

UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



Una Institución Adventista

**Obtención de quitosano entrecruzado con ácido cítrico como
antifúngico para la inhibición del crecimiento del fitopatógeno
(Rhizoctonia solani)**

Por:

Yanitza Yesenia Elescano Bautista.

Yesica Lisbeth Juarez Morccolla.

Asesor:

Dr. Noe Benjamin Pampa Quispe

Lima, diciembre de 2019

**DECLARACIÓN JURADA
DE AUTORIA DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

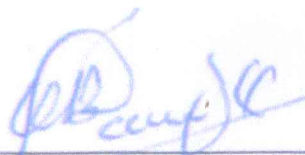
Noe Benjamin Pampa Quispe, de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: "OBTENCIÓN DE QUITOSANO ENTRECruzADO CON ÁCIDO CÍTRICO COMO ANTIFÚNGICO PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL FITOPATÓGENO (RHIZOCTONIA SOLANI)" constituye la memoria que presentan las estudiantes Yanitza Yesenia Elescano Bautista y Yesica Lisbeth Juarez Morccolla para aspirar al Grado Académico de Bachiller en Ingeniería Ambiental cuyo trabajo de investigación ha sido realizado en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente constancia en Lima, al 2 de diciembre del año 2019.



Dr. Noe Benjamin Pampa Quispe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

En Lima, Ñaña, Villa Unión, a 2 día(s) del mes de diciembre del año 2019 siendo las 10:30 horas,

se reunieron los miembros del jurado en la Universidad Peruana Unión Campus Lima, bajo la dirección del (de la)

presidente(a): PhD Leonor Segunda Bustinza Cabala

secretario(a): Mg. Iliana del Carmen Gutierrez Rodriguez y los demás miembros:

Ing. Samuel Tito DelaCruz Napan, Mg. Ronald Hugo Rosales Meza

y el (la) asesor(a) Dr. Moé Benjamin Pampa Quispe

con el propósito de administrar el acto académico de sustentación del trabajo de

investigación titulado: Obtención de quitosano entrecruzado con ácido cítrico como antifúngico para la inhibición del crecimiento del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*

de los (las) egresados (as): a) Yanitza Yesenia Elescano Bautista

b) Yesica Lisbeth Juarez Morcolla

conducente a la obtención del grado académico de Bachiller en

Ingeniería Ambiental
(Denominación del Grado Académico de Bachiller)

El Presidente inició el acto académico de sustentación invitando a las candidato (a)/s hacer uso del tiempo determinado para su exposición. Concluida la exposición, el Presidente invitó a los demás miembros del jurado a efectuar las preguntas, y aclaraciones pertinentes, las cuales fueron absueltas por las candidato (a)/s. Luego, se produjo un receso para las deliberaciones y la emisión del dictamen del jurado.

Posteriormente, el jurado procedió a dejar constancia escrita sobre la evaluación en la presente acta, con el dictamen siguiente:

Candidato/a (a): Yanitza Yesenia Elescano Bautista

CALIFICACIÓN	ESCALAS			Mérito
	Vigesimal	Literal	Cualitativa	
<u>Aprobado</u>	<u>18</u>	<u>A-</u>	<u>Muy Bueno</u>	<u>Sobresaliente</u>

Candidato/a (b): Yesica Lisbeth Juarez Morcolla

CALIFICACIÓN	ESCALAS			Mérito
	Vigesimal	Literal	Cualitativa	
<u>Aprobado</u>	<u>18</u>	<u>A-</u>	<u>Muy Bueno</u>	<u>Sobresaliente</u>

(*) Ver parte posterior

Finalmente, el Presidente del jurado invitó a las candidato (a)/s a ponerse de pie, para recibir la evaluación final y concluir el acto académico de sustentación procediéndose a registrar las firmas respectivas.

Leonor Bustinza Cabala
Presidente/a

Dr. Moé Benjamin Pampa Quispe
Asesor/a

Samuel Tito DelaCruz Napan
Candidato/a (a)

Ronald Hugo Rosales Meza
Miembro

Iliana del Carmen Gutierrez Rodriguez
Secretario/a

Samuel Tito DelaCruz Napan
Miembro

Yesica Lisbeth Juarez Morcolla
Candidato/a (b)

**Obtención de quitosano entrecruzado con ácido cítrico
como antifúngico para la inhibición del crecimiento del
fitopatógeno (*Rhizoctonia solani*)**

**Obtaining chitosan cross-linked with citric acid as an antifungal for growth inhibition of
phytopathogen (*Rhizoctonia solani*)**

YANITZA YESENIA ELESANO BAUTISTA^{§*}, YESICA LISBETH JUAREZ
MORCCOLLA^{§*}

§Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental - Universidad Peruana Unión

