50 - 7.20 |
| Rata hembra | 17.90 |
| Macaco | 7.80 |
| Hamster | 10.20 |

Fuente: Santacroce y col., 2008

lípidos por modificación bioquímica en los residuos en la proteína B-100 de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) por actividad de la molécula AFB1 (Santos, 1999; Peraica y col., 1999).

En Kenia, India y Tailandia se han reportado casos de aflatoxicosis aguda (hepatotoxicidad) por consumir maíz contaminado por aflatoxinas; solamente en Kenia, el 20 de julio del 2004 se presentaron 317 casos, de ellos 125 terminaron en muerte, siendo el brote más extenso y grave documentado en todo el mundo (Lewis y col., 2005).

La exposición crónica es más común que la exposición aguda; sin embargo, en cierta forma es más difícil de identificar. Los animales y muy seguramente el hombre, están expuestos al consumo de cierta cantidad de toxina durante toda su vida o por largos períodos de tiempo. Existe evidencia científica de que la exposición crónica a la toxina induce a la producción de células cancerígenas, convirtiéndolo en un problema de salud pública.

En la exposición crónica, el efecto más drástico se ve en el ADN. Su efecto se puede subdividir en carcinogénico, mutagénico y teratogénico. Además de los efectos carcinogénicos, las aflatoxinas y sus metabolitos pueden afectar cualquier órgano. Sin embargo, el órgano diana principal es el hígado, produciendo hígado graso y pálido, necrosis moderada y extensiva, hemorragia y otras patologías como alargamiento de la vesícula, daño en el sistema inmune, nervioso o reproductivo (Santos, 1999).

Se estima que la dosis letal para adultos es de aproximadamente 10-20 mg de aflatoxinas. Sin embargo, al menos una mujer sobrevivió a la ingestión de más de 40 mg de aflatoxina purificada en un intento de suicidio fallido (Bennett y col., 2007).

Los efectos tóxicos y cancerígenos de la AFB1 están íntimamente vinculados a la tasa de activación y la tasa de desintoxicación en los niveles primario y secundario del metabolismo. La AFB1 no es mutagénica activa entre sí (Do y Dong-Kung, 2007, Peraica y col., 1999). Para que la acción tóxica de la aflatoxina ocurra es necesario que ésta tenga un cambio metabólico, el cual ocurre en las células hepáticas, en la función microsomal citocromo P-450 y participa el O² y las enzimas dependientes del NADPH localizadas en el retículo endoplásmico de las células.

Durante la activación, se adiciona un grupo funcional a la AFB1, produciendo los compuestos hidroxilados denominados aflatoxina M1 (AFM1), aflatoxina Q1 (AFQ1) y el metabolito demetilado aflatoxina P1 (AFP1), considerados de manera general como productos de la desintoxicación. Las AFQ1 y AFP1 son conjugados con ácido glucurónico y son eliminados por la orina y las heces. Una parte de la AFM1 es eliminada sin modificaciones por heces, orina, leche, y en aves por medio del huevo. Sin embargo, el producto final de la Fase I es la conversión de la AFB1 a su forma reactiva AFB1 exo-8,9-epóxido, que a su vez pueden unirse al ADN y proteínas.

En el ADN, el AFB1 exo-8,9-epóxido es un compuesto altamente inestable y se une covalentemente en la posición N7 de la guanina del ADN para formar aductos responsables del efecto carcinogénico y mutagénico de las aflatoxinas. El aducto identificado como el 8,9 dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxaflatoxina B1 (AFB1-ADN), es el que más se forma tanto *in vitro* como *in vivo*. Este aducto, AFB1-N7-guanidina no es removido del ADN, pero su anillo imidazol se abre y forma una molécula más estable química y biológicamente, la AFB1-formamidopirimidina (AFB1-FAPY), la cual causa errores en las transcripciones subsecuentes del ADN (Guzmán de Peña, 2007; Do y Dong-Kung, 2007; Peraica y col., 1999).

La Fase II del metabolismo de AFB1 incluye aquellas reacciones de conjugación enzimática que inactivan al 8,9 epóxido. Este epóxido puede hidrolizarse a 8,9 dihidrodiol, lo cual ocurre espontáneamente, y éste puede conjugarse con glutatión para formar AFB1-SG. Este compuesto se forma por la acción catalítica de una familia de isoenzimas glutatión-S-transferasas (GTS). El conjugado AFB-SG es el metabolito biliar más abundante y es excretados en orina (Guzmán de Peña, 2007).

Producción de Aflatoxinas

La producción de aflatoxinas depende principalmente de las condiciones de crecimiento, humedad, temperatura, sustrato, y otros factores que afectan el estado de los hongos (Bennett y col., 2007; Yu y col., 2002).

Especie de hongos

Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*; sin embargo, otras especies también están implicadas en su producción, aunque son menos frecuentes en la naturaleza como se mencionó anteriormente. Se ha reportado que *A. flavus* es más predominante mundialmente y más invasiva que *A. parasiticus* (Bennett y col., 2007; Razzaghi-Abyeneh y col., 2006; Windham y Williams, 2007). El porcentaje de *A. flavus* toxigénicas varía con la cepa, sustrato, y el origen geográfico. En diversos reportes se menciona que las cepas de *A. flavus* capaces de producir aflatoxinas varían del 28 hasta el 50% (Wang y col., 1993; Wei y Jong, 1986; Razzaghi-Abyeneh y col., 2006), en cambio las cepas de *A. parasiticus* productoras de aflatoxinas varían del 95 al 98% (Dorner y col., 1984). *A. flavus* solo puede producir aflatoxina B1 y B2, mientras que *A. parasiticus* produce aflatoxina B1, B2, G1 y G2, esta diferencia se debe a que *A. flavus* no presenta el gen CypA responsable de la producción de las aflatoxinas G1 y G2, dentro del grupo de genes responsables de la biosíntesis de aflatoxinas (Wilkinson, 2007).

Esporulación

Existe una fuerte relación entre la esporulación y la producción de aflatoxinas, dado que las condiciones ambientales necesarias para la producción de metabolitos secundarios y de la esporulación son similares. Se ha reportado que los compuestos que inhiben la esporulación de los hongos también inhiben la producción de micotoxinas y viceversa (Klich, 2007; Yu y col., 2002).

Factores ambientales

La producción de aflatoxinas depende principalmente de los factores ambientales como la temperatura, actividad de agua y pH. La mayor cantidad de aflatoxinas se producen en condiciones de sequía y altas temperaturas (Yu y col., 2002).

Actividad de agua. La disponibilidad de agua es esencial tanto para el crecimiento de hongos y producción de aflatoxinas. Los niveles máximos de aflatoxinas ocurren en actividades de agua de 0.95-0.96, a temperaturas de 21 °C y 30°C, y en Aw de 0.89 a 37°C (Koehler y col., 1985; Klich, 2007; Bennett y Klich, 2003).

Temperatura. La temperatura óptima para la producción de aflatoxinas está entre 24 y 30°C, con algunas variaciones debido a la tensión y al sustrato. La mayor producción de aflatoxinas por *A. flavus* es a 30°C y para *A. parasiticus* es de 28°C. El tiempo de incubación donde se dá la mayor producción de aflatoxinas a estas condiciones es de 7 a 11 días (Klich, 2007; Bennett y Klich, 2003).

Potencial de Hidrógeno. El pH tiene una fuerte influencia sobre la producción de aflatoxinas. Los mayores niveles de aflatoxinas se han encontrado a pH inicial de 5-7 (Ehrlich y col., 2005; Do y Dong Kug, 2007). El máximo nivel de aflatoxinas se presenta después del crecimiento de hongos cuando el pH final está entre 3.4 y 5 (Do y Kung-Choi, 2007). A valores de pH menores de 3.5, se ha reportado un aumento en la producción de AFB1 diez veces mayor que de AFG1, ya que a este pH se afectan las enzimas (citocromo P-450) involucradas en la formación de las aflatoxinas tipo G (Ehrlich y col., 2005).

Fuentes de nutrientes

Los factores nutricionales juegan un papel importante en la regulación de la producción de aflatoxinas. Los hongos sintetizan enzimas como amiloglicosidasa, amilasa, invertasa, celulosa y proteinasa para degradar las macromoléculas necesarias para su desarrollo, y por consiguiente, para la formación de aflatoxinas (Alzwei y col., 2004; Mellon y Cotty, 1998). Las fuentes de carbono que es fácilmente accesible a la vía metabólica primaria de la glucólisis es la más importante para el crecimiento y la producción de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Mellon y Cotty, 1998; Klich, 2007; Yu y col., 2002).

Fuentes de carbono. Los carbohidratos tienen una fuerte influencia sobre la producción de aflatoxinas. La glucosa y sacarosa son los que generan el mayor nivel de aflatoxinas. Otras fuentes de carbono como la fructosa, rafinosa, maltosa, galactosa, ribosa, xilosa, manosa y glicerol también aumentan la producción (Davis y col., 1967). Sin embargo, el uso de lactosa, piruvato y ácido láctico, como única fuente de carbono no afectan la producción de aflatoxinas (Abdollahi y Buchanan, 1980). Disolventes orgánicos como acetona, benceno, ciclohexano, dioxinas, acetato de etilo, etanol y hexano, incrementan la producción aflatoxinas por *A. parasiticus* (Mellon y Cotty, 1998; Klich, 2007; Yu y col., 2002).

Fuentes de nitrógeno. La fuente de nitrógeno tiene un efecto positivo en la producción de aflatoxinas. Se ha reportado que el glutamato de sodio, glicina, nitrato de amonio, urea, nitrato de cloro, nitrato de sodio, extracto de levadura, peptona, aspartato, glicina, prolina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, asparagina, metionina, alanina, valina, leucina y nitrato de potasio, incrementan la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus* (Mellon y Cotty, 1998; Klich, 2007).

Metales. La producción de aflatoxinas depende de la presencia de metales traza, principalmente zinc, magnesio, hierro y molibdeno. El cobre, boro y manganeso tienen poco efecto sobre la producción de toxinas y la adición de sales de metales traza como hierro, manganeso, cobre y cadmio incrementa notablemente la producción de aflatoxinas. Sin embargo, las sales de cromo trivalente, la plata y el mercurio inhiben la producción de aflatoxinas (Cuero y col, 2003).

Radiación

La mayor producción de aflatoxinas ocurre más en la oscuridad que en presencia de luz. Se ha demostrado que la radiación gamma inactiva las aflatoxinas en una solución de agua y en dimetilsulfóxido. La irradiación con reduce los niveles y la producción de aflatoxinas en maíz húmedo (Klich, 2007).

El estrés oxidativo

Hay una estrecha relación entre el estrés oxidativo y la producción de aflatoxina (Huang, 2009; Reverberi, 2008). Especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y lipoperóxidos que se forman a partir de la oxidación de ácidos grasos insaturados aumentan la producción de aflatoxinas (Reverberi, 2008).

Se ha reportado que la presencia de ácido oleico, linoleico, linolénico, hidroperóxido de cumeno, hidroperóxido de ácido linoleico, tetracloruro de carbono y ácido ascórbico estimulan la producción de aflatoxinas (Wilson y col., 2004; Patel y col., 1990; Klich, 2007).

En *A. parasiticus* se ha encontrado que el estrés oxidativo se produce durante todo el crecimiento del hongo, y se ha reportado que el estrés aumenta la actividad de los factores de transcripción responsables de la activación de la biosíntesis de aflatoxinas, y por consiguiente se produce una mayor cantidad de aflatoxinas (Reverberi, 2006; Klich, 2007).

Control de Aflatoxinas

Durante muchos años la principal alternativa para el control de hongos toxicogénicos han sido los productos químicos como los fungicidas. Sin embargo, estos presentan algunos inconvenientes como la contaminación generada hacia el medio ambiente, presencia de patógenos resistentes, presencia de residuos químicos en los productos alimenticios, y efectos nocivos para el humano y animales (Sandoskumar y col., 2007; Rosas-Burgos y col., 2009; Reverberi y col, 2005).

El potencial que tienen los fungicidas para causar efectos adversos en los humanos varía enormemente. Históricamente algunas de las epidemias más trágicas de envenenamiento por fungicidas, han ocurrido mediante el consumo de semillas de granos que fueron tratadas con mercurio orgánico o hexaclorobenceno. Los fungicidas más comunes son en base a bencenos sustituidos, tiocarbamatos, etilén-bis-ditiocarbamatos, tioftalimidias, compuestos

de cobre, compuestos organomercúricos, compuestos organoestánicos, compuestos de cadmio y fungicidas orgánicos.

Los fungicidas son usados extensamente en la industria y en la agricultura para diferentes propósitos que incluyen: protección de las semillas y granos durante su almacenamiento, transportación y germinación; para la protección de cultivos maduros y para la eliminación de hongos que atacan las superficies. El mecanismo de acción de los fungicidas en general, es el desorden del metabolismo celular, bloqueando la respiración celular ocasionándole la muerte del hongo.

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas los investigadores han encontrado numerosos productos naturales y compuestos sintéticos capaces de disminuir la producción de micotoxinas. Un inhibidor, se define como un compuesto que inhibe la síntesis de aflatoxinas durante el cultivo, en condiciones propicias para su biosíntesis. La mayoría de los inhibidores actúan de tres maneras en la biosíntesis de aflatoxinas: 1) modifican el entorno fisiológico o de otro tipo de señalización de las entradas percibidas por el hongo; 2) interfirieren en la transducción de señales y redes de regulación de la expresión génica; y 3) bloquean la actividad de una enzima biosintética (Holmes y col., 2008).

Compuestos naturales

La mayoría de los compuestos químicos que se reportan como inhibidores de aflatoxinas responden a su actividad antioxidante, y actúan disminuyendo los factores generados en el estrés oxidativo, responsables en parte de la producción de aflatoxinas. Más concretamente, actúan sobre los factores de transcripción aflR y aflJ, responsables de la biosíntesis de las aflatoxinas (Reverberi, 2006).

Entre ellos se encuentran compuestos naturales sintetizados partir de algunas plantas, especias y granos tal es el caso de los compuestos fenólicos (ácido sinápico, ácido cáfeico, ácido vanílico, etc.) y flavonoides (flavonas, flavonoides, cumarinas, cromonas, biflavonoides, fitoalexinas, taninos, etc.), terpenoides como carotenos, luteína y zeaxantina. Los extractos de neem y extractos de pimienta negra (piperina, piperlongumina), antocianos, gossipol y

xilano se han reportado como inhibidores de la producción de aflatoxinas (Holmes y col., 2008).

Algunos aceites esenciales de canela, oregano, y neem, entre otros, han demostrado inhibir el crecimiento de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas (Sandoskumar y col., 2007; Klich, 2007; Holmes y col., 2008). El ácido fítico extraído de algunas semillas ocasionan una menor producción de aflatoxinas debido a su capacidad de quelar cationes polivalentes (Holmes y col., 2008). También algunos compuestos volátiles obtenidos de las hojas del neem han reducido la producción de aflatoxinas en un 90% (Razzaghi-Abyaneh y col., 2006). Además, compuestos volátiles como el canfeno, limoneno y nonol también inhiben la producción de aflatoxinas (Wilson y col., 1981; Klich, 2007) al igual que el etileno (Huang y col., 2009). La cafeína inhibe la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* mediante la reducción de la absorción de carbohidratos por el hongo (Sandoskumar y col., 2007; Holmes y col., 2008).

Compuestos sintéticos

Algunos insecticidas como el carbaril, diclorvos, naled, pelitre y fosforo de hidrógeno inhiben la biosíntesis de aflatoxinas (Antonacci y col., 1999). Además, también se ha demostrado que fungicidas como el ketoconazol, miconazol, econazol e itraconazol, inhiben la producción de aflatoxinas. El uso de ácido propiónico, ácido benzoico, acetato de sodio y cloruro de sodio, reducen la producción de aflatoxinas. El selenito o telurito también reduce el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* (Klich, 2007) al igual que los antioxidantes sintéticos como el BHT, BHA (Reverberi y col., 2005).

Otras alternativas para el control y desintoxicación de aflatoxinas que han tenido éxito son los presentados a continuación.

Control biológico

El control biológico es una alternativa muy prometedora para el control de hongos toxicogénicos y su producción de aflatoxinas. Diferentes organismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos no toxicogénicos han sido probados

para el control de la contaminación de aflatoxinas (Yin y col., 2008). La competencia intraespecífica es la base para el control biológico de las aflatoxinas, ya que las cepas no aflatoxigénicas ocupan el mismo nicho ecológico que las cepas aflatoxigénicas nativas, y como consecuencia hay competencia entre ellos (Dorner y Horn, 2007; Wicklow y Horn, 2007). Sin embargo presentan algunas desventajas como efecto lento y además, el uso de herbicidas en el campo afecta el crecimiento de las cepas no aflatoxigénicas. Así mismo, existe preocupación de que las cepas no aflatoxigénicas muten con el tiempo y presenten la capacidad de producir aflatoxinas (Wicklow y Horn, 2007). Los microorganismos utilizados para el control biológico son:

Hongos. Una gran variedad de hongos son capaces de inhibir la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, tales como *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. sydowii*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma viride* y *Alternaria alternata*, entre otros. Sin embargo los que han tenido más éxito son las especies de *A. flavus* no toxicogénicas. Actualmente, se ha desarrollado un control biológico aprobado por la Agencia de Protección del Ambiente (EPA) llamado AF36 (cepa de *A. flavus* no toxicogénica) (Yin y col., 2008; Klich, 2007).

Bacterias. Varias especies de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Lactobacilos spp*, *Pseudomonas spp*, *Ralstonia spp* y *Streptomyces spp* han demostrado capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y la producción de aflatoxinas. El efecto de las bacterias sobre la producción de aflatoxinas depende de las condiciones de crecimiento y de la cepa de hongo.

El crecimiento de *A. parasiticus* NRRL 2999 se reduce en gran medida cuando crece en cultivos líquidos con tres cepas de *Lactobacillus* (Elmholt, 2008; Yin y col., 2008; Klich, 2007; Nesci y col., 2005).

Otro tipo de control de aflatoxinas principalmente para alimentos de consumo animal son los absorbentes, los cuales se ligan a la aflatoxina impidiendo que ésta sea absorbida en el organismo, excretándose en heces. Los tipos de absorbentes conocidos son zeolitas, bentonitas, arcillas, aluminosilicatos de sodio y calcio y tierra diatomea (Bennett y col., 2007).

Detoxificación

Muchos compuestos químicos han presentado habilidad para detoxificar las aflatoxinas especialmente la AFB1. Los métodos más comerciales se presentan a continuación:

Amonificación. El amoniaco aplicado ya sea como gas o líquido, reacciona con la molécula de aflatoxina para destruir su toxicidad. La amonificación del maíz es utilizada para consumo animal debido a que ocasiona graves daños a la salud humana y al mismo grano (decoloración), además de ser un proceso muy costoso (Vincelli, 2008).

Álcalis y nixtamalización. El tratamiento alcalino causa hidrólisis del anillo lactona de AFB1. La eficiencia reactiva de diferentes álcalis para degradar la AFB1 se encuentran en el siguiente orden: hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, carbonato de potasio, carbonato de sodio, bicarbonato de potasio, hidróxido de amonio, bicarbonato de sodio y carbonato de amonio.

Dentro de los tratamientos con álcali está el proceso de nixtamalización del maíz para elaboración de tortillas, el cual es sumamente utilizado en México; consiste en el cocimiento del grano durante 45-60 min en una solución alcalina 1% de hidróxido de calcio, seguido del remojo durante 14 h. Se ha reportado que la nixtamalización elimina gran cantidad de aflatoxinas presentes en el grano, alrededor del 85% (Anguiano-Ruvalcaba y col., 2005; García y Heredia, 2006). Se han encontrado otros compuestos químicos capaces de detoxificar la aflatoxinas como son el hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno y el bisulfito (Dendi y Pérez, 2006).

Aflatoxinas en maíz

El maíz (*Zea mays L.*) es una gramínea originaria de México, la cual después del descubrimiento de América se distribuyó a Europa, África y Asia. A nivel mundial el maíz representa el 5.4% del total de las fuentes alimenticias de la humanidad, y como cultivo ocupa el tercer lugar después del trigo y el arroz

(González, 1995). Este cereal es utilizado como alimento en los países de Centro, América del Sur, México, y África, siendo parte fundamental de la dieta.

La producción mundial de maíz en el 2006 alcanzó un volumen de 709 millones de toneladas, donde EUA aportó el 40% de la producción seguido de China (19%), Brasil (5%) y México (3%). La producción de maíz en México en el 2006 se estimó en 21.9 millones de toneladas, incrementándose a 25 millones en el 2008 (SAGARPA, 2009). El estado de Sonora ocupa el lugar número 14 a nivel nacional, siendo los principales productores la región del Valle del Yaqui y el Valle del Mayo, aportando 186,640 toneladas.

El grano de maíz se caracteriza por tener un fruto cubierto, el cual le proporciona protección contra agentes bióticos externos (Serna, 1996). En la Tabla 3 muestra la composición química del maíz y la Tabla 4 el contenido de minerales. Se puede apreciar que el maíz presenta todos los requerimientos necesarios para la contaminación por hongos toxicogénicos y la producción de micotoxinas, siendo susceptible además al ataque de bacterias, roedores, aves e insectos. Estos últimos actúan como agentes de diseminación de la micobiota, contribuyendo al crecimiento y multiplicación de los hongos, ya que el metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad de los granos y la ruptura del pericarpio, permitiendo la entrada de los patógenos.

La contaminación del maíz por aflatoxinas es un problema internacionalmente importante. Las condiciones del medio ambiente (sequía) y las prácticas agronómicas han sido reportadas como favorables para la producción de aflatoxinas (Bucio-Villalobos y col., 2001). Este cereal es susceptible a contaminarse tanto en el campo como en el almacén, siendo los factores determinantes la temperatura, contenido de humedad, y la presencia de insectos.

El maíz es contaminado en precosecha por hongos principalmente del género *Fusarium* y durante el almacenamiento por especies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y en menor medida por *A. parasiticus*, sin embargo también se ha encontrado su presencia en precosecha ocasionando que su estudio sea de mayor interés debido a las implicaciones tóxicas que representan (Dendy y Dobraszczyk, 2001).

Tabla 3. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (*Zea mayz* L).

| Componente químico | Pericarpio (%) | Endospermo (%) | Germen (%) |
|--------------------|----------------|----------------|------------|
| Proteínas | 3.7 | 8.0 | 18.4 |
| Extracto etéreo | 1.0 | 0.8 | 33.2 |
| Fibra cruda | 86.7 | 2.7 | 8.8 |
| Cenizas | 0.8 | 0.3 | 10.5 |
| Almidón | 7.3 | 87.6 | 8.3 |
| Azúcar | 0.34 | 0.62 | 10.8 |

Fuente: Watson, 1987.

Tabla 4. Contenido de minerales del maíz (*Zea mays L.*)

| Mineral | Concentración (mg/100 g) |
|----------------|---------------------------------|
| P | 299.6 ± 57.80 |
| K | 324.8 ± 33.90 |
| Ca | 48.3 ± 12.30 |
| Mg | 107.9 ± 9.40 |
| Na | 59.2 ± 4.10 |
| Fe | 4.8 ± 1.90 |
| Cu | 1.3 ± 0.20 |
| Mn | 1.0 ± 0.20 |
| Zn | 4.6 ± 1.20 |

Fuente: Bressani y col., 1989.

La contaminación del maíz con aflatoxinas es importante en México, debido a que este grano se utiliza principalmente para consumo humano (Guzmán de Peña, 2006). Su uso y consumo en México es diferente a la de Estados Unidos. En México, aproximadamente el 60% de la producción total de maíz es destinado al consumo humano, en contraste con sólo el 4% en los Estados Unidos, además, en México se cuenta con una de las más altas tasas de consumo por humanos en el mundo (120 Kg per cápita).

La norma oficial mexicana, NOM-188-SSA1-2002, establece que el máximo nivel de aflatoxinas permitidos en los cereales destinados a consumo humano y animal, así como los requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. El máximo nivel permitido de aflatoxinas totales es de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y cuando este límite es superado, se utiliza para la alimentación animal (límite máximo para aves de corral 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, cerdos 100-200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, para el ganado vacuno 100-300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), o bien, se vende a un precio muy bajo a industrias productoras de etanol. La norma NOM-187-SSA1/SCFI-2002 establece que para los productos de maíz como masa para tortilla, el máximo nivel de aflatoxinas permitido es de 12 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para la masa y nixtamalizado, y 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para otros productos a base de maíz (García y Heredia, 2006).

En México la mayor problemática en maíz que se tiene es la contaminación poscosecha por aflatoxinas, debido a las deficientes condiciones de almacenamiento. Sin embargo, actualmente la contaminación con aflatoxinas precosecha llama la atención, ya que en los últimos años las condiciones en las que se siembra el maíz son aptas para la producción de aflatoxinas por los hongos involucrados, principalmente la sequía y las altas temperaturas. Probablemente uno de los episodios más importantes de contaminación por aflatoxinas en maíz fue en el estado de Tamaulipas en 1989, siendo considerado por muchos años como una de las principales áreas productoras de maíz; donde alcanzó niveles de aflatoxinas superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, siendo destinado al consumo animal (García y Heredia, 2006, Guzmán de Peña, 2006).

Actualmente se han desarrollado híbridos de maíz que se utilizan en distintas partes del mundo (E.U.A), resistentes a la contaminación por hongos

toxicogénicos y la contaminación por aflatoxinas; sin embargo, en México esta alternativa es poco viable, ya que el maíz transgénico no es permitido por legislaciones del gobierno (García y Heredia, 2006).

En México, el mayor consumo de maíz es a través de la tortilla, la cual se elabora por nixtamalización. Diversos autores, como ya se mencionó, reportan que la nixtamalización reduce la cantidad de aflatoxinas en maíz y esta práctica posiblemente sea la causa de que en México no se presenten, o al menos no se documenten, tantos casos relacionados a las implicaciones generadas por las aflatoxinas a los humanos. Sin embargo en algunas comunidades principalmente del sur, como Chiapas, Tabasco y Yucatán, el consumo de alimentos a base de maíz no nixtamalizado (pozole, bebidas a base de maíz, etc.) es muy frecuente.

La contaminación del maíz por insectos es común en México, identificándose tres principales especies: *Carpophilus freemani*, *Sitophilus zeamais*, y *Carthartus quadricollis*, los cuales son vectores para la contaminación por hongos y la posible contaminación de aflatoxinas (García y Heredia, 2006).

