

QP702
C5C4

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MÉRIDA-VENEZUELA



***Efecto del quitosano sobre la germinación
y preservación de la semilla de calabacín.
(Curcubita pepo)***

Trabajo de Grado por la Lcda. Alicia B. Chirinos A., ante la ilustre Universidad
de Los Andes, para optar al Título de MAGÍSTER SCIENTIAE en Química
Aplicada, Mención Polímeros

Tutor: Dr. Cristóbal Laréz Velásquez
Co-Tutora: MSc. Melangel Tacoronte

Mérida- Venezuela
Enero, 2013

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

www.bdigital.ula.ve

A Dios por ser la guía de cada paso que doy

A mis padres

Regulo y Belén

Al amor de mi vida

Alexander

A Mis hijos

Andrea y Alejandro

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTOS

Al ver finalizada ésta importante meta en mi vida, me doy cuenta que con esfuerzo, constancia, dedicación y sobre todo queriendo lo que se hace se pueden lograr cada uno de los sueños que estén dentro de nuestros corazones, siempre acompañada de la mano DIOS, quien colocó en este hermoso camino a las personas necesarias que me acompañaron en esta experiencia de vida, brindándome su apoyo incondicional, su amistad, sus sonrisas, sus sobre todo sus conocimientos, orientaciones y correcciones, es por ello que quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A Dios Todopoderoso por permitirme ver cumplido un sueño y por su compañía todos los días.

A mis padres Regulo y Belén, por su amor, apoyo en todo momento.

A mis hermanas Mary, Alejandra, Gabriela, por confiar en mí y por todo su apoyo en especial a Emilia.

Al amor de mi vida mi esposo Alexander, por ser el fiel compañero, amigo, que con su inmenso amor, comprensión, colaboración siempre supo darme ánimos y mucha fortaleza en esos momentos que lo necesite.

A mis hijos Andrea y Alejandro seres a quienes amo, mis regalos de DIOS, y son el motivo de seguir adelante y forjar un futuro. Dios los bendiga.

*A mi tutor Dr. Cristobal Lárez quiero agradecerle de modo muy especial, por su confianza y valiosa guía en el desarrollo de este trabajo, por su gran calidad humana, por su paciencia y por su amistad, quiero decirle en estas cortas líneas que difícilmente se encuentra un mejor ejemplo de amor por la investigación y deseos de compartir con otros los conocimientos adquiridos. Ha sido un doble honor ser su tesista y compartir momentos inolvidables con mi familia, en mí tiene una amiga incondicional.....
Gracias*

A mi cotutora MSc. Melange Tacoronte mi agradecimiento por ser más que cotutora una amiga quien me brindó su apoyo incondicional desde el inicio de este trabajo, por su valiosa guía, enseñanzas y por su paciencia, gracias por todos los momentos compartidos de trabajo, de risas, de

enseñanzas de vida. Ha sido una más de las bendiciones de Dios ser tu tesista y compartir momentos tan especiales con mi familia..... Gracias

Al Dr. Enrique Millán, por ser la persona que DIOS colocó en mi camino para poder realizar este meta.....Muchas gracias

Al Dr. Argenis Mora, por su valioso aporte en el desarrollo de la tesis. Gracias

A los Dr. Francisco López y Dr. Jesús Conteras por sus valiosos apoyo, orientaciones en cada etapa del desarrollo de esta tesis. Además por compartir momentos maravillosos, por permitirme integrarme a laboratorio como un miembro más de esta gran familia, y con ello hacerme sentir como en casa.....Muy agradecida.

A mis compañeros del laboratorio de polímeros y grandes amigos de siempre, mi querida Amal, por ser más que amiga una hermana, Naim y Alejandro... Gracias por brindarme su amistad los quiero mucho. A Carlos Torres por su amistad, colaboración y apoyo durante la realización de los análisis pertinentes al trabajo, a Simón, Meribary, Sandra, Lilitiana, Yesica, Daisy... por compartir momentos realmente especiales.

A personas especiales, donde su enseñanza fue de vida; Sra. Sonoko, Sr. Orlando, Sra. María, Sr. Juvenal, y a la familia Hocevar en especial a Nelva por brindarme tanto cariño Gracias por hermosos momentos compartidos.

A mi gran amiga Mariela Sánchez, por estar allí siempre que la necesite, por tener siempre una palabra de apoyo Gracias

A la Universidad de Los Andes y en especial a la facultad de Ciencias, por acogerme en esta casa de estudios

Al Instituto Universitario de Tecnología Alonso Gamero por el apoyo a mi formación académica.

A todas las personas de que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la concentración, peso molecular del quitosano, número de capas de revestimiento, condiciones y tiempo de almacenamiento sobre la germinación *in vitro* del calabacín. Las semillas extraídas del fruto fueron esterilizadas y recubiertas con dos capas de solución de quitosano despolimerizado con periodato de potasio: C2 (Mw = 34kDa) y C5 (Mw = 28 kDa) a partir de quitosano comercial (C0). El efecto de estas soluciones sobre la germinación se realizó en dos etapas: (a) después de la remoción del fruto (T_0) y (b) durante un periodo de seis meses con almacenamiento en ambiente y nevera. Se realizó un Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para establecer las combinaciones adecuadas de la concentración de quitosano (CQ) y el tiempo de preservación (T_p) de la semilla en condiciones de nevera y ambiente que permitan optimizar las respuesta tiempo de germinación (T_g) y germinación acumulada (%GA) a través de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Los resultados demuestran que las semillas recubiertas con dos capas de C5 almacenadas en nevera presentaron un mayor estímulo en la germinación acumulada (% GA) en menor tiempo (T_g), tomado a partir del segundo día de germinación. Con el fin de lograr la máxima germinación (%GA) en el menor tiempo posible (T_g), los modelos matemáticos derivados de la MSR permitieron estimar los valores óptimos. Para semillas bajo refrigeración, se obtuvo la máxima germinación acumulada de 108% con una relación óptima de las variables (T_p)/(CQ) de 4,5/0,65 y para un tiempo de germinación mínimo de 1,61 días las variables (T_p)/(CQ) fueron : 4,4 /0,58 (p/v). Se evidencia un efecto considerable del quitosano sobre la respuesta germinación acumulada y tiempo de germinación al compararse con aquellas semillas no tratadas, denominada controles. La propiedad que presentan estos oligómeros de quitosano en la germinación y crecimiento de semillas, convierten a este producto ambientalmente inofensivo en un potencial promotor del crecimiento de plantas en el menor tiempo posible.

Palabras clave: Quitosano, semillas de calabacín, compuesto central rotatable, metodología de superficie respuesta, germinación.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN	iii
1.-INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.- Generalidades sobre la quitina y el quitosano.....	3
a.- Breve reseña histórica.....	3
b.- Fuentes de obtención de la quitina y el quitosano.....	5
1.2.-Propiedades del quitosano	7
a.- Propiedades fisicoquímicas.....	7
b.- Propiedades del quitosano útiles en la agricultura.....	8
1.3.- Aplicaciones del quitosano.....	11
a.- Aplicaciones del quitosano en la agricultura.....	11
1.4.-Caracterización del quitosano.....	14
1.4.1.- Determinación del grado de N-acetilación/desacetilación.....	15
a.- Espectroscopia infrarroja	15
b.- Titulación conductimétrica	17
1.4.2.- Determinación del peso molecular promedio del quitosano.....	19
a.- Viscosimetría	19
b.- Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).....	22
1.5.- Despolimerización del quitosano con KIO_4	24
1.6.-Diseño compuesto central rotatable (DCCR).....	26
1.7.- Generalidades en el proceso germinativo de las semillas.....	28
a.- Definición de germinación.....	28
b.- Proceso de germinación.....	28
c.- Factores que afectan la germinación	30
d.- Latencia de la semilla.....	34
1.8.- Antecedentes	37
2.-Hipótesis.....	41
3.- Objetivos de la investigación.....	41
a. Objetivo general	41
b. Objetivos específicos.....	41

4.- PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1.- Reactivos y solventes	43
4.2.- Material vegetal	43
4.3.- Instrumentación	44
4.4.- Desarrollo experimental.....	45
4.4.1.- Caracterización del quitosano.....	45
a. Determinación del grado de N-acetilación (GDA):	45
b. Determinación del peso molecular	45
4.5.-Despolimerización del quitosano con KIO_4	46
4.6.- Proceso de esterilización de las semillas.....	47
4.7.- Recubrimiento de las semillas.....	48
4.8.- Proceso de germinación.....	49
4.9. Diseño compuesto central rotatable (DCCR).....	50
a.- Construcción de la matriz del diseño	50
b.- Cálculo de los niveles de los factores CQ y TP.....	50
4.10.- Análisis estadístico	52
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
5.1.- Caracterización del quitosano.....	54
a.- Determinación del grado de N-acetilación:	54
b.- Determinación del peso molecular	57
5.2.- Despolimerización del quitosano con KIO_4	60
5.3.- Cobertura de semillas	61
5.4.- Análisis estadístico.....	64
a.- Análisis de varianza	64
b.- Análisis de varianza de los tratamientos:.....	64
c.- Comparación de las medias mediante la mínima diferencia significativa.....	65
d.- Optimización de la concentración de quitosano y el tiempo de preservación.....	66
e.- Modelos polinómicos de variables independientes.....	68
6.- CONCLUSIONES	72
7.- RECOMENDACIONES	73
8.- REFERENCIAS.....	75
9.- ANEXOS	92

ANEXO 1	92
ANEXO 2	93
ANEXO 3	94
ANEXO 4	95

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE FIGURAS

Fig.1 Estructuras químicas de (a) quitina (b) quitosano (Lárez, 2006).....	4
Fig. 2: Esquema elemental de la producción de los derivados de la quitina	5
Fig. 3.- Esquema simplificado para la obtención de quitina y quitosano a partir de la concha de crustáceos (Lárez, 2006).....	6
Fig. 4: Espectro infrarrojo de una muestra de quitosano. Las líneas de base a y b son las utilizadas por Baxter <i>et al.</i> (1992) (ecuación 1) y las líneas de base c y d son las utilizadas por Brugnerotto <i>et al.</i> (2001) (ecuación 2).....	16
Fig. 5: Curva de valoración conductimétrica donde se aprecia las tres ramas que permiten determinar los equivalentes de grupos amino presentes (Hirano y Nagano, 1989).	18
Fig. 6: (a) Titulación conductimétrica de quitosano para diversas cantidades iniciales de quitosano (b) titulación del quitosano mostrando la neutralización del blanco (solución de HCl) (Lárez, 2006).	18
Fig. 7: Diagrama simplificado del proceso de separación en la cromatografía de exclusión por tamaño.	22
Fig. 8: Cromatograma de la solución de quitosano de 0,1516 g/dL en ácido acético (0,3M)/ acetato de sodio (0,2M).	23
Fig. 9: Esquema del proceso de germinación.....	29
Fig. 10: Curva de absorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las diferentes fases. I imbibición; II activación metabólica; III crecimiento radicular (Herrera, 2006). .	29
Fig. 11: Comportamiento del fitocromo (Martínez <i>et al.</i> , 2004).....	34
Fig. 12: Proceso de preparación de las semillas de calabacín: (a) extracción de las semillas del fruto, (b) selección, (c) remoción de la capa superficial de la semilla, (d) adición de hipoclorito de sodio, (e) secado de las semillas en la campana de flujo laminar.....	47
Fig. 13: Proceso de aspersión directa de semillas estériles de calabacín con solución de quitosano: (a) disposición de las semillas en la rejilla, (b) aspersión con las soluciones de quitosano y (c) secado al aire de las semillas.....	48
Fig. 14: Procedimiento de germinación del calabacín: (a) capsulas de Petri esterilizadas, (b) hidratación del sustrato, (c) siembra de semillas, (d) condiciones de germinación para semillas fotoblásticas negativas y (e) emergencia de la radícula (germinación de la semilla).	49
Fig. 15: Espectro infrarrojo del quitosano comercial (Fluka, BioChemika) en pastilla de KBr.	54
Fig. 16: Curva de titulación conductimétrica para el quitosano comercial (Fluka, BioChemika).....	56
Fig. 17: Gráfico de η_{red} en función de c_p (g/dL) para el quitosano comercial.	58
Fig. 18: Trazado cromatográfico de la solución de quitosano (4mg/mL en buffer ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2M)).....	59

Fig. 19 Trazado de SEC para C0, C2 y C5 obtenidas después del proceso de despolimerización con KIO_4	60
Fig. 20: Fotografías de las semillas de calabacín con recubrimientos de quitosano: (a) semilla control, (b) una capa, (c) dos capa (d) tres capas.....	61
Fig. 21: Micrografías de semillas colocadas de forma longitudinal I (a) semilla control, (b) semilla con quitosano; semillas colocadas de forma transversal (a') semilla control, (b') semilla con quitosano.....	62
Fig. 22: Números de capas- tratamientos C0, C2, C5 en función del %GA).....	62
Fig. 23: Comparación de medias entre tratamiento y grupos en función de (A) %GA; (B) (Tg). Valores de medias con la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la MDS ($\alpha = 0,05$)	66
Fig. 24: Superficie de respuesta para C5-N (A) %GA y (B) Tg.	69