El propósito de esta investigación fue obtener un biopolímero conformado por Quitosano entrecruzado con ácido cítrico (QAC) aplicado como antifúngico para inhibir el crecimiento del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Desarrollándose tres etapas: la primera etapa consistió en la obtención de Quitosano a partir de exoesqueleto de langostino blanco mediante cuatro procesos y entrecruzarlo con ácido cítrico por esterificación. La segunda etapa, fue el aislamiento del fitopatógeno en estudio de un cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) infectado, y por último se evaluó la eficiencia del antifúngico mediante la comparación del crecimiento micelial (mm) de la muestra testigo y las muestras con porcentajes de quitosano al 1%, 1.5% y 2%, determinando así el porcentaje de inhibición. Los resultados indicaron que el producto obtenido fue el QAC, alcanzando un 37.5% de rendimiento global. Adicionalmente tras un periodo de 2 meses se logró el aislamiento del fitopatógeno en estudio totalmente purificado. Finalmente se evaluó el efecto inhibitorio del QAC ante el hongo *Rhizoctonia Solani* durante cinco días consecutivos, dicho efecto actuó directamente proporcional a la concentración del tratamiento, en donde se alcanzó un 95.07% de inhibición del crecimiento micelial a una concentración de 2% del QAC. A pesar de presentar una acción antifúngica en las concentraciones de 1% y 1.5% del biopolímero, estas muestras solo llegaron a oscilar entre 20.84% a 93.77% de eficiencia.

Palabras clave: Quitosano, entrecruzamiento, *Rhizoctonia solani*, biopolímero, antifúngico.

Abstract

The purpose of this research was to obtain a biopolymer formed by Chitosan cross-linked with citric acid (QAC) applied as an antifungal to inhibit the growth of the *Rhizoctonia solani* phytopathogen. Developing three stages: the first stage consisted in obtaining Chitosan from white shrimp exoskeleton through four processes and cross-linking it with citric acid by esterification. The second stage was the isolation of the phytopathogen under study of an infected potato crop (*Solanum tuberosum*), and finally the efficiency of the antifungal was evaluated by comparing the mycelial growth (mm) of the control sample and samples with percentages of 1%, 1.5% and 2% chitosan, thus determining the percentage of inhibition. The results indicated that the product obtained was the QAC, reaching a 37.5% overall yield. Additionally, after a period of 2 months, phytopathogen isolation was achieved in a fully purified study. Finally, the inhibitory effect of QAC against the *Rhizoctonia Solani* fungus was evaluated for five consecutive days, this effect acted directly proportional to the concentration of the treatment, where 95.07% inhibition of mycelial growth was reached at a concentration of 2% of the QAC. Despite presenting an antifungal action at the concentrations of 1% and 1.5% of the biopolymer, these samples only ranged from 20.84% to 93.77% efficiency.

Keywords: Chitosan, crosslinking, *Rhizoctonia solani*, biopolymer, antifungal.

*Correspondencia de autor: Yanitza Yesenia Elescano Bautista
Km 19 Carretera Central, Ñaña, Lurigancho, Lima 15, Perú.

INTRODUCCIÓN

La presencia de fitopatógenos que atacan pre, durante y post cosecha de los cultivos provocan el bajo desarrollo de las plantas, su temprana muerte y altas pérdidas económicas para el agricultor (del Puerto, Suárez, & Palacio, 2014). Para controlar y tratar diversas plagas usualmente son empleados diferentes tipos de biocidas (agroquímicos, fertilizantes y pesticidas). Sin embargo, con el pasar del tiempo estos microorganismos antagonistas se tornan más resistentes, siendo necesario el uso de una mayor dosis para su control, lo cual implica una mayor liberación de elementos nocivos a los suelos y plantas, mayor costo económico y pérdida de producción biológica (Agrios, 2005).

Para el tratamiento y control de los fitopatógenos existen diferentes alternativas que pueden ser empleados como la aplicación de fungicidas químicos, tratamientos térmicos, aplicación de aceites esenciales y el uso de biopolímeros (Juárez, Sosa, & López, 2010). Los biopolímeros como el quitosano, comparados a los métodos anteriormente mencionados poseen ventajas tales como; función antifúngica, biocompatibilidad, biodegradabilidad, sin toxicidad ni efectos secundarios (Rodríguez, Ramirez, Bosquez, Barrera, & Bautista, 2009). Por ejemplo, Ayala (2015) ha evidenciado que el quitosano es un biopolímero natural que puede tener actividad antibacteriana como antifúngica, este efecto va de la mano con 4 factores: Microorganismos, factores intrínsecos del quitosano, solubilidad, grado de desacetilación, capacidad quelante, estado físico del quitosano y los factores ambientales: PH, Temperatura y tiempo. Además, los polímeros entrecruzados de quitosano dieron resultados positivos en términos biológicos y mecánicos, cuando se compara con el quitosano solo. Para realizar el entrecruzamiento de polímeros se usan materiales altamente cancerígenos y neurotóxico como: epíclorhidrina y el glutaraldehído. Es por esto por lo que emplear el ácido cítrico con complejos de quitosano, es una solución ambientalmente aceptable y por lo tanto así obtienen materiales con diferentes propiedades y aplicaciones (Chávez, Acevedo, Luzardo, Valbuena, & Colina, 2018). En último lugar el quitosano es muy eficaz para inhibir la germinación de las esporas, la elongación del tubo germinal y el crecimiento radial. La mayoría de los estudios se han realizado con levaduras y mohos asociados con el deterioro de los alimentos y las plantas (Ayala, 2015).