En Sonora hay pocos estudios realizados sobre la presencia de aflatoxinas en maíz, pero esto no significa que esta exento a la contaminación, ya que los pocos estudios realizados reportan presencia de aflatoxinas. Ayala y Rodríguez (2008), mencionan que las condiciones climatológicas de las regiones productoras de maíz del Estado (Valle del Yaqui y Mayo) propiciaron el desarrollo de hongos productores de micotoxinas como *Aspergillus flavus*, incrementando el riesgo a la salud tanto en humanos como en animales. Estos autores reportaron valores de aflatoxinas hasta de 7.9 µg/Kg y presencia en un 74.2% de las muestras analizadas.

En Sonora se han realizado trabajos para inhibir la producción de aflatoxinas, como son el uso de compuestos extraídos de plantas y algunos aceites esenciales a partir de granos, obteniendo resultados alentadores. Otra alternativa viable a las condiciones del Estado de Sonora es la utilización de quitosano extraído de desechos de camarón, debido a su actividad fungistática sobre diversos hongos.

Quitosano

El quitosano, un derivado desacetilado de la quitina, es un polímero natural policatiónico, biodegradable, no tóxico y biocompatible con humanos (Muzzarelli y Muzzarelli, 2005; Agulló y col., 2004). Se encuentra naturalmente en las paredes celulares de algunos hongos, en la cutícula de insectos y en las conchas y caparazones de crustáceos. La fuente comercial para su obtención a nivel industrial es la desacetilación química de la quitina de crustáceos (Lárez, 2003).

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano un material versátil para diversas aplicaciones (Lárez, 2003; Lárez, 2006) siendo las principales: química analítica, biomedicina, medicina, agricultura y ganadería, cosméticos, dietéticos, industria papelera, tratamiento de agua, industria de los alimentos, biotecnología, tecnologías de membrana, industria textil, alimentos nutraceuticos, procesos industriales y envoltura y recubrimientos protectores de alimentos (Peral y Gartzia, 2002; Plascencia, 2004).

Métodos de obtención de quitina

El quitosano se obtiene a partir de la desacetilación química o enzimática de la quitina de los crustáceos, y ésta se encuentra covalentemente asociada a diferentes compuestos como minerales, lípidos y proteínas, siendo necesario la aplicación de métodos drásticos para poder remover el material quitinoso. Existen diferentes métodos para la obtención de quitina y quitosano a gran escala; el más utilizado en la industria es el método químico, que involucra el uso de ácidos y álcalis a altas concentraciones y temperaturas; sin embargo, actualmente el método biológico a tenido mucha importancia (Goycoolea y col., 2004).

Método químico. Los métodos químicos emplean grandes cantidades de agua y energía generando desechos corrosivos; además, dificultan la recuperación de otros productos de alto valor agregado como proteínas y pigmentos (Beaney y col., 2005).

La desproteínización química de crustáceos se lleva a cabo usando generalmente soluciones de NaOH a temperatura entre los 65 y 100°C durante 1 a 24 h (Goycoolea y col., 2004)

La desmineralización consiste básicamente en la remoción de carbonato de calcio y del fosfato presente en menor cantidad. Esto se realiza mediante un tratamiento ácido con soluciones diluidas de HCl a temperatura ambiente. El tiempo de tratamiento, la concentración de las soluciones y la cantidad a usar de las mismas, varía dependiendo del tipo de materia prima.

Método biológico. Los métodos biológicos para la obtención de quitina son una alternativa a los métodos químicos; sin embargo, la obtención del polímero por estos tratamientos es más tardada. Dentro de los métodos biológicos se encuentra el ensilado, el cual consiste en el tratamiento de la biomasa por medio de la adición de ácidos orgánicos como el ácido láctico, o inorgánicos como el ácido sulfúrico, o por medio de la fermentación con bacterias ácido lácticas que producen el ácido *in situ* a partir de una fuente de azúcares (Goycoolea y col., 2004). Este proceso representa ventajas en el tratamiento de cabezas de camarón, ya que permite la remoción de proteínas y pigmentos con valor agregado. Este proceso puede ser combinado con tratamientos químicos para remover más eficazmente los residuos de proteínas y minerales presentes.

Métodos de obtención de quitosano

La obtención de quitosano se da por desacetilación de la quitina, donde se puede implicar el método químico o enzimático.

Método químico. Consiste en emplear soluciones alcalinas fuertes (NaOH o KOH) y se presentan dos formas de desacetilación: homogénea y heterogénea. La desacetilación homogénea consiste en que la quitina es suspendida en álcali y dicha suspensión es refrigerada con hielo para su disolución, posteriormente se somete a desacetilación con álcalis fuertes a temperatura cercana a la del ambiente durante largo período de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y

que el ataque a los grupos amidas sea más uniforme. La desacetilación heterogénea se efectúa con álcalis fuertes (NaOH 50%) a alta temperatura (100°C) por un periodo corto de tiempo (generalmente 2 horas). La reacción se presenta en las regiones amorfas del polímero ocasionando que la distribución de los grupos amino no sea uniforme (Goycoolea y col., 2004).

Método enzimático. Se realiza mediante el uso de enzimas como la quitina desacetilasa, la cual cataliza la conversión de quitina a quitosano por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. La limitación de este método es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de quitina insoluble, y por lo tanto es necesario un pre tratamiento. La principal ventaja de este método respecto al químico, es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, hecho muy apreciado para aplicaciones biomédicas (Goycoolea y col., 2004).

Actividad fungistática

Se ha demostrado que el quitosano posee propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos. Algunos autores han reportado que el grupo amino en la posición del carbono 2 del residuo de glucosamina, es el que le da la característica antimicrobiana al quitosano (Plascencia, 2004). Este efecto inhibitorio se ha detectado en una amplia variedad de bacterias (No y col., 1995), hongos (Serbi y col., 2003), levaduras (Ralston y col., 1964) y virus (Kochkina y col., 1995).

La actividad antifúngica del quitosano se ha evaluado en diferentes especies de hongos. Los resultados derivados de estudios *in vitro* fundamentalmente han estado relacionados con el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas. Algunos autores relacionan el efecto al hongo con la concentración de quitosano, otros con el peso molecular y el nivel de desacetilación, e inclusive con el tiempo de exposición del polímero en la célula fúngica (Hernández-Lazaurdo y col., 2008).

El quitosano ha demostrado tener un efecto fungistático en *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* en concentraciones de 0.75-6.0 mg/mL (El Ghaouth y col, 1992); asimismo sobre *Sclerotinia sclerotiorum* en concentración de 1% al 4% (Cheah y col,

1997), *Rhizoctenia solana* a .5 a 6 mg/mL (Wade y Lamondia, 1994) y sobre *Fusarium solana* a 12 y 18 mg/mL (Hadwiger y Beckman, 1980). Otros estudios reportan una completa inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *R. stolonifer*, *P. digitatum* y *C. gloeosporioides* a concentración de 3% (Bautista-Baños y col, 2004; 2006).

Mecanismo de acción

El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana del quitosano no se conoce, aunque se han propuesto diferentes mecanismos:

- a) Interacción entre cargas (+) del quitosano y las cargas (-) de la membrana celular de los microorganismos. Esto puede ocasionar una degradación de proteínas y otros constituyentes intercelulares; o bien, alteraciones en la permeabilidad de la célula microbiana.
- b) Inhibición del crecimiento de microorganismos a través de la capacidad del quitosano para quelar metales traza que son importantes para la célula (Chan y col., 2001).
- c) Activación de mecanismos de defensa en células, mediante la inducción de fitoalexinas, compuestos fenólicos, ácido salicílico y el aumento en la producción de enzimas de defensa como quinasas, quitosanasas, glucanasas o fenilalanina amonía-liasas (Vander y col., 1998).
- d) Penetración del quitosano al interior de la célula microbiana interaccionando con el ADN del microorganismo, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero, proteínas y enzimas (Rabea y col., 2003).

JUSTIFICACIÓN

Considerando el impacto económico y social generado por la presencia de hongos toxicogénicos como *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas en granos de alimentación básica como lo es el maíz, principalmente en países como México, y a la actual demanda del uso de conservadores naturales por los problemas ocasionados por el uso de fungicidas sintéticos como la contaminación ambiental, de alimentos, la resistencia de patógenos y efectos sobre la salud humana y animal, se ha incrementado el estudio y uso de productos naturales con actividad biológica como lo es el quitosano obtenido a partir de desechos de crustáceos contra diversos patógenos. Aunado a lo anterior, la alta producción camaronícola en México genera gran cantidad de desechos, ocasionando problemas de contaminación ambiental. Solamente en el 2008 la producción de camarón fue de 187 mil toneladas (CONAPESCA, 2009), siendo el estado de Sonora el principal productor en el país, con una producción de 81,311.5 toneladas (COSAES, 2009). Es por ello que la obtención y estudio de quitosano de desecho de camarón con alto valor agregado, es una alternativa viable para inhibir el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y controlar la producción de aflatoxinas en productos agrícolas como el maíz.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto del quitosano sobre el crecimiento y morfología de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 y la producción de AFB1.

Particulares

1. Obtener y caracterizar químicamente al quitosano obtenido a partir de desechos de camarón.
2. Determinar el efecto de diferente concentración de quitosano sobre el crecimiento y desarrollo de *A. parasiticus in vitro*.
3. Determinar la concentración media inhibitoria (QC₅₀) del quitosano sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus*.
4. Evaluar el efecto de la concentración media inhibitoria del quitosano (QC₅₀) sobre la germinación de esporas, división mitótica, septos y parámetros morfométricos de *A. parasiticus*.
- 5.- Evaluar el efecto de la concentración media inhibitoria de quitosano (QC₅₀) sobre la producción de AFB1 por *A. parasiticus*.
- 6.- Determinar sí la concentración media inhibitoria (QC₅₀) obtenida para quitosano en el control de *A. parasiticus* tiene efecto mutagénico usando como modelo *Salmonella typhimurium*.

HIPÓTESIS

La aplicación *in vitro* de quitosano obtenido a partir de desecho de camarón, afecta la morfología de *A. parasiticus* ATCC 16992, ocasionando un retardo en el crecimiento del hongo y una disminución en la producción de aflatoxina B1 (AFB1).

MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 4 presenta un diagrama general de la metodología utilizada durante el trabajo.

Obtención de Quitosano

Obtención de la materia prima

Los desechos de camarón fresco *Litopenaeus vanameii* fueron obtenidos de la planta congeladora Costamar ubicada en el kilómetro 54 de la carretera Hermosillo - Bahía de Kino, Sonora. El desecho de camarón consistió exclusivamente de cabezas (cefalotórax), las cuales se transportaron en hielo y almacenaron en congelación a -20°C en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), hasta su utilización para obtener quitosano mediante dos vías (quitosano ensilado y quitosano fresco) como se describe a continuación.

Análisis proximal de la materia prima

Contenido de ceniza. El contenido de ceniza de la cabeza de camarón se determinó gravimétricamente mediante el método 938.08 de la AOAC (1999).

$$\text{Ceniza (\%)} = \frac{\text{Peso muestra} - \text{Peso ceniza}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

Contenido de Proteína. La cabeza de camarón fue digerida. El contenido de nitrógeno de la cabeza de camarón se determinó por el método microKjeldahl, usando el factor de 6.25 para el cálculo (Pearson, 1976).

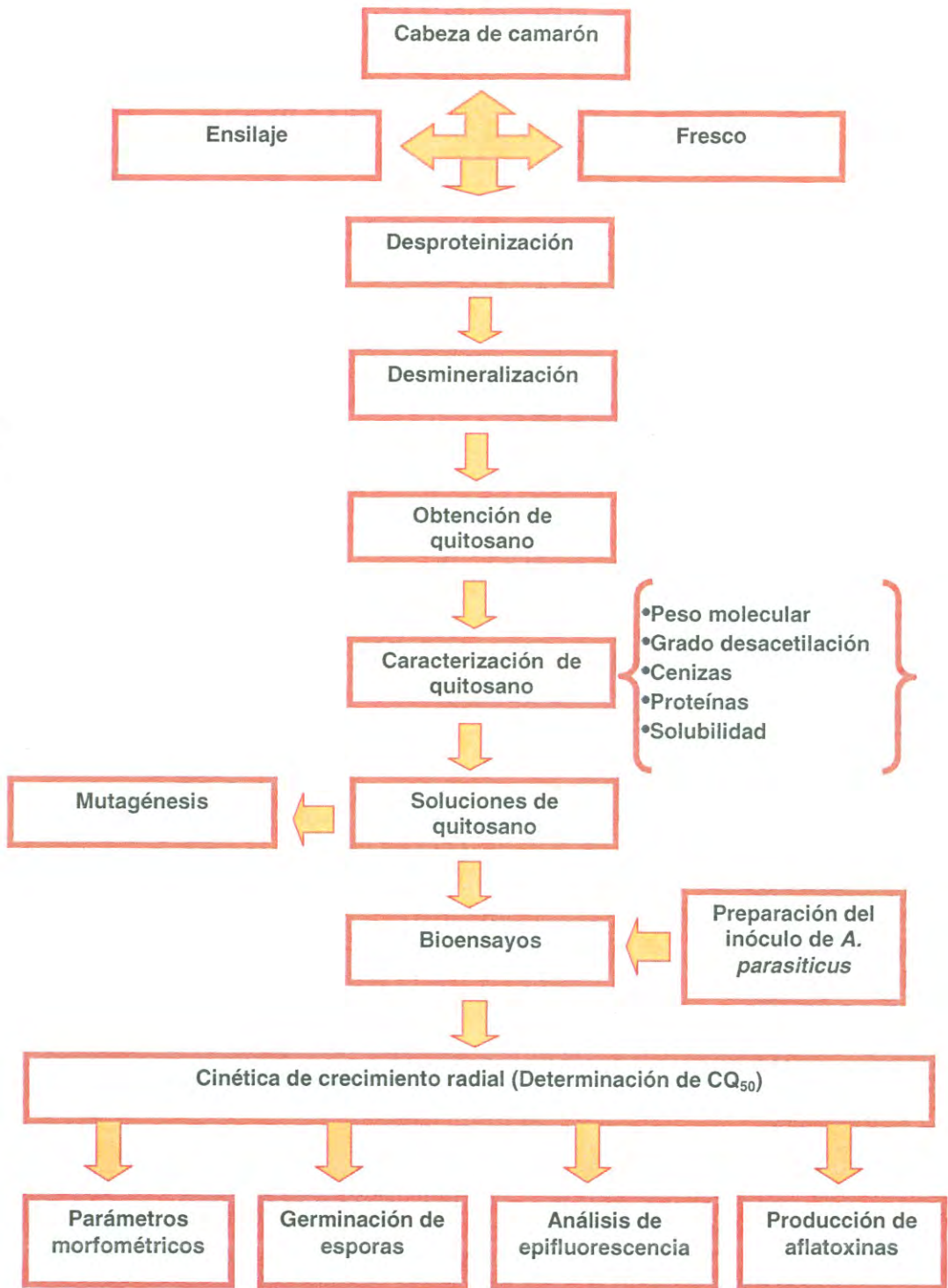


Figura 4. Diagrama de flujo de metodología utilizada.

Obtención de quitosano ensilado

Preparación del inóculo de *Lactobacillus*. Se disolvieron 16.5 g de Lactobacill MRS Broth DIFCO en 300 mL de agua destilada y se esterilizaron a 121°C por 15 min; después se inoculó con *Lactobacillus* sp aislado de cabeza de camarón (Jaime-Quijada, 2008). Se incubó a 37°C por 36 h.

Obtención de quitina. El desecho de camarón se trituró en una licuadora por un minuto. El ensilado se preparó mezclando el desecho triturado y se adicionó el 10% en base al peso del desecho de ácido láctico al 10%, sacarosa e inóculo de *Lactobacillus* y fue incubado a 37°C por 2 días (Jaime-Quijada, 2008). Una vez terminado este periodo se lavó el desecho, se secó al sol por 4 h. Posteriormente se desproteinizó con NaOH al 2% y se desmineralizó con HCl 1.2 M, ambos a una proporción sólido-líquido de 1:18 por 2 h.

Obtención de Quitosano. La conversión de quitina a quitosano se hizo por desacetilación alcalina con NaOH al 60%, en un baño de agua a 37°C y agitación constante (85 rpm) por 7 días, a una proporción sólido-líquido de 1:12 (Cota-Arriola, 2007).

Obtención de quitosano fresco

Obtención de quitina. Las cabezas de camarón se trituraron en una licuadora por un minuto y se prensaron manualmente. Posteriormente desproteinizaron con NaOH al 2% y desmineralizaron con HCl 1.2 M, ambos a una proporción sólido-líquido de 1:18 por 2 h. Se lavó el desecho y se secó al sol por 4 h obteniendo así la quitina de cabezas de camarón fresco.

Obtención de quitosano. La conversión de quitina a quitosano se obtuvo por desacetilación alcalina con NaOH al 60% en baño de agua a 37°C y agitación constante (85 rpm) por 7 días, a una proporción sólido - líquido de 1:12 (Cota-Arriola, 2007).

Caracterización Fisicoquímica del Quitosano

La caracterización química del quitosano es la parte esencial para determinar la pureza y funcionalidad del polímero.

Contenido de ceniza

El contenido de ceniza de los quitosanos obtenidos se determinó gravimétricamente mediante el método 938.08 de la AOAC (1999), usando como control quitosano comercial de camarón de baja viscosidad (Sigma-Aldrich).

$$\text{Ceniza (\%)} = \frac{\text{Peso muestra} - \text{Peso ceniza}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

Contenido de Proteína

La cuantificación de proteína se realizó tomando una muestra de 0.2 g de cada uno de los quitosanos. A cada uno de ellos se les agregó NaOH al 2% en una proporción sólido-líquido de 1:20 y se calentaron en baño María a 90°C por 2 h con la finalidad de extraer el nitrógeno de la proteína residual presente en el quitosano (Argüelles y col., 2004). Después se filtró la disolución en papel Wathman # 4, recuperando la fracción líquida. El contenido de nitrógeno residual se determinó en dicha fracción utilizando el método de microKjeldahl (Pearson, 1976).

Peso molecular

Se determinó utilizando los datos de viscosidad intrínseca obtenida a partir de la viscosidad relativa. Para cada quitosano se prepararon 4 soluciones con ácido acético 0.3 M y acetato de sodio 0.2 M, con concentraciones de 0.025, 0.050, 0.075 y 0.1% (p/v). A cada una de ellas incluyendo el solvente, se les midió el tiempo de paso por un viscosímetro capilar Ubbelohde introducido en un baño de agua a 25°C, considerando cada corrida como viscosidad

relativa. El valor de la viscosidad intrínseca se determinó con los valores de las viscosidades relativas mediante extrapolación gráfica de las curvas obtenidas. Posteriormente, se calcularon los valores de peso molecular a partir de los valores de la viscosidad intrínseca, empleando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. Los valores para las constantes **K** y α fueron 13.8×10^{-5} y 0.85 dL/g, respectivamente (González-Aguilar y col., 2008).

$$[\eta] = KM_v^\alpha$$

Donde:

M_v , es el peso molecular promedio viscosimétrico; **K** y α son constantes que dependen del sistema disolvente utilizado y de la temperatura; $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca (Argüelles y col., 2004).

Grado de desacetilación

El grado de desacetilación se determinó mediante Espectroscopía de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR) con pastillas de KBr (Nadarajah, 2005), midiendo las absorbancias de los picos característicos en el espectro de quitosano (Khan, 2002).

El análisis de los espectros resultantes para determinar el grado de desacetilación se llevó a cabo mediante el método de Sabnis, utilizando las líneas bases de correlación de los valores de absorbancias (A_{1655} , A_{3450}) descrito por el mismo método (Valenzuela, 2006).

$$\%DA = 97.67 - [26.486 \times (A_{1655}/A_{3450})]$$

Donde:

A_{1655} = Es la absorbancia correspondiente a las vibraciones de deformación de la banda Amida I.

A_{3450} = Es la absorbancia correspondiente a las vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo.

Preparación de las soluciones de quitosano

De cada uno de los quitosanos se prepararon soluciones de diferente concentración en ácido acético, según el ensayo requerido. Las soluciones se agitaron continuamente en una placa magnética durante 12 – 24 h. Cada una se centrifugó y se filtró a través de papel Wathman #4 con una bomba de vacío para remover impurezas y partículas insolubles.

Solubilidad. Se prepararon soluciones de los quitosanos obtenidos y del quitosano control a las concentraciones de 1, 3, 5, 7, 10, 20 y 25 g/L en ácido acético al 1% (v/v) y se agitaron por 24 h. Estas se centrifugaron y filtraron con una bomba de vacío a través de papel Wathman #4 previamente a peso constante. Se secó el papel filtro con las impurezas de quitosano en una estufa de convección de aire por 2 h a 105°C y se pesó en una balanza analítica. El porcentaje de solubilidad fue calculado por diferencia de peso (Shirai y col., 1999; Rao y Stevens, 2005).

A partir de la caracterización química de ambos quitosanos, se seleccionó el mejor para ser utilizado en los bioensayos.

Bioensayos

Se utilizó una cepa de *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) mantenida en agar papa dextrosa (PDA) a 5°C.

Propagación y resuspensión de esporas

El inóculo de *A. parasiticus* se llevó a cabo por picadura en el medio PDA, incubando a 28°C por 3 días. Las esporas se resuspendieron con Tween 80 al 0.1% (v/v) con agitación por 5 min. La concentración de esporas se determinó por conteo en cámara de Neubauer.

Efecto del quitosano sobre la cinética de crecimiento radial

Se preparó una solución concentrada de cada uno de los quitosanos, de 15 g/L en ácido acético 0.04 M. A partir de ellas se hicieron diluciones con agua destilada para obtener soluciones de 2, 4, 6, 8 y 10 g/L y se esterilizaron a 121°C por 15 min. Se preparó medio de cultivo Czapeck al cual se le adicionó cada una de las soluciones de quitosano en proporción 3:7 (v/v) quitosano:medio de cultivo, respectivamente, ajustando el pH a 5.60. Posteriormente se inoculó el medio con 1×10^4 esporas/mL del inóculo de *A. parasiticus* mediante la técnica de pozo (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Se incubó a 28°C con una actividad de agua (a_w) de 0.98 (Martins y col., 2008).

Se utilizaron 4 controles de referencia: control de agua, control de ácido acético a pH de 5.60, control de sorbato de potasio al 0.2% y 0.4% (estas concentraciones de sorbato son las más utilizadas en la industria alimentaria) como conservador comercial. Cada 12 h se midió manualmente el radio de la colonia y se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control de ácido acético.

$$\% \text{ de inhibición} = 1 - \left(\frac{R_i}{R_c} \right) \times 100$$

Donde R_c es el promedio de la colonia en el medio control con ácido acético (pH 5.6), y R_i , es el radio de la colonia en el medio con quitosano (Martínez-Camacho, 2009).

Determinación de la concentración media inhibitoria (CQ_{50}) y velocidad de crecimiento

Se determinó la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* a partir de los valores de la pendiente de la grafica de radio vs tiempo. Asimismo se estimó la concentración inhibitoria media del quitosano (CQ_{50}) mediante análisis Probit, a un intervalo de confianza de 95% utilizando el programa estadístico NCSS 2001 (NCSS Inc., USA) (Infante y Calderón, 1994). Para ello se usaron las concentraciones y mediciones obtenidas en la cinética de crecimiento radial. La CQ_{50} estimada fue utilizada para todas las demás determinaciones, incluyendo

una repetición de crecimiento radial, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Efecto del quitosano sobre la germinación de esporas

Se prepararon placas de Petri con medio de cultivo Czapeck, al cual se le adicionó el quitosano de cabeza camarón (quitosano fresco) y quitosano comercial de baja viscosidad a la concentración encontrada para CQ_{50} , ajustando el pH a 5.60. Se inocularon 1×10^4 esporas/mL del inóculo de *A. parasiticus* mediante la técnica de siembra en placa. Ésta consiste en poner el inóculo en el centro de la placa y esparcirlos en toda la superficie del medio con una varilla de vidrio estéril (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Las placas se incubaron a 28°C con a_w de 0.98 (Martins y col., 2008), retirando al azar 2 placas cada 4 h para su evaluación. De las placas muestreadas se contaron 200 esporas al azar, determinando el número de esporas germinadas y no germinadas (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Para esta determinación se utilizó un control de ácido acético a pH 5.60 y el control de sorbato de potasio al 0.4% como conservador comercial. Se calculó el porcentaje de inhibición de esporas germinadas respecto al control de ácido acético.

$$\% \text{ de inhibición} = 1 - \left[\frac{S_i}{S_c} \right] \times 100$$

Donde S_c es el porcentaje de esporas germinadas en el medio control con ácido acético (pH 5.6), y S_i , es el porcentaje de esporas germinadas en el medio con quitosano (Martínez-Camacho, 2009).

Análisis de microscopía de epifluorescencia

Para evaluar el efecto del quitosano sobre el proceso de división mitótica y de formación de septos de *A. parasiticus* se utilizó microscopía de epifluorescencia. Para la realización de este ensayo se utilizó medio líquido Czapeck, al cual se le añadió quitosano de cabeza de camarón y comercial de

baja viscosidad (CQ₅₀ encontrada para cada quitosano), en proporción quitosano-medio 3:7 (v/v) y se inoculó con 1×10^5 esporas/mL de la suspensión de esporas.

Número de septos en hifas. Se determinó utilizando tinción con solución de Blanco de Calcoflúor en concentración de 10 μ L/mL. El colorante se adhiere a quitina y glucanos emitiendo fluorescencia, lo cual permite observar las paredes celulares y septos de las hifas de *A. parasiticus*. Se utilizó un filtro azul-violeta a una longitud de onda de excitación y emisión de 350-360 y 600-610 nm, respectivamente (Momany y Taylor, 2000; Plascencia-Jatomea y col., 2003).