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE TABLA

Tabla 1: Propiedades del quitosano (Crini <i>et al.</i> , 2009; Peniche, 2006)	8
Tabla 2: Aplicaciones del quitosano. (Peniche, 2006; Crini <i>et al.</i> , 2009)	12
Tabla 3: Algunos sistemas utilizados para la determinación de pesos moleculares de quitosano por SEC (Varum <i>et al.</i> , 1997; Aiba, 1991).....	22
Tabla 4: Rango experimental y niveles de variables independientes.....	51
Tabla 5: Combinaciones de los valores reales de CQ y TP.	52
Tabla 6: Asignaciones de las bandas del espectro infrarrojo del quitosano.....	55
Tabla 7: Absorbancias de interés del espectro infrarrojo del quitosano y valores obtenidos para el GDA (Lárez, 2006).....	55
Tabla 8: Valores calculados de las magnitudes utilizadas en viscosimetría.....	57
Tabla 9: Resultados obtenidos a partir del gráfico de Huggins.....	58
Tabla 10: Determinación del peso molecular promedio viscoso a partir de la ecuación de MHS....	59
Tabla 11: Resultados de la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de la solución de quitosano (4mg/mL en ácido acético (0,3M)/ acetato de sodio (0,2M)).....	60
Tabla 12: Resultados de Tg obtenidos durante los estudios de germinación de semillas control y recubiertas con quitosano. Condiciones de almacenamiento de semillas: nevera	63
Tabla 13: Resultados de %GA obtenidos durante los estudios de germinación de las semillas de calabacín control y recubiertos con quitosano.Condiciones de almacenamiento de semillas: nevera	63
Tabla 14: Análisis de varianza del modelo polinomial para la optimización del grupo C5-N en función de las variables respuesta %GA y Tg.	67

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

1.-INTRODUCCIÓN

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes del océano y del planeta, junto con la celulosa. Su tasa de regeneración en la biósfera es de aproximadamente $2,3 \times 10^9$ toneladas/año, lo que equivale a casi al doble de la tasa de la celulosa, (Goycoolea *et al.*, 2004). Desde el punto de vista estructural, la quitina es un polímero lineal de *N*-acetil-*D*-glucosamina presente en la pared celular de algunos hongos como ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, microalgas como las diatomeas, en el exoesqueleto de artrópodos (crustáceos, moluscos, insectos, arácnidos y anélidos) y en la estructura interna de otros invertebrados (Tsigos *et al.*, 2000).

Tanto la quitina como su principal derivado el quitosano, han sido el centro de atención en los últimos años debido al uso en diversos campos tales como: alimentos, medicina cosmética, farmacéutica, medio ambiente, agricultura, entre otras. Cada vez se reportan más usos de la quitina y el quitosano a nivel mundial. Para el año 2005, el mercado mundial de estos polímeros estaba dominado por Estados Unidos (30%), seguido de Japón y Asia del pacífico con un (20%) y Europa con un (15%). Aun cuando Latinoamérica no se encuentra entre los principales productores de quitina y quitosano a nivel mundial se ha reportado que podría generar hasta un 12 % de la demanda mundial de quitina (Goycoolea *et al.*, 2004; Lárez, 2008). Algunos países de la región, tales como Brasil, Chile, Cuba y México, han sido pioneros en la instalación de empresas que producen, desarrollan y comercializan derivados de quitina y quitosano principalmente con fines agrícolas.

Venezuela no se considera productor de quitina y quitosano a pesar de contar con fuentes generadoras de desechos pesqueros en granjas camaroneras distribuidas en más 4.000 km de costa. En general, los productos que contienen estos dos materiales en su formulación son importados, especialmente de Chile aquellos usados en aplicaciones agrícolas. Según el Instituto Socialista de Pesca y Acuicultura (INSOPESCA), para el año 2010 la producción camaronera nacional se incrementó de 10.482 a 13.368 toneladas anuales. Los desechos generados del aprovechamiento de estos recursos producen suficiente cantidad de exoesqueletos de camarón y cangrejo que fácilmente podrían surtir de materia prima

varias plantas de producción de estos dos biopolímeros, y otros subproductos aguas abajo en lo que puede ser su extensa cadena de procesamiento. En ese sentido, en el país se han generado algunos proyectos para la construcción de plantas para la extracción de quitina y producción de quitosano a partir de exoesqueletos de camarones y cangrejos, tanto públicos (Fundación Zuliana de Investigaciones Tecnológicas, INZIT) como privados (INNOVAQUITO, Maracaibo)

1.1.- Generalidades sobre la quitina y el quitosano

a.- Breve reseña histórica.

El primer reporte de una investigación científica relacionada con el material que hoy en día se conoce como quitina fue realizado por el científico inglés Charles Hatchett (1795), aunque él no dedicó ningún trabajo a establecer su estructura. Sin embargo, el reconocimiento por su aislamiento lo ha recibido el francés Henry Braconnot, quien en 1811 cuando trabajaba con hongos superiores, logró aislar la quitina y le asignó el nombre de fungina; posteriormente Odier en 1823 aisló, a partir de escarabajos en soluciones alcalinas, un compuesto insoluble que forma la estructura de las plantas, llamándola "quitina" (del griego *tunic*, envoltura). El quitosano es el principal derivado de la quitina y fue descubierto por Rouget en 1859, cuando reportó que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio concentrado se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta "quitina modificada", como él la llamó, se tornaba de color violeta en solución diluida de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó "chitosan" en inglés, que ha sido traducido al español como "quitosano", "quitosana", "quitosán" o "chitosan" (Lárez, 2003; Pastor e Higuera., 2004).

La quitina y el quitosano son heteropolímeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ó 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranososa y glucosamina (GlcN) ó 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa, unidos por enlaces glucosídicos β -(1-4) (ver **Figura 1**). En la quitina predominan las unidades acetiladas y en el quitosano las unidades desacetiladas. Dado que estos polímeros presentan variabilidad en su grado de polimerización, relación de

unidades acetiladas/desacetiladas y sus secuencias, es común describirlos con su peso molecular y grado de desacetilación (GD), parámetros de los cuales dependen sus propiedades fisicoquímicas y biológicas (Harish *et al.*, 2007).

El quitosano se obtiene por una reacción de desacetilación de la quitina, es decir, la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2 da lugar a un grupo amino en esa posición, lo que se produce cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado a temperaturas superiores a 60°C por tiempos prolongados. Cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos (Lárez, 2003). El GD del quitosano es igual o superior al 50% (Crini *et al.*, 2009) mientras que el de la quitina puede ser menor de 10% (Mourya, 2008) e incluso sus grupos aminos, como se observa en la **Figura 2**, pueden estar totalmente acetilados, como es el caso del polímero extraído de diatomeas denominado quitano (Falk *et al.*, 1999).

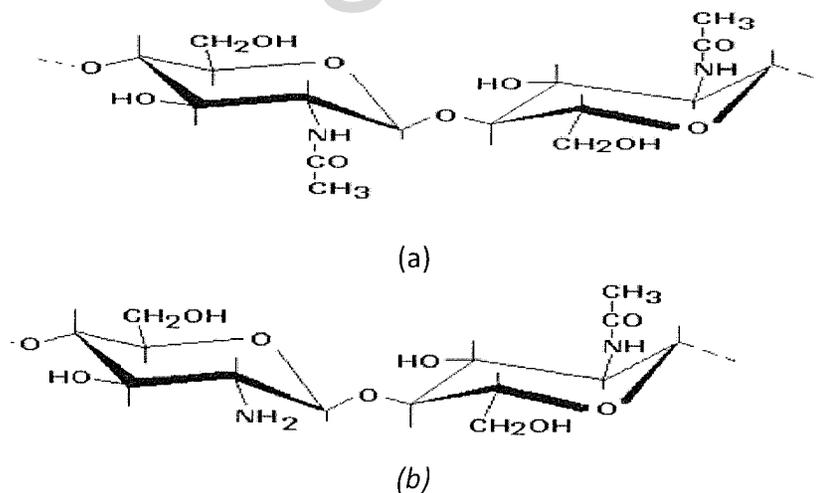


Fig.1 Estructuras químicas de (a) quitina (b) quitosano (Lárez, 2006).

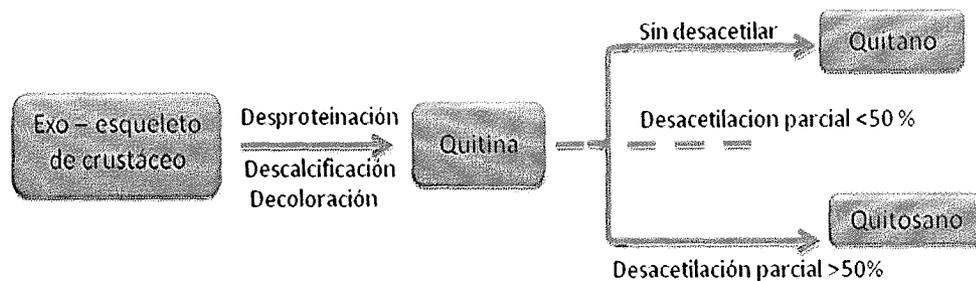


Fig. 2: Esquema elemental de la producción de los derivados de la quitina

b.- Fuentes de obtención de la quitina y el quitosano.

La quitina se encuentra distribuida en distintos linajes de organismos eucariotas: artrópodos, moluscos, nematodos, algas, hongos y protozoos. A pesar de su amplia distribución su principal fuente de extracción con fines industriales son los exoesqueletos de diversos tipos de crustáceos, principalmente camarones, langostas, cangrejos y kril, disponibles como desechos de la industria de alimentos de origen marino. Éstos constituyen de 20-58% del peso seco (Khor, 2001). La estimación mundial de obtención de quitina a partir de exoesqueletos de crustáceos es de 50.000 toneladas al año y la disponibilidad mundial de la quitina de esta fuente está estimada en 39.000 toneladas (Arago *et al.*, 2004). Otras fuentes exploradas para la extracción de quitina son las plumas de calamar, en las que ésta se encuentra en su forma cristalina β (Kurita *et al.*, 1993), y las paredes celulares de algunos hongos como los basidiomicetos, por ejemplo *Ganoderma lucidum* (Ospino *et al.*, 2012).

Por su parte, el quitosano se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de hongos zigomicetos, principalmente del orden Mucorales (Amorin *et al.*, 2005), también en basidiomicetos y en algunos ascomicetos, en algas, cutículas de insectos, crustáceos y en algunos arácnidos y mariápodos (Ruiz y Espinoza, 1999). Sin embargo, la fuente más importante para producir quitosano a nivel industrial es la quitina, la cual mediante un proceso de desacetilación química o enzimática ha permitido producirlo a gran escala. El proceso de producción de quitosano más común es la transformación termoquímica de la quitina extraída de exoesqueletos de crustáceos desechados en la industria.

Desde el punto de vista químico, los procesos de extracción de la quitina a partir de exoesqueletos de crustáceo, y su posterior transformación en quitosano, se realiza de acuerdo al diagrama simplificado de la **Figura 3**.

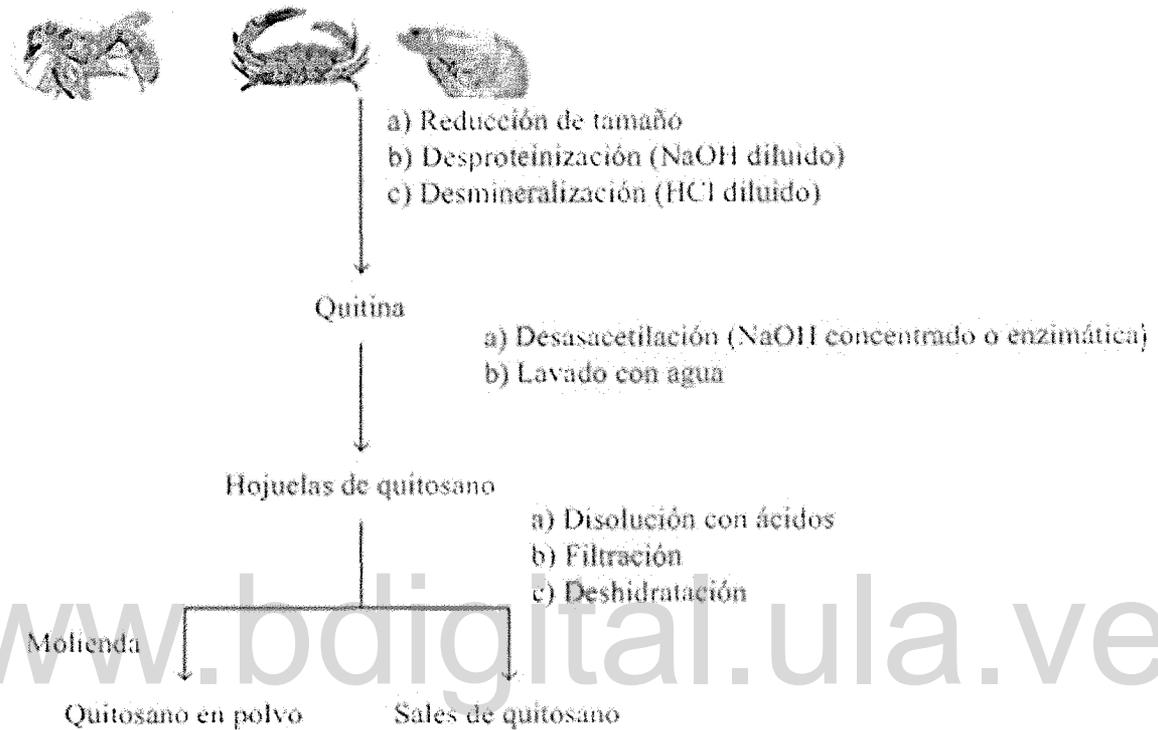


Fig. 3.- Esquema simplificado para la obtención de quitina y quitosano a partir de la concha de crustáceos (Lárez, 2006).