Chávez Huerta et al. (2018) estudiaron el entrecruzamiento de quitosano con ácido cítrico para la obtención de quitosano a partir de desproteínización, desmineralización, despigmentación y desacetilación obtuvieron resultados favorables con respecto a la obtención de quitosano, empleando exoesqueletos de cangrejo y el posterior entrecruzamiento de quitosano con ácido cítrico mediante dos tipos de reacciones de entrecruzamiento: amidación y esterificación, caracterizando química y estructuralmente las muestras obtenidas, mediante espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido en modo ambiental (ESEM) para identificar los cambios a nivel estructural y químico en el producto. Acorde a sus resultados se obtuvo finalmente que, ambas reacciones pueden ser empleadas para realizar el entrecruzamiento de quitosano.

Acorde a la investigación realizada por Pabón, Velázquez, Evangelista, León, & Hernández (2015) se empleó *Jatropha curcas*, una planta con potencial agrícola e industrial, la metodología usada fue aislar dos hongos de semillas no germinadas, de la cual se identificaron *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata*, para evaluar los efectos del quitosano, se observó el crecimiento micelial, esporulación y la germinación de esporas, adicionalmente se observó los efectos sobre la germinación de las semillas de la planta mencionada, demostrándose que las concentraciones de quitosano (0.5, 1, 2 y 4 mg.ml⁻¹) tuvieron una eficaz inhibición del crecimiento micelial de *F. equiseti* y *C. lunata*, siendo este el primer reporte del efecto del quitosano en *J. curcas*. Los datos obtenidos en la esporulación y germinación de esporas estuvieron estrechamente relacionados con la especie fúngica; ya que el quitosano inhibió completamente la esporulación de *C. lunata*, mientras que en la *F. equiseti*, la germinación de esporas. En conclusión, el quitosano no afectó la germinación de la semilla, pero si causó efectos inhibitorios en estos dos tipos de hongos. En un marco nacional, acorde a la investigación realizada por Castro & Vidal (2015) a partir de caparazones residuales de “muy muy” *Emerita análoga*, que se encuentra en grandes proporciones

a lo largo del litoral peruano, mediante la desmineralización con HCl y desproteización con NaOH se pudo obtener quitina, teniendo un rendimiento de 12.5% (510g) de quitina a partir de 4 kg de *Emerita análoga*, añadiendo el proceso de desacetilación se pudo obtener quitosano, contando con un rendimiento del 9.5%, es decir (386g) de este, como última instancia se caracterizaron ambos productos, obteniendo para la quitina un 9.66% de humedad, 2.38% de cenizas, 2.28% de nitrógeno, en el caso de la quitosano se determinó un 6.75% de humedad, 1.29% de ceniza y un 0.83% de nitrógeno. Verificando así que la quitina tuvo mayor porcentaje de humedad, cenizas, nitrógeno. Parra & Ramírez (2002) en la estación experimental “Los Palacios”, estudiaron el efecto in vitro de diferentes derivados de la quitina, sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani Kuhn*, para esto se evaluó el diámetro de la colonia a los 2, 4 y 6 días, determinando así el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo, los resultados obtenidos mostraron que el efecto inhibitorio en presencia de las quitosanas HMK - 70 y Q - 63 y correspondiente hidrolizado enzimático HQ -63, aumentó el efecto con la concentración de los productos, destacando estos dos últimos con un 100% de inhibición con una concentración de 1 mg. mL⁻¹. En otro sentido, la D - glucosamina y la N - Acetil - Glucosamina no se evidenció inhibición del crecimiento micelial, mientras que la quitina coloidal (UC), presentó un pequeño efecto inhibitorio sobre el hongo en estudio.

Es por esto que la demanda de alternativas de control de las enfermedades fúngicas es de mayor interés en estos días. Por consiguiente, la aplicación de productos de biopolímeros naturales son una alternativa ambientalmente beneficiosa ante los de producción química.