Número de divisiones mitóticas. Se llevó a cabo mediante preparaciones previamente fijadas en una solución de 3.7% de formaldehído, 0.2% de triton X-100 y buffer de fosfatos 50 mM (pH 7). La fijación de las esporas adheridas a los cubreobjetos (previamente colocados en las cajas Petri antes de añadir el medio líquido Czapek con quitosano), se realizó sumergiéndolos completamente en la solución fijadora durante 1h a 25°C. Se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en un portaobjetos, para llevar a cabo la tinción mediante la adición de 2 gotas de solución Hoechst 33258 (Bisbenzimidaz H 33258 de Sigma) en concentración de 100 ng/mL, y se dejaron reposar durante 5 min a 25°C. Se realizó la observación de los núcleos de las esporas en el microscopio de epifluorescencia, utilizando un filtro azul-violeta a una longitud de onda de emisión y excitación de 330-380 y >420 nm, respectivamente (Plascencia-Jatomea y col. 2003; Momany y Taylor, 2000). Para este ensayo se utilizaron un control de agua, ácido acético a pH 5.6 y sorbato de potasio. El colorante es específico para DNA, lo que permite la visualización de los núcleos (Plascencia-Jatomea y col., 2003).

Parámetros morfométricos

Se midió el diámetro y longitud de las hifas terminales en la etapa de crecimiento apical, así como el diámetro de las esporas e hifas en la etapa de germinación y microscopía de epifluorescencia de *Aspergillus parasiticus* con las

diferentes concentraciones de quitosano y de los controles utilizadas para cada etapa. Para las observaciones se utilizó un microscopio marca Olympus CX31, con una cámara integrada infinity 1 (Media Cybernetics, USA), a un objetivo de 40X. Las mediciones se realizaron con un analizador de imágenes (Image Pro-Plus versión 6.3). El diámetro de esporas e hifas se determinó mediante el promedio de al menos 50 mediciones (Plascencia-Jatomea, 2004).

Efecto del quitosano sobre la producción de aflatoxina

Se colocaron 50 g de maíz en un matraz Erlenmeyer y posteriormente éste fue rehidratado a una humedad de 40% mediante la adición de agua destilada. El maíz fue esterilizado 2 días consecutivos en autoclave 121°C y 15 psi por 20 min (Suárez-Jiménez, 2007). Se agregaron 10 mL de la solución de los quitosanos fresco y comercial (pH 5.60) a los matraces a las CQ₅₀ encontrada para cada uno (Bucio-Villalobos y col., 2001). Se inoculó cada matraz con la suspensión de esporas hasta alcanzar una concentración de 1×10^5 esporas/mL de *Aspergillus parasiticus* y se incubaron a 28°C (Martins y col., 2008). El ensayo se realizó con dos repeticiones por duplicado y las muestras se sacaron para su cuantificación cada 4 días por 16 días hasta que finalizó el ensayo. Se utilizaron 2 tratamientos diferentes (producción de AFB1 en presencia de quitosano fresco de cabeza de camarón y quitosano comercial de baja viscosidad) y tres controles (agua, ácido acético a pH 5.60 y sorbato de potasio al 0.4% a pH 6.5).

Extracción y purificación. Una vez terminado el tiempo de incubación, las aflatoxinas se extrajeron con 100 mL de metanol:agua (80:20) y 5 g de cloruro de sodio (Vicam aflatest), mediante agitación mecánica por 30 min en un agitador tipo Shaker Modelo 75 marca Demoni y se filtraron con papel Whatman #1 (Suárez-Jiménez, 2007). Posteriormente se realizó la purificación de las aflatoxinas tomando 10 mL del filtrado anterior diluido con 40 mL de agua destilada, se agitaron en un vortex por 30 s y se filtraron a través de papel fibra de vidrio. Enseguida se purificaron 10 mL del filtrado con una columna de inmunoafinidad Aflatest (Micotoxin testing sistem, Vicam), las cuales contienen un anticuerpo monoclonal específico para ligar aflatoxina B1, B2, G1 y G2. La

columna se lavó 2 veces con 10 mL de agua destilada permitiendo así el aislamiento, purificación y concentración de las aflatoxinas en la columna. Las aflatoxinas fueron eluidas y recolectadas en una celda de borosilicato 12 x 75 mm (Fisherbrand) con 1.0 mL de metanol grado HPLC (NOM-188-SSA1-2002; Vicam aflatest).

Cuantificación. Se cuantificaron aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) por fluorimetría (Vicam) y concentración de AFB1 por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Aflatoxinas totales. Se tomaron las aflatoxinas purificadas y concentradas contenidas en la celda con el mililitro de metanol, se le adicionó 1.0 mL de solución reveladora de bromo al 0.03%, se agitó en un vortex por 5 s para eliminar burbujas y después se colocó la celda en un fluorómetro Serie 4 (Vicam modelo 1107-103606) previamente calibrado para el método Aflatest con estándar de micotoxinas (Fluorometer Calibration Standards Vicam). Se leyó la concentración de aflatoxinas totales después de 60 s, directamente en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (NOM-188-SSA1-2002, Vicam aflatest).

Aflatoxina B1. Se tomaron las aflatoxinas purificadas y concentradas contenidas en la celda con el mililitro de metanol y se adicionó 1.0 mL de acetonitrilo, se tomaron 200 μL y se mezclaron con 700 μL de solución derivatizadora (10 mL de ácido trifluoroacético, 5 mL de ácido acético y 35 mL de agua destilada), agitando en vortex por 30 s. La solución se calentó a 65°C durante 10 min en baño María. Para la cuantificación por HPLC (Bomba Varian modelo 9012), se inyectaron 20 μL de la mezcla derivatizada en una columna analítica de fase reversa (C18) marca Vydac de 250 x 4.5 mm con un tamaño de poro de 5 μm . El método fue isocrático de 15 min, con una fase móvil de agua, acetonitrilo y metanol (60:20:20), a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y loop de 20 μL instalado a un detector de fluorescencia (Varian Prostar, Modelo 363) con una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 440 nm (NOM-188-SSA1-2002).

La cuantificación se realizó mediante la siguiente fórmula:

Área del pico - ordenada al origen x 1 x dilución
pendiente

Donde:

Área del pico: Se calcula de los cromatogramas obtenidos.

La pendiente y la ordenada en el origen se obtienen de la curva estándar para AFB1.

Las soluciones estándar se prepararon mediante la disolución de AFB1 pura (Sigma, Co) en acetonitrilo a concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 750 µg/mL.

Estudio de Mutagenicidad

Prueba de mutagenicidad de quitosano en *Salmonella*

Se utilizaron cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98) histidina-dependiente creadas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas (sustancias promutágenas). La preparación del cultivo consistió en incubar a baño María la cepa de *S. typhimurium* a 37°C, 120 rpm por 12 horas. Se aplicaron las QC₅₀ encontradas para crecimiento radial de *A. parasiticus* de los quitosanos obtenidos del cefalotórax del camarón (Quitosano ensilado, Quitosano fresco), usando como control quitosano comercial de baja viscosidad, sorbato de potasio al 0.4% y agua acidificada con ácido acético a pH 6.5, siendo éste último el solvente para los quitosanos obtenidos.

El ensayo consistió en añadir 2.0 mL de Top agar con histidina y biotina contenidos en tubos de ensayo, mantenidos a 45°C y posteriormente se adicionaron 100 µL de cultivo fresco de la cepa de *S. typhimurium* (TA98), 100 µL de quitosano en presencia o ausencia de 500 µL de la mezcla enzimática S9 (extracto enzimático del hígado de rata). Posteriormente se agitaron los tubos y se vertieron sobre las placas de agar mínimamente glucosado, las cuales se incubaron a 37°C por 48 h, cuantificando el número de revertantes inducidas en cada placa. Se utilizó un control positivo con AFB1 disuelto en DMSO, 100 µL de la cepa de *S. typhimurium* (TA98) y 500 µL de la mezcla

enzimática S9 y un control negativo (revertantes espontáneas) conteniendo solamente *S. typhimurium* (TA98), con y sin mezcla enzimática S9.

La expresión de resultados positivos es cuando las revertantes inducidas (control positivo y sustancias a probar) doblan el número de revertantes espontáneas (control negativo) (Maron y Ames, 1993).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza usando diseño factorial con diferente fuente de variación. La variable respuesta fue el número de esporas germinadas, crecimiento radial, diámetro y longitud de esporas y la producción de aflatoxinas. La diferencia significativa entre grupos se determinó mediante la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico Infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Proximal del Cefalotorax de Camarón (*Litopenaeus vanameii*)

El análisis proximal reportado para los desechos de camarón aún de una misma especie (*Litopenaeus vanameii*), son variables dependiendo de factores como la alimentación, sexo, edad, lugar y época de captura, etc. Sin embargo, los datos bibliográficos presentados en la Tabla 5 para el contenido de proteína y cenizas de cefalotórax de camarón (*L. vanameii*), son semejantes a los valores encontrados en las cabezas que se utilizaron como materia prima en el presente estudio y que se presentan en la misma tabla.

Rendimientos de Quitina y Quitosano

Los rendimientos de quitina obtenidos por tratamiento biológico (ensilado) y por tratamiento químico (fresco) se presentan en la Tabla 6, observándose que el porcentaje de quitina en ambos casos fueron ligeramente similares. Respecto a los rendimientos de quitosano obtenido de estas quitinas, se encontró que éste fue semejante para ambas.

Se han llevado a cabo diversos estudios comparando la eficiencia entre el método biológico y el químico; sin embargo, en el presente trabajo no se observó diferencia entre ambos métodos. Estos resultados concuerdan con Rao y Stevens (2005), quienes no encontraron diferencia entre ambos métodos, obteniendo un rendimiento de quitina de 4.4% a partir de cabezas de camarón, valores menores a los encontrados en el presente estudio.

Por otra parte, Martínez-Camacho (2009) reporta rendimientos de quitina y quitosano de 2.38% y 1.59%, respectivamente, utilizando la misma materia prima y las mismas condiciones que el tratamiento biológico empleado en este estudio. Los valores reportados por estos autores son menores a los del presente estudio, tal vez debido a pérdidas durante el proceso, principalmente en las etapas de filtración y lavado.

Tabla 5. Composición química de la cabeza de camarón *Litopenaeus vanameii*.

| Composición química | Bibliográfico (%) | Obtenidos (%) |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Proteína | 53.5 | 51.65 ± 0.24 |
| Ceniza | 22.6 | 21.49 ± 0.53 |
| Fibra cruda | 7.2 | ----- |
| Extracto etéreo | 8.9 | ----- |

Fuente: FAO, (1998).

Qn: Quitina, Q: Quitosano

Tabla 6. Rendimientos de quitina y quitosano a partir de cabezas de camarón *Litopenaeus vanameii*.

| Tratamiento | Rendimiento (%) | Material removido (%) |
|--------------------|------------------------|------------------------------|
| Qn. Ensilado | 9.73 | 90.27 |
| Q. Ensilado | 5.74 | 94.26 |
| Qn Fresco | 12.55 | 87.45 |
| Q. Fresco | 6.20 | 93.79 |

Zakaria y col. (1998) mencionan que se pierde alrededor del 5.1% de quitina durante la filtración del licor del ensilado (partículas muy finas de quitina que se van en la filtración), mientras que Rao y Stevens (2005) reportan pérdidas en el rendimiento de quitina entre el 50 y 60%, tanto en el tratamiento biológico como el químico.

Cota-Arriola (2007), obtuvo quitina y quitosano mediante la misma metodología para el tratamiento químico (fresco), y la misma materia prima fresca, reportando valores de quitina y quitosano de 10.9% y 6.7%, respectivamente, siendo estos valores semejantes a los encontrados en este estudio. Sin embargo, hay reportes como el de Mármol y col. (2006), quienes obtuvieron 24.1% de quitina y 18.5% de quitosano por el método químico, valores superiores a los reportados en este estudio. Lo anterior puede deberse a factores como la edad, sexo, época y lugar de captura que influyen en la composición proximal de los desechos de camarón.

Caracterización Química

La calidad del quitosano depende de la pureza del mismo, para ello se trata de eliminar principalmente proteínas y cenizas. El porcentaje de proteína y ceniza residual para las quitinas y quitosanos obtenidos y para el control comercial se muestran en la Tabla 7. El tratamiento de ensilaje para obtención de quitina, fue el más efectivo para eliminar proteína, lo cual se puede deber a la actividad de las enzimas proteasas presentes en el tratamiento actuando sobre la proteína, provocando la hidrólisis dando así lugar a su remoción. Lo anterior también explica el rendimiento más bajo de quitina por tratamiento biológico (ensilaje), ya que la quitina obtenida es más pura en lo que respecta a los minerales residuales por ambos tratamientos.

Los valores de proteína y ceniza del quitosano del tratamiento químico fresco fueron diferentes estadísticamente, siendo estos más bajos e indicando que es un quitosano de mejor calidad. Lo anterior demuestra que la desacetilación eliminó de forma más eficiente a las proteínas y cenizas presentes en la quitina. Comparando estos resultados con los del quitosano

Tabla 7. Porcentaje de proteínas y cenizas residuales en quitina y quitosano.

| Tratamiento | Proteína (%) | Cenizas (%) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Qn. Ensilado | 1.56 ± 0.02 | 1.19 ± 0.00 |
| Q. Ensilado | 0.67 ± 0.01 ^b | 0.57 ± 0.04 ^b |
| Qn. Fresco | 9.31 ± 0.06 | 1.17 ± 0.21 |
| Q. Fresco | 0.48 ± 0.06 ^a | 0.44 ± 0.02 ^a |
| Q. Comercial | 0.67 ± 0.01 ^b | 0.78 ± 0.06 ^c |

Qn: Quitina, Q: Quitosano. Diferente superíndice indican diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

comercial, se observa que los quitosanos obtenidos por ambos tratamientos en el laboratorio son similares, indicando que el proceso permite obtener un quitosano similar al comercial.

No y Meyers (1995) mencionan que para poder considerar al quitosano de buena calidad, tiene que presentar valores de proteína y ceniza menores al 1.0%, y los aquí obtenidos cumplen satisfactoriamente con lo anterior. Sin embargo, Percot y col., (2003) señalan que un porcentaje de proteína residual satisfactoria oscila aproximadamente del 1.0 al 7%.

Diversos estudios reportan que los valores de proteína y cenizas residuales dependen del método de extracción utilizado. Rao y Stevens (2005) reportan valores de proteína y cenizas residuales menores al 1.0 % para quitosano obtenido por método biológico (ensilaje), mismo que es igual al encontrado en el presente estudio. En el caso del quitosano obtenido por vía química, estos valores son más variables, ya que algunos autores cuantifican el nitrógeno total, por lo que están considerando el nitrógeno presente en la molécula de quitosano y por ende, dan valores más elevados. Mármol y col., (2006) reportaron valores de proteína de 6.84% y cenizas del 0.08% en quitosano obtenido por el método químico. Cota-Arriola (2007), aplicando el mismo método de obtención de quitosano por tratamiento químico (fresco) y el mismo tratamiento de extracción de proteína residual, reportó 0.51% de proteína y 0.58% de cenizas, valores semejantes a los del presente trabajo.

Peso Molecular y Grado de Desacetilación

El peso molecular y el grado de desacetilación (DD) del quitosano son parámetros importantes para determinar su funcionalidad, y dependen principalmente de la fuente y de la forma de obtención (Young y col., 1998).

Los valores de peso molecular, viscosidad intrínseca y grado de desacetilación de los quitosanos obtenidos en el presente estudio se muestran en la Tabla 8. Se observa que los dos quitosanos obtenidos son de bajo peso molecular, ya que están por debajo de los 400 kDa (<400 bajo peso molecular, 400-600 medio peso molecular y > 600 alto peso molecular).

El quitosano obtenido por tratamiento químico (quitosano fresco) presentó un peso molecular más alto, debido a que la cadena de la estructura del quitosano es más larga, indicando que la cadena no sufrió depolimerización (Argüelles y col., 2004). En cambio, el bajo peso molecular del quitosano obtenido por método biológico (quitosano ensilado), puede ser debido a que durante el ensilado las proteasas y las condiciones ácidas rompieron en mayor medida la cadena de la estructura de la quitina y los enlaces covalentes entre proteína-quitina y minerales quitina. El caso del quitosano comercial es semejante al del quitosano ensilado, y su bajo peso molecular se debe a que industrialmente la obtención de quitina es por método químico, y la conversión de quitina a quitosano es por desacetilación heterogénea donde se usa temperatura de 100°C, ocasionando rompimiento de la estructura del quitosano (Argüelles y col., 2004).

El grado de desacetilación del quitosano influye en sus propiedades fisicoquímicas, en la biodegradabilidad, solubilidad en soluciones ácidas, hidratación, actividad inmunológica, biocompatibilidad y propiedades biológicas, factores que son importantes al momento de seleccionar un quitosano adecuado para cada aplicación (Argüelles y col., 2004). La Tabla 8 muestra los valores del grado de desacetilación, en ella se observa que el DD del quitosano comercial es más alto que el de los obtenidos en el presente, los cuales fueron semejantes, quizás debido a que se emplearon las mismas condiciones de desacetilación.

Los valores que se reportan en la literatura son variables y la mayoría hacen referencia al quitosano obtenido por desacetilación heterogénea (desacetilación con NaOH 50% a 100°C por 2 h). Miranda y col., (2003) reportan para quitosano obtenido por método químico y con desacetilación heterogénea, un peso molecular de 130 kDa, valor semejante al quitosano comercial (171.1 KDa). Sin embargo, los valores anteriores son bajos respecto al quitosano obtenido por tratamiento químico en fresco, y esto se debe principalmente a la alta temperatura que se usa en la desacetilación heterogénea.

Para el caso de quitosano obtenido por el método biológico (ensilaje), Martínez-Camacho (2009) reporta un peso molecular de 100 kDa bajo las mismas condiciones de obtención del quitosano del presente estudio. Por su

La solubilidad del quitosano depende principalmente del grado de desacetilación y de la distribución de los grupos aminos de la cadena, así como del contenido residual de proteína y cenizas. En la Tabla 9 se muestran los valores de solubilización de los quitosanos a diferentes concentraciones, observándose valores de solubilidad superiores a 92.0%. El material insoluble puede estar constituido por los residuos de proteína y minerales remanentes. Rao y Stevens (2005) determinaron valores de solubilización tanto para quitosano obtenido por el método biológico como por el químico superiores al 90.0 %, resultados equiparable a los obtenidos en el presente estudio.

Efecto del Quitosano sobre el Crecimiento Radial de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992

Los resultados de crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* a diferente concentración de los quitosanos, se muestran en los anexos 1, 2 y 3. En la Figura 5 se presenta el crecimiento radial de *A. parasiticus* a diferentes tiempos. El control ácido (pH 5.6) no presentó diferencia con respecto al control con agua ($p > 0.05$).

Los quitosanos que presentaron efecto significativo ($p < 0.05$) fueron el comercial y el quitosano fresco, a concentraciones de 3.0 y 4.5 g/L, respectivamente. Es posible que ambos quitosanos presenten un efecto mayor en comparación con el quitosano obtenido por método biológico (ensilaje), ya que el quitosano comercial presenta mayor grado de desacetilación y por lo tanto mayor número de grupos aminos libres. En el caso del quitosano obtenido por método químico (fresco), su actividad puede deberse a que su peso molecular es mayor que los demás quitosanos, indicando que existe un mayor número de grupo amino protonados en la solución, y por lo tanto mayor carga positiva que puede interactuar sobre las cargas negativas de la membrana del hongo, alterando su permeabilidad y afectando el crecimiento del mismo, compensando el bajo grado de desacetilación comparado con el quitosano comercial. Cabe mencionar que el efecto del quitosano depende mayormente de estos dos parámetros (grado de desacetilación y peso molecular).

Tabla 9. Porcentaje de solubilidad a diferentes concentraciones de quitosano.

| Quitosano (g/L) | Q. Ensilado (%) | Q. Fresco (%) | Q. Comercial (%) |
|------------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| 3 | 95.89 ± 2.67 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| 5 | 93.15 ± 1.62 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| 7 | 94.59 ± 0.40 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| 10 | 92.01 ± 1.04 | 100 ± 0 | 96.46 ± 0.21 |
| 20 | 94.58 ± 1.53 | 95.08 ± 2.57 | 93.35 ± 3.03 |
| 25 | 93.96 ± 0.97 | 95.70 ± 1.97 | 92.13 ± 2.80 |

Q. Quitosano

parte, Beaney y col., (2005) obtuvieron quitosano a partir de *Nephrops norvegicus* con peso molecular de 70.3 kDa, mientras que Sini y col., (2007) reportaron un peso molecular de 256 kDa utilizando *Bacillus subtilis* para el ensilado. El valor obtenido en el presente estudio está en medio de los dos reportes anteriores y puede ser debido a las bacterias usadas en el ensilaje, así como a la materia prima utilizada.

En la práctica el máximo nivel de desacetilación que se obtiene mediante un tratamiento simple, es aproximadamente de 75-85% (Goycoolea y col., 2004). Actualmente, para reportar el grado de desacetilación se debe de señalar la ecuación y el método de determinación empleados. Khan y col., (2002) demostraron que ambos factores influyen sobre el resultado, ya que muchos autores no presentan la ecuación de obtención, por lo que los porcentajes de desacetilación son variables.

Miranda y col. (2003) obtuvieron un DD de 85% para quitosano obtenido por tratamiento químico y desacetilación heterogénea, valor más alto al reportado en este estudio. Asimismo, Cota-Arriola (2007) reporta un DD de 78.8% con 5 días de desacetilación para quitosano obtenido bajo las mismas condiciones y con la misma fórmula para calcularlo que las utilizadas en el presente trabajo, siendo además un valor semejante al encontrado. Rao y Stevens (2005) reportaron un DD de 84% para quitosano obtenido por método biológico, mientras que Beaney y col., (2005) de 82.2% y Sini y col., (2007) de 81%. Los quitosanos antes mencionados fueron obtenidos por desacetilación heterogénea, y los valores son semejantes a los obtenidos en este trabajo. Esto indica que las condiciones de laboratorio a las que se llevó a cabo la desacetilación permiten obtener valores similares a los obtenidos en condiciones industriales (desacetilación heterogénea). Por otra parte, Martínez-Camacho (2009) obtuvo un quitosano con un DD de 64.6% bajo las mismas condiciones que el presente estudio, siendo este un valor menor al encontrado (82.63%), esto es debido a que se utilizó otra fórmula para el cálculo del grado de desacetilación, comprobando así lo mencionado por Khan y col., (2002).

Solubilidad del quitosano

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de los quitosanos.

| Tratamiento | PM(KDa) | [η] (dL/g) | DD (%) |
|---------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------|
| Q. Ensilado | 168.40 ^a | 4.76 \pm 0.33 ^a | 82.63 |
| Q. Fresco | 306.30 ^b | 7.69 \pm 0.16 ^b | 80.90 |
| Q. Comercial | 171.10 ^a | 3.59 \pm 0.17 ^a | 89.71 |

Q: Quitosano, PM: Peso molecular, [η]: viscosidad intrínseca, DD: grado de desacetilación (DD). Diferente superíndice indica diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

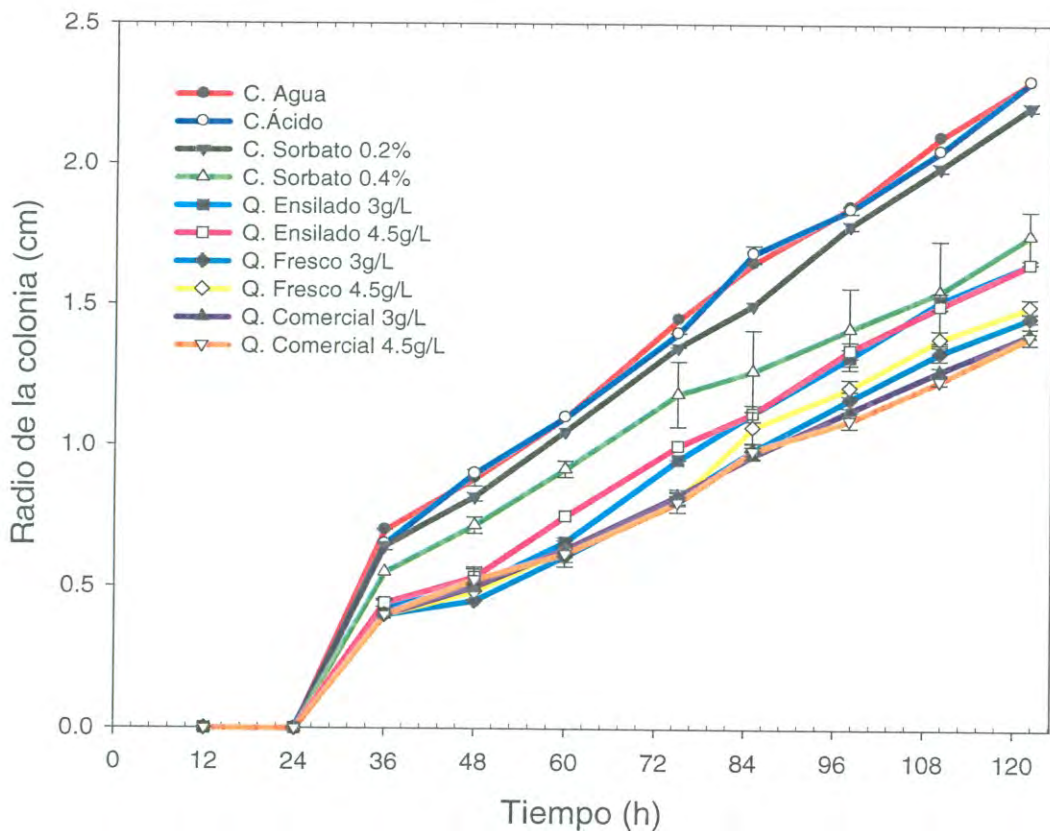


Figura 5. Efecto del quitosano obtenido sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio sólido Czapeck a 28°C.

En el caso del sorbato de potasio, se ha mencionado que su potencial depende del tipo de microorganismo, de la concentración utilizada, y del pH del medio donde se aplique. Sofos (1989) menciona que el mecanismo de acción incluye alteraciones en la morfología, integridad y función de la membrana celular, así como inhibición de enzimas de transporte de actividad metabólica, principalmente deshidrogenasas involucradas en la oxidación de ácidos grasos, sugiriendo que la muerte del microorganismo expuesto es atribuida a la generación de agujeros en la membrana celular.

En la Figura 5 se corrobora que entre mayor es la concentración de sorbato, es mayor su efecto a un mismo pH (6.5), siendo la concentración más efectiva de 0.4%. Sin embargo, presentó menor efecto que todos los tratamientos con quitosano a partir de los 2.4 g/L ($p < 0.05$) (Tabla 10). Sofos (1989) indica que el efecto inhibitorio del sorbato inicia a partir de pH de 6.5, sin embargo a este pH en el presente trabajo no se observó alto efecto inhibitorio hacia *A. parasiticus*.