Las principales etapas de la extracción de quitina son la desproteínización con NaOH diluido, la desmineralización con HCl diluido, seguido de la desacetilación enzimática o química con NaOH concentrado lavado con agua, para obtener las hojuelas de quitosano, que posteriormente se tratan con disoluciones ácidas, se filtran y se deshidratan, para finalmente reducir el tamaño (molienda) obteniendo el quitosano en polvo y sus sales (Lárez, 2006).

1.2.-Propiedades del quitosano

a.- Propiedades fisicoquímicas

Las dos propiedades fisicoquímicas más importantes del quitosano son el grado de desacetilación y el peso molecular. El grado de desacetilación es la fracción de grupos aminos libres que posee la cadena polimérica del quitosano; éste es un parámetro muy importante al momento de caracterizar estos biopolímeros. Influye no solo en el resto de sus propiedades fisicoquímicas, sino también en su biodegradabilidad, solubilidad de soluciones ácidas, hinchamiento en agua, actividad inmunológica, inactividad. Este hecho es de suma importancia al momento de seleccionar un quitosano adecuado para cada aplicación (Krist *et al.*, 1993). En general, los quitosanos son insoluble a a pH neutro y alcalino, pero solubles en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos, incluyendo ácido glutámico, clorhídrico, láctico y acético. En medio ácido, el grupo amino se protona y la molécula se carga positivamente (Krist *et al.*, 1993), lo que la hace más hidrofílica y soluble en medio acuoso ácido.

Por otro lado, el quitosano es un material estable, capaz de interactuar, formar complejos ó adsorber otras sustancias químicas (Muzarelli *et al.*, 2009). Puede formar sales con ácidos y originar polielectrólitos con solubilidades variables, dependiendo de la naturaleza de los aniones, el GD, el peso molecular del polímero, el pH y la temperatura (Pastor e Higuera, 2004). Sus propiedades pueden ser modificadas cambiando el grado de desacetilación, el pH, la fuerza iónica, etc. Con un pH neutro la mayoría de las moléculas de quitosano pierden su carga y precipitan en la solución.

Debido al alto peso molecular que puede llegar a poseer, y a su estructura no ramificada, el quitosano es un excelente agente espesante porque aumenta la viscosidad de medios acuosos ácidos. La viscosidad de la solución de quitosano decrece con el aumento de la temperatura y aumenta con el grado de desacetilación. El quitosano es una molécula versátil con numerosas propiedades de interés como se observa en la **Tabla 1**. Puede ser modificado químicamente con poca variación en su peso molecular gracias a que sus unidades monoméricas tienen grupos hidróxilos primarios (C6), secundarios (C-3) y

también grupos aminos primarios (C-2); puede ser derivatizado por sustituciones, elongación de sus cadenas y despolimerización física, química y enzimática; esta última proporciona un poderoso medio para promover nuevas actividades biológicas y modificar las propiedades mecánicas (Harish y Tharanthan, 2007)

Tabla 1: Propiedades del quitosano (Crini *et al.*, 2009; Peniche, 2006).

Propiedades	Quitosano
Físicas y químicas	Aminopolisacárido lineal con alto contenido de nitrógeno Estructura rígida de D-glucosamina, alta cristalinidad e hidrofiliidad Capacidad de formar puentes de hidrógeno intramoleculares, alta viscosidad Base débil, el grupo amino actúa como un nucleófilo potente ($pK_a = 6,3$) Soluble en soluciones ácidas diluidas Forma sales orgánicas e inorgánicas Propiedades quelantes y de formación de complejos Conductividad iónica
Poliectrolitos	A pH ácido, biopolímero catiónico con alta densidad de carga (una carga positiva por residuo de glucosamina) Agente floculante, interactúa con moléculas cargadas negativamente Capacidad para formar películas, adhesividad Materiales para aislamiento de biomoléculas
Biológicas	Biocompatible: no tóxico, biodegradable, absorbible Bioactivo: actividad antimicrobiana, antiácida, antitumorante, hipolipédémica, bioadhesividad, mucoadhesividad

b.- Propiedades del quitosano útiles en la agricultura

El uso de productos bioproductos es uno de los principales retos de la agricultura moderna. En este sentido, el quitosano representa una alternativa muy prometedora debido a su carácter natural, significativa actividad biológica y facilidad de obtención. Por otra parte, algunas de sus propiedades lo hacen sumamente atractivo para su aplicación en el campo de la agricultura, como por ejemplo: Actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras), actividad antiviral, inducción de resistencia a enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal (Lárez, 2008). La actividad bactericida que presenta el quitosano se encuentra asociada a la carga positiva que se desarrolla cuando éste se encuentra a $pH < 5,5$, debido a la protonación del grupo amino presente en cada una de sus unidades glucosamina, lo que lo hace soluble en medio acuoso, según muchos

autores, confiriéndole también mayor actividad biocida (Papineau *et al.*, 1991; Helander *et al.*, 2001; Devlieghere *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales el quitosano ejerce dicha actividad no han sido dilucidados completamente. A pesar de ello, hay algunos mecanismos propuestos para explicar acciones específicas, como por ejemplo que la interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas, como la *Echerichia coli*) altera significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo (Chung *et al.*, 2004). Otros autores han propuesto que la formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrientes/desechos, provocando la muerte bacteriana (Devlieghere *et al.*, 2004). Otro mecanismo propone (Fernández *et al.*, 2004) que la interacción electrostática entre los grupos NH_3^+ del polication y los grupos fosforilos de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas causa daños en ésta, provocando la salida de material intracelular (Liu *et al.*, 2004).

La actividad antimicrobiana del quitosano dependerá en gran manera de aquellos factores que ayuden a acentuar las cargas positivas en la cadena del biopolímero. Entre estos factores cabe destacar el grado de desacetilación, la distribución de los grupos desacetilados a lo largo de la cadena, la longitud de la cadena, la distribución de los pesos moleculares (Terbojevich *et al.*, 1991) el pH, la fuerza iónica del medio, el contraión asociado en su forma sal y la temperatura.

De igual modo, la actividad fungicida del quitosano se ha asociado desde hace mucho a su carácter catiónico. La interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la membrana celular de los hongos, cambia la permeabilidad de ésta, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Benhamou *et al.*, 1992). Sin embargo, existen varios factores que ya han sido estudiados que mejoran la actividad como fungicida del quitosano, tales como: una dosis adecuada, su peso molecular, que el hongo se encuentre en un estadio

de desarrollo adecuado ya que éstos presentan diversas sensibilidades en sus distintos estadios (Liu *et al.*, 2007), etc.

Por otro lado, han sido publicados algunos trabajos sobre la actividad antiviral que ejercen las soluciones de quitosano, llegando incluso a inhibir enfermedades de plantas provocadas por virus y viroides (Chirkov *et al.*, 2002; Hirano y Nagano., 1989). También se ha reportado la inhibición de la enfermedad causada por inoculación de hojas de tomate con un viroide que afecta la papa (potato spindle tuber viroid) cuando éstas fueron tratadas con soluciones de quitosano (Pospieszny *et al.*, 1997). Las principales observaciones de estos estudios han sido que la inhibición viral depende de la combinación virus/hospedante, de la concentración de quitosano aplicado y de la forma de aplicarlo.

Su actividad como inductor de mecanismos de defensa en algunas plantas ha sido comprobada desde hace ya unos 30 años (Pearce *et al.*, 1982) sensibilizándolas para responder más rápidamente al ataque de patógenos. Entre las sustancias cuya inducción se ve favorecida por la presencia de quitina y/o quitosano, así como también muchos de sus derivados, se incluyen:

Fitoalexinas: pisantina, risitina, orchinol, genistein, etc.

Proteínas relacionadas a la patogénesis.

Inhibidores proteicos

Ligninas.

En el caso del quitosano se ha propuesto que esta sensibilización ocurre porque su presencia estimula mecanismos de defensa ya conocidos (Barka *et al.*, 2004) como por ejemplo: la producción de quitinasas y glucanasas (Benhamou, 1992), la lignificación en hojas dañadas (Pearce *et al.*, 1982) o intactas (Moerschbacher *et al.*, 1986), la generación de peróxido de hidrógeno o la formación de fitoalexinas en legumbres y plantas solanáceas. Los compuestos que provocan este tipo de respuestas se conocen como inductores.

Por último, una de las propiedades más interesantes que posee el quitosano es la de bioestimulante del crecimiento, como por ejemplo durante la germinación y desarrollo de la respuesta inductiva en el crecimiento del sistema radicular, de las plantas, en la tasa de crecimiento radicular, adelanto de la floración, incremento de los rendimientos de las cosechas, etc. Hasta la fecha no se han planteado mecanismos claros que expliquen tal efecto. Sin embargo, un estudio relacionado con el crecimiento de tejidos vegetales ha mostrado que el origen del quitosano es un aspecto importante. Los oligo-quitosanos procedentes de hongos necesitaron de dosis menores que los oligómeros procedentes de caparazones de camarones (Nge *et al.*, 2006) para la inducción de la diferenciación de tejidos de plantas de orquídeas, lo cual no es del todo extraño ya que se sabe que uno de los aspectos fundamentales en las propiedades fisicoquímicas del quitosano es su fuente de extracción.

1.3.- Aplicaciones del quitosano.

En los últimos veinte años las publicaciones científicas, patentes y páginas web de diversas empresas muestran un incremento en la producción, caracterización, usos y aplicaciones del quitosano y sus derivados. La evolución de los usos y aplicaciones de estos biopolímeros es muy significativa y su tendencia crece año a año debido a sus propiedades funcionales, fisicoquímicas y biológicas (Harish y Tharanathan, 2007; Li *et al.*, 1997).

Actualmente se conocen más de 2.000 aplicaciones para estos materiales, las cuales se han generado en campos tan variados como la medicina, la farmacia, la alimentación, el control ambiental, la biomedicina, la farmacia y cosmética, la agricultura, entre otros, siendo el sector alimentario el más prolífico, consumiendo alrededor del 50% de las 2.000 consumidas en todo el mundo (Harish *et al.*, 2007). En la **Tabla 2** se resumen algunas de las áreas con las aplicaciones más comúnmente encontradas del quitosano (Li *et al.*, 1997; Tsigos *et al.*, 2000; Peniche, 2006; Xu *et al.*, 2007).

a.- Aplicaciones del quitosano en la agricultura

En los últimos años el uso de quitosano en diversas áreas de la agricultura se ha ido incrementando. El quitosano se presenta como una alternativa prometedora al considerar diversos aspectos como lo son: su fácil accesibilidad, bajos costos de obtención,

ambientalmente inofensivo en grandes volúmenes, la baja toxicidad para humanos y animales, versatilidad de formas de usos (ej. soluciones, hidrogeles, películas) y el amplio espectro de uso que ha encontrado, abarcando aspectos como: protección postcosecha de frutos y vegetales, protección de plantas contra fitopatógenos, enmiendas de suelo, protección de semillas, matrices de liberación controlada de agroquímicos, estimulación en la germinación y crecimiento vegetal, algunos de los cuales ya han sido aprobados legalmente en varios países y están siendo aprovechados comercialmente (Lárez, 2008).

Tabla 2: Aplicaciones del quitosano. (Peniche, 2006; Crini *et al.*, 2009)

Campo	Aplicaciones
Alimento	Clarificación y desacidificación de frutas y bebidas, remoción decolorante, sólidos y ácidos, conservantes, antioxidante, aditivos, estabilizante de color, intensificación del sabor, control de textura, emulsionante, espesante, adsorción de lípidos, fibras alimenticias encapsulación de nutraceuticos.
Biomedicina	Producción de suturas quirúrgicas, cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras, membranas para diálisis, vasos sanguíneos artificiales, control de colesterol en sangre, inhibición de tumores en placa dental, control de liberación de medicamentos y genes (terapia génica), anticoagulante de la sangre, hemostático, antigastritis, sustituyentes de piel
Farmacia	Dosificación de fármacos, lentes de contacto, dosificación de vacunas, sistemas de liberación transversal, terapias génicas.
Cosmética	Agentes hidratantes para la piel, tratamiento para el cabello, capsulas para adelgazar, maquillaje, esmalte de uñas, lociones de baño, cremas para la cara, manos y cuello, cremas dentales.
Papel	Tratamiento de la superficie del papel, papel fotográfico, papel de copia sin carbón. Mejoras sus propiedades mecánicas y eléctricas aumenta su resistencia a la grasa y al plegamiento.
Textil	Formación de fibras, absorción de colorantes y estabilizador del color.
Tratamiento de agua	Filtración, recuperación de iones metálicos, pesticidas, y desechos sólidos, floculante/coagulante de proteínas, aminoácidos, fenoles, bifenilos policlorados (PCBs)
Agricultura	Recubrimiento de semillas y hojas, agente bactericida y fungicidas, protector de frutos, protección de plántula, germinación, estimulador del crecimiento vegetal, inductor de mecanismo de defensa, remediación de los suelos, aspersión de flores, liberación controlada de agroquímicos.