Y por ello la presente investigación se enfocó en obtener el quitosano entrecruzado con ácido cítrico para inhibir el crecimiento del fitopatógeno (*Rhizoctonia solani*). Debido a que se buscó reforzar la propiedad antifúngica del quitosano con el ácido cítrico y así medir la eficiencia de este compuesto frente al *Rhizoctonia solani*, el cual afecta diversos cultivos a nivel mundial, provocando el marchitamiento y posterior pudrimiento del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de exoesqueleto de langostino blanco (1 kilogramo) se obtuvieron del Mercado Central “La arenera”, de crustáceos provenientes del terminal pesquero del Callao.

Los reactivos utilizados para la elaboración de quitosano son de grado analítico dependiendo de su aplicación, adquiridos de Movilab del Perú S.A.C. Con respecto a la obtención del hongo *Rhizoctonia solani*, se trabajó en la Universidad Agraria la Molina – UNALM.

Los materiales empleados fueron pipeta de 10 mL, 20 placas Petri, matraz de Erlenmeyer, mechero, probeta, asa de siembra, papel de filtro rápido, varilla de vidrio, cámara de Neubauer.

Los equipos empleados fueron el agitador mecánico, bomba al vacío, licuadora doméstica marca Oster 3 velocidades, para la esterilización de los materiales se utilizó una autoclave marca MMM de modelo Ecocell, vitrina de extracción de gases y vernier digital marca Gearwrench para el proceso de obtención de quitosano y evaluación de inhibición antifúngica.

Método de obtención del QAC (quitosano entrecruzado con ácido cítrico)

Lavado de materia prima

Los exoesqueletos de langostino blanco, en primera instancia se lavaron, limpiaron y secaron durante 1 hora a 100 °C, utilizando una estufa de marca MMM, modelo Ecocell. Después se trituraron, empleando un mortero y posteriormente una licuadora doméstica marca Oster de tres velocidades, hasta la obtención de una partícula de aproximadamente 2 mm de diámetro.

Desproteínización

Se calentaron 18 g de quitina, en 180 mililitros de solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10% m/V a una temperatura de 90 °C y una velocidad de 600 RPM a 1 hora.

Desmineralización

Después se adicionó una solución 6 M de ácido clorhídrico (HCl) a temperatura ambiente, empleando una proporción total de 1:10, durante 1 hora. Posteriormente se despigmentó con etanol (CH₃CH₂OH) en el equipo de la bomba al vacío, realizando lavados continuos, hasta visualizar que la muestra se clarifique.

Desacetilación

Para este procedimiento se agregó una solución acuosa de NaOH al 30% m/V a 100 °C, por un lapso de 4 horas. Al término se lavó la muestra con agua destilada, se filtró y secó a temperatura ambiente. Los reactivos que se emplearon en los procesos son de grado analítico.

Entrecruzamiento de quitosano con ácido cítrico

Se tuvo que pesar 15 gramos de quitosano, que se procedió a disolver en una solución de ácido acético al 3% m/v, a la solución resultante se le adicionó 1.5 gramos de ácido cítrico, para la formación del entrecruzamiento con la formación de enlaces éster. La reacción mencionada se desarrolló en el calentador magnético a un máximo de 90 °C durante 1 hora. (Chávez et al., 2018)

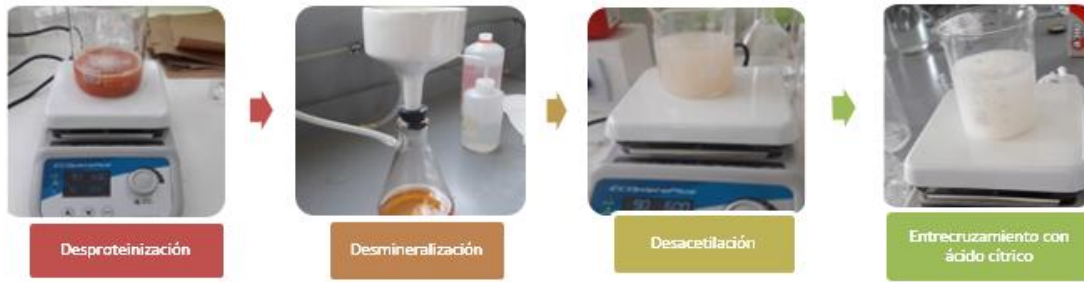


Figura 1 Metodología para la obtención del QAC.

Por último, se obtuvo el rendimiento global del QAC utilizando la siguiente expresión:

$$RG = \frac{RR}{RT} 100$$

Dónde:

RT = cantidad en gramos de la muestra inicial.

RR = cantidad en gramos del producto final (quitosano entrecruzado con ácido cítrico).