En la Tabla 10 se presentan las velocidades de crecimiento para cada uno de los quitosanos. La velocidad de crecimiento del hongo en los controles, tanto de ácido como de agua fue similar. En todos los tratamientos de quitosano a diferente concentración, el hongo presentó una velocidad de crecimiento más baja con respecto a los controles, siendo más lenta en el tratamiento con quitosano comercial, indicando que la presencia de quitosano retarda la fase de adaptación del hongo, y por consiguiente la velocidad de crecimiento disminuye.

A partir de los datos obtenidos del crecimiento radial del hongo, se calcularon los porcentajes de inhibición respecto al control ácido (anexos 4, 5, 6, y 7). Se encontró que los quitosanos en todas las concentraciones probadas, presentaron valores de inhibición menores del 50%. Sin embargo, como era de esperarse, a las 122 h en las concentraciones de 3.0 y 4.5 g/L, tanto el quitosano comercial y el quitosano fresco, fueron más efectivos ($p < 0.05$) para controlar el crecimiento de *A. parasiticus* (Tabla 10).

Plascencia-Jatomea (2004) reportó que el quitosano (1.6 g/L) causó un porcentaje de inhibición del 98.0% sobre *Penicillium expansum* a las 48 h. Así mismo, Martínez-Camacho (2006), reporta que quitosano de medio peso molecular y DD de 80.0% a 4 g/L ocasionó un 45.7% de inhibición a las 48 h

Tabla 10. Velocidad de extensión e índice fungistático de *Aspergillus parasiticus* a las 122 h en medio sólido Czapeck, a 28°C.

| Tratamiento | Velocidad de extensión radial (cm/h) | Índice fungistático (%) |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| C. Agua | 0.0216 | |
| C. Ácido | 0.0215 | |
| C. Sorbato 0.4% | 0.0162 | 8.70 ± 0.00 ^j |
| C. Sorbato 0.2% | 0.0206 | 3.99 ± 0.63 ^{de} |
| Q. Ensilaje 0.6 g/L | 0.0196 | 19.20 ± 0.63 ^h |
| Q. Ensilaje 1.2 g/L | 0.0182 | 25.72 ± 0.63 ^f |
| Q. Ensilaje 1.8 g/L | 0.0167 | 25.00 ± 2.88 ^{cd} |
| Q. Ensilaje 2.4 g/L | 0.0165 | 28.26 ± 0.00 ^{cde} |
| Q. Ensilaje 3.0 g/L | 0.0158 | 28.26 ± 0.00 ^c |
| Q. Ensilaje 4.5 g/L | 0.0157 | 5.80 ± 1.26 ^c |
| Q. Fresco 0.6 g/L | 0.0208 | 15.22 ± 0.00 ^{hi} |
| Q. Fresco 1.2 g/L | 0.0186 | 21.38 ± 1.26 ^g |
| Q. Fresco 1.8 g/L | 0.0175 | 28.62 ± 0.63 ^{ef} |
| Q. Fresco 2.4 g/L | 0.0158 | 36.59 ± 0.63 ^c |
| Q. Fresco 3.0 g/L | 0.0139 | 34.78 ± 1.09 ^{ab} |
| Q. Fresco 4.5 g/L | 0.0144 | 12.87 ± 1.26 ^b |
| Q. Comercial 0.6 g/L | 0.0187 | 12.87 ± 1.26 ^g |
| Q. Comercial 1.2 g/L | 0.0186 | 14.32 ± 0.63 ^g |
| Q. Comercial 1.8 g/L | 0.0157 | 27.62 ± 0.63 ^{cd} |
| Q. Comercial 2.4 g/L | 0.0142 | 33.55 ± 0.00 ^b |
| Q. Comercial 3.0 g/L | 0.0132 | 39.07 ± 0.00 ^a |
| Q. Comercial 4.5 g/L | 0.0129 | 39.46 ± 1.26 ^a |

C: Control, Q. Quitosano. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticas. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

sobre *Aspergillus niger*. Además, a esta misma concentración de quitosano, Quintana-Obregón (2006) y Suárez-Jiménez (2007) encontraron un porcentaje de inhibición del 58.0 y 67.5% sobre *Fusarium verticillioides* a las 264 h y 144 h, respectivamente. Fang y col. (1994), reportan que 5.0 mg/mL de quitosano a pH de 5.4 ocasionaron una inhibición del 41.4% a los 6 días para *A. niger* y 63.0% en *A. parasiticus*. Cabe mencionar que la inhibición del quitosano dependerá de la especie de hongo y de las características físico-químicas del biopolímero principalmente el peso molecular y grado de desacetilación, debido a esto es que se observen diferentes índices fungistáticos en comparación con los reportes antes mencionados y los encontrados en el presente estudio.

En la Figura 6 se observa con mayor claridad el efecto inhibitorio de los quitosanos sobre crecimiento radial de *A. parasiticus*, en ella se puede apreciar que a las 48 h se obtiene el máximo porcentaje de inhibición, a excepción del quitosano comercial a 4.5 g/L que se logra hasta las 60 h, y se debe al efecto del quitosano sobre la adaptación del hongo limitando su crecimiento. Después se observa que el índice de inhibición baja, debiéndose a que el hongo ya se adaptó a la presencia del quitosano, sin embargo, a las 84 h se observa otro incremento en la inhibición del hongo, pudiéndose deber a que en este tiempo empiezan a escasear los nutrientes que el hongo necesita para su crecimiento; aunque en el intervalo entre las 85 y 96 h la inhibición baja, posiblemente a la resistencia del hongo por sobrevivir, sintetizando los últimos nutrientes para su crecimiento y entrar después a la etapa de decadencia o muerte.

Determinación de las Concentraciones Medias Inhibitorias (CQ₅₀) de los Quitosanos

A partir de los resultados obtenidos en la etapa de crecimiento radial se calcularon las dosis inhibitorias medias (CQ₅₀) para cada quitosano mediante análisis Probit, las cuales se muestran en el anexo 8. Las concentraciones seleccionadas para quitosano fresco y comercial fueron 6.71 y 6.24 g/L a las 122 h, respectivamente, mismas que fueron utilizadas para todos los demás ensayos. En el caso del quitosano ensilado, la concentración seleccionada fue

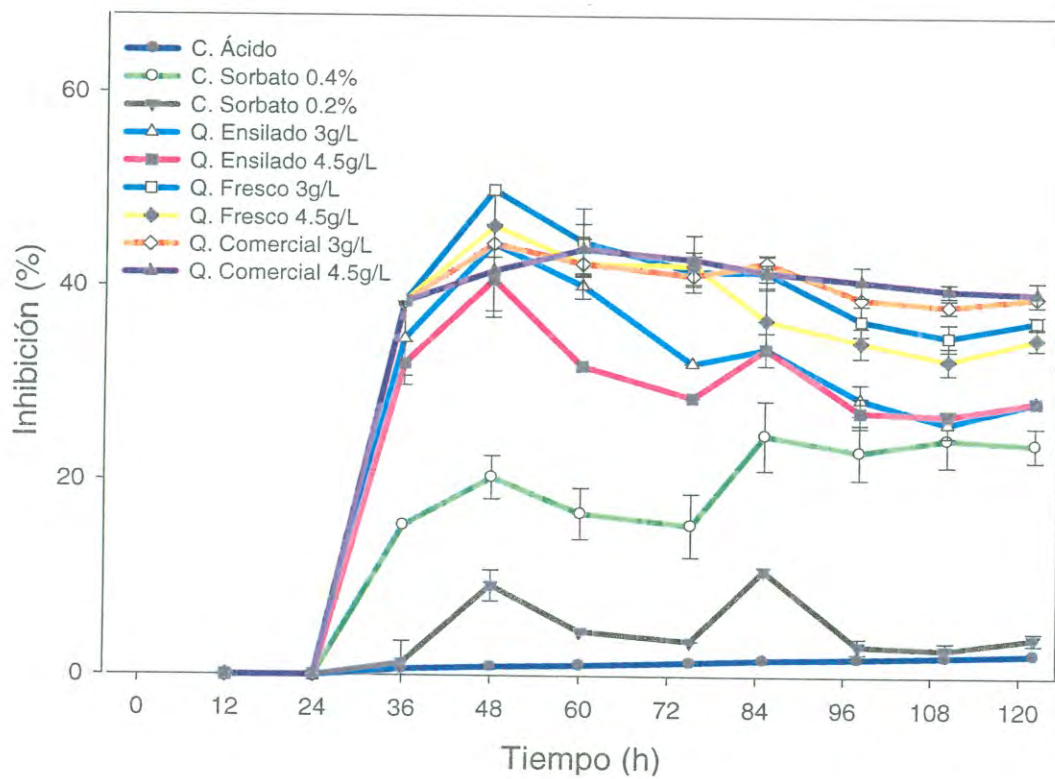


Figura 6. Porcentaje de inhibición del quitosano sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio sólido Czapeck a 28°C.

de 6.28 g/L a las 60 h, ya que en la concentración de las 122 h (15.94 g/L), la solución de quitosano se gelifica.

Con la finalidad de evaluar el efecto de las dosis inhibitorias medias (CQ₅₀) de cada quitosano, se realizó de nuevo el ensayo de crecimiento radial sobre *A. parasiticus*. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 7, observándose que el mayor efecto lo presentó el quitosano fresco y el comercial ($p > 0.05$).

En la Tabla 11 se muestra la velocidad de crecimiento radial del hongo, donde el control ácido presenta más del doble de la velocidad que los tratamientos con quitosano, lo que sugiere que a estas concentraciones inhibe a *A. parasiticus* en más de un 50%. Además, se muestran los porcentajes de inhibición para cada quitosano, donde se puede verificar que la CQ₅₀ encontrada para cada uno fueron efectivas ($p < 0.05$), ya que fue mayor del 50% a las 122 h. El quitosano comercial y el quitosano fresco presentaron mayor efecto inhibitorio a las 122 h, siendo ambos significativamente diferentes ($p < 0.05$) al quitosano de ensilaje.

La Figura 8 presenta el porcentaje de inhibición del quitosano (CQ₅₀) sobre *A. parasiticus*, donde se puede apreciar con mayor claridad el efecto de los quitosanos, observándose a las 24 h y 84 h los mayores índices de inhibición, debiéndose a lo explicado anteriormente en la etapa de crecimiento radial.

Los resultados de inhibición sobre *A. parasiticus* obtenidos por la aplicación de quitosano comercial y quitosano fresco, a sus respectivas CQ₅₀ (58.7 y 56.9%, respectivamente), es similar a los resultados reportados por Fang y col., (1994) para el mismo hongo.

Con base en los resultados antes mencionados, donde se observó que el quitosano ensilado fue el que presentó menor efecto sobre *A. parasiticus*, aunado a los problemas de gelificación a altas concentraciones, se decidió eliminar este tratamiento de quitosano y se usó el control de sorbato de potasio (pH 6.5) de 0.4% para los ensayos posteriores.

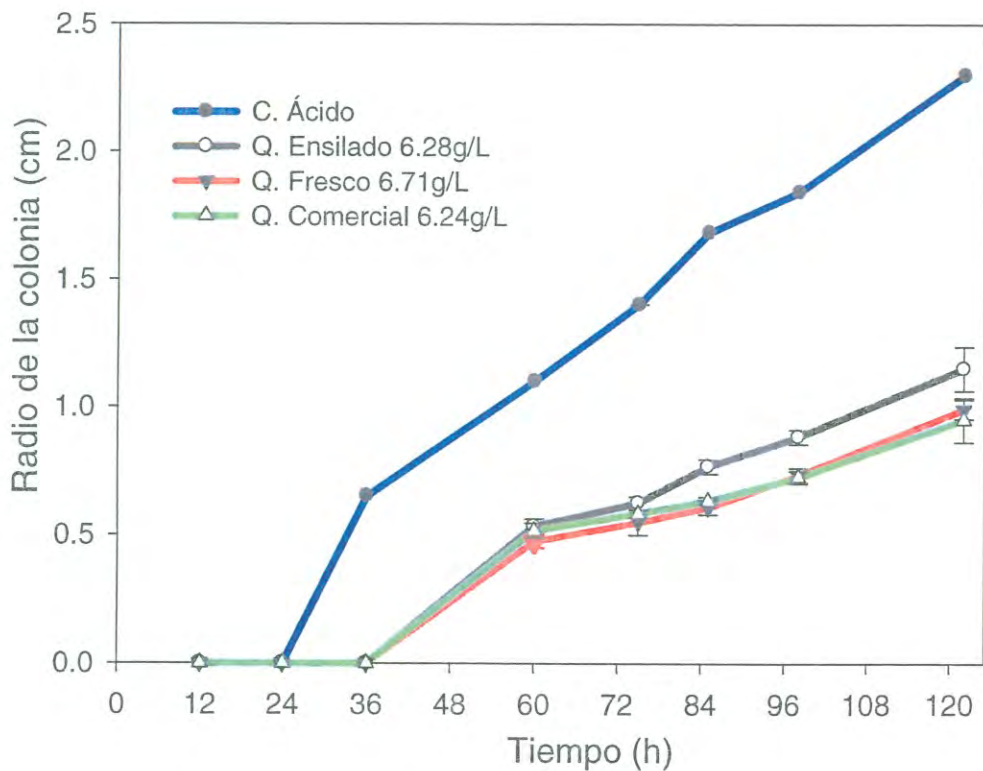


Figura 7. Efecto del quitosano (CQ₅₀) sobre el crecimiento radial de *Aspegillus parasiticus* en medio sólido Czapeck a 28°C.

Tabla 11. Velocidad de extensión e índice fungistático del quitosano (CQ₅₀) sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio sólido Czapeck a 28°C.

| Tratamiento | Índice fungistático (%) | Velocidad de extensión radial (cm/h) |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| C. Ácido | ----- | 0.022 |
| Q. Ensilaje 6.27 g/L | 50.00 ± 2.77 ^a | 0.011 |
| Q. Fresco 6.70 g/L | 56.88 ± 1.66 ^b | 0.010 |
| Q. Comercial 6.24 g/L | 58.70 ± 3.77 ^b | 0.010 |

C: Control, Q: Quitosano. Diferente superíndice indica diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

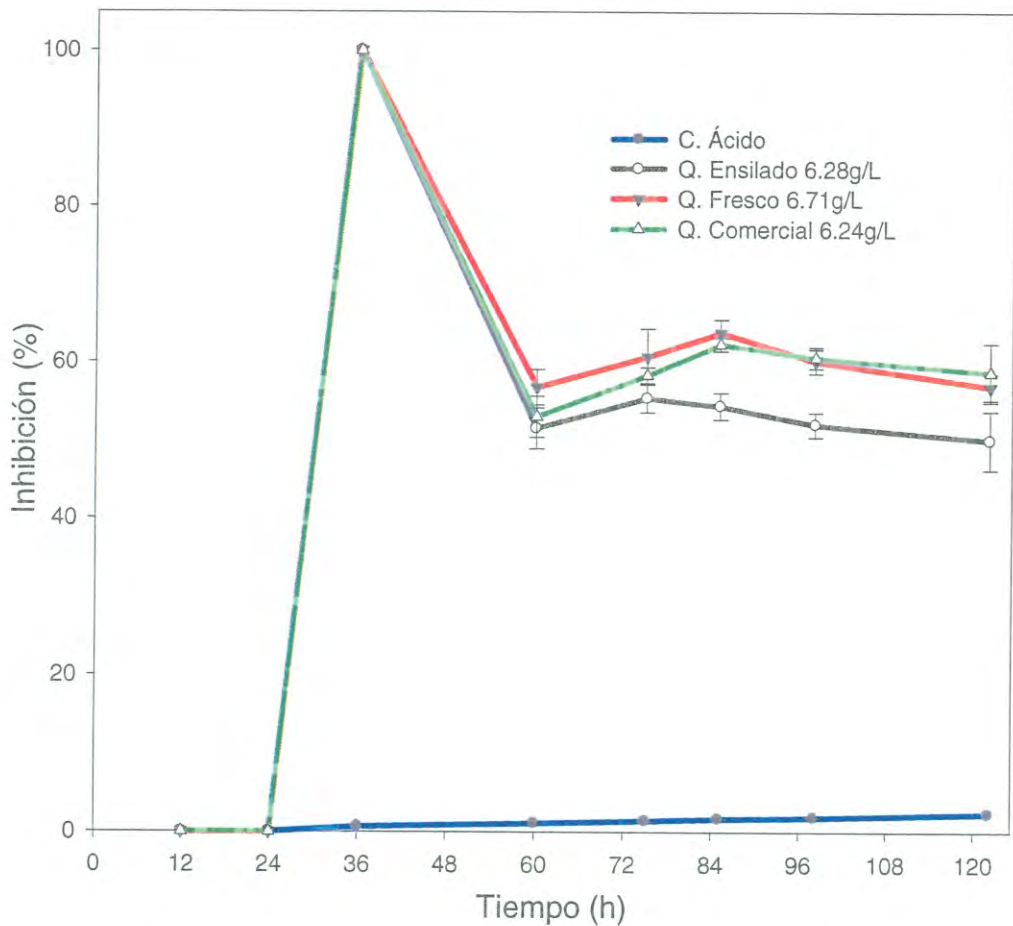


Figura 8. Porcentaje de inhibición del quitosano (CQ₅₀) sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio sólido Czapeck a 28°C.

Diámetro y longitud promedio de hifas de *A. parasiticus* ATCC 16992 a las 72 horas de crecimiento en medio sólido Czapeck

La Tabla 12 muestra los valores de diámetro y longitudes de las hifas terminales a las 72 h. El quitosano comercial a concentración de 3 g/L presenta diferencia significativa ($p < 0.05$), efecto que se manifestó por un incremento en el diámetro de las hifas con respecto a los demás tratamientos y a los controles. El diámetro de esporas fue menor significativamente ($p > 0.05$) en presencia de sorbato de potasio con respecto a los demás tratamientos de quitosano y a los controles, con excepción del quitosano de ensilaje (1.2 g/L), indicando que no tuvo efecto sobre el diámetro de esporas. Los tratamientos con quitosano y los controles fueron estadísticamente iguales respecto a la longitud de hifas ($p < 0.05$).

Estudios recientes han demostrado que el quitosano no solamente es eficaz para detener el crecimiento de los hongos, sino que induce a cambios morfológicos por alteraciones moleculares, y por desorganización celular (Ait Barka y col., 2004). Plascencia-Jatomea, (2004) reporta que la presencia de quitosano ocasiona hinchamiento en el diámetro y longitud de las hifas de *A. niger* a las 72 h, ocasionando mayor hinchamiento a mayor concentración de quitosano, tal y como se observa en el presente estudio para quitosano comercial.

Se ha reportado que el incremento del diámetro de hifas se debe a alteraciones en la pared celular, o bien a cambios en la presión y en la tensión de la pared. Estudios anteriores reportan que el quitosano induce excesivamente la ramificación de *R. stolonifer* y *S. sclerotiorum*, ocasionando hifas hinchadas y reducción de la longitud de hifas (El Ghaouth y col., 1992; Cheah y col, 1997; Bautista-Baños y col, 2006). La disminución del diámetro de hifas del hongo en presencia de sorbato puede deberse a su efecto sobre la permeabilidad de la membrana pudiendole provocar agujeros y ocasionar la salida de nutrientes.

Deacon (1993) menciona que la longitud de las hifas es muy variable dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, y que el diámetro es

Tabla 12. Diámetro y longitud promedios de las hifas de *Aspergillus parasiticus* a las 72 horas de crecimiento en medio de cultivo sólido Czapeck.

| Tratamiento | Diámetro (μm) | Longitud(μm) |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| C. Agua | 4.24 \pm 0.701 ^{abc} | 116.07 \pm 82.870 ^a |
| C. Ácido | 4.08 \pm 0.993 ^{abc} | 98.14 \pm 60.460 ^a |
| C. Sorbato 0.4% | 3.90 \pm 0.742 ^c | 90.54 \pm 46.258 ^a |
| C. Sorbato 0.2% | 3.75 \pm 0.681 ^c | 112.40 \pm 56.744 ^a |
| Q. Ensilaje 0.6 g/L | 4.13 \pm 0.867 ^{abc} | 85.79 \pm 57.550 ^a |
| Q. Ensilaje 1.2 g/L | 3.69 \pm 0.554 ^c | 87.65 \pm 48.719 ^a |
| Q. Ensilaje 1.8 g/L | 4.30 \pm 0.675 ^{abc} | 87.36 \pm 61.381 ^a |
| Q. Ensilaje 2.4 g/L | 3.95 \pm 0.758 ^{abc} | 64.69 \pm 31.422 ^a |
| Q. Ensilaje 3.0 g/L | 4.64 \pm 0.697 ^{abc} | 62.37 \pm 39.830 ^a |
| Q. Ensilaje 4.5 g/L | 4.60 \pm 0.651 ^{abc} | 59.95 \pm 22.760 ^a |
| Q. Fresco 0.6 g/L | 4.11 \pm 0.698 ^{abc} | 77.44 \pm 53.410 ^a |
| Q. Fresco 1.2 g/L | 4.83 \pm 0.731 ^{abc} | 72.45 \pm 40.470 ^a |
| Q. Fresco 1.8 g/L | 5.46 \pm 0.997 ^{abc} | 62.66 \pm 58.590 ^a |
| Q. Fresco 2.4 g/L | 4.79 \pm 0.699 ^{abc} | 60.59 \pm 56.320 ^a |
| Q. Fresco 3.0 g/L | 5.47 \pm 0.664 ^{abc} | 47.00 \pm 37.860 ^a |
| Q. Fresco 4.5 g/L | 4.88 \pm 0.686 ^{abc} | 57.00 \pm 37.860 ^a |
| Q. Comercial 0.6 g/L | 4.75 \pm 1.352 ^{abc} | 91.26 \pm 39.960 ^a |
| Q. Comercial 1.2 g/L | 4.93 \pm 0.651 ^{abc} | 72.98 \pm 26.810 ^a |
| Q. Comercial 1.8 g/L | 5.27 \pm 0.526 ^{abc} | 72.61 \pm 40.240 ^a |
| Q. Comercial 2.4 g/L | 6.36 \pm 0.695 ^{ab} | 68.86 \pm 39.290 ^a |
| Q. Comercial 3.0 g/L | 6.46 \pm 0.886 ^a | 42.56 \pm 31.581 ^a |
| Q. Comercial 4.5 g/L | 5.91 \pm 0.923 ^{abc} | 64.41 \pm 43.200 ^a |

C: Control, Q: Quitosano. Diferente superíndice entre columnas indica diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

relativamente constante, esto explica la alta desviación estándar en la longitud de hifas terminales, permitiendo no encontrar diferencia significativa entre los tratamientos.

Efecto del quitosano (CQ₅₀) sobre la Germinación de Esporas de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992

La Figura 9 muestra el efecto provocado por los quitosanos con respecto al control ácido y al sorbato de potasio. Se observa que éste último fue el que retardó más la germinación de esporas ($p < 0.05$), sin embargo después de las 16 h el efecto disminuyó debido a la adaptación del hongo, germinando de manera exponencial. Esto indica que el sorbato a una concentración de 0.4% y pH 6.5 tiene mayor efecto en las primeras etapas de germinación de esporas, aumentando el periodo de adaptación.

En los quitosanos se observó que el mayor efecto sobre la germinación de esporas se logró antes de las 12 h, teniendo efecto significativo ($p < 0.05$) respecto al control ácido. A las 24 h cuando el control alcanzó el 100% de esporas germinadas, se observó que el quitosano comercial no fue diferente significativamente ($p > 0.05$) al control, indicando que el hongo produjo los compuestos necesarios para adaptarse a la presencia del quitosano. El quitosano obtenido por tratamiento químico (fresco) mantuvo un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.05$) con respecto al control ácido y al quitosano comercial.

En la Tabla 13 se muestran las velocidades de germinación e índice fungistático del hongo en presencia de los quitosanos. En el control ácido pH 6.5, se observa que en las primeras 12 h el hongo germina rápidamente, debido a que no existe ningún compuesto que lo detenga, indicando que la fase de adaptación fue muy corta.

La velocidad de germinación del hongo bajó en presencia de quitosano en las primeras 12 h, debido a que la fase de adaptación del hongo fue más prolongada respecto al control ácido, principalmente en quitosano fresco. Sin embargo después de las 12 h la velocidad aumento, indicando que el hongo se adapta rápidamente a la presencia de quitosano.

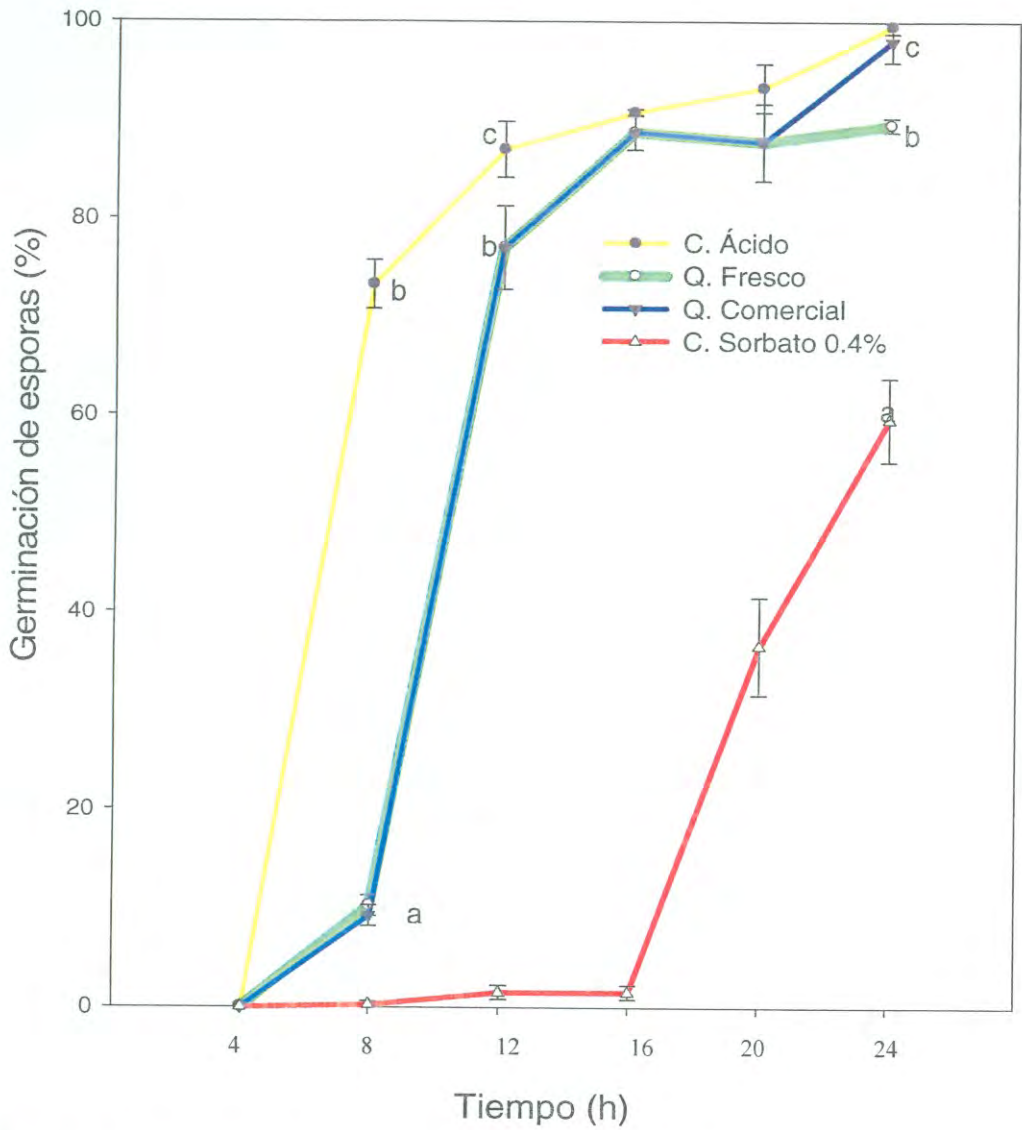


Figura 9. Efecto del quitosano sobre la germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* a 28°C.