Así por ejemplo, el quitosano se presenta como un agente que controla numerosas enfermedades pre y post-cosecha en diferentes productos de horticultura; igualmente permite extender la vida media de frutas y vegetales cubiertos con sus películas en las

bodegas de almacenamiento, conservando mejor su textura y apariencia con el tiempo, debido a la modificación de la atmósfera interna y a la disminución de las pérdidas de agua por transpiración. También es aplicado superficialmente en plantas (ej. raíces, hojas y frutos) presentando un efecto doble:

- su acción antifúngica, la cual se favorece tanto por la concentración de quitosano y la presencia de sus oligómeros, al tener éstos mayor accesibilidad a la membrana celular (Xu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003)
- por la mejor fijación de agroquímicos, ya que una vez que el agroquímico se une al quitosano es resistente a la remoción por factores ambientales externos como la lluvia o vientos (Freepons *et al.*, 1997; Ziani *et al.*, 2010).

Además, el quitosano y sus oligómeros pueden también actuar como inductores de mecanismos de defensa en muchas plantas, sensibilizándolas frente al ataque de patógenos.

Diversas investigaciones han demostrado que el quitosano también actúa como un antiviral, inhibiendo enfermedades de plantas provocadas por virus y viroides tales: como virus del mosaico de la alfafa (VMA) en hojas de frijoles y el virus de mosaico del tabaco (VMT) (Pospieszny *et al.*, 1983), logrando controlar completamente la infección local.

Por otro lado, el quitosano en su forma hidratada forma hidrogeles que pueden encapsular agroquímicos y/o fertilizantes, creando sistemas de liberación controlada. Estos sistemas presentan ventajas en comparación a las formulaciones tradicionales tales como: protección del(os) agente(s) a dosificar, liberación automática del agroquímico únicamente en el lugar seleccionado a una velocidad adecuada, mantenimiento de la concentración óptima en el tiempo, control de las cantidades de los agroquímicos y biodegradabilidad disminuyendo el riesgo en la toxicidad en humanos y animales (Lárez, 2008).

Se ha demostrado que las películas de quitosano utilizadas en el recubrimiento de semillas presentan diversas bondades. Entre ellas se destacan:

Su actividad antifúngica frente a hongos como el *Aspergillus nigger* y la *Alternaria alternata* (Ziani *et al.*, 2010)

Como inductor genético, al reforzar y orientar ciertas características que dan fortaleza a las plantas (Ruiz y Espinoza, 1999) .

Como agente bioestimulador de la germinación de semillas; en algunos casos ha logrado elevar el porcentaje de germinación a los niveles requeridos para la certificación, conllevando a mayores niveles de producción.

La aplicación de quitosano ha mostrado tener efectos positivos en el crecimiento de las plantas al estimular el desarrollo radicular, retoños y hojas. Los efectos observados en varias plantas florales y de cosecha han demostrado una estimulación en su crecimiento y renovación de flores (Chandrkrachang, *et al.*, 2002). En trabajos recientes se concluye que existe una relación de proporcionalidad inversa entre el peso molecular del quitosano y el porcentaje de germinación y crecimiento radicular (Freepons *et al.*, 1997; Ziani *et al.*, 2010; Hirano y Nagano, 1989).

1.4.-Caracterización del quitosano.

Tanto la composición de las cadenas del quitosano como sus dimensiones suelen variar en dependencia de la fuente y del método de obtención, por lo que la determinación del grado de acetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de estos polisacáridos debido a que ambos parámetros tienen una gran incidencia en sus propiedades. Otras características, tales como la polidispersidad de su masa molecular, el contenido de humedad, el contenido de proteínas, su cristalinidad, etc., son también de obligado conocimiento. Para las aplicaciones en la alimentación, la medicina y farmacia, el contenido de metales pesados, endotoxinas, proteínas, entre otros, suelen ser también objeto de rigurosa determinación.

A continuación se describe los principales métodos empleados para la caracterizar estos biopolímeros (Hirano y Nagano., 1989).

1.4.1.- Determinación del grado de N-acetilación/desacetilación.

Se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación de estos polímeros basados en diversas técnicas, entre las que se pueden mencionar la espectroscopia infrarroja (Agulló *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2009; Sannan *et al.*, 1978; Miya *et al.*, 1980; Domszy, 1985; Moore, 1980; Baxter *et al.* 1992; Brugnerotto *et al.*, 2001), espectroscopia RMN de protón (Inoue *et al.*, 1997; Ebert *et al.*, 1997; Varum *et al.*, 1991; Muzzarelli *et al.*, 1997), la potenciometría (Agulló *et al.*, 2004; Muzzarelli *et al.*, 1997) y la conductimetría (Muzzarelli *et al.*, 1997; Raymond, 1993). Otras técnicas alternativas incluyen el análisis elemental (Roberts, 1992), el análisis térmico (García y Peniche, 1983).

Normalmente este parámetro se designa con las siglas DA por sus iniciales en inglés, aunque también se puede encontrar como F_A , o como el grado de desacetilación, DD, de acuerdo a la preferencia de cada autor. Otro parámetro directamente relacionado con el grado de N-acetilación y que es posible estimar a partir del el mismo, es la masa molar del equivalente-amino; esta masa molar se calcula de la siguiente manera (Hirano y Nagano, 1989)

a.- Espectroscopia infrarroja

Por su simplicidad, es hasta el presente el método más empleado. Las muestras se pueden preparar para su análisis en forma de películas o en pastillas de KBr. Las películas se obtienen esparciendo una solución de quitosano del 3-4% en peso en ácido acético 0,1M sobre una placa de vidrio y dejándola secar durante la noche. Posteriormente se sumergen en NaOH o amoníaco en metanol para convertirlas de sal ácida a la forma amina. Luego se lava con abundante agua y se secan a vacío durante la noche. Las pastillas se preparan moliendo una pequeña cantidad del polímero finamente dividida (por ejemplo 2mg) conjuntamente con 100mg de KBr y la mezcla se prensa para obtener una pastilla, la cual se puede secar a vacío durante la noche.

En la **Figura 4**, se muestra el espectro infrarrojo de quitosano con un 30 por ciento de N-acetilación. En éste se pueden apreciar las bandas características a 3450cm^{-1} (tensión de

los grupos -OH), 3292cm^{-1} (tensión N-H), 2919 y 2862cm^{-1} (tensión C-H), 1655cm^{-1} (amida I), 1580cm^{-1} (doblaje del grupo -NH₂), 1313cm^{-1} (amida III), 1154cm^{-1} (tensión asimétrica del puente C-O-C), 1082 y 1032cm^{-1} (vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranósica) y a 896cm^{-1} (tensión C-H de los grupos anoméricos) (Agulló *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 1992; Brugnerotto, *et al.*, 2001; Peniche *et al.*, 1999; Sreevinasan, 1998).

El método IR se basa en correlacionar las absorbancias de dos bandas de absorción pre-determinadas con el porcentaje de acetilación del quitosano. La selección de la bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación. Normalmente, una de las bandas es amida y la otra cualquier banda que sirva de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración de las pastillas de KBr.

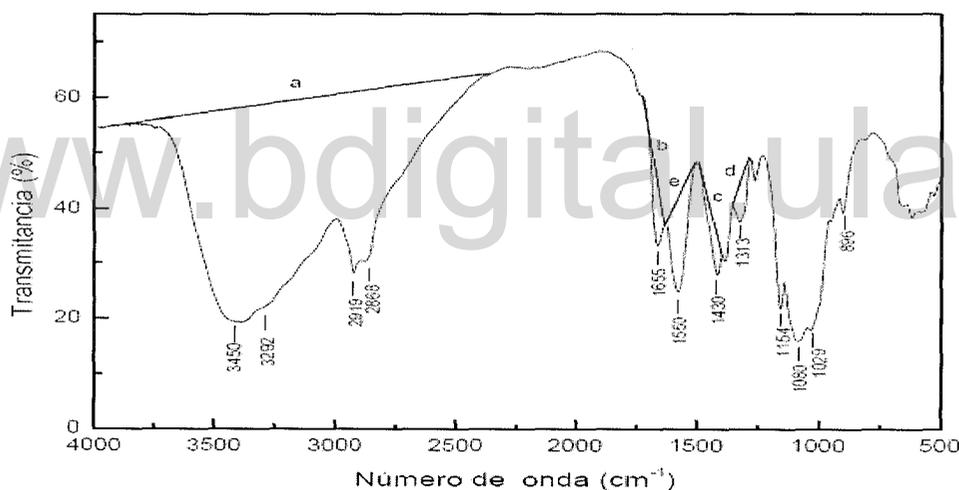


Fig. 4: Espectro infrarrojo de una muestra de quitosano. Las líneas de base a y b son las utilizadas por Baxter *et al.* (1992) (ecuación 1) y las líneas de base c y d son las utilizadas por Brugnerotto *et al.* (2001) (ecuación 2).

El método de Baxter *et al.* (1992) ha sido usado con frecuencia en la literatura. En éste, el grado de N-acetilación se calcula por la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115 \quad (1)$$

donde A_{1655} y A_{3450} son las absorbancias de las señales correspondientes a la amida I y al estiramiento O-H, tomada como referencia, respectivamente.

Más recientemente Brugnerotto *et al.* (2001) realizaron una extensiva investigación en la que analizaron 25 muestras de quitina y quitosano de diferentes fuentes y con grados de acetilación, determinados por espectroscopia RMN, que iban desde 0,5% hasta 97,9%. Tomando como señal relacionada con la acetilación la banda localizada a 1320cm^{-1} y como referencia la banda a 1420cm^{-1} , obtuvieron una correlación lineal que viene expresada por la siguiente relación:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = 31,92 (A_{1320}/A_{1420}) - 12,20; \quad (2)$$

En todas estas determinaciones por IR es muy importante la selección adecuada de las líneas base en el cálculo de la absorbancia para obtener buenos resultados (Roberts, 1992).

b.- Titulación conductimétrica

El método descrito por Raymond *et al.* (1993) se basa en la elevada conductividad que presentan los iones hidronio e hidroxilos en comparación con otros. Una solución de quitosano en exceso de HCl se valora con una solución de NaOH y se usa en este caso, un conductímetro. La neutralización del exceso de ácido se manifiesta como una disminución casi lineal de la conductividad hasta llegar a su valor mínimo, como se detallan en las **Figuras 5 y 6**. Seguidamente, se produce un incremento en la conductividad debido a la neutralización de los grupos amino protonados del quitosano. Esta curva presenta cierta curvatura motivada por la precipitación del quitosano, que comienza a $\text{pH}=6,5$.

Después de la neutralización la curva ascendente adquiere una mayor pendiente debido al exceso del álcali añadido. Los cambios de pendiente que se observan en los dos puntos mencionados presentan cierta curvatura. Este hecho se debe, en el primer caso, a la disociación inicial de los grupos amino protonados del quitosano y, en el segundo caso, a la precipitación del quitosano anteriormente mencionada. De esta forma, la equivalencia se calcula determinando las posiciones de las intersecciones de las ramas correspondientes de la curva. La diferencia entre los dos puntos de intersección corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los grupos aminos libres de quitosano, lo que permite determinar el grado de N-acetilación de la muestra. Es importante utilizar en los cálculos el valor del peso seco de la muestra, corregida de

acuerdo con el contenido de humedad (Hirano y Nagano, 1989; Agulló *et al.*, 2004). En la **Figura 6**, se muestran algunos ejemplos de este tipo de curvas.