Método de aislamiento del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*:

El proceso comenzó con la selección de la muestra, en donde se obtuvo del tubérculo *Solanum tuberosum* con síntomas de infección fungal. Luego se transportó las muestras recolectadas al laboratorio para su procedimiento de aislamiento en donde se desinfectaron con lejía al 0.5% por un minuto y se enjuagó tres veces con agua destilada, secando la muestra en un papel filtro o toalla estéril.

En el segundo paso se elaboró el PDA, utilizando 15.6 gr del insumo con 400 ml de agua destilada en un medio esterilizado (cerca a mecheros). Para el proceso de aislamiento, se sembró un pedazo del tubérculo directamente en placas que contenían el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 27°C por cinco días en donde se observó el desarrollo del fitopatógeno (Gómez, Soberanis, Tenorio, & Torres, 2013).

Luego se procedió a hacer repiques en diferentes placas de vidrio con PDA, con la finalidad de obtener el fitopatógeno sin otros contaminantes, este proceso tuvo una duración de aproximadamente dos meses.



Figura 2 Aislamiento puro del Fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*".

Método de eficiencia de la actividad antifúngica:

Efectos del QAC en la inhibición de crecimiento de micelio de *Rhizoctonia solani*

Un disco de micelio del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, se colocó en la parte media de las placas de Petri con el medio envenenado que se refiere a la solución del PDA que contenían concentraciones de quitosano al 1 %, 1.5 %, 2 % (m/v) en total unas 8 placas incubándose a 28 ± 2 °C, también se contó con 4 placas de Petri testigo que sólo contenían PDA y el fitopatógeno al centro. El crecimiento micelial se expresa como diámetro medio (mm), este se midió utilizando un vernier digital. En cuando el micelio alcanzó el borde de las placas testigo (5días), el diámetro medio de crecimiento del microorganismo de estudio en presencia de quitosano entrecruzado con ácido cítrico se contrastó con el cultivo testigo. Se realizó un total de tres repeticiones de cada concentración de quitosano entrecruzado con ácido cítrico y del testigo (Pabón et al., 2015).

Para de determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\left(1 - \left(\frac{\text{diámetro de la colonia tratada}}{\text{diámetro de la colonia control}} \right) \right) \right] \times 100$$

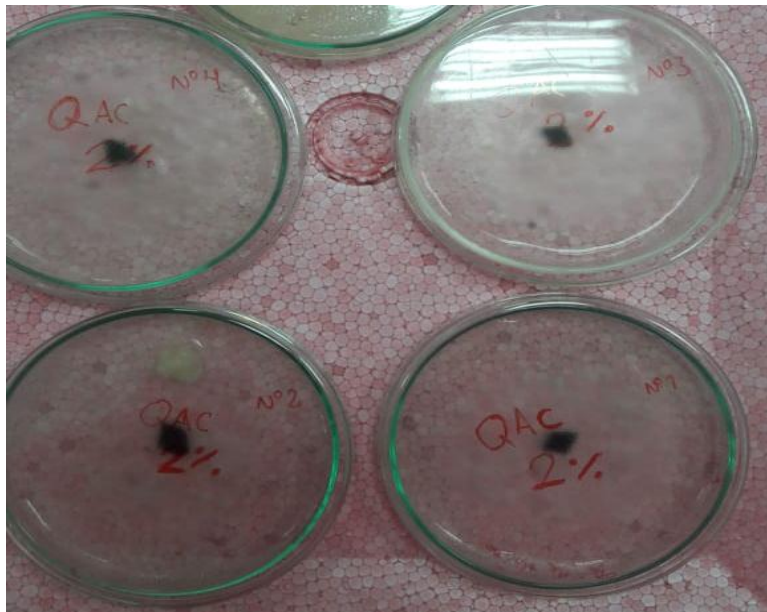


Figura 3 Placas Petri con QAC al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención de quitosano entrecruzado con ácido cítrico (QAC)

Tabla 1: Pruebas Físicas del QAC (Quitosano entrecruzado con ácido cítrico)

Parámetros	Características
color:	Blanco.
viscosidad:	Media.
olor:	Inoloro
RG (rendimiento global)	37.5%



Figura 4 QAC (Quitosano entrecruzado con ácido cítrico)

En la Tabla 1 se presenta la muestra las pruebas de observación in situ del biopolímero en donde se obtuvo que, a partir de 40 gramos de exoesqueletos de langostino blanco, posterior a los procesos químicos ya citados se obtuvo 15 gramos de QAC (quitosano entrecruzado con ácido cítrico) alcanzando un 37.5% de rendimiento global del biopolímero.

Debido a las características físicas organolépticas obtenidas en la investigación, se reafirma lo mencionado por Jinasena, Pathirathna, Wickramarachchi, & Marasinghe, (2011), con respecto a la factibilidad de su aplicación en el manejo de pos cosecha, puesto que al no ser percibido por el olfato humano, no alteraría las propiedades físicas ni organolépticas de los frutos.