Tabla 13. Efecto del quitosano (CQ₅₀) sobre la velocidad de germinación de esporas e índice fungistático sobre *Aspergillus parasiticus* a 28°C.

| Tratamiento | Vel. de germinación (esporas/h) | | Índice fungistático (%) | |
|----------------------|------------------------------------|---------|---------------------------|---------------------------|
| | 0-12 h | 12-24 h | 12 h | 24 h |
| C. Ácido | 21.75 | 2.00 | ----- | ----- |
| C. Sorbato 0.4% | 0.37 | 14.50 | 98.27 ± 4.94 ^a | 40.20 ± 4.24 ^a |
| Q. Fresco 6.70g/L | 14.69 | 4.70 | 41.25 ± 0.35 ^b | 10.05 ± 0.70 ^b |
| Q. Comercial 6.24g/L | 19.25 | 3.07 | 11.49 ± 3.88 ^b | 1.50 ± 2.12 ^c |

C: Control, Q: Quitosano. Diferente superíndice en las filas indica diferencia estadística. Prueba de Tukey p<0.05 (Infostat).

La velocidad de germinación del hongo es casi nula en las primeras 16 h en presencia de sorbato de potasio, debido a que la fase de adaptación del hongo fue muy prolongada, pero después la velocidad de germinación del hongo se incrementó notablemente, debido a que el hongo ya se adaptó a las condiciones, germinando a alta velocidad.

Los porcentajes de inhibición a las 20 y 24 h con respecto al control ácido se muestran en la Tabla 14. El sorbato de potasio tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la germinación de esporas de *A. parasiticus* respecto a los quitosanos. En el caso de los quitosanos, el obtenido por tratamiento químico (fresco) presentó mayor inhibición significativa ($p < 0.05$) respecto al quitosano comercial, el cual tuvo un porcentaje de inhibición bajo.

La germinación de esporas es un indicativo de la adaptación del hongo a las condiciones del medio. Se ha reportado que el calcio (Ca^{+2}) juega un papel importante en el proceso de germinación, acumulándose grandes cantidades en la espora (Plascencia-Jatomea, 2004). Por otro lado, McIntyre y col., (2001) reportan que el Ca^2 también es importante en el control del crecimiento de la hifa a través de la actina, participando en las señales de ramificación. El quitosano puede actuar como agente quelante del calcio, indisponiéndolo para su utilización por el hongo y retardando así la germinación de esporas.

Martínez-Camacho (2006) reportó que el quitosano causó un porcentaje de inhibición de germinación de esporas del 63.7% sobre *A. niger* a las 24 h de exposición. Así mismo, Quintana-Obregón (2006) encontró un 93.0% de inhibición del quitosano sobre la germinación de *Fusarium verticillioides* a las 44 h. Plascencia-Jatomea reportó un 42.52% de inhibición sobre la germinación de *Penicillium expansum*. Estos valores están por encima de los encontrados en este trabajo, indicando que el quitosano es más efectivo sobre estas especies de hongos que con *Aspergillus parasiticus*, ya que dicho efecto es dependiente de la especie del hongo expuesto.

Diámetro de esporas e hifas en la etapa de germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 en medio de cultivo sólido Czapeck

La Tabla 14 presenta el diámetro de las esporas e hifas de *A. parasiticus*, es importante mencionar que el diámetro de las esporas al inicio fue de $5.18 \pm 0.497 \mu\text{m}$. Se observó que a las 8 y 16 h en presencia de quitosano, el diámetro fue mayor ($p < 0.05$) con respecto a los controles ácido y sorbato. Los quitosanos no presentaron diferencia significativa entre si.

El diámetro de las esporas de *A. parasiticus* en presencia de los controles ácido y el sorbato de potasio, no presentaron diferencia significativa entre ellos.

El diámetro de las hifas a las 8 y 16 h fue mayor en los tratamientos con los quitosanos ($p < 0.05$) con respecto a los controles ácido y sorbato, aunque no se observó diferencia significativa entre ambos quitosanos. El diámetro de las hifas en presencia de los controles ácido y sorbato de potasio no fueron diferentes significativamente entre si. El aumento del diámetro de las esporas en presencia de quitosano se puede deber a que la espora, al no estar adaptada para germinar, sigue sintetizando compuestos como carbohidratos, lípidos y proteínas (principalmente enzimas), ocasionando mayor hinchazón de la misma. Plascencia-Jatomea (2004) reportó un incremento en el diámetro de esporas e hifas de *A. niger* en presencia de quitosano debido al estrés que este genera al hongo.

Deacon (1993) menciona que las esporas de *A. niger* cuando se incuban a temperaturas no óptimas para su crecimiento (44°C), continúan hinchándose, formando células redondas gigantes. Además, durante la prolongada fase de hinchamiento, el hongo madura normalmente y desarrolla la capacidad para producir esporas; de hecho, parece estar obligado a producirlas. Lo anterior puede ocurrir con la presencia de quitosano, ocasionado una mayor producción de aflatoxinas.

El incremento de las hifas del hongo en presencia de los quitosanos posiblemente puede deberse a lo reportado por McIntyre y col, (2001), señalando que la síntesis de quitina es fundamental para el crecimiento de las hifas y la diferenciación de la pared celular, ya que la quitina en la mayoría de los hongos es el componente principal de la pared celular (Deacon, 1993).

Tabla 14. Diámetro promedios de esporas e hifas de *Aspergillus parasiticus* en la etapa de germinación de esporas en medio de cultivo sólido Czapeck.

| Tratamiento | Diámetro de esporas (μm) | | Diámetro de hifas (μm) | |
|--------------|---------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | 8 horas | 16 horas | 8 horas | 16 horas |
| C. Ácido | 8.36 ± 0.795^a | 9.24 ± 0.549^a | 4.05 ± 0.319^a | 4.23 ± 0.883^a |
| C. Sorbato | 7.53 ± 0.794^a | 8.94 ± 0.716^a | ----- | 5.47 ± 0.860^a |
| Q. Comercial | 10.08 ± 0.804^b | 10.54 ± 0.504^b | 4.75 ± 0.219^b | 5.78 ± 0.640^b |
| Q. Fresco | 10.03 ± 0.850^b | 10.32 ± 0.493^b | 4.96 ± 0.492^b | 6.09 ± 0.807^b |

C: Control, Q: Quitosano. Diferentes superíndices en las filas indican diferencias estadísticas. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

Las enzimas quitina sintasas ubicadas en vesículas lisosomales son las responsables de catalizar la polimerización de la quitina, y éstas a su vez son activadas por cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (Campos-Gongora y col., 2007). McIntyre y col, (2001) reportan que cuando se interrumpe la cascada de la quitina sintasa para formar quitina en especies de *Aspergillus*, las paredes celulares de las hifas se hinchan, apareciendo conidióforos anormales y como es de esperarse, un contenido de quitina bajo.

Por otra parte, se conoce la capacidad del quitosano para quelar cationes, pudiendo afectar la activación de la cascada de la quitina sintasas, ocasionando la alteración morfológica de las hifas, principalmente hinchazón de éstas.

Microscopía de Epifluorecencia

Número de divisiones mitóticas de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992

En la Figura 10 se observan los núcleos presentes en las esporas e hifas de *A. parasiticus* y en la Figura 11 se muestra el número de divisiones mitóticas a diferentes tiempos de *A. parasiticus*.

Las esporas del hongo en presencia de los quitosanos presentaron mayor número de divisiones mitóticas a las 3 h, presentando alrededor del 40% de las esporas una división mitótica en comparación con los controles. Sin embargo, a las 6 h se incrementó la división celular de la espora de *A. parasiticus* junto con el sorbato de potasio con respecto al control agua y ácido, encontrándose en más del 40% de las esporas una división mitótica y alrededor del 20% con dos divisiones mitóticas, indicando que conforme pasa el tiempo la división celular de las esporas aumenta. A las 9 y 11 h hubo presencia de núcleos en las hifas del hongo, principalmente en el control agua (Figura 9a) y ácido (presentando hifas largas) ocasionando mayor número de divisiones mitóticas, respecto al con presencia de quitosano y sorbato, donde casi no hay germinación de la espora, y por consiguiente las hifas presentes son cortas y casi no presentaron núcleos en hifas (Figura 9b).

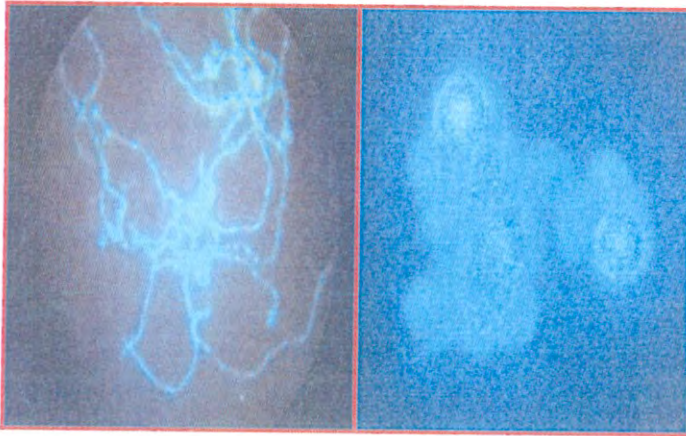


Figura 10. Presencia de núcleos en esporas e hifas de *Aspergillus parasiticus*, a las 9 horas a) control agua, b) quitosano comercial.

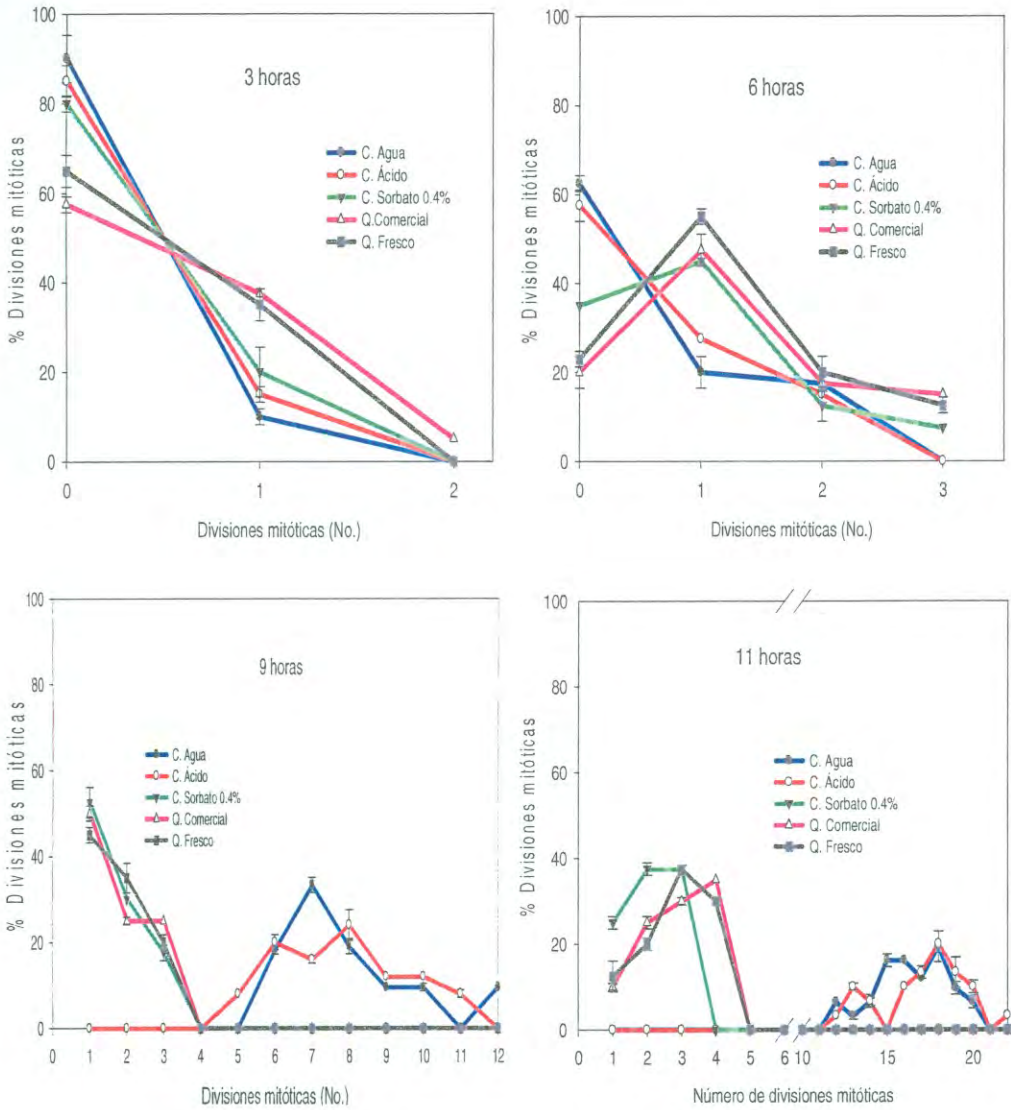


Figura 11. Número de divisiones mitóticas de *Aspergillus parasiticus* en medio líquido Czapeck a 28°C.

En las primeras 6 h se observaron más divisiones mitóticas en presencia de los quitosanos y de sorbato, esto puede deberse a que la espora, al no estar adaptada a la presencia de quitosano y sorbato de potasio, sigue sintetizando compuestos como carbohidratos, proteínas y enzimas para su adaptación y generando más divisiones mitóticas debido a que la germinación se retarda respecto a los controles, pudiéndose relacionar con el aumento en producción de aflatoxinas producidas por el hongo en presencia de quitosano. El hongo en presencia del control de agua y de ácido no encontró resistencia, germinando rápidamente y por lo tanto hay mas presencia de divisiones mitóticas a lo largo de la hifa en comparación a los tratamientos con quitosano.

Número de septos en hifas de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992

El conteo de septos en hifas se realizó mediante tinción con solución de Blanco de Calcoflúor, el cual es específico para teñir la quitina y los glucanos de las paredes celulares y septos (Momany y Taylor, 2000). El colorante tiñe el quitosano debido a la estructura semejante a la quitina, siendo un obstáculo para la visualización de los septos en el presente estudio (Figura 12b). Cabe mencionar que para visualizar los septos en presencia de quitosano se combinó la luz epifluorescente con la luz blanca del microscopio (Figura 12c).

La figura 13 presenta el números de septos presentes en las hifas de *A. parasiticus*. Las hifas del hongo en presencia de los controles agua y ácido, presentaron mayor número de septos respecto a los quitosanos, aumentando con el tiempo debido al alargamiento de la hifa. Se observaron hasta 6 septos a las 12 h y hasta 16 septos a las 15 h. Las hifas del hongo en presencia de los quitosanos fueron aseptadas a las 12 h, mientras que un bajo porcentaje eran septadas a las 15 h (< 40%). Las hifas en presencia de quitosano comercial presentaron un septo (20%) y dos septos (18%) a las 15 h. Las hifas en presencia de quitosano fresco presentaron un septo (22%), observándose hifas menos septadas respecto a las hifas en presencia de quitosano comercial. El hongo en presencia de sorbato de potasio a las 12 y 15 h no presentó hifas y por lo tanto no hubo septos, pero a las 28 h se observaron hifas largas septadas (7-9 septos).

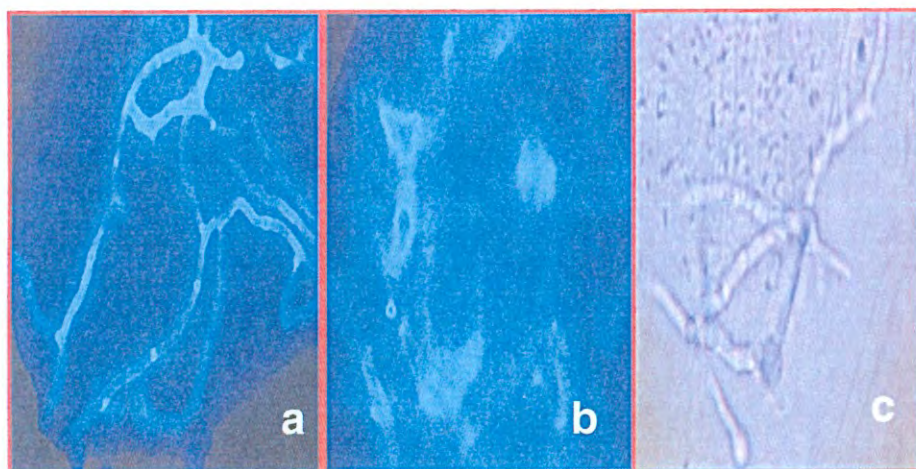


Figura 12. Presencia de septos en hifas de *Aspergillus parasiticus* en medio líquido Czapeck, a las 15 h, a) septos en control agua con luz violeta, b) septos en quitosano con luz violeta, c) septos con quitosano con luz violeta y blanca.

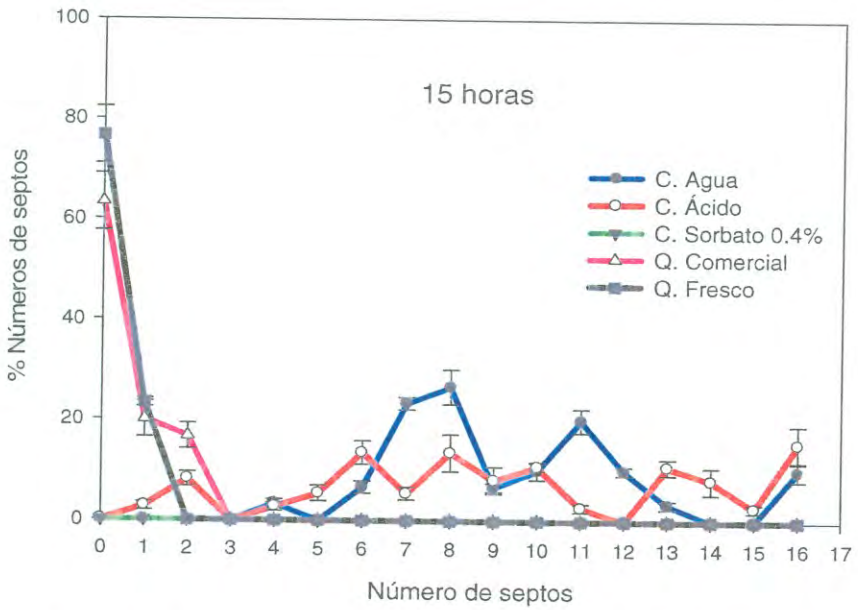
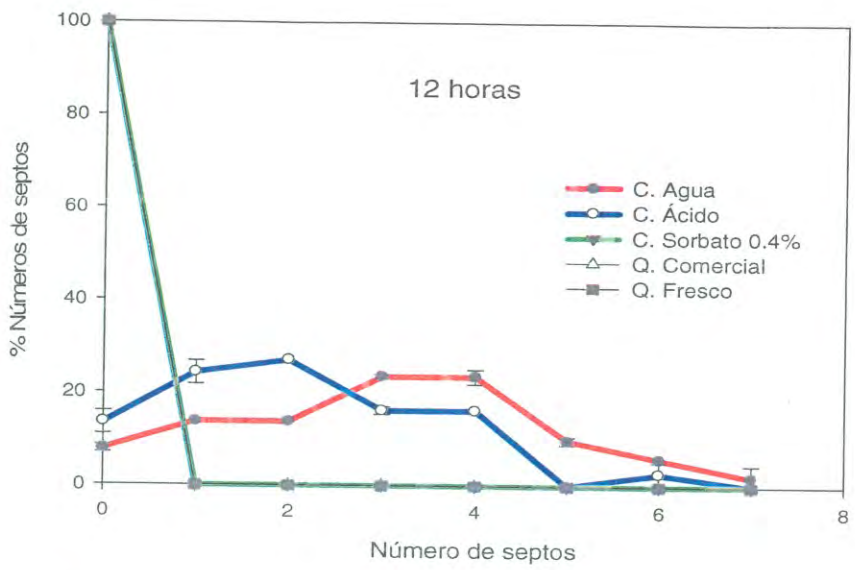


Figura 13. Número de septos en hifas de *Aspergillus parasiticus* en medio líquido Czapeck, a 28°C.

Plascencia-Jatomea (2004), reportó que las hifas de *A. niger* fueron aseptadas en presencia de quitosano debido al efecto tóxico que presenta el biopolímero hacia el hongo. Como se mencionó anteriormente, McIntyre y col., (2001) reportan que el mecanismo de la quitina sintasa es importante en la formación del septo, debido a que está compuesto principalmente por quitina. El quitosano como ya se ha descrito anteriormente, tiene la capacidad de quelar metales responsables de la activación de la quitina sintasa, interrumpiendo la formación de quitina, y por consiguiente la formación del septo como se observa en el presente estudio. Por otro lado (Deacon, 1993) menciona que la formación del septo se produce cuando hay división celular a lo largo de las hifas, y como se describió anteriormente, las hifas en presencia de quitosano son muy cortas disminuyendo la división celular, pudiendo deberse a este motivo la ausencia del septo en *A. parasiticus* en presencia de los quitosanos.

Diámetro de esporas e hifas de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 en medio líquido Czapek

La tabla 15 presenta el diámetro de las esporas en medio líquido Czapek. Es notable que el diámetro de esporas aumente conforme pasa el tiempo como un proceso natural de la espora en la etapa de germinación. El diámetro de las esporas del hongo a las 6, 9 y 11 h en presencia de los quitosanos fue mayor, presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los controles agua, ácido y al sorbato. El aumento del diámetro en las esporas en presencia de quitosano, puede deberse a que la espora al no estar adaptada para germinar, sigue sintetizando compuestos ocasionando una mayor hinchazón, como ya se ha mencionado anteriormente.

La tabla 16 presenta el diámetro de hifas (número de septos) en medio líquido Czapek. El diámetro de hifas se incrementó conforme el tiempo por un proceso natural de hidratación (Deacon, 1993). El diámetro es mayor en todos los tiempos evaluados en presencia de los quitosanos presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los controles agua, ácido y sorbato.

Tabla 15. Diámetros de esporas de *Aspergillus parasiticus* en medio líquido Czapeck, a 28°C.

| Tiempo(h) | Diámetro promedio de esporas (µm) | | | | |
|-----------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Control Agua | Control Ácido | Control Sorbato | Quitosano comercial | Quitosano fresco |
| 0 | 5.18 ± 0.497 | 5.18 ± 0.497 | 5.18 ± 0.497 | 5.18 ± 0.497 | 5.18 ± 0.497 |
| 6 | 5.32 ± 0.544 ^a | 5.08 ± 0.748 ^a | 4.80 ± 0.555 ^a | 7.08 ± 0.601 ^b | 7.30 ± 0.609 ^b |
| 9 | 5.88 ± 0.648 ^a | 5.29 ± 0.736 ^a | 4.95 ± 0.507 ^a | 8.01 ± 0.696 ^b | 8.59 ± 0.856 ^c |
| 11 | 5.96 ± 0.781 ^a | 5.54 ± 0.677 ^a | 4.83 ± 0.647 ^a | 8.98 ± 0.895 ^b | 9.08 ± 0.755 ^b |

Diferente superíndice en las columnas indica diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

Tabla 16. Diámetro promedio de hifas de *Aspergillus parasiticus* en medio líquido Czapeck, a 28°C.

| Diámetro promedio de hifas (μm) | | | | | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Tiempo(h) | Control Agua | Control Ácido | Control Sorbato | Quitosano Comercial | Quitosano Fresco |
| 12 | 1.87 ± 0.320^a | 1.89 ± 0.393^a | ----- | ----- | ----- |
| 15 | 1.88 ± 0.382^a | 1.93 ± 0.423^a | ----- | 4.71 ± 0.489^d | 4.78 ± 0.454^d |
| 18 | 2.88 ± 0.357^a | 2.24 ± 0.525^a | 1.95 ± 0.264^a | 4.98 ± 0.875^d | 5.75 ± 0.691^d |

Diferente superíndice en las filas indican diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

El aumento del diámetro de hifas del hongo en presencia de quitosano respecto a los controles, se puede deber a que el biopolímero tiene la capacidad de quelar metales, necesarios para la activación del mecanismo quitina sintasa (responsable de la polimerización de quitina), ocasionando hinchamiento y malformaciones en las hifas de *A. parasiticus* (McIntyre y col., 2001).