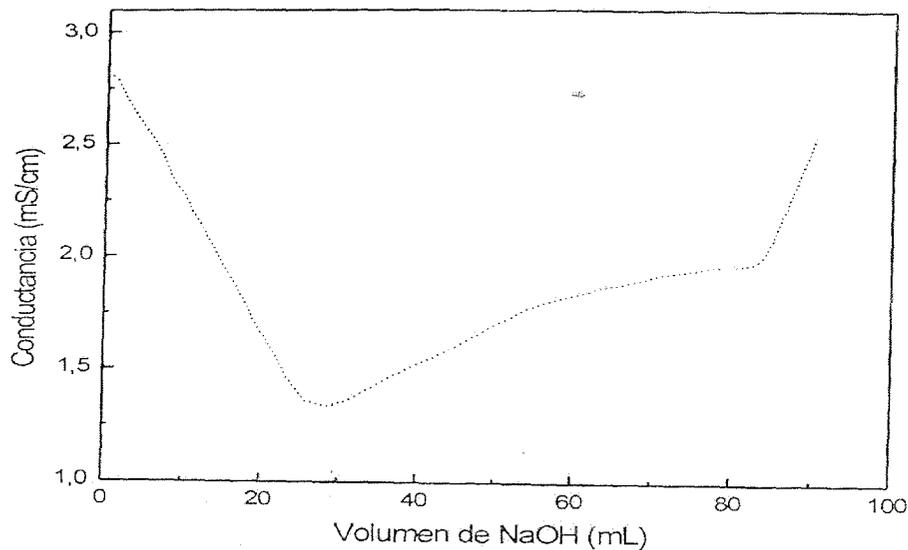


Fig. 5: Curva de valoración conductimétrica donde se aprecia las tres ramas que permiten determinar los equivalentes de grupos amino presentes (Hirano y Nagano, 1989).

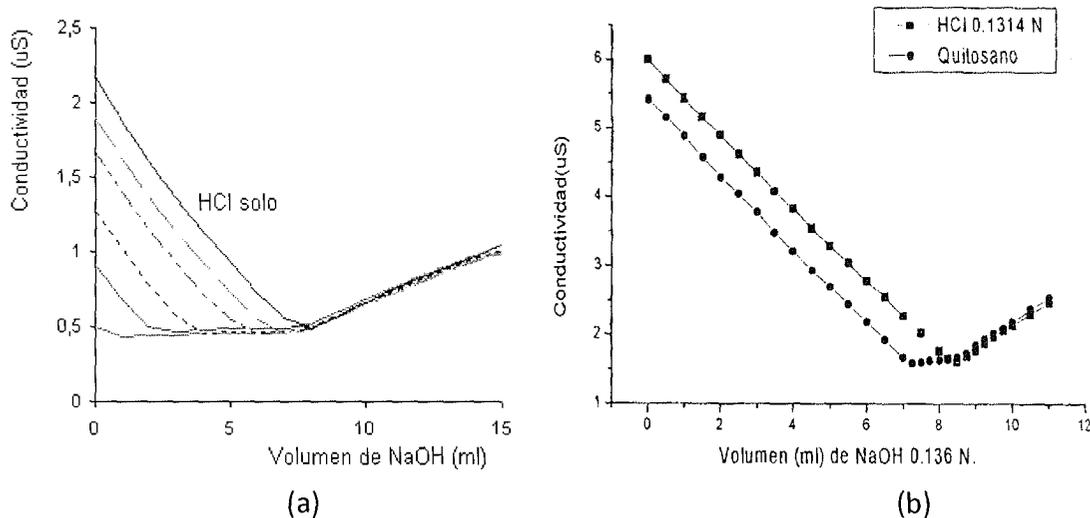


Fig. 6: (a) Titulación conductimétrica de quitosano para diversas cantidades iniciales de quitosano (b) titulación del quitosano mostrando la neutralización del blanco (solución de HCl) (Lárez, 2006).

1.4.2.- Determinación del peso molecular promedio del quitosano.

a.- Viscosimetría

La viscosimetría es el método más utilizado para obtener el peso molecular del quitosano. La viscosidad en una solución está definida como la resistencia de un líquido a fluir. Es una de las propiedades más importantes de los polímeros porque depende de su estructura química, de las interacciones con el solvente y del tamaño molecular. La viscosidad de una solución tiene origen en dos contribuciones: la del disolvente y la del polímero. Por lo general, las viscosidades de las macromoléculas son muy altas dado el gran volumen de estas especies, lo que trae como consecuencia una mayor resistencia al movimiento.

Es importante señalar que la mayor resistencia al movimiento está influenciada por el grado de empaquetamiento de la cadena, el cual depende de las magnitudes relativas de las fuerzas intermoleculares entre el polímero y las moléculas de disolvente, en comparación con la fuerza entre dos partes de la cadena del polímero. Por lo tanto, podemos esperar que la viscosidad de una disolución de polímeros dependa del tamaño y la forma (del peso molecular y el grado de empaquetamiento) de las moléculas de polímeros en la disolución. Al limitarnos a un tipo dado de polímero en un disolvente determinado, entonces el grado de empaquetamiento permanece igual, y el peso molecular del polímero se puede determinar mediante medidas de viscosidad (Petrucci *et al.*, 1999; Katime, 1994).

Algunas magnitudes empleadas en viscosimetría son:

La viscosidad relativa, o coeficiente de viscosidades (η_r), de una disolución de polímeros se define como el cociente entre la viscosidad absoluta de la disolución, η , y la del disolvente puro, η_o (Katime, 1994).

$$\eta_r = \eta / \eta_o \quad (3)$$

La viscosidad específica se define como:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \eta - \eta_o / \eta_o \quad (4)$$

La viscosidad reducida se define como:

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/c \quad (5)$$

donde c es la concentración de polímero. Ésta es una medida de la capacidad de un polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente.

viscosidad inherente se define como :

$$\eta_{inh} = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}/c \quad (6)$$

Aun en soluciones muy diluidas las moléculas de polímeros son capaces de interacciones intermoleculares. Las dos contribuciones a la viscosidad reducida son el movimiento de las moléculas aisladas en el disolvente y la interacción entre las moléculas del polímero y el solvente de la solución. Para eliminar las interacciones es necesario extrapolar a concentración cero y obtener allí las viscosidades inherente y reducida, cualquiera de ellas es comúnmente conocida como viscosidad intrínseca (Katime, 1994).

$$[\eta] = (\eta_{red})_{c \rightarrow 0} = (\eta_{inh})_{c \rightarrow 0} \quad (7)$$

Para efectuar la extrapolación es conviene conocer la dependencia de la viscosidad intrínseca con la concentración. La teoría rigurosa no está aun terminada pero Huggins propuso una ecuación muy aproximada:

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k_1[\eta]^2 c \quad (8)$$

Ésta se aplica sólo a soluciones diluidas, generalmente del orden del 1%, para las que el gráfico de η_{sp}/c en función de la concentración (c) genera una recta cuya ordenada en el origen es la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y K_1 es la constante hidrodinámica denominada de Huggins. El parámetro k_1 depende de las interacciones que se establecen entre las moléculas vecinas de polímero que se encuentran en disolución. Ambos parámetros, $[\eta]$ y k_1 , son medidas indirectas de la capacidad del disolvente para solvatar un polímero en particular. La viscosidad intrínseca es una expresión de la interferencia hidrodinámica entre el polímero y el disolvente, lo que refleja la capacidad del disolvente para disolver el polímero. La constante k_1 puede considerarse independientemente del peso molecular y la rigidez de la cadena de polímero y, por lo tanto, es un parámetro adecuado para la selección de un buen disolvente para un polímero en especial. La constante k_1 describe

sólo la interacción resultante de la diferencia estructural química del polímero y la naturaleza del solvente. El parámetro k_1 suele adoptar valores comprendidos entre 0,3 (en caso de muy buenos disolventes) y 0,5 (para disolventes theta o ideales). Valores superiores a 0,5 son indicativos de que el polímero está sufriendo procesos de agregación.

La relación que existe entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular consiste en que la viscosidad intrínseca mide el volumen específico de una cadena polimérica aislado, razón por la cual su determinación se realiza extrapolando a concentración nula. Su valor depende del tamaño y la forma de la molécula del soluto, así como de su interacción con el disolvente y de la temperatura de trabajo. Muchísimos datos experimentales muestran que para un tipo dado de polímero, en un disolvente determinado, la expresión de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) se cumple bien a temperatura constante:

$$[\eta]=K M_v^\alpha \quad (9)$$

donde M_v es el peso molecular promedio viscoso, K y α son constantes para un sistema dado polímero/disolvente/temperatura. Esta relación ha sido comprobada experimentalmente en muchos sistemas polímero/solvente. Al llevar a cabo mediciones de viscosidad intrínseca y peso molecular y representarlas en un grafico de $\ln[\eta]$ en función del $\ln M$, se obtiene una línea recta, cuya ordenada en el origen es igual al $\ln K$ y la pendiente igual al exponente α .

Cuando se tiene el valor de dichas constantes para un sistema polímero/disolvente/temperatura determinado se pueden utilizar para la determinación del peso molecular promedio viscoso. (Katime, 1994).

$$M_v = \{[\eta]/K\}^{1/\alpha} \quad (10)$$

Para aplicar esta expresión es necesario trabajar con solventes buenos (en condiciones theta $\alpha = 0,5$; para disolventes buenos $0,5 < \alpha < 1$). Un valor próximo a la unidad asegura que M_v obtenido es aproximado al peso molecular promedio en peso (M_w).

b.- Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) permite determinar no solamente el peso molecular sino también la distribución de pesos moleculares del polímero (Yau *et al.*, 1979). El método consiste en hacer pasar una disolución diluida del polímero a través de una columna rellena de un gel rígido poroso. Las columnas comúnmente empleadas son las de geles de copolímeros estireno/divinilbenceno. Las moléculas del polímero en solución se difunden a través de la estructura porosa de gel en una extensión que depende de su tamaño: las moléculas más grandes penetran poco o nada en los poros del gel y fluyen más rápido, mientras que las pequeñas realizan un recorrido mayor a través de la estructura porosa del relleno y se retrasan en su avance por la columna, tal como se muestra en la **Figura 7**. Se produce, de esta manera, una separación en términos de sus tamaños moleculares (de modo más correcto, de sus volúmenes hidrodinámicos).

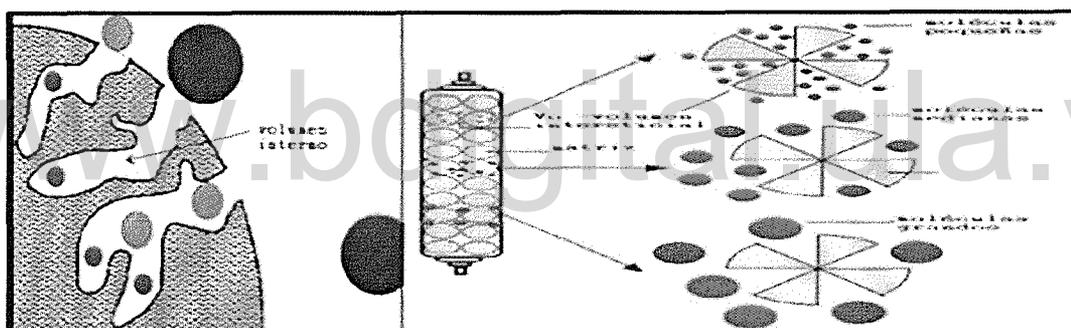


Fig. 7: Diagrama simplificado del proceso de separación en la cromatografía de exclusión por tamaño.

En la **Tabla 3**, se muestran algunos sistemas utilizados para la determinación de pesos moleculares de quitosanos por SEC (Isogai *et al.*, 1979).

Tabla 3. Algunos sistemas utilizados para la determinación de pesos moleculares de quitosano por SEC (Varum *et al.*, 1997; Aiba, 1991).

Muestra	Pretratamiento	Eluyente
Quitosano	Ninguno	Tampón ácido acuoso
	N-acetilación con Ac ₂ O	LiCl/N,N-dimetilacetamida

En la **Figura 8**, se presenta el cromatograma correspondiente a un quitosano comercial utilizando como eluyente un tampón ácido acuoso.

En éste cromatograma, la fase estacionaria consiste de redes porosas tridimensionales de polímeros entrecruzados. Las columnas son empaquetadas con estos polímeros, cuyo tamaño de poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a ellos, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán entrar libremente en ellos. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de ésta. Las moléculas de mayor tamaño que los poros harán el camino más corto, ya que nunca entran a la malla de la fase estacionaria. Se dice que estas moléculas son excluidas. Las moléculas pequeñas pueden difundir dentro de la matriz. Cuanto menor es su tamaño, mayor es la probabilidad de que entren a un poro. Así, a menor tamaño de la molécula, más largo el camino que seguirá dentro de la malla de la fase estacionaria. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

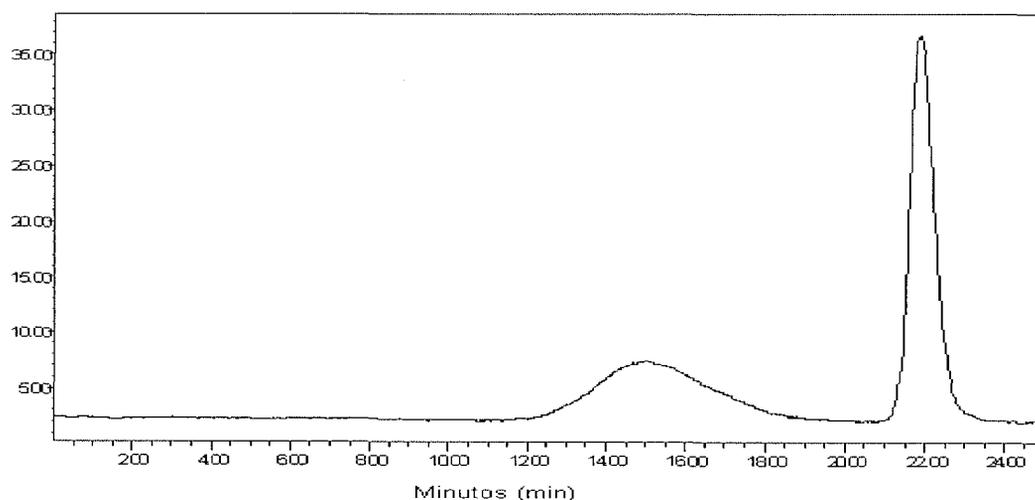


Fig. 8: Cromatograma de la solución de quitosano de 0,1516 g/dL en ácido acético (0,3M)/ acetato de sodio (0,2M).