Aislamiento de fitopatógeno (*Rhizoctonia Solani*)

Mediante repiques a partir de una muestra infectada de *Solanum tuberosum* (papa), se obtuvo el objeto de estudio totalmente purificado, puesto que inicialmente la muestra infectada contenía otros microorganismos, lo que dificultó la obtención pura del hongo. En la Figura 5 observamos la evolución del fitopatógeno en estudio al primer, tercer, quinto y séptimo día.

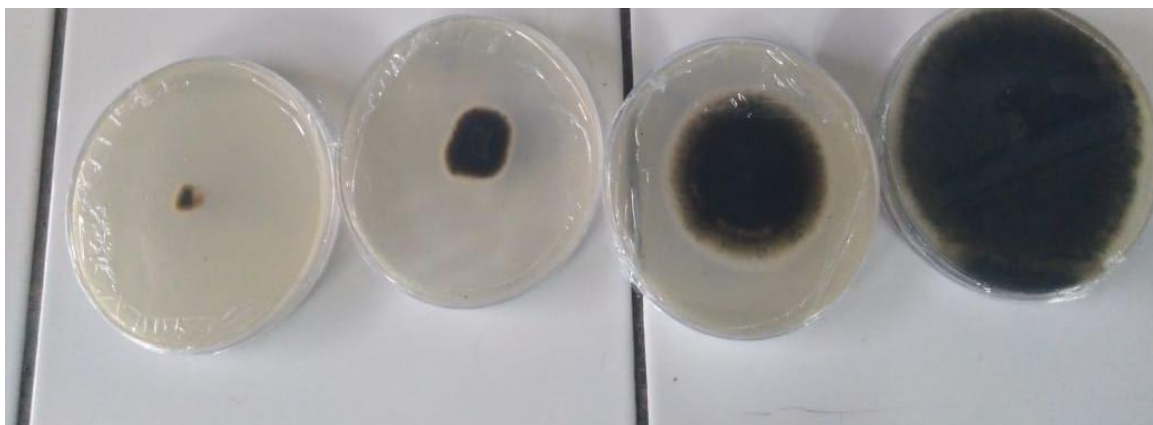


Figura 5 Evolución periódica del Fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*"

Efectividad antifúngica

Efectos del QAC en la inhibición de crecimiento de micelio de *Rhizoctonia solani*

En la Tabla 2 se observa la evaluación del primer, segundo, tercer, cuarto y quinto día a las 3 repeticiones realizadas de las concentraciones (QAC control, 1 %QAC,1.5% QAC y al 2% QAC) se obtuvo en modo general los siguientes resultados:

Tabla 2: Porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*" Día 1.

R	QAC Control	1%	1.5%	2%
R1	0%	77.38%	86.23%	90.82%
R2	0%	13.13%	54.93%	95.07%
R3	0%	69.90%	93.77%	93.08%

Tabla 3: Porcentaje de inhibición del fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*" Día 2.

Repeticiones	QAC Control	1% QAC	1.5% QAC	2% QAC
R1	0%	44.67%	59.89%	61.88%
R2	0%	10.00%	38.72%	87.16%
R3	0%	31.38%	75.45%	82.93%

Tabla 4: Porcentaje de inhibición del fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*" Día 3.

Repeticiones	QAC Control	1% QAC	1.5% QAC	2% QAC
R1	0%	34.38%	46.86%	49.49%
R2	0%	19.79%	14.80%	84.76%
R3	0%	22.60%	45.57%	81.41%

Tabla 5: Porcentaje de inhibición del fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*" Día 4.

Repeticiones	QAC Control	1% QAC	1.5% QAC	2% QAC
R1	0%	29.39%	37.63%	41.67%
R2	0%	11.85%	23.96%	78.01%
R3	0%	24.65%	47.17%	72.32%

Tabla 6 Porcentaje de inhibición del fitopatógeno "*Rhizoctonia Solani*" Día 5.

Repeticiones	QAC Control	1% QAC	1.5% QAC	2% QAC
R1	0%	20.84%	38.53%	40.25%
R2	0%	16.8%	48.08%	63.27%
R3	0%	18.06%	62.34%	65.52%

Se ha obtenido que las soluciones con quitosano entrecruzado con ácido cítrico desde la solución al 1 % (m/v), 1.5 % (m/v) y 2 % (m/v), la última concentración presenta una inhibición mayor del 95.07 % del hongo *Rhizoctonia solani* como se observa en el **Gráfico 1**, en contraste con la investigación de Ayala et al. (2014), que determinaron que a partir de 50 mg/L de quitosano, se observaría una efectividad frente al hongo *Mycosphaerella Fijiensis Morelet*. Evidenciando que a partir de una concentración de 50 mg/L de quitosano se visibiliza sus propiedades antifúngicas, y que con concentraciones del 2 % (m/v) de quitosano entrecruzado con ácido cítrico, se obtiene hasta un 93.77 % de inhibición.