Efecto del Quitosano sobre la Producción de Aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992

Aflatoxinas totales

En la tabla 17 se muestra el efecto del quitosano sobre la producción de aflatoxinas totales por *A. parasiticus* (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) a diferentes intervalos de tiempo. Primeramente es importante mencionar que el maíz comercial utilizado en la preparación del medio de cultivo presentó un alto valor de aflatoxinas totales (160 µg/Kg), el cual se consideró en el análisis de resultados. A los 4 días el hongo en presencia del control agua, sorbato y quitosano fresco produjeron mayor cantidad de aflatoxinas ($p < 0.05$) con respecto al control ácido y al quitosano comercial. A los 8 días el hongo produjo mayor cantidad de aflatoxinas en presencia del control agua ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos, mientras que a los 12 días se produjeron mayor cantidad de aflatoxinas ($p < 0.05$). Al final de la cinética (16 días) el hongo en presencia de quitosano comercial presentó la mayor cantidad de aflatoxinas ($p < 0.05$).

En la figura 14 se observa mejor el comportamiento de la producción de aflatoxinas totales a diferentes intervalos de tiempo. En el control agua se observó un comportamiento normal de producción de aflatoxinas, donde se presenta una máxima a los 8 días y después disminuye, probablemente por reducción de los nutrientes disponibles (fuentes de carbono y nitrógeno). A los 4 y 8 días en el control agua se detectó la mayor cantidad de aflatoxinas, esto debido a que no había en el medio ningún supresor que afectará la producción

Tabla 17. Efecto del quitosano sobre la producción de aflatoxinas totales por *Aspergillus parasiticus*.

| Tratamiento | Aflatoxinas totales ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | |
|--------------|---|------------------|--------------------|-------------------|
| | 4 días | 8 días | 12 días | 16 días |
| C. Agua | 560 ± 7.07^c | 690 ± 7.07^d | 600 ± 7.07^b | 530 ± 14.14^a |
| C. Ácido | 510 ± 7.07^b | 560 ± 7.07^b | 460 ± 7.07^a | 680 ± 7.07^c |
| C. Sorbato | 540 ± 7.07^c | 470 ± 7.07^a | 1090 ± 28.28^c | 590 ± 7.07^b |
| Q. Comercial | 470 ± 7.07^a | 660 ± 7.07^c | 585 ± 35.35^b | 750 ± 14.14^d |
| Q. Fresco | 540 ± 7.07^c | 650 ± 7.07^c | 580 ± 21.21^b | 700 ± 7.07^c |

C: Control, Q: Quitosano. Diferente superíndice en las filas indica diferencia estadística. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat).

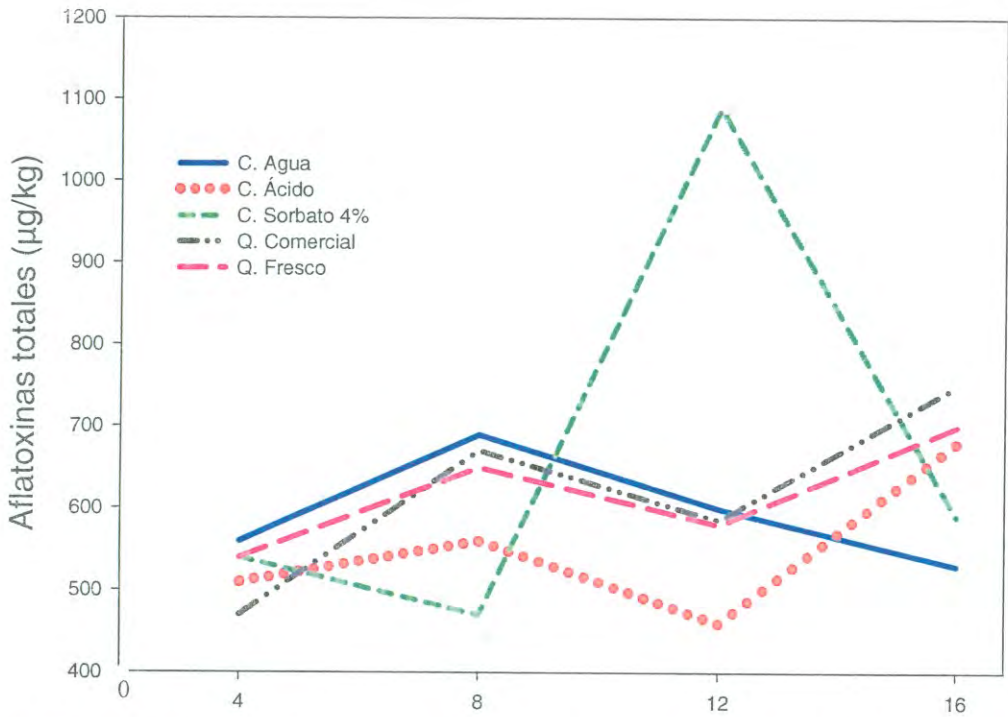


Figura 14. Efecto del quitosano en la producción de aflatoxinas totales por *Aspergillus parasiticus*.

de las mismas y los nutrientes estaban más disponibles. En el control con sorbato de potasio, se observó que a los 8 días se presentó una disminución en la producción de aflatoxinas, menor que en el resto de los tratamientos.

Lo anterior posiblemente debido a que el sorbato disminuyó la asimilación de carbono de algunos sustratos como la glucosa, acetato, succinato, piruvato, lactato, oxaloacetato (Sofos, 1987), que son importantes para la biosíntesis de los metabolitos secundarios. Sin embargo, a los 12 días se incrementó notablemente la producción de aflatoxinas, siendo la mayor ($p > 0.05$) de todos los tratamientos. Esto puede ser una respuesta al estado de estrés al que estaba sometido el hongo, activando la G-proteína responsable a su vez de activar las señales de transcripción (aflR y aflJ) para desencadenar la cascada en la biosíntesis de aflatoxinas (Ehrlich y col., 2002). Además, en este intervalo de tiempo (12 días), el hongo está totalmente adaptado a la presencia de sorbato en el medio y así puede utilizarlo como fuente de nutrientes.

La producción de aflatoxinas en presencia de ácido acético (control) fue menor de los 4 a los 12 días con respecto al control agua, lo cual se puede deber a que las aflatoxinas G1 y G2 se producen en menor cantidad a pH bajos (Ehrlich y col, 2005). Sin embargo, en el intervalo de los 12 a los 16 días la producción de aflatoxinas en el control ácido y en los quitosanos (disueltos en ácido acético) se incrementó significativamente. Este comportamiento puede ser explicado porque algunos hongos como *Aspergillus*, cuando se acaban los nutrientes del medio, son capaces de utilizar el ácido acético como fuente de carbono ocasionando un aumento en la actividad enzimática de hasta veinte veces por la vía del ciclo del glioxilato, el cual es un mecanismo alternativo para producir azúcares, explicando así un incremento como el que se observó en la producción de aflatoxina en dichos tratamientos.

La producción de aflatoxinas por el hongo en presencia de los quitosanos no se vio afectada, ya que el hongo posiblemente pudo utilizarlo como fuente de carbono y de nitrógeno (por el grupo amino, y a residuos de proteínas) una vez adaptado a su presencia, o debido al estrés que pudo generar el quitosano al hongo, ocasionando un incremento en las señales de transcripción (aflR y aflJ), causando una mayor producción de aflatoxinas y por consiguiente un aumento en la esporulación (Ehrlich y col., 2002). Bennett y

col., (2007) indican que las condiciones ambientales requeridas para la producción de aflatoxinas y la esporulación son similares para ambos procesos y ocurren a la misma hora.

Deacon (1993) reporta que las esporas de *Aspergillus* cuando se incuban en condiciones no óptimas para su crecimiento, la germinación se retarda y el hongo madura normalmente desarrollando la capacidad para producir esporas más rápidamente y en mayor cantidad que cuando se encuentra en condiciones normales; de hecho parece estar obligado a producirlas. Bautista-Baños y col, (2006) señalan que en algunos casos el quitosano estimula la esporulación como respuesta al estrés inducido por este polímero, por lo tanto esto también podría ser otra causa del aumento en la producción de aflatoxinas, por el incremento de la actividad de los factores de transcripción responsables de la biosíntesis de aflatoxinas.

Aflatoxina B1 (AFB1)

En todos los tratamientos y en todos los tiempos se encontró la presencia de AFB1 por medio del análisis por HPLC. La figura 15 muestra los cromatogramas de AFB1 producidos por *A. parasiticus* en todos los tratamientos. Los dos primeros picos que se observan corresponden al frente de solvente, el pico que se encuentra en un tiempo de retención de 3.5-3.6 min corresponde a la AFB1, el cual se comprobó con la curva estándar de AFB1 y posiblemente los otros picos que se observan a un tiempo de retención de 4.5 y 5.5 min puedan ser la aflatoxina G2 y B2, de acuerdo con el tiempo de elución por el método de cuantificación utilizado (NOM-188-SSA1-2002).

En la tabla 18 se muestran los valores de AFB1 producida por *A. parasiticus* a diferentes tiempos en presencia de quitosano (quitosano comercial y quitosano fresco), y en controles (agua, ácido acético, sorbato de potasio). Se observa que la producción de AFB1 fue disminuyendo en todos los tratamientos hasta los 12 días. En el intervalo entre los 12 y 16 días se presentó un incremento en la producción.

El hongo en presencia del control ácido presentó la mayor producción de AFB1 a todos los tiempos ($p < 0.05$), sin embargo a los 12 días en el sorbato y

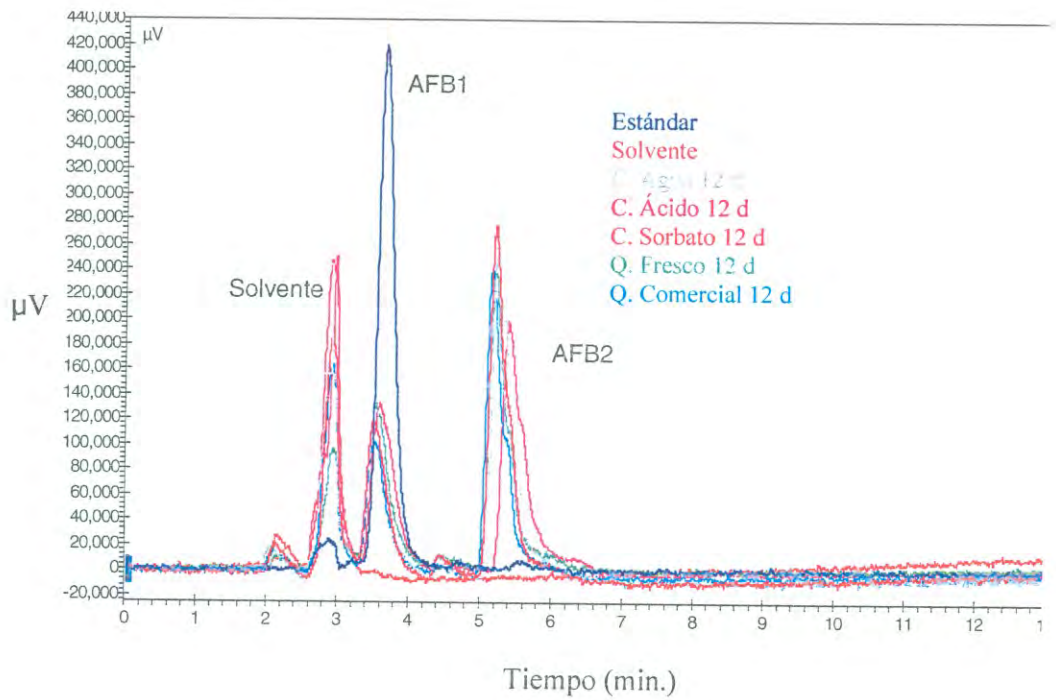


Figura 15. Cromatogramas obtenidos para aflatoxina B1

Tabla 18. Producción de aflatoxina B1 por *Aspergillus parasiticus*.

| Tratamiento | Aflatoxina B1 (µg/Kg) | | | |
|--------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 4 días | 8 días | 12 días | 16 días |
| C. Agua | 177.99 ± 0.898 ^c | 54.34 ± 11.391 ^a | 40.93 ± 20.350 ^a | 90.51 ± 23.080 ^a |
| C. Ácido | 286.01 ± 17.161 ^d | 260.73 ± 2.050 ^b | 117.40 ± 11.943 ^b | 134.93 ± 6.218 ^a |
| C. Sorbato | 138.36 ± 13.039 ^b | 73.61 ± 13.039 ^a | 110.68 ± 24.366 ^b | 131.14 ± 25.066 ^a |
| Q. Comercial | 101.99 ± 13.470 ^a | 95 ± 12.466 ^a | 39.78 ± 9.723 ^a | 110.51 ± 25.386 ^a |
| Q. Fresco | 151.09 ± 4.179 ^{bc} | 107.6 ± 15.330 ^a | 72.37 ± 18.717 ^{ab} | 120.71 ± 32.420 ^a |

C: Control, Q: Quitosano. Diferentes superíndices en las filas indican diferencias estadísticas. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat)

el control de ácido acético fueron iguales estadísticamente. A los 16 días los tratamientos no presentaron diferencia significativa entre si. La producción de AFB1 en presencia de quitosano fue menor ($p>0.05$) hasta los 8 días con respecto al control ácido. El hongo en presencia del ácido acético produjo mayor cantidad de AFB1 y puede ser debido a que a pH más bajos (<3.5) la producción se incrementa por la inhibición de las aflatoxinas G1 y G2 (la monooxigenasa citocromo p450 necesaria para la formación de AFG1 es más inestable a pH menores que la monooxigenasa P450 requerida para la formación de AFB1) (Ehrlich y col., 2005).

En la tabla 19 se muestra la repetición de la producción de AFB1 producida por *A. parasiticus*. Se observa que el hongo en presencia del control ácido produjo mayor cantidad de AFB1 ($p<0.05$) y en presencia de quitosano produjo menor cantidad hasta los 8 días, al igual que con el sorbato de potasio, con respecto al control ácido. Sin embargo, a los 16 días la producción fue igual al control ácido. Comparando la producción de AFB1 en presencia de ambos quitosanos, se observa que la producción es más baja cuando el hongo está en contacto con el quitosano comercial. En general, el comportamiento fue muy semejante en ambos ensayos, indicando que el ensayo utilizado es reproducible.

Se ha reportado que el quitosano inhibe totalmente la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus in vitro* (Fang y col., 1994). Los mecanismos que se reportan involucrados en la inhibición de la producción de aflatoxinas son los siguientes:

El quitosano activa mecanismos de defensa en plantas y granos, principalmente compuestos fenólicos, fitoalexinas, ácido salicílico y enzimas como quitinasa, quitosanas y glucanasas (Fajardo y col., 1995; Vander y col., 1998; Sathiyabama y Balasubramanian, 1998; Ozeretskovskaya y col., 2009). Por otra parte, Hua y col., (1999) reportaron que los compuestos fenólicos inhiben la producción de aflatoxinas, actuando en los pasos iniciales de la biosíntesis provocando que los precursores no se generen. Latha y col., (2007) reportaron que existe una relación negativa entre el total de contenido fenólico en los granos y la producción de aflatoxina. Adom y Liu, (2002) mencionan que el grano entero de maíz contiene fenoles en cantidades de 2.12 y 15.55 $\mu\text{mol/g}$ (Salinas-Moreno, 2007)

Tabla 19. Producción de aflatoxina B1 por *Aspergillus parasiticus* (repetición).

| Aflatoxina B1 ($\mu\text{g/Kg}$) | | | | |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Tratamiento | 4 días | 8 días | 12 días | 16 días |
| C. Agua | 180.99 ± 9.327^b | 62.75 ± 5.077^a | 50.48 ± 8.865^a | 82.24 ± 19.820^a |
| C. Ácido | 250.3 ± 6.300^c | 173.92 ± 7.693^c | 104.05 ± 4.844^b | 127.48 ± 6.788^{ab} |
| C. Sorbato | 130.23 ± 24.530^a | 121.76 ± 24.536^b | 146.54 ± 5.784^c | 167.65 ± 2.170^b |
| Q. Comercial | 100.98 ± 12.522^a | 92.28 ± 12.523^{ab} | 52 ± 9.383^a | 105.59 ± 32.079^a |
| Q. Fresco | 121.30 ± 1.308^a | 98.24 ± 1.300^{ab} | 93.12 ± 6.074^b | 152.48 ± 4.341^b |

C: Control, Q: Quitosano. Diferentes superíndices en las filas indican diferencias estadísticas. Prueba de Tukey $p < 0.05$ (Infostat)

Además, reporta que los compuestos fenólicos en el grano de maíz están conformados por flavonoides y ácidos fenólicos, concentrados principalmente en el pericarpio. Los ácidos fenólicos más importantes en el grano de maíz son el ferúlico, p-cúmarico y sinápico (Classen y col., 1990). Fajardo y col., (1995) reportaron que el quitosano al inducir la producción de ácidos fenólicos, reduce la producción de aflatoxinas debido a su capacidad antioxidante, actuando sobre los radicales libres producidos durante el estrés oxidativo del hongo, los cuales son responsables de la activación de la biosíntesis de aflatoxinas. Con base a los reportes antes mencionados, se podría esperar que el quitosano indujera los compuestos fenólicos presentes en el grano de maíz, reduciendo la producción de aflatoxinas; sin embargo, en el presente estudio no sucedió así, y puede ser debido a efecto de la doble esterilización realizada al maíz en el presente estudio, ocasionando la pérdida de los compuestos fenólicos del grano de maíz. Fanelli y Fabbri (1989) reportaron que la producción de aflatoxinas en semillas esterilizadas fue mucho mayor que cuando no se esterilizaban, sugiriendo que durante la esterilización en autoclave se producen daños biológicos, químicos y físicos y otros mecanismos naturales de defensa de las semillas se dañan.

Otro mecanismo sugiere que el quitosano tiene la capacidad de quelar metales importantes en la producción de aflatoxinas (Kurita, 2006; Klich y col., 2007). Fang y col., (1994) reportaron que el quitosano con grado de desacetilación de 71.5%, a una concentración de 4.0 y 5.0 mg/mL inhibe totalmente la producción de aflatoxinas totales por *A. parasiticus* NRRL 2999 a los 18 días a 28°C y pH 5.4 en un medio de cultivo propuesto por Hara y col., (1974) [conteniendo buffer de acetato de sodio y ácido acético (1 litro), (NH₄)H₂PO₄ (10 g), K₂HPO₄ (1 g), MgSO₄·7H₂O (0.5 g), KCl (0.5 g), FeSO₄·7H₂O (0.01 g), sacarosa (30 g), HgCl₂ (5x10⁻⁴), licor de maíz (0.5 g), agar (20 g)].

Por otro lado, Cuero y col., (1991) indican que las soluciones de N-carboximetilquitosano inhibió la producción de aflatoxinas por la cepa de *A. flavus* y *A. parasiticus* en un medio de cultivo sintético. El grano de maíz cuenta con los nutrientes necesarios para la biosíntesis de aflatoxinas (fuente de carbono, fuente de nitrógeno y minerales, entre otros); sin embargo, en los estudios antes mencionados se utilizan medios sintéticos para evaluar el efecto

del quitosano sobre la producción de aflatoxinas, dando resultados de inhibición muy alentadores, pero presentan limitaciones, ya que el polímero cuando se encuentra en un medio sintético actúa de manera diferente que en un medio natural como el grano de maíz utilizado en este estudio (Khich y col., 2007). En un medio sintético los minerales están expuestos libremente a la presencia de quitosano, es por ello que el mecanismo de quelación funciona perfectamente en este sistema, pero está muy lejos de la realidad, ya que en el grano de maíz los metales no están expuestos, sino que se encuentran formando parte de la estructura del grano, haciendo más difícil la interacción entre el quitosano y los metales, por lo tanto su propiedad quelante es limitada, provocando que la producción de aflatoxinas ocurra libremente.

Mutagenicidad del Quitosano (CQ₅₀)

El ensayo de Ames utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas. Para la detección de sustancias mutagénicas se incluye un sistema de activación metabólica (fracción microsomal de hígado de rata).

Después del tiempo de incubación, las colonias revertantes son contadas. Para el cálculo de la expresión, se divide el número de revertantes en las placas con muestra problema (ácido acético, sorbato de potasio, quitosano ensilado, quitosano fresco y quitosano comercial) entre el número de revertantes espontáneas de las placas control. Un valor igual o mayor a dos, indican la presencia de mutágenos.

Para llevar a cabo el ensayo se requiere de ciertas especificaciones, tal es el caso de los solventes, ya que en la prueba se emplean solventes orgánicos donde el quitosano es insoluble. Es por ello que la solución de quitosano se hizo con ácido acético calculando que el pH final fuera de 6.5, pH al cual es permitido realizar la prueba sin que afecte el crecimiento de la bacteria. El ensayo se llevó a cabo en presencia y ausencia de la mezcla enzimática S9, para verificar si el quitosano necesita o no de activación.

En la tabla 20 se muestran los resultados del ensayo de mutagénesis (revertantes) para los quitosanos (CQ₅₀), control de ácido acético y del sorbato

Tabla 20. Potencial mutagenico de quitosanos usando *Salmonella typhimurium* TA 98, con y sin activación enzimática en la prueba de Ames.

| Tratamiento | Sin enzima S9 | | Con enzima S9 | |
|--------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 1 | Ensayo 2 |
| C. RE espontáneas | 26.33 ± 5.86 | 34.00 ± 1.00 | 41.33 ± 6.35 | 44.66 ± 4.16 |
| C. Ácido | 26.33 ± 2.08 | 34.66 ± 0.57 | 35.33 ± 4.04 | 41.66 ± 1.15 |
| C. Sorbato | 21.66 ± 1.53 | 37.66 ± 5.13 | 25.00 ± 2.64 | 30.66 ± 7.37 |
| Q. Ensilado | 23.66 ± 4.93 | 27.66 ± 3.21 | 31.33 ± 3.21 | 38.00 ± 1.73 |
| Q. Fresco | 30.33 ± 6.11 | 40.00 ± 6.16 | 41.75 ± 8.06 | 39.75 ± 0.95 |
| Q. Comercial | 30.33 ± 4.16 | 34.00 ± 8.71 | 40.66 ± 5.03 | 35.66 ± 2.08 |

RE: Revertantes, C: Control, Q: Quitosano

de potasio 0.4%. Con base en las condiciones de la prueba, la muestra de quitosano ensilaje, el quitosano fresco, el quitosano comercial, el control de ácido acético, y el sorbato de potasio al 0.4% no presentaron actividad mutagénica frente a las cepas probadas de *S. typhimurium* (TA 98).

La figura 16 se presenta la curva de AFB1 usada como control positivo en el ensayo de Ames. Se observa que todas las concentraciones usadas en la curva de aflatoxinas tuvieron un efecto mutagénico, ya que el valor de la división entre el número de revertantes en las placas con aflatoxina y número de revertantes de las placas control (41.33) es mayor a 2, indicando la presencia de actividad mutagénica. Al aumentar la concentración de aflatoxina, la actividad mutagénica también aumenta; sin embargo, a la concentración de 1000 ng, el efecto disminuyó, esto puede deberse a que esta concentración resulta letal para la bacteria, limitando su crecimiento.

El quitosano durante varios años se ha reportado como no mutagénico, siendo considerado como sustancia GRAS (generalmente reconocida como seguro) para humanos. La mayoría de los estudios mutagénicos del quitosano se realizan con ratas, por los inconvenientes que presenta el quitosano para el ensayo de Ames ya mencionados. Sin embargo, Nam y col., (2000) evaluaron el efecto mutagénico de oligosacáridos disueltos en agua con y sin activación metabólica (S9) por el ensayo de Ames, encontrando resultados negativos como los mostrados en este estudio. Además, se ha evaluado el poder antimutagénico de los oligosacáridos de quitosano por el ensayo de Ames (Nam, 2001) y con ensayos *in vivo* con ratones sobre el mutágeno 2-amino-3,8-dimetilimidazol-[4,5]quinoxalina (MeIQx) (Shon y col., 2001) presente en carne frita, encontrando que los oligosacáridos modificaron su mutagenicidad, actuando como protector antimutagénico, proponiendo que el efecto se debía a que dichos polímeros alteran las enzimas como el citocromo P450 y los cofactores en el hígado, responsables de la activación del mutágeno.

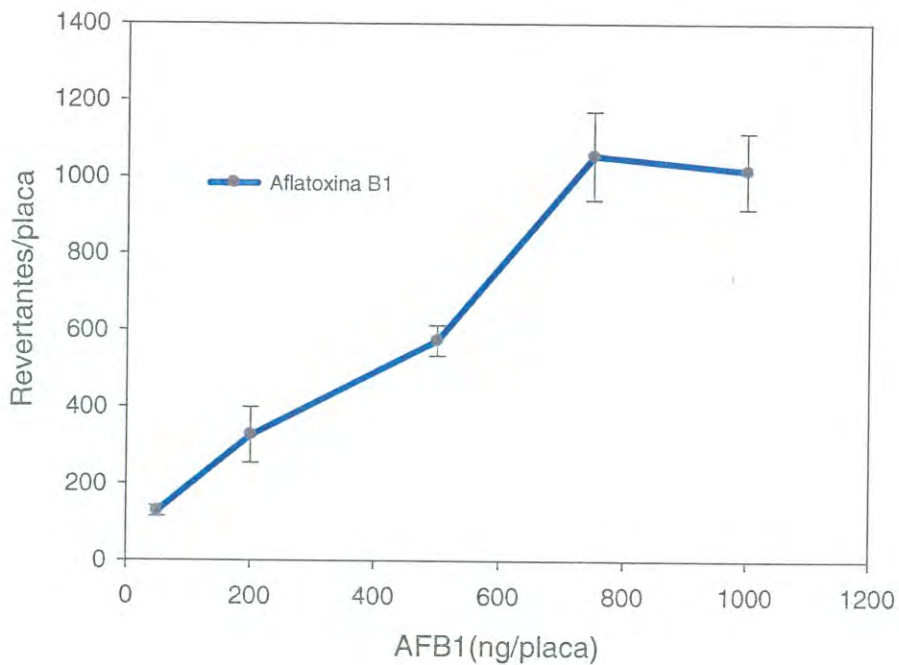


Figura 16. Curva de aflatoxina B1 usada como control positivo en la prueba de Ames.