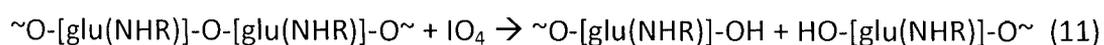
1.5.- Despolimerización del quitosano con KIO_4 .

La despolimerización o degradación del quitosano se realiza con la finalidad de obtener oligómeros y materiales de bajo peso molecular basados en este biopolímero. Es un área de mucho interés actual por varias razones. En primer lugar, estos derivados de bajo peso molecular muestran mayor solubilidad en medios acuosos de pH neutro que sus homólogos de mayor tamaño (Qin *et al.*, 2002a). También estos materiales han mostrado mayor bioactividad en algunas aplicaciones específicas, donde pueden tomar ventaja adicional de su origen natural, como por ejemplo en la preservación de alimentos (Sekiguchi *et al.*, 1994) aplicaciones agrícolas (Lárez, 2008) terapia génica (Eliyahu *et al.*, 2003; Krishnendu *et al.*, 2007), etc., debido a que son sustancias más amigables con el ambiente y/o presentan excelentes características de biocompatibilidad. Similarmente, su baja toxicidad es también un factor a considerar. La despolimerización del quitosano ha sido lograda por una diversidad de rutas hidrolíticas, incluyendo el uso de sustancias químicas tales como el ácido nítrico (Tommeraas *et al.*, 2007), agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (Qin *et al.*, 2002), radicales libres como el persulfato de potasio (Hsu *et al.*, 2002), entre otros; métodos físicos como la fotodegradación (Wang *et al.*, 2005), tratamientos ultrasónicos (Liu *et al.*, 2006), radiación ionizante, etc.; y tratamientos biológicos mediante el empleo directo de enzimas (quitosanasas, papaína, lizosima, bromelina), (Patil *et al.*, 2000; Lárez *et al.*, 2007) o de microorganismos que generan sustancias quitinolíticas (Struszczyk *et al.*, 2006).

La diversidad de métodos que se han estudiado para producir quitosanos de bajo peso molecular y oligoquitosanos se ha incrementado, todo ello con el interés de obtener distintas vías degradativas, ya que pueden generar materiales con estructuras y, por ende, con propiedades diferentes. Una reacción que permite ilustrar con claridad la diversidad de estructuras que pueden obtenerse durante la degradación del quitosano es su oxidación con periodato, debido a que este reactivo puede inducir la ocurrencia de diversas reacciones, cuyas extensiones obviamente dependerán en gran medida de las condiciones en las cuales se realicen los experimentos. Entre las posibles reacciones que pueden ocurrir tenemos: (a) reacciones de oxidación de enlaces C-C (Vold, 2004) con

sustituyentes como grupos hidroxilo y amino vecinales, conocidas como reacción de Malaprade (Malaprade, 1928); (b) la reacción de desconchado (oxidación extensiva en las unidades terminales); y (c) la reacción de despolimerización por hidrólisis de los enlaces glucosídicos. La oxidación del quitosano con peryodato ha sido estudiada recientemente por Christensen *et al.* (2008) usando el agente oxidante en proporciones que permiten oxidar extensiones mayores al 5% de las unidades glucosamina. En este caso, se reportó la ocurrencia de la reacción de Malaprade, con la consecuente flexibilización de la cadena, pero también se reportó la ocurrencia notoria de la reacción de despolimerización, como ha sido propuesto en estudios previos (Vold *et al.*, 2005).

La despolimerización de polisacáridos es un proceso que puede verse favorecido por un mecanismo de radicales libres (Painter, 1988), lo cual merece especial atención en el caso de reacciones con periodato en presencia de luz, porque se sabe desde hace mucho tiempo que en tales condiciones éste se descompone espontáneamente en radicales libres (Symons, 1955; Scott, 1976). Se ha reportado que esta descomposición es una reacción compleja que puede producir varios tipos de radicales libres, incluyendo radicales HO•, IO₃• y IO₄• (Domenech *et al.*, 2004). En ese sentido, investigaciones recientes indican que el uso de proporciones pequeñas del agente oxidante (con relación a los cantidades de grupos amino presentes en la solución de quitosano) favorecen la reacción de despolimerización por hidrólisis de los enlaces glucosídicos (Zambrano, 2009; Christensen *et al.*, 2008), ya que se ha comprobado que las reacciones de Malaprade y de desconchado ocurren apreciablemente para proporciones más altas de agente oxidante. Por ello, se puede asumir que la reacción de hidrólisis de la unión glucosídica puede ser representada por la siguiente ecuación:



donde $-\text{[glu}(\text{NHR})-\text{O}-\text{]}$ representa la unidad constitucional repetitiva del quitosano, que como se sabe puede ser de dos tipos: acetilada (R = -COCH₃) y desacetilada (R = H).

1.6.-Diseño compuesto central rotatable (DCCR)

La metodología de la superficie de respuesta surge como una alternativa de solución a la necesidad de superar los inconvenientes que se presentan en los diseños con arreglo factorial de tratamientos, cuando el número de factores y niveles crecen considerablemente (Chacín, 1998).

El diseño compuesto central rotatable (DCCR) es definido como un conjunto particular de métodos estadísticos y matemáticos que emplean los investigadores para auxiliarse en la solución de ciertos tipos de problemas relativos a procesos científicos o de ingeniería. Hasta ahora su mayor aplicación ha tenido lugar en las investigaciones industriales (Meyers, 1971; Mora *et al.*, 2000; Montgomery, 1991). El DCCR fue propuesto por Box & Wilson en 1951 como una alternativa al factorial 3^k ; básicamente consiste de un núcleo factorial 2^k , cuyos niveles de los factores se codifican con +1 y -1, así como niveles α que pueden variar de acuerdo al número de factores a evaluar y garantiza, además, una propiedad estadística de rotabilidad. El proceso consiste en analizar y optimizar respuestas de variables dependientes influenciadas por variables independientes, asumiendo estas últimas como continuas (Montgomery, 1991). Diferentes autores (Ascanio *et al.* 1996; Tacoronte, 1997; González *et al.*, 2006) han comprobado la utilidad del DCCR en experimentos de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* de uso agrícola (Bustamante *et al.*, 2006).

Para ello existen procedimientos de comparaciones múltiples entre todas las parejas de medias, que se usan aun cuando el objetivo sea seleccionar los tratamientos con las mejores medias. Los procedimientos de comparaciones múltiples de Tukey, Duncan y Dunnett son ampliamente usados en investigación agrícola. En este caso, el análisis de varianza aporta la estimación de la varianza del error con sus grados de libertad y la información básica sobre si existe o no diferencias significativas en las medias de los tratamientos.

La forma de la función f que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es, en general, desconocida, por lo que el primer objetivo de la Metodología de

Superficie de Respuesta (MSR) consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la función f . Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los k factores X_1, X_2, \dots, X_k y se selecciona un conjunto de tratamientos sobre los que realizar las observaciones experimentales, que se utilizarán tanto para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo propuesto (por ejemplo, a través del método de mínimos cuadrados) como para obtener una estimación de la variación del error experimental (para lo que es necesario tener al menos 2 observaciones por cada tratamiento). Se realizan, entonces, contrastes sobre las estimaciones de los parámetros y sobre el ajuste del modelo y, si el modelo se considera adecuado, puede utilizarse como función de aproximación. En tal caso, el estudio de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada, pues su análisis será aproximadamente equivalente al del sistema real.

Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de aproximación son los de órdenes uno y dos, que nos proporcionan, respectivamente los siguientes modelos:

Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de aproximación son los de órdenes uno y dos; para la investigación se utilizó el modelo de segundo orden, tal como se muestra en la ecuación 12 (Montgomery, 1991)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 + \varepsilon \quad (12)$$

donde

Y = Valor promedio de la variable de respuesta

β_0 = Intercepto

β_1 = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 1 sobre la variable promedio

β_2 = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 2 sobre la variable promedio

β_3 = Razón de cambio (efecto cuadrático) del factor 1 sobre la variable promedio

β_4 = Razón de cambio (efecto cuadrático) del factor 2 sobre la variable promedio

β_5 = Razón de cambio del efecto entre X_1 y X_2 sobre la respuesta promedio

$X_1 X_2$ = Valores de las variables independientes

ε = Término de error (efecto no explicado por el modelo)

1.7.- Generalidades en el proceso germinativo de las semillas.

a.- Definición de germinación.

Es una serie de eventos en los cuales un embrión en estado quiescente al ser estimulado por ciertas condiciones de humedad, temperatura, luz y oxígeno se desarrolla formándose una plántula. La germinación incorpora aquellos eventos que se inician con la absorción de agua por la semilla seca y terminan con la elongación del eje embrionario. El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean el embrión, como se muestra en la **Figura 9**, en la cual se presenta un esquema del proceso de germinación (Herrera, 2006; Gracia, 2006)

b.- Proceso de germinación.

La **Figura 10**, muestra las tres fases en la cual se divide el proceso de la germinación.

- La fase I corresponde a la imbibición, que es el proceso físico de absorción de agua necesaria para la rehidratación de las proteínas y organelas celulares, así como para el transporte y para que ocurran las reacciones hidrolíticas.
- En la fase II se lleva a cabo el proceso de activación del metabolismo donde se pone en marcha la maquinaria de síntesis y degradación; en esta fase ocurre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, también se incrementan las actividades enzimáticas, así como la degradación de las sustancias de reservas.
- Y por último, la fase III corresponde a la emergencia de la radícula (crecimiento visible), concluyendo en el proceso germinativo, ya que el crecimiento subsecuente se considera un proceso aparte.

Todos estos procesos se lleven a cabo en presencia esencial de: agua, oxígeno y la temperatura. En ausencia de alguno de estos factores, la mayoría de las semillas se mantendrían en estado quiescente.



Fig. 9: Esquema del proceso de germinación.

Fase I. Imbibición: es el primer paso del proceso de germinación, definido como el proceso físico temporal de absorción – adsorción de agua por parte de las membranas en la semilla. Inicialmente el agua penetra por capilaridad al interior de la semilla en germinación por una intensa absorción de sus tejidos constitutivos y luego se redistribuye dentro de la semilla por adsorción (Herrera, 2006).

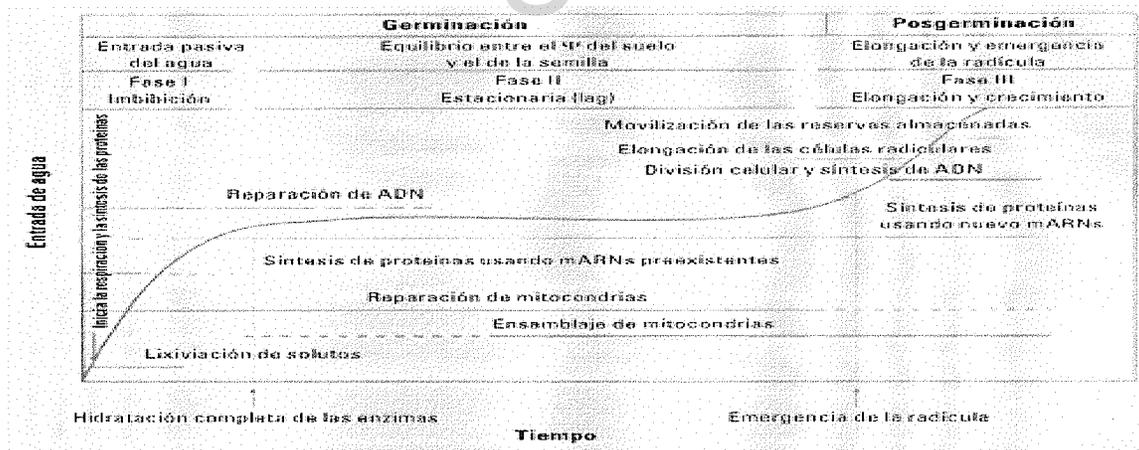


Fig. 10: Curva de absorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las diferentes fases. I imbibición; II activación metabólica; III crecimiento radicular (Herrera, 2006).

Fase II. Activación metabólica: esta etapa representa el verdadero proceso de germinación. En ella se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el

correcto desarrollo de la plántula y se caracteriza por el cese en la absorción de agua y una actividad respiratoria más reducida. En esta fase predomina el ciclo de la pentosa fosfato.