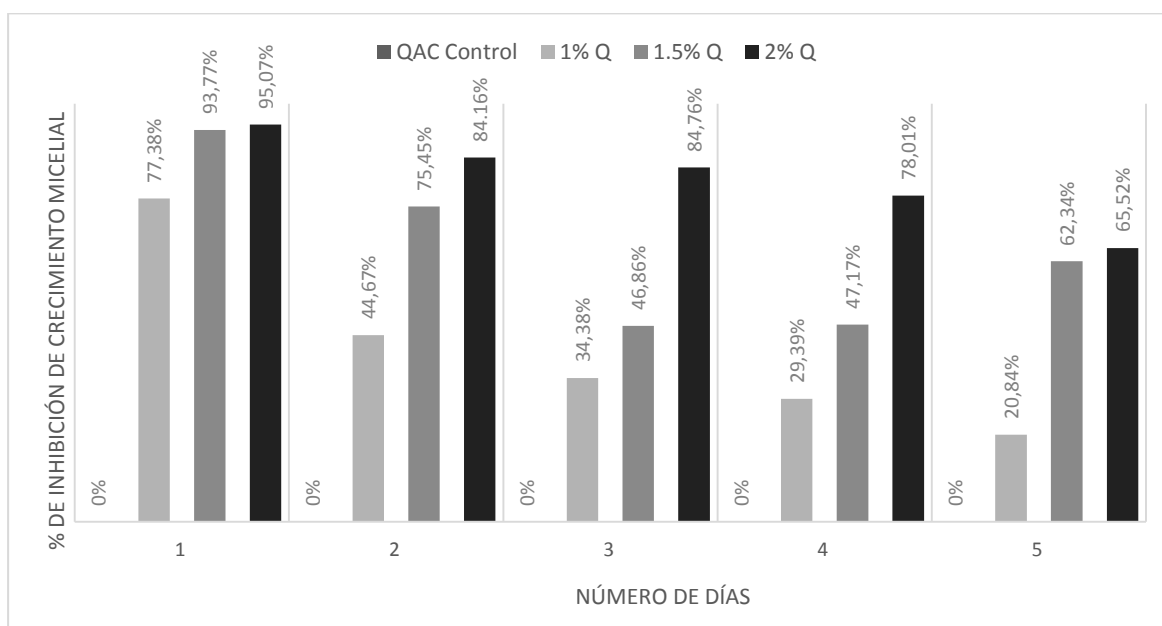


Gráfico 1 Relación entre % de inhibición durante 5 días.

Jinasena et al. (2011) mencionan que para el control al 100% de la enfermedad generada por el fitopatógeno *Colletotricum musae* se utilizaron soluciones con concentraciones de quitosano igual o mayores al 1.00 % irradiado y concentraciones igual o mayores del 1.5 % no irradiado aplicados en *Musa paradisiaca* (banano). A diferencia de los resultados obtenidos con respecto a la acción antifúngica del QAC frente al hongo *Rhizoctonia solani*, se obtuvo que para una concentración del 2 % se logró obtener una inhibición del 95.77%, esto evidencia que con respecto al microorganismo *Colletotricum musae* a partir de una concentración de 1.5% de quitosano se controló al 100%, mientras que el microorganismo *Rhizoctonia solani*, se controló al 93.77% utilizando QAC al 2%, esto indica que el *Colletotricum musae* a una menor proporción de antifúngico presenta una inhibición completa, mientras que el hongo *Rhizoctonia solani*, presenta una inhibición parcial.

Parra & Ramírez (2002) señalan que se alcanzó un 30% de inhibición micelial en el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani Kuhn* en una evaluación de la acción anti fúngica de la quitina coloidal (QC) a los dos, cuatro y seis días, realizando la comparativa con la presente investigación se obtuvo que el QAC, alcanzó un 93.77% de inhibición micelial, evidenciando una notoria diferencia entre la acción antifúngica de cada polímero, un factor influyente es el grado de acetilación ya que la quitina coloidal presentó un 88%, con respecto al grado de acetilación del QAC en la presente investigación no ha sido caracterizado, sin embargo acorde a (Ramírez, Delgado, & Andrade, 2016) explican que, el grado de acetilación (%) del quitosano es de 18.4%, lo cual repercutió en su acción antifúngica, sugiriendo la relevancia que presenta la cantidad de grupos aminos cargados en la cadena polimérica.