CONCLUSIONES

A partir de cabezas de camarón *Litopenaeus vanameii* se obtuvo quitosano de buena calidad por tratamiento biológico (ensilaje) y por tratamiento químico (fresco), con características semejantes a los quitosanos obtenidos industrialmente. Las CQ_{50} de quitosano comercial y quitosano fresco fueron efectivas para detener el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* (>50%), aún por encima del control de sorbato de potasio. Los quitosanos fueron más efectivos para detener la germinación de esporas dentro de las 12 h, siendo el quitosano fresco el más efectivo. La presencia de quitosano afectó la morfología del hongo, incrementando el diámetro de esporas e hifas, mostrando hifas morfológicamente irregulares y cortas. Además, la presencia de quitosano y sorbato de potasio ocasionaron un incremento del número de divisiones mitóticas en la espora. Asimismo, afectó la septación del hongo, interrumpiendo su formación. El quitosano y el sorbato de potasio no fueron capaces de inhibir la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus*, donde la presencia de ácido acético tuvo mayor influencia, incrementando la producción de AFB1, sin embargo hasta los 8 días la producción de aflatoxinas en presencia de quitosano disminuyó respecto al control ácido. Los quitosanos no presentaron un efecto mutagénico ante *Salmonella typhimurium*.

RECOMENDACIONES

Utilizar otro tipo de tinción que no interfiera con la visualización del septo en presencia de quitosano.

Cuantificar el contenido de quitina en el hongo en presencia de quitosano, para ver el efecto sobre la enzima quitina sintasa y relacionarlo con las alteraciones morfológicas del hongo.

Utilizar luz ultravioleta para esterilizar el maíz que se utilice en la producción de aflatoxinas, para no afectar la composición química de compuestos fenolicos del grano.

Medir la esporulación y el pH del hongo en presencia de quitosano a diferentes intervalos de tiempo, para relacionarlo con la producción de aflatoxinas.

Cuantificar los compuestos fenólicos del grano de maíz en presencia de quitosano y relacionarlos con la cuantificación de aflatoxinas, para relacionarlos con la finalidad de conocer si el quitosano induce.

Cuantificar la producción de aflatoxinas en medio de cultivo sintéticos y en grano de maíz en presencia de quitosano, para establecer la capacidad quelante del polímero y su relación con la producción de micotoxinas

Utilizar una combinación de quitosano y un antioxidante para determinar el efecto sinergista sobre la producción de aflatoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M.L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S79-S84.
- Abdollahi, A., y Buchanan, R.L. 1980. Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. 40th Annual meeting of the Institute of Food Technologists. 1365-2621.
- Adom, K. K., y Liu, R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182-6187.
- Agulló, E., Albertengo, L., Pastor, A., Rodríguez, M.S., y Valenzuela, F. 2004. Caracterización de quitina y quitosano. En: Quitina y Quitosano: Aplicaciones en alimentación y control ambiental. 1^a ed. Ed. Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp.224.
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., y Vernet, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant. Cell. Rep.* 22:608-614.
- Alzwei, A.O., Aldoo, K.E., Elgerb, A.M., y Candlish, A.A.G. 2004. Production of extracellular enzymes and aflatoxins in solid substrate fermentation with aflatoxigenic *Aspergillus spp.* *Mycotoxin Res.* 20:87-94.
- Anguiano-Ruvalcaba, G.L., Cortina, V.A.V., y Guzmán de Peña, D. 2005. Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su generación por acidificación de la masa. *Salud Pública de México.* 47:369-375.
- Antonacci, L., Salvat, A.E., Faifer, C., y Godoy, H.M. 1999. Suppression of spore germination and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* during and after exposure to high levels of phosphine. *Mycopathologia.* 147:83-87.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of AOAC International. 15th ed. Arlington, VA.
- Argüelles, W., Heras, A.C., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche, C., y Román, J.S. 2004. Caracterización de quitina y quitosano. En: Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. 1^a ed. Ed. Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp.312.

- Arenas, G.R. 2003. *Micología medica ilustrada*. Segunda edición. Ed McGraw Hill. México. Pp. 227-232.
- Ayala, F.D., y Rodríguez, E.P. 2008. Micobiota y producción de fumonisinas y aflatoxinas en grano de maíz (*Zea mays L.*), cosechado en el 2006 en el sur de Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. Pp 58-69.
- Bailly, J.D., y Guerre, P. 2009. Safety of meat and processed meat. Ed. Burjassot Spain. *Food Microbiology and Food Safety*. Pp.52.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., y Wilson, C.L. 2006. Chitosan as a potential compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop. Prot.* 25:108-118.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., y Bosquez-Molina, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22:178-186.
- Beaney, P., Mendoza, J.L., y Healy, M. 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80:145-150.
- Bennett, J.W., y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews.* 16: 497-516.
- Bennett, J.W., Kale, S., y Yu, J. S. 2007. Aflatoxins: Background, toxicology, and molecular biology. Ed. Foodborne Diseases. *Human. Press.* Pp 355-373.
- Bressani, R., Breuner, M., y Ortiz, M. 1989. Contenido de fibra ácido y neutro detergentes y de minerales menores en maíz y su tortilla. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 39(3):382-391.
- Bucio-Villalobos, C.M., Guzman de Peña, D., y Peña-Cabriales, J.J. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología.* 18:83-87.
- Bullerman, L.B. 1999. Mycotoxins-Classification. En: Encyclopedia of food microbiology. Ed: Richard, K.R. Elsevier, Oxford. Pp: 1512-1520.
- Bullerman, L.B. 2002. Processing effects on mycotoxins: Introduction. En: Mycotoxins and food safety. Ed: Devries, J.W.; Trucksess, M.W., y Jackson, L.S. Kluwer Academic/Plenum, New York, NY. Pp: 155-156.

- Campos-Gongora, E., Ebery, F., Willhoeft, U.V., Said, Said, S.F., y Tannich, E. 2007. Clonación y análisis de la estructura primaria de quitina sintetasas de *Entamoeba histolitica*. Perfil de expresión durante el enquistamiento. *Ciencia UANL*. 8(4):470-476.
- CAST. 2003. Micotoxins. Risks in plant, animal and human systems. Ames, Iowa. Pp. 152-155.
- Chan, V., Mao, H.Q., y Leong, K.W. 2001. Chitosan-induced perturbation of dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine membrane bilayer. *Langmuir*. 17(12): 3749-3756.
- Chang, P.K., Matsushima, K., Takahashi, T., Yu, J., Abe, K., Bhadnagar, D., Gwo-Fang, Y., Koyama, Y., y Cleveland, T.E. 2007. Understanding nonaflatoxicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research. *Appl. Microbiol. Biot.* 76(5):977-984.
- Cheah, L.H., Page, B.B.C., y Sheperd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of sclerotina carrots. *N. Z. J. Crop. Hort. Sci.* 25:89-92.
- Classen, D., Arnason, J.T., Serratos, A., Lambert, J.D.H., Nozillo, C., y Philoéne, B.J.R. 1990. Correlation of phenolic acids content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT's collections. *J. Chem. Ecology*. 16(2): 301-314.
- CONAPESCA. 2009. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Anuario Estadístico de Pesca. <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/>.
- COSAES. Comité de Sanidad Acuícola en Sonora, A.C. 2009. <http://www.cosaes.com.mx> .2009
- Cota-Arriola, O. 2007. Obtención y estudio de quitosano y biopelículas funcionales de compositos de quitosano. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. Pp. 55-58.
- Cuero, R., Ouellet, T., Yu, J., y Mogongwa, N. 2003. Metal ion enhancement of fungal growth, gene expression and aflatoxin synthesis in *Aspergillus flavus*: RT-PCR characterization. *J. Appl. Microbiol.* 94:953-961.
- Cuero, R.G., Osuji, G., y Washington, A. 1991. N-carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnol. Lett.* 13:41-444.
- Davis, N.D., Diener, U.L., y Agnihotri, V.P. 1967. Production of aflatoxins B1 and G1 in chemically defined medium. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 31:251-256.

- Deacon, J.W. 1993. Introducción a la Micología Moderna. Ed Limusa, Noriega editores. Segunda reimpresión. México. Pp 11-199.
- Dendi, M., y Pérez, J.F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención. En: XXII Curso de Especialización FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). Barcelona.
- Dendy, A.V.D., y Dobraszczyk, B. 2001. Cereals and cereal products. Chemistry and Technology. Aspen Publishers Inc. Gaitsburg, MD, USA. Pp. 4:370.
- Do, J.H., y Dong-Kung, C. 2007. Aflatoxins: Detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotech Bioprocess Bioeng.* 12(6):1226-8372.
- Dorner, J.W., Cole, R.J., y Diener, U.L. 1984. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia.* 87:13-15.
- Dorner, J.W., y Horn, B.W. 2007. Separate and combined applications of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* for biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia.* 163:215-223.
- Ehrlich, K.C., Chang, P.K., Yu, J., y Cotty, P.J. 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6518-6524.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., y Cotty, P.J. 2005. Divergent regulation of aflatoxin production at acidic pH by two *Aspergillus* strains. *Mycopathologia.* 159(4):579-581.
- El-Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., y Asselin, A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.* 82:398-402.
- Elmholt, S. 2008. Mycotoxins in the soil environment. Ed. Springer Berlin Heidelberg. *Secondary Metabolites in Soil Ecology.* 14:167-203.
- Fajardo, J.E., Waniska, R.D., Cuero, R.G., y Pettit, R.E. 1995. Phenolic compounds in peanut seeds enhanced elicitation by chitosan and effects on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Food. Biotechnol.* 9: 59-78.
- Fanelli, C., y Fabbri, A.A. 1989. Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia.* 107(11):5-120.

- Fang, S., Li, C.F., y Shih, C. 1994. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *J. Food. Prot.* 56:136-140.
- FAO. 1998. Animal feeding and food safety. En: Report of an FAO expert consultation Rome, 10-14 March, 1997. FAO, food and nutrition. Pp. 69, Rome.
- FAO. 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. En: Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., y Galvano, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins. *J. Food. Prot.* 64:120-131.
- Gao, J., Liu, Z., and Yu, J., 2007. Identification of *Aspergillus* section *flavi* in maize in northeastern China. *Mycopathologia.* 11: 91-95.
- García, S., y Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia.* 162: 255-264.
- González, A.U. 1995. El maíz y su conservación. Ed. Trillas. México D.F. Primera edición. Pp.11-42.
- González-Aguilar, G.A., Valenzuela, E., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea-Valencia, F., Martínez-Tellez, M.A., Villegas-Ochoa, M.A., Monroy-García, I.N., y Ayala-Zavala, J.F. 2009. Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya maradol. *Journal Food Agric.* 89(1):15-23.
- Gorman, D.D., Kang, M.S., Cleveland, T., y Hutchinson, R.L. 1991. Field aflatoxins production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on maize kernels. *Biomedicina y Ciencias Biológicas.* 61(3):132-149.
- Goycoolea, F., Agulló, E., y Mato, R. 2004. Fuentes y obtención. En: Quitina y quitosano: obtención caracterización y aplicaciones. 1ª ed. Ed. Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp.109-130.
- Guzmán de Peña, D. 2006. Las aflatoxinas en maíz: desde la contaminación en campo hasta la legislación en México. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 2(48):126-130.

- Guzmán de Peña, D. 2007. La expresión a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México*. 49:227-235.
- Hadwiger, L.A., y Beckman, J.M. 1980. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant. Physiol.* 66:205-211.
- Hara, S., Fennell, D.T., y Hesseltine, W. 1974. Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. *Appl. Environ. Microbiol.* 27(6):1118-1123.
- Hernandez-Lazaurdo, A.N., Bautista-Baños, S., Velásquez-Del Valle, M.G., Mendez-Montalvo, M.G., Sánchez-Rivera, M.M., y Bello-Perez, L.A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Enhrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydr. Polym.* 73(4):541-547.
- Holmes, R., Boston, R., y Payne, G. 2008. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78(4):559-572.
- Hua, S.S.T., Grosjean, O.K., y Baker, J.L. 1999. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:289-291.
- Huang, J.J., Jiang, H.F., Zhou, Y.Q., Lei, Y., Wang, S.Y., y Liao, B.S. 2009. Ethylene inhibited aflatoxin biosynthesis is due to oxidative stress alleviation and related to glutathione redox state changes in *Aspergillus flavus*. *Int. J. Food. Microbiol.* 130(2): 17-21.
- IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr.* 82:301-366.
- Infante, G.S., y Calderón, A.L. 1994. Manual de análisis Probit. Colegio de Postgraduados. Centro de Estadística y Cálculo, Cámara Nacional de la Industria. Ed. Mexicana. Pp.107.
- Jaime-Quijada, E.A. 2008. Propiedades mecánicas y fungistáticas de biopelículas de quitosano obtenido a partir de ensilados de cabeza de camarón con balanceo de Carbono/Nitrógeno. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora. Pp.40-45.
- Jarvis, B.B., y Miller, J.D. 2005. Micotoxins as harmful indoor air contaminants. *App. Microbiol. Biot.* 66:367-372.

- Kabak, B., Dobson, A.D.W., y Van, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 46:593-619.
- Khan, T.A., Peh, K.K., y Chang. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5(3): 205-212.
- Klich, M.A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*. 48:71-80.
- Kochkina, Z.M., Pospieszny, H., y Chirkov, S.N. 1995. Inhibition by chitosan of productive infection of the T-series bacteriophages in the *Escherichia coli* culture. *Microbiology*. 64(2):211-5.
- Koehler, P.E., Beuchat, L.R., y Chhinnan, M.S. 1985. Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal. *J. Food. Prot.* 48:1040-1043.
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycol.* Wallingford, CAB International. Pp. 161.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Functional Biopolymers from Marine Biotechnology*. 8:203-226.
- Lárez, C.V. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances de Química* 1. 1(2):15-21.
- Lárez, V.C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 4(2):91-97.
- Latha, P., Sundhakar, E.P., Sreenivasulu, E.Y., Naidu, E.P.H., y Reddy, E.P.V. 2007. Relationship between total phenols and aflatoxin production of peanut genotypes under end-of-season drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29(6):563-566.
- Bogantes, P.L., Bogantes, D.L., y Bogantes, S.L. 2004. Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*. 46:140-150.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., y Kieszak, S. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health. Perspect.* 113:1763-1767.

- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., y Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:645-667.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., y Aldred, D. 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and micotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:723-730.
- Mármol, Z., Gutiérrez, E., Paéz, G., Ferrer, J., y Rincón, M. 2006. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias.* 4(2):1-10.
- Maron, D.M., y Ames, B.D. 1993. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Muttion. Res.* 113:173-215.
- Martínez-Camacho, A. P. 2006. Efecto antifúngico de quitosanos de diferente viscosidad sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* NRRL-3. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. Pp: 55-85.
- Martínez-Camacho, A.P. 2009. Propiedades estructurales y fungistáticas de biopelículas de quitosano obtenido de ensilados de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. Pp.10-60.
- Martins, H.M., Almeida, I., Márquez, M., y Bernardo, F. 2008. Interaction of wild strains of *Aspergilla* with *Aspergillus parasiticus* ATCC15517 and aflatoxin production. *Int. J. Mol. Sci.* 9:394-400.
- Matsushima, K., Yashiro, K., Hanya, Y., Abe, K., Yabe, K., y Hamasaki, T. 2001. Absence of aflatoxin biosynthesis in koji mold (*Aspergillus sojae*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 771-776.
- McIntyre, M., Muller, C., Dynesen, J., y Nielsen, J. 2001. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 73:150-190.
- Mellon, J.E., y Cotty, P.J. 1998. Effects of oilseed storage proteins on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal Am. Oil Chem. Soc.* 75:1085-1089.
- Miranda, P.S., Cárdenas, G., López, D., y Lara-Sagahon, A.V. 2003. Comportamiento de películas de quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Journal of the Mexican Chemical Society.* 47(4):331-336.

- Momany, M., y Taylor, I. 2000. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology*. 146: 3279-3284.
- Muzzarelli, R.A.A., y Muzzarelli, C. 2005. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Adv. Polym. Sci.*186:151-209.
- Nadarajah, K. 2005. Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan. Ph.D. Dissertation. University and Agricultural and Mechanical College. Louisiana State University, Baton Rouge, LA. U.S.A. Pp. 8-30, 95-99.
- Nam, K. 2001. Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu tests. *Biotechnol. Lett.* 23:971-975.
- Nam, M.Y., Shon, Y.H., Kim, S.K., Kim, C.H., Jeong, T.R., y Nam, K.S. 2000. Effect of chitosan oligosaccharides on polyamine metabolism for chemopreventive activity. *Journal Chitin and Chitosan*. 5:15-18.
- Nesci, A.V., Bluma, R.V., y Etcheverry, M.G. 2005. *In vitro* selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *Eur. J. Plant Pathol.* 113(2):159-171.
- No, H.K., y Meyers, S.P. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan. A review. *J. Aquat. Food Product. Technol.* 4:27-52.
- Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
- Overy, D.P., Seifert, K.A., Savard, M.E., y Frisvad, J.C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *Int. J. Food Microbiol.* 2737:1-9.
- Ozeretskovskaya, O.L., Vasyukova, N.I., Gerasimova, G.I., Chalenko, A.A.L., Levov, A.N., LLina, A.V., Varlamov, V.P., y Tarchevskil, I.A. 2009. Potato resistance induced by chitosan derivates. *Doklady Biological Sciences*. 421(3):355-357.

- Park, D. 2002. "The concept of Food Safety". International Workshop on Mycotoxins. College Park, Maryland, USA.
- Patel, U.D., Bapat, S.R., y Dave, P.J. 1990. Induction of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* by ascorbic acid mediated lipid peroxidation. *Curr. Microbiol.* 20:159-164.
- Pearson, D. 1976. The chemical analysis of food. septima edition. Churchill, Livingston. Edinburgh, London and NewYork, Pp 27-72.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., y Pavlovic, M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.* 77:754-66.
- Peral, I., y Gartzia, I. 2002. Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de pesca: quitina, quitosano y sus aplicaciones. <http://www.Poscosecha.com/does/quitina.html>
- Percot, A., Viton, C., y Domard. A. 2003. Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules.* 4(5): 1380-1385.
- Pitt, J.I., y Hocking, A.D. 1999. Fungi and food spoilage. 2nd ed. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, MD.
- Pitt, J.I., y Miscamble, B.F. 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* 58:86-90.
- Plascencia, J.M. 2004. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. México, D.F. Pp:4-24,71-87.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniera, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., y Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol.Biosci.* 3(10); 582-586.
- Prieto-Simon, B., y Campas, M. 2009. Immunochemical tools for mycotoxin detection in food. *Monatsh. Chem.*140:915-920.
- Quintana-Obregón, E.A. 2006. Efecto inhibitor del quitosano en el crecimiento de *Fusarium verticillioides* y producción de fumonisinas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., y Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 4(6): 1457-1465.
- Ralston, G.B., Tracey, M.V., y Wrench, P.M. 1964. Inhibition of fermentation in bakers' yeast by chitosan. *Biochem. Biophys. Acta.* 93(3):652-5.

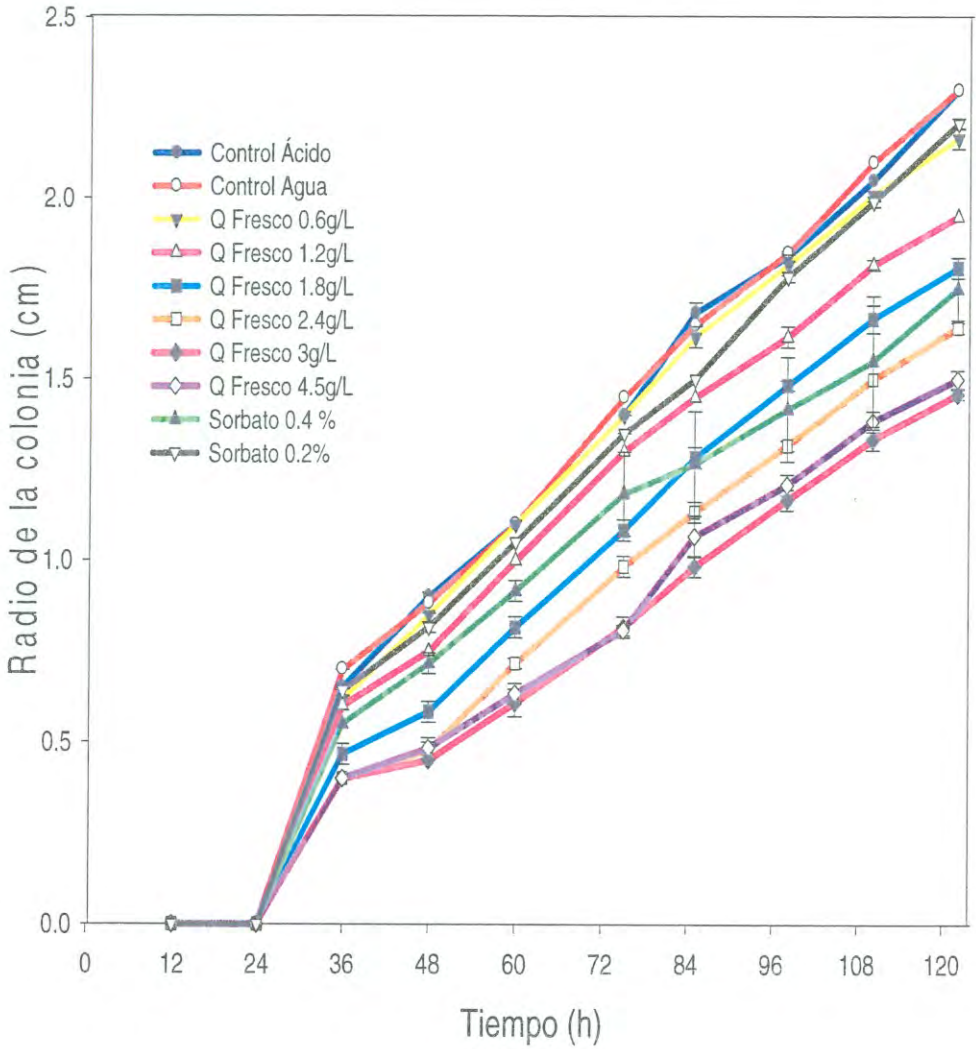
- Rao, M.S., y Stevens, W.F. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *J. Chem. Technol. Biot.* 80(9):1080-1087.Pp.2-40.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H. y Rezaee, M.B. 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* section Flavi in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*.161: 183-192.
- Reddy, K.R.N., Reddy, Ch.S., Kumar, P.N., Reddy, C.S., y Muralidharan, K. 2009. Genetic variability of aflatoxin B1 producing *Aspergillus flavus* strains isolated from discolored rice grains. *Journal Microbiol. Biotechnol.* 25:33-39.
- Reverberi, M., Fabbri, A.A., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., y Fanelli, C. 2005. Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(2):207-15.
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Fabbri, A.A., y Fanelli, C. 2006. Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis. *Mycotox. Res.* 22(1):39-47.
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., Picardo, M., Fanelli, C., y Fabbri, A.A. 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: A role for ApyapA gene. *Eucariotic Cell.* 7(6):988-1000.
- Reyneri, A. 2006. The role of climatic condition on micotoxin production in cereal. *Veterinary Research Communications.* 30:87-92.
- Rosas-Burgos, E.C., Cortez-Rocha, M.O., Cinco-Moroyoqui, F.J., Robles-Zepeda, R.E., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado. D.T y Larez-Villa, F. 2009. Antifungal activity in vitro of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World J. Microb. Biot.* 25(12): 2257-2261.
- SAGARPA. Servicio de información estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2009. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Salinas-Moreno, Y. 2007. Componentes fenólicos de grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. *Agrociencia.* 41:295-305.