Fase III. Crecimiento de la radícula: con la penetración de las envolturas de la semilla por parte de radícula se marca el final del proceso de germinación y el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de reservas. Para que emerja la radícula, ésta debe atravesar varias barreras internas principalmente la testa o endospermo. En la mayoría de las especies, la emergencia de la radícula requiere del debilitamiento de las estructuras que rodean la punta de la raíz. En el caso del tomate y el melón, es el endospermo y no el embrión es el que termina la germinación. En las horas previas a que la radícula emerja, la fuerza necesaria para penetrar los tejidos que rodean la radícula disminuyen rápidamente; este debilitamiento de sus estructuras es producido, en muchas especies, por la degradación o por la separación de las paredes celulares del endosperma, compuesto generalmente por polímeros de mananos o galactomananos, los cuales son degradados por las enzimas producidas y secretadas por el mismo endosperma. La actividad de estas enzimas (endo β -mananasa, α -galactosidasa y β -manosidasa) se incrementa durante la imbibición. Las giberelinas (fitohormona) tienen un papel indispensable en la activación de las enzimas hidrolasas que permite la emergencia de la radícula (Herrera, 2006; Gracia, 2006)

c.- Factores que afectan la germinación

Los factores que afectan la germinación podemos dividirlos en dos tipos:

Factores internos: son intrínsecos o propios de la semilla, como la madurez y la viabilidad

Madurez de la semilla: la semilla es madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico. La madurez morfológica se presenta cuando todas las estructuras de la semilla han completado su desarrollo, dándose por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo. La madurez de la semilla también se le relaciona con la deshidratación de los diferentes tejidos que forman la semilla. Muchas semillas, aunque sean morfológicamente maduras, pueden seguir siendo incapaces de germinar porque necesitan experimentar aún una serie de

transformaciones fisiológicas. Debido a que la semilla necesita la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o acumulación de sustancias promotoras, es decir, de alguna manera necesitan ajustes en el equilibrio hormonal y/o en la sensibilidad de sus tejidos para las distintas sustancias activas. La madurez fisiológica se alcanza al mismo tiempo que la morfológica, o bien puede haber diferencias de semanas, meses o hasta años.

Viabilidad de la semilla: es el periodo de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Este periodo varía dependiendo del tipo de semilla y las condiciones de almacenamiento. En general, la vida media de una semilla oscila entre 5 y 25 años. Las semillas pierden su viabilidad por causas muy diversas. Se podría pensar que mueren porque agotan sus reservas nutritivas, pero no es así, sino que conservan la mayor parte de las mismas cuando ya han perdido su capacidad germinativa. En resumen, podemos decir que, para alargar más el tiempo de vida de una semilla, ésta debe conservarse en las siguientes condiciones: mantenerla seca (dentro de algunos límites), a temperaturas bajas y reducir al mínimo la presencia de oxígeno en el medio de conservación.

Factores externos: entre los factores ambientales más importantes que inciden en la germinación se tienen: la humedad, la temperatura, la luz y la concentración de los gases. Estas condiciones son las que van a determinar los primeros fenómenos de la germinación

Humedad: la absorción de agua es el primer paso, y el más importante, que tiene lugar durante la germinación; para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. En condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Por ello, hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal, siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico. Aunque el agua es necesaria para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión.

Temperatura: La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación ya que influye de varias maneras, como un factor de ruptura de la latencia y en la germinación en sí, determinando tanto la capacidad como la tasa de germinación. Las especies vegetales tienen la capacidad de germinar en un amplio y definido rango de temperatura máxima y mínima debido a que la actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. Del mismo modo, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. Por ello, las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. Para cada clase de semilla existe una temperatura mínima y una máxima en la que ocurre la germinación.

Además, dentro del rango de temperatura mínima/máxima, existe un punto en el que se obtiene máxima germinación y esta ocurre más rápidamente; este punto corresponde a la temperatura óptima. Estas temperaturas se conocen como las temperaturas cardinales de germinación. La clasificación de las temperaturas de germinación se describe a continuación:

Temperatura mínima. Por debajo de esta temperatura los procesos de germinación no se pueden detectar visualmente, dentro de un período razonable de tiempo.

Temperatura máxima. Es la temperatura por encima de la cual los mecanismos de germinación no operan y por lo tanto no se da crecimiento del embrión. En contraste con la temperatura mínima, la máxima es fácil de determinar ya que temperaturas superiores a la máxima causan daños irreversibles a las semillas (excepción a esta regla son las semillas que entran en latencia a altas temperaturas).

Temperatura óptima: esta se puede definir como la temperatura a la cual se da el porcentaje máximo de germinación en un mínimo de tiempo

Gases: la mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O₂ y CO₂. De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas. Para que la germinación tenga éxito, el O₂ disuelto en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión. A veces, algunos elementos presentes en la cubierta

seminal como compuestos fenólicos, capas de mucílago, macroesclereidas, etc., pueden obstaculizar la germinación de la semilla por que reducen la difusión del O₂ desde el exterior hacia el embrión. Además, hay que tener en cuenta que la cantidad de O₂ que llega al embrión disminuye a medida que aumenta disponibilidad de agua en la semilla. A todo lo anterior hay que añadir que la temperatura modifica la solubilidad del O₂ en el agua que absorbe la semilla, siendo menor la solubilidad a medida que aumenta la temperatura. (Gracia, 2006)

Luz: La exposición a la luz estimula la germinación de semilla de muchas especies, tanto silvestres como agrícolas. Este estímulo de la luz en la germinación está mediado por la acción del fitocromo, una cromoproteína soluble constituida por dos subunidades idénticas de unos 1200 aminoácidos y una masa molecular de alrededor de 125kDalton, la cual posee la capacidad de encontrarse en dos estados: uno promotor de la germinación (Pfr), que se produce bajo una condición de iluminación de luz blanca o por iluminación con luz de una longitud de onda correspondiente al rojo (660nm), y otro en un estado inhibitorio (Pr), que se produce cuando la semilla se encuentra en la oscuridad o cuando son iluminadas con longitud de onda correspondiente al rojo lejano (730nm), tal como se muestra en la **Figura 11**.

El efecto de la luz puede ser promotor o inhibidor según la composición espectral, la irradiación y la duración de la irradiación, la temperatura y la fisiológica de las semillas. La efectividad de la irradiación también depende del grado de inhibición y, en la mayoría de las especies, la respuesta máxima requiere un mínimo de 24 horas de imbibición. La irradiación es efectiva en semillas deshidratadas. Las semillas se denominan fotoblásticas positivas o negativas según la germinación resulte estimulada o inhibida por la luz. En el caso específico de las especies *Cucúrbita pepo*, éstas se caracterizan por ser fotoblásticas negativas, es decir naturalmente tienen el fitocromo activo y, al ser sometidas a luz, el fitocromo es inactivado, razón por la cual, estas especies solo germinan bajo oscuridad total (Martínez *et al.*, 2004).

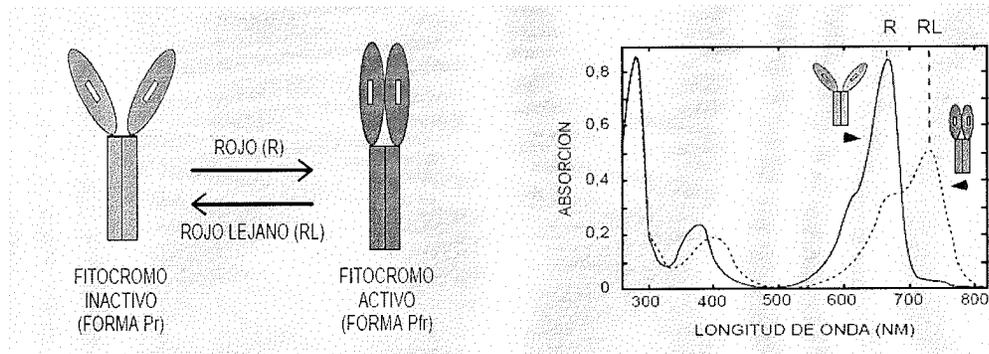


Fig. 11: Comportamiento del fitocromo (Martínez *et al.*, 2004).

d.- Latencia de la semilla.

La latencia o dormición en la semilla se entiende como el estado en el cual una semilla viable no germina aunque se la coloque en condiciones adecuadas de humedad, temperatura y concentración de oxígeno para hacerlo. Las causas por las que no germinan pueden deberse a la existencia de un periodo cronológicamente regulado de interrupción del crecimiento y de disminución del metabolismo durante el ciclo vital. Sin embargo, debe distinguirse este término del que se utiliza para describir semillas que no germinan por carencias de condiciones ambientales adecuadas; estas semillas se denominan quiescentes (Herrera, 2006).

Tipos de latencia: la latencia puede clasificarse dependiendo de la localización de la inhibición en la semilla; cada una de las categorías posee ventajas y desventajas, así como tratamientos específicos para romper el estado de dormancia. Los factores responsables de la latencia (latencia innata) son muy diversos, pero podemos agruparlo en tres grupos: exógena, endógena y latencia combinada (García, 2006). A continuación se clasifican la latencia en dos grandes grupos:

Latencia exógena: las semillas que presentan este tipo de latencia tienen un retraso en la germinación y es debido a las propiedades físicas y químicas de las cubiertas seminales, por lo podríamos denominarla “*latencia impuesta por cubierta seminales*”. En este caso el embrión aislado germina con normalidad. Los mecanismos que actúan en la latencia impuesta por las cubiertas seminales son:

Impermeabilidad al agua: en algunas familias (Leguminosas, Malváceas, Quenopodiáceas, Convolvuláceas, Liliáceas, Solanáceas) las cubiertas seminales actúan como barrera a la difusión del agua, debido a la presencia de cutícula y a un parénquima en empalizada muy desarrollado. En condiciones naturales, tanto la flora microbiana del suelo como los cambios de temperatura pueden desgastar las cubiertas, haciendo que se vuelvan permeables al agua. Sin embargo, en condiciones de laboratorio podemos acelerar el proceso mediante distintos tratamientos: abrasión con arena, aplicando ácido sulfúrico concentrado durante períodos cortos de tiempo; sumergiendo las semillas en agua hirviendo; mediante cambios de temperatura.

Impermeabilidad al intercambio de gases: A veces, son las diferentes capas de tejido que rodean el embrión las responsables de que no se produzca el intercambio de gases entre éste y el medio externo, dificultando así la entrada de O₂, como ocurre en la *Curcubita pepo* (calabacín). Esta barrera supone un impedimento para que se produzca la respiración, llegando a impedir la germinación de la semilla. La baja difusión del O₂ a través de la cubierta se debe, en la mayoría de los casos, a la presencia sobre la cubierta seminal de una capa mucilaginosa. En algunas semillas (*Rumex crispus*, *Butela*, *Avena fatua*) se puede inducir la germinación eliminando la testa o rompiéndola.

Resistencia mecánica: En las semillas con pericarpio duro, la radícula no puede romperlo, y éste actúa como obstáculo mecánico a la germinación; un ejemplo de ello lo tenemos en las semillas de *Eleagnus angustifolia*. Podemos acelerar la germinación si eliminamos manualmente el pericarpio, o bien si lo sometemos a diferentes tratamientos térmicos.

Presencia de inhibidores: la presencia de inhibidores en las cubiertas seminales es el causante de que especies tropicales y subtropicales no puedan germinar en las estaciones secas. La naturaleza química de los inhibidores es muy variada, pero principalmente se trata de compuestos fenólicos. La eliminación manual de la cubierta o la lixiviación de los frutos es suficiente para que se inicie la germinación. En condiciones naturales esto ocurre durante las estaciones lluviosas (Gracia, 2006).

Latencia endógena: la latencia endógena viene determinada por características anatómicas, morfológicas y fisiológicas del propio embrión (latencia embrionaria). En este caso, el embrión es durmiente en sí mismo y es incapaz de germinar incluso si es aislado de la semilla y colocado en condiciones favorables. Este tipo de latencia sólo puede eliminarse cuando existan factores que puedan provocar cambios en las características anteriores, tales como la estratificación a ciertas temperaturas, condiciones de iluminación, administración de sustancias de crecimiento, etc. Podemos distinguir tres tipos de latencia endógena, dependiendo de la característica que provoque tal dormición: latencia morfológica, latencia fisiológica, y latencia morfofisiológica.

Latencia morfológica: este tipo de latencia se debe a que el embrión no está desarrollado totalmente y, por lo tanto, la germinación no puede producirse hasta que el embrión complete su total desarrollo. Las Palmáceas, Araliáceas, Magnoliáceas y Ranunculáceas son ejemplos que presentan este tipo de latencia. La madurez del embrión se completa en condiciones de estratificación a temperaturas adecuadas durante días o meses. Además, esta inmadurez embrionaria está asociada con algún tipo de latencia morfofisiológica.

Latencia fisiológica: se debe a una disminución en la actividad de los embriones. Se puede eliminar en las semillas que la presentan mediante un almacenamiento en sitio seco, con tratamiento frío o con tratamiento luminoso.