De acuerdo a diversos autores se ha observado que el quitosano tuvo una eficaz actividad antifúngica in vitro en diferentes microorganismos como *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici* y *Pythium debaryanum*; evidenciando su acción inhibitoria (Lárez, 2008). Adicionalmente en la investigación titulada “Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinera*” se estudió la protección proporcionada por el quitosano en gel al 1.75% en las plántulas de uva contra el fitopatógeno *B. cinérea* mostrando una efectiva actividad inhibitoria en el crecimiento de este microorganismo, asimismo se observó la activación de mecanismos de defensa (Barka, Eullaffroy, Clément, & Vernet, 2004). Lo cual reafirma el potencial inhibitorio del quitosano, en sus diversas presentaciones.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda dedicar al procedimiento de aislamiento del fitopatógeno “*Rhizoctonia Solani*” un prolongado periodo de tiempo, puesto que demora aproximadamente dos meses para su purificación.
- Se recomienda efectuar la caracterización del QAC (quitosano entrecruzado con ácido cítrico), para cuantificar la calidad del biopolímero obtenido (valoración potenciométrica, porcentaje de ceniza, humedad y materia insoluble).
- Se recomienda utilizar bomba al vacío, para el filtrado de la muestra previo y posterior a cada subproceso para la obtención del QAC.

CONCLUSIONES

La presente investigación aporta información relevante para el conocimiento de la actividad del quitosano entrecruzado con ácido cítrico contra el fitopatógeno “*Rhizoctonia solani*”. Se logró obtener QAC (quitosano entrecruzado con ácido cítrico) bajo condiciones in vitro. Logrando un porcentaje de rendimiento 37.5%. Luego en una duración de 2 meses y medio se obtuvo el aislamiento purificado del fitopatógeno *Rhizoctonia Solani*. El QAC en los resultados de eficiencia fúngica se obtuvo que la concentración 2% QAC fue el más óptimo en la inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno verificando que se tiene una correlación directa entre la mayor concentración de tratamiento con el porcentaje de inhibición del diámetro micelial.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Peruana Unión, por habernos proporcionado las instalaciones del laboratorio, indispensables para la ejecución del trabajo in vitro para la continuación de la investigación.

Referencias

- Agrios, G. (2005). *Fitopatología. Fitopatología* (2nd ed.). Mexico.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ayala, A., Colina, M., Molina, J., Vargas, J., Rincón, D., Medina, J., ... Cárdenas, H. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella Fijensis* Morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6), 312–338.
- Ayala, G. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *ResearchGate*, 2(1), 31–38. Retrieved from www.researchgate.net/publication/288511705
- Barka, E. ., Eullaffroy, P., Clément, C., & Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22(8), 608–614.
<https://doi.org/10.1007/s00299-003-0733-3>
- Castro, N., & Vidal, C. C. (2015). Obtención y caracterización de quitina y quitosano del *Emerita* Analoga a escala piloto. *Rev. Tzhoecoen*, 8(5), 55.
- Chávez, A., Acevedo, S., Luzardo, E., Valbuena, A., & Colina, M. (2018). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO ENTRECRUZADO CON ÁCIDO CÍTRICO. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, 19(5), 227–235.
- del Puerto, A. M., Suárez, S., & Palacio, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387.
- Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M., & Torres, E. (2013). *Manual de Producción y Uso de Hongos Antagonistas*. Perú: SENASA.
- Jinasena, D., Pathirathna, P., Wickramarachchi, S., & Marasinghe, E. (2011). Effect of Chitosan (Unirradiated and Irradiated) Treatment on Anthracnose Disease and Its Potential to Increase the Shelf life of “Embul” Banana. *International Journal of Environmental Science and Development*, 2(4), 248–252. <https://doi.org/10.7763/ijesd.2011.v2.132>
- Juárez, G. ., Sosa, M. ., & López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14–23. Retrieved from <https://tsia.udlap.mx/hongos-fitopatogenos-de-alta-importancia-economica-descripcion-y-metodos-de-control/>
- Lárez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista Científica UDO Agrícola*, 8(1), 1–22.
- Pabón, D., Velázquez, M. G., Evangelista, S., León, R., & Hernández, A. N. (2015). Efectos del quitosano en hongos fitopatógenos y en la germinación de semillas de *Jatropha curcas* L. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 21(3), 241–253.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.10.051>
- Parra, Y., & Ramírez, M. A. (2002). EFECTO DE DIFERENTES DERIVADOS DE LA QUITINA SOBRE EL CRECIMIENTO In Vitro DEL HONGO *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 23(2), 73–75. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193218114014.pdf>
- Ramírez, C. A., Delgado, E., & Andrade, A. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *CIM*, 4(October), 769–776. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/309493340>
- Rodríguez, A. T., Ramirez, M. A., Bosquez, E., Barrera, L. L., & Bautista, S. (2009). PROPIEDADES QUÍMICO-ESTRUCTURALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA QUITOSANA EN MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307–317.