- Sandosskumar, K., Karthikeyan, E.M., Mathiyazhagan, E.S., Mohankumar, E.M., Chandrasekar, E.G., y Velazhahan, E.R. 2007. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B1 by the medicinal plant Zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.). *World J. Microb. Biot.* 23(7):1007-1014.
- Santacroce, M.P., Conversano, M.C., y Casalino, E. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 18: 99–130.
- Santos, C.O.N. 1999. Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. *MedUNAB.* 2(6):124-129.
- Sathiyabama, M., y Balasubramanian, R. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Prot.* 17:307-313.
- Sebti, I.A., Martial-Giros, A., Carnet-Pantiez, S., y Grelier, V.C. 2005. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *J. Food Sci.* 70 (2):101-103.
- Serna, S.S.R.O. 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT Editor, S.A. México. Primera Edición. Pp. 207-216.
- Shirai, K. 1999. Utilización de desechos de camarón para obtención de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp.2-30, 103-110
- Shon, Y.H., Ha, Y.M., Jeong, T.R., Kim, C.H., y Nam, K.S. 2001. Modifying action of chitosan oligosaccharide on 2- Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced mutagenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34:90-94.
- Sini, T.K., Santhesh, S., y Mathew, P.T. 2007. Study of the production of chitin and chitosan from shrimp shell by *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research.* 342:2425-2429.
- Sofos, J.N. 1989. Sorbate food preservatives. Ed. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. Pp.111-121.
- Suárez-Jiménez, G.M., Cortez-Rocha, M.O., Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., y Cinco-Moroyoqui, F.J. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium*

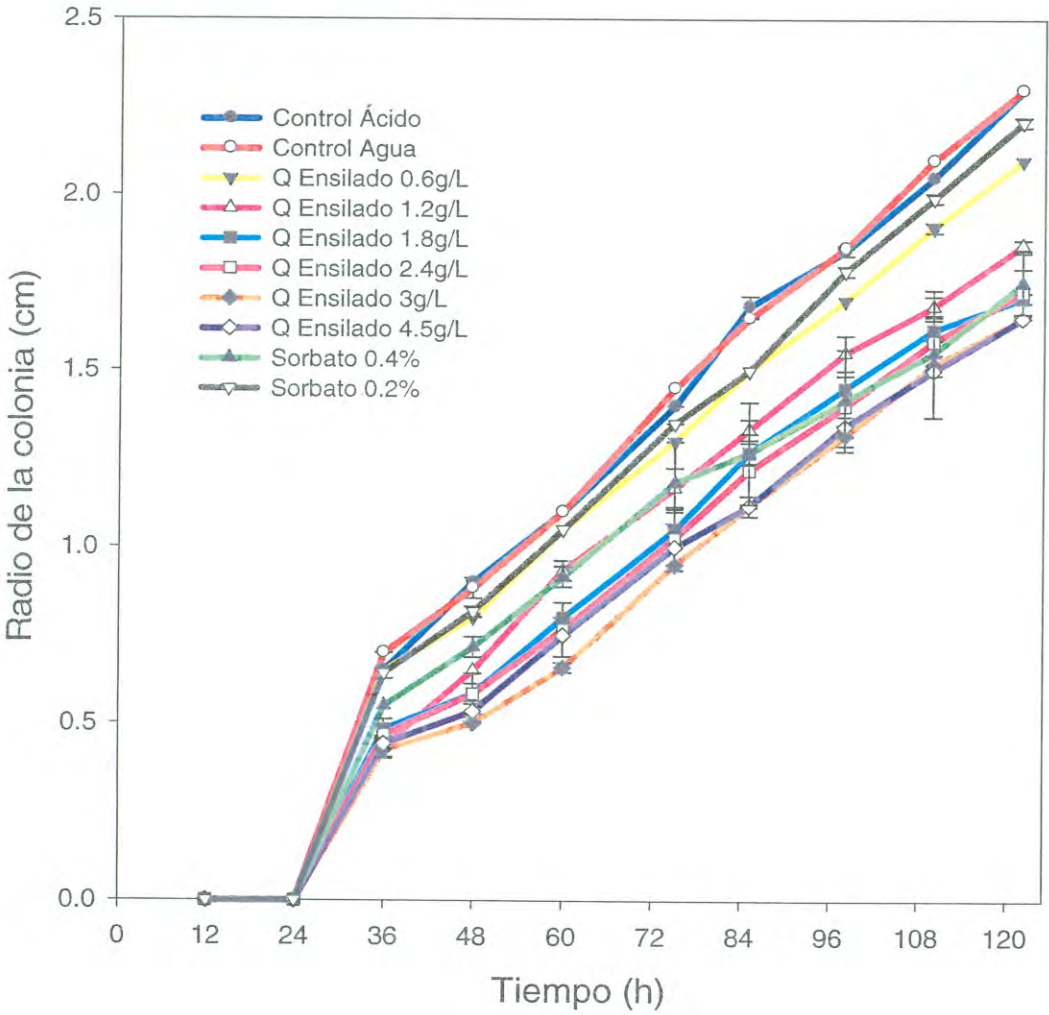
- verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B1 production. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25:134-142.
- Valenzuela, C.C.L. 2006. Obtención de quitosán de pota (*Dosidicus gigas*) empleando altas dosis de radiación gamma. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. Pp.19-40.
- Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E., y Moerschbacher, B.M. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetilated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.* 118:1353-1359.
- Venancio, A., y Paterson, R. 2007. The challenge of mycotoxins. In Food Safety—A Practical and Case Study Approach. McElhatton, A., y Marshall, R.J. Eds. Pp. 26–49. New York.
- VICAM. 2007. Micotoxin Testing system. User guide. Watertown, MA, USA. <http://www.vicam.com>.
- Vincelli, P. 2008. Aflatoxin in corn: Fumonisin, vomitoxin, and other micotoxins in corn produced by *Fusarium* fungi. *Plant Pathologist.* 14:180-190.
- Wade, H.E., y Lamondia, J.A. 1994. Chitosan inhibits *Rhizoctonia fragariae* but not strawberry black root rot. *Adv. Strawberry Res.* 13:26-31.
- Wang, Z.G., Tong, Z., Cheng, S.Y., y Cong, L.M. 1993. Study on pectinase and sclerotium producing abilities of two kinds of *Aspergillus flavus* isolates from Zhejiang. *Mycopathologia.* 121:163-168.
- Watson, S.A. 1987. Structure and composition in corn, food user of whole corn and dry-miller fraction in corn. Chemistry and Technology. S. Watson and P.F. Ramstad, Eds. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. Pp. 350-340.
- Wei, D.L., y Jong, S.C. 1986. Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. *Mycopathologia.* 93:19-24.
- Wicklow, D.T., y Horn, B.W. 2007. Association between vegetative compatibility and aflatoxin production by *Aspergillus* species during intraspecific competition. *Mycoscience.* 48:267-273.
- Wilson, D.M., Gueldner, B.C., Mckinney, J.K., Lievsay, E.H., Evans, B.D., y Hill, R.A. 1981. Effect of β -ionone on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* growth, sporulation, morphology and aflatoxin production. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 58:958a-961a.

- Wilson, R.A., Calvo, A.M., Chang, P.K., y Keller, N.P. 2004. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* $\Delta 12$ - desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction. *Microbiology*. 150: 2881-2888.
- Windham, L.G., William, E., y Williams, P. 2007. Systemic infection of stalks and ears of corn hybrids by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. 164(5): 249-254.
- Yabe, K., y Nakajima, H. 2004. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(6):745-755.
- Yin, Y., Yan, L.Y., Jiang, J.H., y Ma, Z.H. 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science*. 9(10):787-792.
- Young, I.C., Hong, K.N., y Meyers, S.P. 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *J. Agric. Food Chem.* 46:3839-3843.
- Yu, J., Bhatnagar, D., y Ehrlich, K.C. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Iberoamerican Mycology*. 19:191-200.
- Yu, J., Chang, P.K., Cary, J.W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., y Linz, J.E. 1995. Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2365-2371.
- Zakaria, Z., Hall, G.M., y Shama, G. 1998. Lactic acid fermentation of scamp waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochem.* 33:1-6.

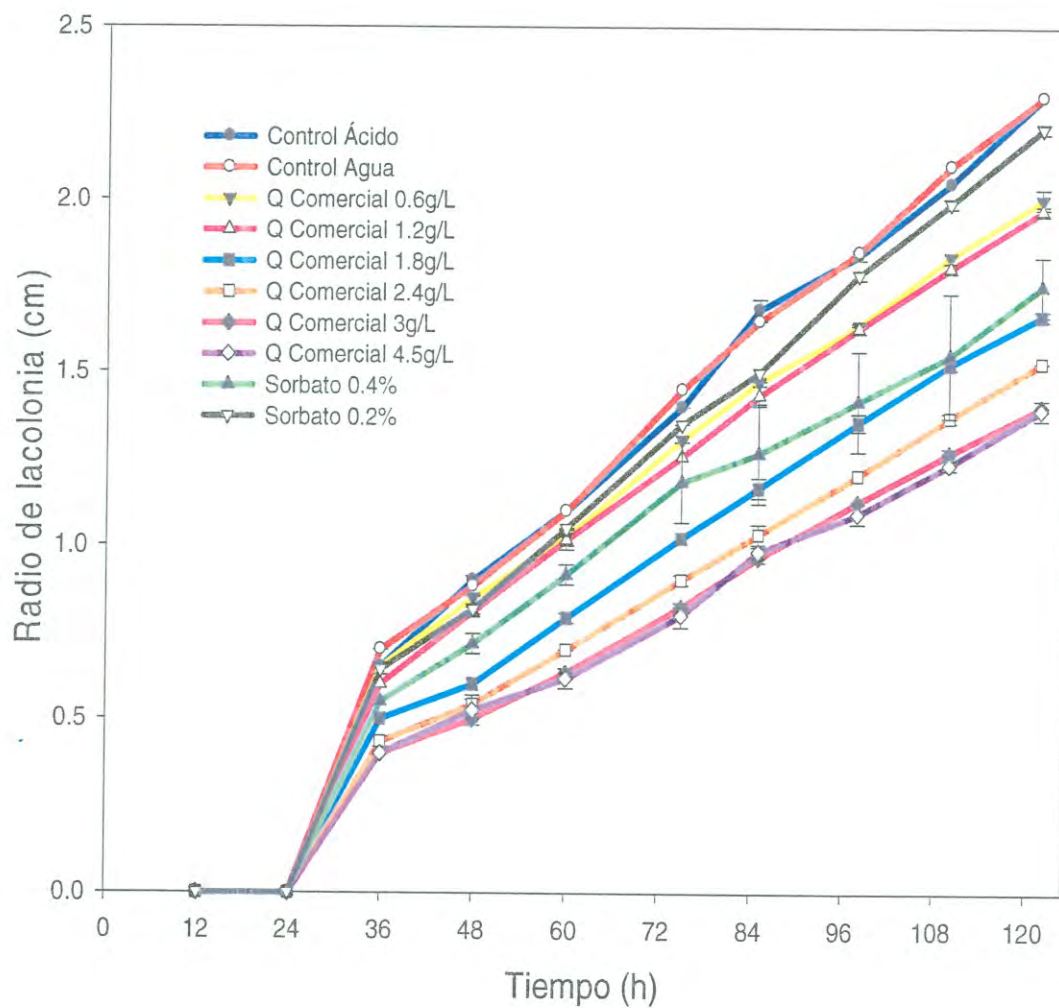
Anexo 1. Efecto del quitosano obtenido por método químico (fresco) sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus*, a 28°C.



Anexo 2. Efecto del quitosano obtenido por método biológico (ensilado) sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus*, a 28°C.



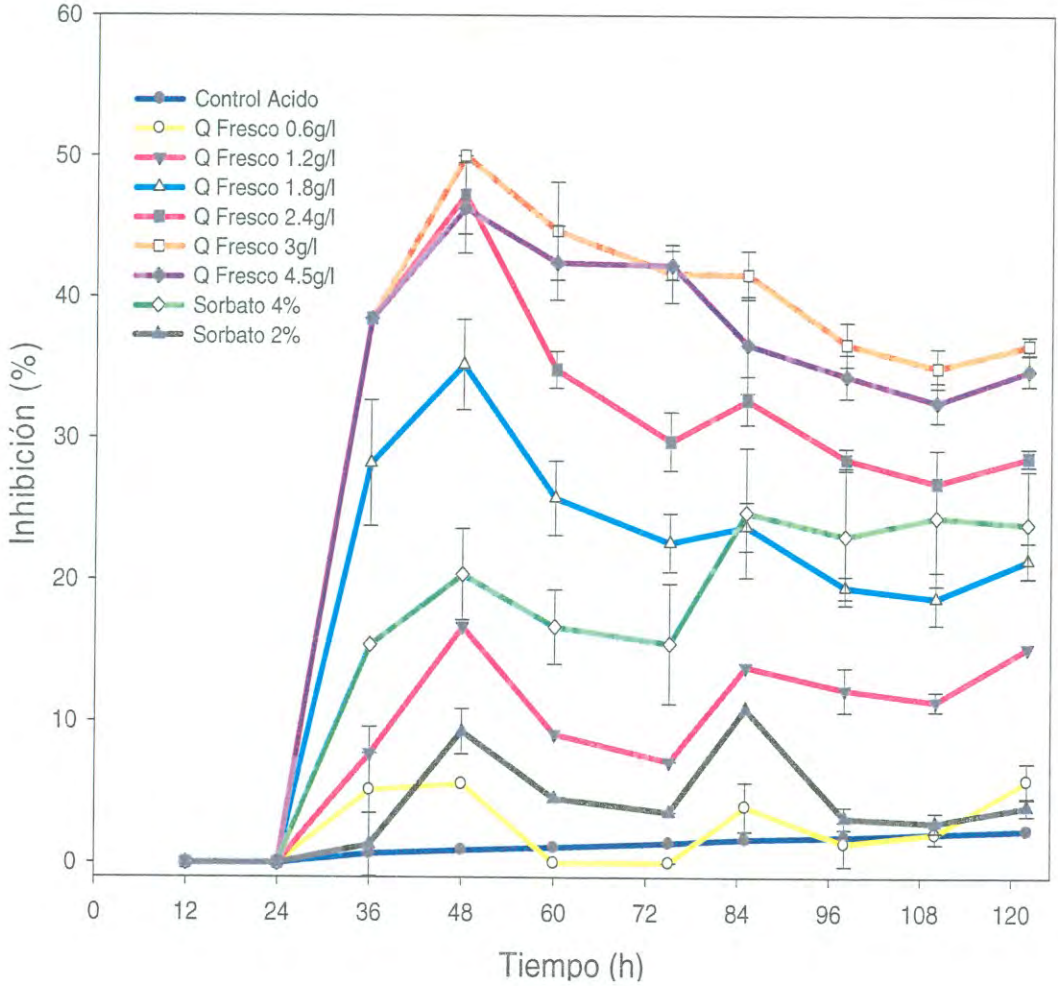
Anexo 3. Efecto del quitosano comercial de baja viscosidad sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus*, a 28°C.



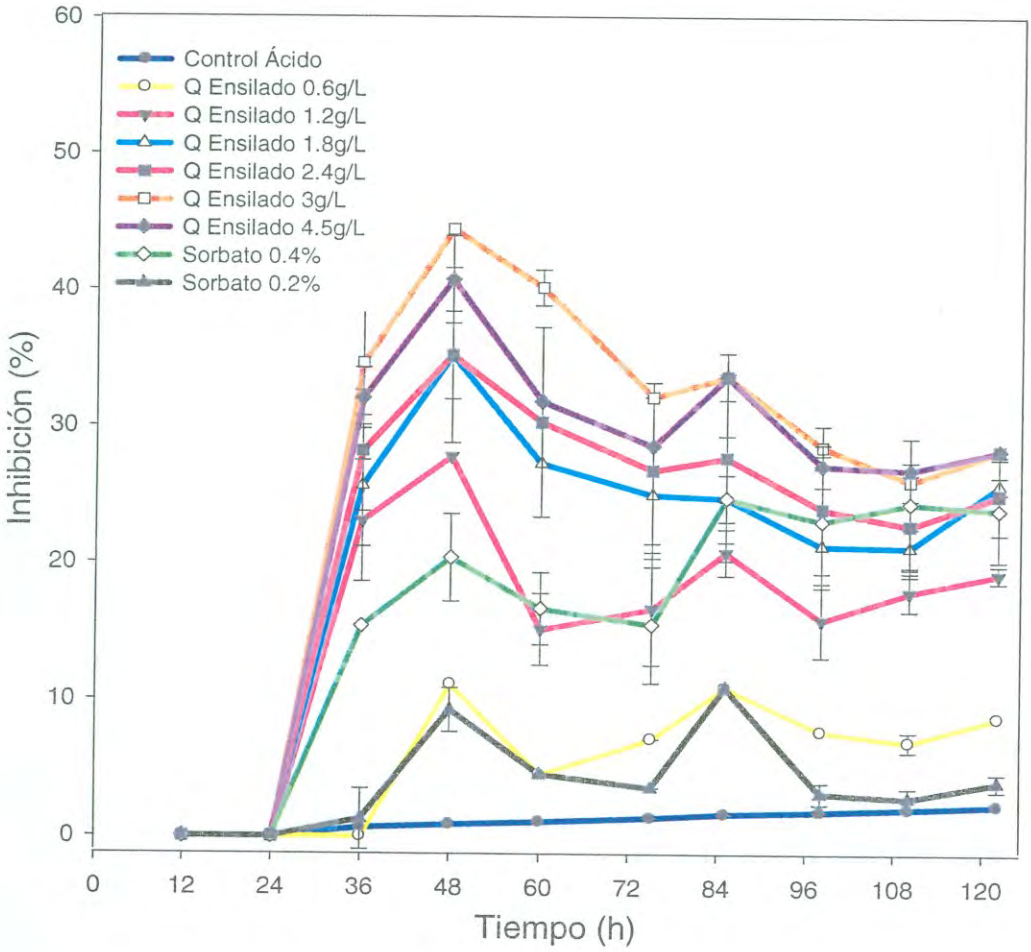
Anexo 4. Porcentaje de inhibición del quitosano sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus*, a 28°C.

| TRAT. | 36 h | 48 h | 60 h | 75 h | 85 h | 98 h | 110 h | 122 h |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| C. Sorbato 0.4% | 15.38 ± 2.22 | 20.37 ± 1.60 | 16.67 ± 0.00 | 15.48 ± 0.00 | 24.75 ± 0.00 | 23.08 ± 0.78 | 24.39 ± 0.70 | 23.91 ± 0.63 |
| C. Sorbato 0.2% | 1.28 ± 2.22 | 9.26 ± 1.60 | 4.55 ± 0.00 | 3.57 ± 0.00 | 10.89 ± 0.00 | 3.17 ± 0.78 | 2.85 ± 0.70 | 3.99 ± 0.63 |
| Q. Ensilaje 0.6g/L | 0.00 | 11.11 ± 0.00 | 4.55 ± 0.00 | 7.14 ± 0.00 | 10.89 ± 0.00 | 7.69 ± 0.00 | 6.91 ± 0.70 | 8.70 ± 0.00 |
| Q. Ensilaje 1.2g/L | 23.07 ± 4.44 | 27.77 ± 0.00 | 15.15 ± 2.62 | 16.67 ± 4.12 | 20.79 ± 1.71 | 15.84 ± 2.71 | 17.89 ± 1.41 | 19.20 ± 0.63 |
| Q. Ensilaje 1.8g/L | 25.64 ± 4.44 | 35.19 ± 3.21 | 27.27 ± 0 | 25.0 ± 3.57 | 24.75 ± 1.71 | 21.27 ± 0.00 | 21.14 ± 1.41 | 25.72 ± 0.63 |
| Q. Ensilaje 2.4g/L | 28.21 ± 4.44 | 35.19 ± 6.42 | 30.30 ± 6.94 | 26.79 ± 6.44 | 27.72 ± 6.18 | 23.98 ± 4.70 | 22.76 ± 3.73 | 25.0 ± 2.88 |
| Q. Ensilaje 3g/L | 34.62 ± 3.85 | 44.44 ± 0.0 | 40.15 ± 1.31 | 32.14 ± 0.00 | 33.66 ± 1.71 | 28.51 ± 1.57 | 26.02 ± 1.41 | 28.26 ± 0.00 |
| Q. Ensilaje 4.5g/L | 32.05 ± 2.22 | 40.74 ± 3.21 | 31.82 ± 0 | 28.57 ± 0.00 | 33.66 ± 1.71 | 27.15 ± 1.57 | 26.83 ± 0.00 | 28.26 ± 0.00 |
| Q. Fresco 0.6g/L | 5.13 ± 4.44 | 5.56 ± 0.00 | 0 ± 0.00 | 0 ± 0.00 | 3.96 ± 1.71 | 1.36 ± 1.57 | 2.03 ± 0.70 | 5.80 ± 1.26 |
| Q. Fresco 1.2g/L | 7.69 ± 0.00 | 16.67 ± 0.00 | 9.09 ± 0.00 | 7.14 ± 0.00 | 13.86 ± 0.00 | 12.22 ± 1.57 | 11.38 ± 0.70 | 15.22 ± 0.00 |
| Q. Fresco 1.8g/L | 28.21 ± 4.44 | 35.19 ± 3.21 | 25.76 ± 2.62 | 22.62 ± 2.06 | 23.76 ± 1.71 | 19.46 ± 0.78 | 18.70 ± 1.86 | 21.38 ± 1.26 |
| Q. Fresco 2.4g/L | 38.46 ± 0.00 | 47.22 ± 2.78 | 34.85 ± 1.31 | 29.76 ± 2.06 | 32.67 ± 1.71 | 28.51 ± 0.78 | 26.83 ± 0.00 | 28.62 ± 0.63 |
| Q. Fresco 3g/L | 38.46 ± 0.00 | 50.00 ± 0.00 | 44.70 ± 3.47 | 41.67 ± 2.06 | 41.58 ± 1.71 | 36.65 ± 1.57 | 34.96 ± 1.41 | 36.59 ± 0.63 |
| Q. Fresco 4.5g/L | 38.46 ± 0.00 | 46.30 ± 3.21 | 42.42 ± 2.62 | 42.26 ± 1.03 | 36.63 ± 3.43 | 34.39 ± 1.57 | 32.52 ± 1.41 | 34.78 ± 1.09 |
| Q. Comercial 0.6g/L | 0.00 | 5.56 ± 0.00 | 6.82 ± 2.27 | 6.71 ± 0.00 | 12.38 ± 0.00 | 11.09 ± 0.00 | 10.37 ± 0.00 | 12.87 ± 1.26 |
| Q. Comercial 1.2g/L | 7.69 ± 0.00 | 10.19 ± 1.60 | 7.58 ± 2.62 | 10.26 ± 0.00 | 14.85 ± 1.71 | 11.55 ± 0.78 | 12.01 ± 0.70 | 14.32 ± 0.63 |
| Q. Comercial 1.8g/L | 23.08 ± 0.00 | 33.33 ± 0.00 | 28.03 ± 1.31 | 27.01 ± 0.00 | 30.69 ± 1.71 | 26.35 ± 1.36 | 25.70 ± 0.70 | 27.62 ± 0.63 |
| Q. Comercial 2.4g/L | 33.33 ± 2.22 | 39.81 ± 1.60 | 36.36 ± 0.00 | 35.61 ± 1.03 | 38.61 ± 1.71 | 34.66 ± 0.00 | 33.17 ± 0.70 | 33.55 ± 0.00 |
| Q. Comercial 3g/L | 38.46 ± 0.00 | 44.44 ± 0.00 | 42.42 ± 1.31 | 41.22 ± 1.03 | 42.57 ± 0.86 | 38.84 ± 0.00 | 38.14 ± 0.70 | 39.07 ± 0.00 |
| Q. Comercial 4.5g/L | 38.46 ± 0 | 41.67 ± 4.81 | 43.94 ± 2.62 | 42.92 ± 2.53 | 41.58 ± 0.86 | 40.68 ± 1.57 | 39.80 ± 0.70 | 39.46 ± 1.26 |

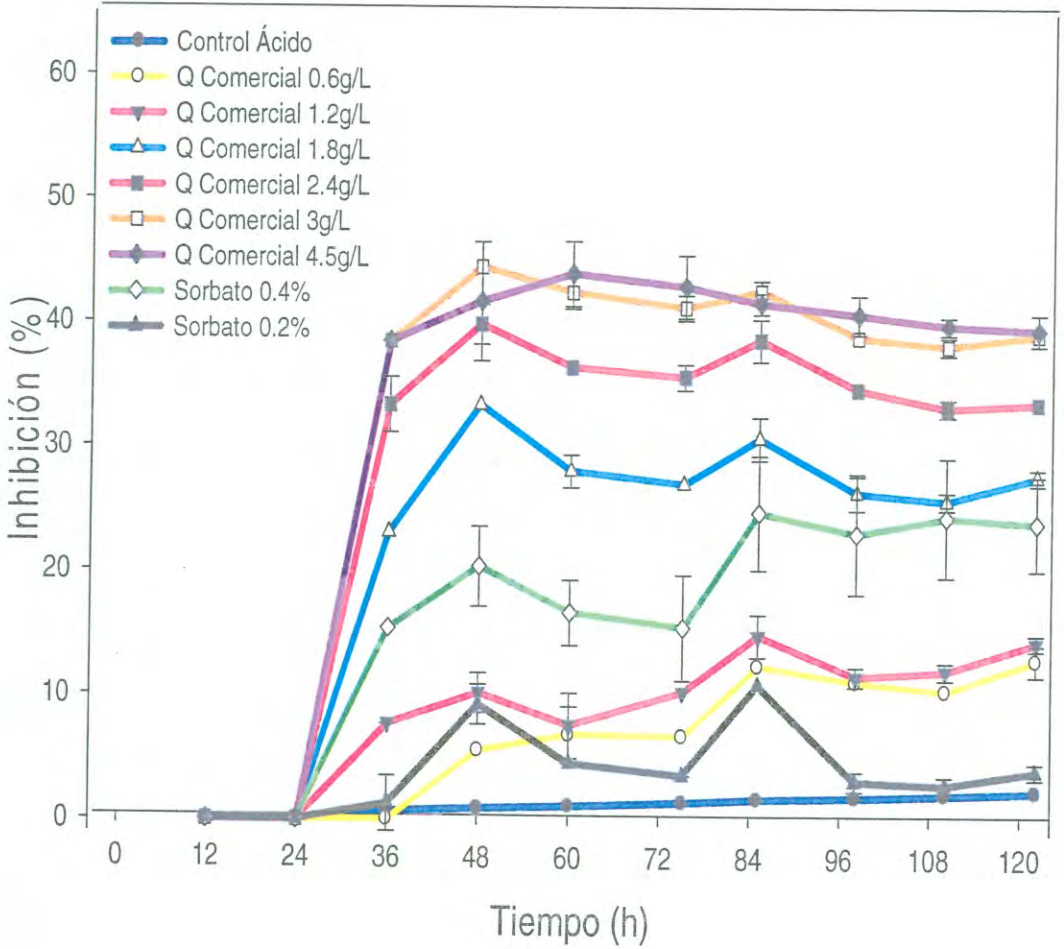
Anexo 5. Porcentaje de inhibición del quitosano fresco sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus*.



Anexo 6. Porcentaje de inhibición del quitosano ensilado sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus*.



Anexo 7. Porcentaje de inhibición del quitosano comercial sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus*.



Anexo 8. Concentraciones medias inhibitorias (CQ₅₀) de los quitosanos a diferentes tiempos a partir del análisis probit del crecimiento radial.

| Tiempo (h) | Q. Fresco (g/L) | Q. Comercial (g/L) | Q. Ensilado (g/L) |
|-------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 36 | 4.89 ± 0.373 | 4.64 ± 0.276 | 7.33 ± 1.090 |
| 48 | 3.50 ± 0.189 | 4.23 ± 0.278 | 5.44 ± 0.866 |
| 60 | 4.09 ± 0.206 | 4.44 ± 0.298 | 6.28 ± 0.713 |
| 75 | 4.34 ± 0.225 | 4.38 ± 0.343 | 10.66 ± 2.267 |
| 85 | 5.24 ± 0.444 | 5.06 ± 0.513 | 10.38 ± 2.357 |
| 98 | 5.69 ± 0.486 | 5.51 ± 0.609 | 14.71 ± 4.075 |
| 110 | 6.30 ± 0.618 | 5.77 ± 0.663 | 17.17 ± 5.409 |
| 122 | 6.71 ± 0.806 | 6.24 ± 0.267 | 15.94 ± 5.063 |

Valores determinados mediante análisis probit (NCSS 2000)

Anexo 9. Porcentaje de inhibición del quitosano (CQ₅₀) sobre el crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus*, a 28°C.

| Trat. | 36 h | 60 h | 75 h | 85 h | 98 h | 122 h |
|--------------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------|
| Q.En 6.27g/L | 100 ± 0 | 51.52 ± 2.62 | 55.36 ± 1.79 | 54.37 ± 1.72 | 51.99 ± 1.57 | 50.00 ± 2.77 ^a |
| Q.Fr 6.70g/L | 100 ± 0 | 56.82 ± 2.27 | 60.71 ± 3.57 | 63.79 ± 1.72 | 60.14 ± 1.57 | 56.88 ± 1.66 ^b |
| Q.CM 6.24g/L | 100 ± 0 | 53.03 ± 2.62 | 58.33 ± 1.03 | 62.30 ± 0.86 | 60.60 ± 1.36 | 58.70 ± 3.77 ^b |