1.- Semillas que necesitan un almacenamiento seco: lo presentan la mayoría de los cereales (arroz, cebada, trigo, avena) y algunas variedades de lechuga y tréboles. Las semillas así almacenadas van perdiendo paulatinamente la latencia y van adquiriendo la capacidad de germinar al colocarlas en condiciones adecuadas. Es por lo tanto una latencia poco profunda, sin conocerse las causas que la provocan, ni los cambios que sufren las semillas tras el almacenamiento.

2.- Semillas con un requerimiento frío: algunas especies que necesitan pasar un período frío son: *Corylus avellana* (avellano), *Fagus sylvatica* (haya), *Fraxinus excelsior* (fresno), *Betula* sp. (abedul), *Pinus* sp. (pino), *Malus* sp. (manzano), *Rosa* sp. (rosa), etc. Estas semillas si se siembran en otoño y quedan expuestas al frío invernal germinarán a la

primavera siguiente. Por ello, la práctica habitual es colocar las semillas embebidas en agua, entre capas de arena, y dejarlas así durante el tiempo que sea necesario, lo que varía según la especie.

3.- Semillas sensibles a la luz: existe un reducido número de especies en las que la germinación es inhibida por la luz (*Nemophilla insignis*, *Phacelia tanacetifolia*, *Lythrum salicaria* y *Phlox drumondii*). Para que estas semillas respondan a la luz han de estar embebidas en agua y percibir un corto período de iluminación. Además, las temperaturas elevadas también les afectan. El almacenamiento en sitio seco permite que al cabo de un cierto tiempo las semillas germinen en oscuridad completa. Parece ser que el fitocromo juega un papel decisivo en la respuesta de las semillas a la luz, tanto en las que la germinación es inhibida como estimulada (reversión rojo/rojo lejano). El fitocromo suministra un sensor luminoso que contribuye a desencadenar todo el proceso de la germinación cuando la semilla se encuentra muy cerca o en la superficie del suelo.

Latencia morfofisiológica: es una combinación de las dos anteriores. Suele darse una inmadurez embrionaria con algún problema fisiológico, como ocurre en semillas de *Viburnum opalus*. Estas semillas germinan a temperaturas cálidas y es el hipocótilo el que presenta el estado durmiente; sólo reanudan el crecimiento cuando la plántula, con un sistema radicular desarrollado, es sometida a un tratamiento frío (Pérez, 1994; Azcón *et al.*, 1993).

Latencia combinada: generalmente, en la mayoría de los casos, las semillas presentan una latencia combinada, es decir, una combinación de latencia endógena y exógena. Así, en semillas de *Tilia* (tilo), por ejemplo, el estado durmiente fisiológico está asociado con una impermeabilidad al agua de las cubiertas seminales (Pérez, 1994; Galvez *et al.*, 2002).

1.8.- Antecedentes

2002

Galve *et al.*, (2002) realizó ensayos de germinación y crecimiento radicular en tabaco, remolacha, tomate, aplicando diferentes dosis 5, 10 y 25 g.kg⁻¹ de soluciones de quitosano con pesos moleculares de 30.000 y 50.000 g.mol⁻¹ bajo un diseño estadístico

completamente al azar, 3 y 4 repeticiones. Concluye que no existe un efecto fitotóxico en las especies evaluadas, que existe un efecto significativo sobre el índice de vigor en tomate y tabaco y se logra un aumento en la longitud radicular de las tres especies.

2004

Tacoronte *et al.*, confirma la utilidad de Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) en ensayos de cultivos vegetales *in vitro*. A partir de un rango de concentraciones hormonales define y alcanza dentro de una superficie de respuesta las condiciones óptimas de alargamiento de yemas laterales de caoba en una relación 0,38mg/L ANA (Ácido Naftalenoacético) y 1,94mg/L (BA) (Benciladeninapurina)

2006

Bustamante *et al.*, (2006) también alcanza con éxitos una superficie de respuesta de meristemas apicales de plátano tratadas y cultivadas bajo condiciones asépticas. Logran establecer un rango de Benciladeninapurina (BA) y Carbón Activado (CA) para : 1.- inducir máxima respuestas de primordios y 2.- asegurar el control máximo de oxidación de los explantes. Como resultado se obtuvo que el diseño generó nueve tratamientos en los rangos de 0-10 mg/L de BA y 0,1-0,4% de CA. La superficie de respuesta resultante de la aplicación del DCCR mostró que los valores óptimos están en 9,5mg/L de BA y 0,4% de CA para la inducción de primordios y 4,3mg/L de BA y 0,3% de CA para controlar la oxidación.

2006

Peniche *et al.*, (2006) realizó una evaluación de las técnicas de caracterización y las oportunidades de aplicaciones que presentan la quitina y el quitosano en diferentes áreas, y en particular en la agricultura, dentro de las investigaciones semillas de tomates recubiertas con quitosano presentaron una velocidad y porcentaje de germinación mayor que las semillas no tratadas. Se concluye que el quitosano se comporta como un bioestimulante en las semillas de tomate tratadas no solo aumenta el porcentaje de germinación sino también las plantas resultantes son más vigorosas, es decir presentan mayor crecimiento longitudinal y diámetro de vástago.

2008

Lárez (2008) llevo a cabo una revisión en la que presenta una visión sobre las potencialidades de la quitina y el quitosano para su uso relacionado en la agricultura en Latinoamérica. En esta investigación revisa las diversas propiedades tales como: actividad bactericida, fungicida, antiviral, estimulante del crecimiento, capacidad inductora; que hacen del quitosano y la quitina biomateriales atractivos para su aplicación en el campo de la agricultura. Además, a lo largo de esta revisión se presentan algunos de los usos más comunes que actualmente se les dan a estos dos biomateriales (recubrimiento de frutos, semillas, alimentos con películas; protección de plántulas; clarificación de jugos de frutas; matrices para la liberación de agroquímicos; biocidas)

2010

Ziani *et al.* (2010) estudiaron el efecto que tienen algunas formulaciones que incluyen quitosano (con pesos moleculares diferentes, presencia o ausencia de surfactante tipo Span 80, valores de pH, y fungicida TMTD) y el grosor del recubrimiento logrado con éstas (número de capas de revestimiento) sobre la germinación, la actividad de hongos y el crecimiento vegetativo de semillas de alcachofa. Los resultados indicaron que el quitosano con menor peso molecular obtuvo un mayor porcentaje de germinación y disminución de la contaminación por hongos. En todos los tratamientos la capa de quitosano estimuló el sistema radicular de la planta, además de observarse que en los tratamientos que incluían quitosano/fungicida con una sola capa de revestimiento se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de germinación y crecimiento de las plantas.

Recientemente se ha estudiado la preparación de hidrogeles como soporte para la inmovilización de enzimas, recubrimiento de implantes ortopédicos, agente floculante de impurezas en aguas (Lárez, 2008), degradación química y biológica de quitosano, bioremediación en suelos contaminados, tratamiento de quemaduras y heridas (Colina, 2010) y como bioestimulante en la germinación y crecimiento radicular en semillas.

El quitosano se ha estudiado en los últimos años como un producto natural para aplicaciones en áreas tales como recubrimiento de semillas (Freepons, 1997, en la

conservación de frutas y hortalizas (Assis *et al.*, 2004), fungicida (Allan y Hadwiger, 1979), crecimiento bioestimulante (Lárez, 2008), (Burrows *et al.*, 2007), elicitador (Franco e Iriti, 2007) y un inductor de resistencia a patógenos (Ozeretskovskaya *et al.*, 2002), etc. La eficacia del quitosano como estimulante de la germinación se ha demostrado también para una variedad de especies de plantas tales como algodón, maíz (Tingda *et al.*, 1994), trigo (Bhaskara *et al.*, 1999), pepino, chile, calabaza (Chandrkrachang, 2002), okra (Jaybhay *et al.*, 2010), alcachofa (Ziani *et al.*, 2010) etc.

En este trabajo, se estudió el efecto de la concentración (0 a 1 p/v), peso molecular del quitosano, número de capas de revestimiento, condiciones (ambiente y nevera) y tiempo de almacenamiento (1 a 6 meses) sobre la germinación *in vitro* de semillas de calabacín, para ello realizó un diseño compuesto central rotatable (CCR) que permitió establecer las combinaciones adecuadas de la concentración de quitosano (CQ) y el tiempo de preservación (Tp) de la semilla el cual le permitan optimizar las respuesta tiempo de germinación (Tg) y germinación acumulada (%GA) a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR).

www.bdigital.ula.ve

HIPÓTESIS/OBJETIVOS

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

2.-Hipótesis

El quitosano posee demostradas propiedades agroquímicas relacionadas con la preservación de semillas y bioestimulación de la germinación y crecimiento en plantas. Su efecto sobre estas variables depende de factores como peso molecular, grado de acetilación, contraíón usado para formar la sal soluble en agua, pH del medio, etc. Sobre esta base se plantea que la protección de semillas de calabacín (*Curcubita pepo*) con películas de quitosanos de distintos pesos moleculares (obtenidos por despolimerización de una muestra comercial de quitosano con periodato de potasio) puede tener efectos favorables sobre su preservación y su germinación, especialmente con las muestras de menor peso molecular

3.- Objetivos de la investigación

a. Objetivo general

Evaluar el efecto del quitosano comercial, despolimerizado y sin despolimerizar con KIO_4 , sobre germinación y la preservación de las semillas calabacín bajo condiciones *in vitro*.

b. Objetivos específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el quitosano comercial, mediante técnicas para determinar su peso molecular (viscosimetría/SEC) y su grado de desacetilación (FTIR/conductimetría).
- Realizar la despolimerización química del quitosano comercial de partida con relaciones molares de KIO_4/NH_2 de 2% y 5%
- Establecer la metodología de cobertura de quitosano al evaluar en las semillas de calabacín el efecto de preservación y germinación cuando la cobertura es de : 1, 2 o 3 capas
- Determinar el tiempo de preservación óptimo y la mejor muestra de quitosano (peso molecular y concentración) para el recubrimiento de las semillas de calabacín, en dos condiciones de almacenamiento (nevera y ambiente), mediante la evaluación del porcentaje de germinación acumulada (%GA) y el tiempo de germinación (Tg) por métodos estadísticos, incluyendo el diseño compuesto central rotatable.

www.bdigital.ula.ve

PARTE EXPERIMENTAL

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

4.- PARTE EXPERIMENTAL

La investigación se desarrolló en conjunto en los Laboratorio de Polímeros y el Laboratorio de Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

4.1.- Reactivos y solventes

Quitosano de peso molecular aproximado a150.000g/mol (Fluka, BioChemika low molecular weight (LMW).

Agua desionizada (Millipore Milli Q18) y agua destilada estéril.

Ácido acético (Riedel de Haen, 99,8%; d= 1,05g/ml)

Acetato de sodio (Pro analysis, 99% anhidro)

Alcohol isopropílico (Fisher Scientific).

Hidróxido de sodio (EKA Chemical, 99%).

Hipoclorito de sodio NaClO (solución de hipoclorito de sodio comercial al 5 %).

Periodato de potasio KIO₄ (Merk, 99,8%).

www.bdigital.ula.ve

4.2.- Material vegetal

Se utilizaron semillas de calabacín procedentes de los frutos de la segunda generación de semillas certificadas (Vilmorin, Francia) adquiridas en una tienda de productos agrícolas local (sobre de 10g). La selección de esta especie para la investigación obedeció a que su tiempo de cultivo es corto y a la disponibilidad en la zona, lo cual favorece el desarrollo de la investigación. Los frutos se cultivaron en un huerto proveniente del sector El Paramillo, vía el plan de El Morro, cuya ubicación geográfica es 8°26'28,04" de latitud norte y 71°11'17,34" de latitud oeste, a 1745 msnm, con valores promedios anuales de (MARS 2004):

Temperatura: 17,8 °C

Humedad relativa 87%

Evaporación 1264 mm

Precipitación de 890,5mm

Las semillas controles y las cubiertas con quitosano se mantuvieron hasta su uso en bolsas de papel cerradas bajo dos condiciones de almacenamiento: ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) y nevera ($\sim 4^{\circ}\text{C}$).

4.3.- Instrumentación

Los espectros de infrarrojo correspondientes a la muestra de quitosano se obtuvieron empleando un espectrómetro FTIR Perkin Elmer (PE), modelo Spectrum 2000 (Nolwack, CT. USA) equipado con una fuente de radiación PE para trabajar en el MIR (Medium Infrared), acumulando 16 barridos a una resolución de 4cm^{-1} .

Las medidas de conductividad de la solución de quitosano se llevaron a cabo usando un conductímetro digital (Hanna Instruments, modelo HI 8033) calibrado con una solución de HI-7033 ($84\mu\text{S}/\text{cm}$ a $25^{\circ}\text{C}/77^{\circ}\text{F}$).

Las medidas de viscosidad se realizaron en un viscosímetro (Cannon 150-D503), usando un baño termostátizado (Gallenkamp) para mantener constante la temperatura de las soluciones a una temperatura de $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

La cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) se llevó cabo en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, Waters 600E), con detector de índice de refracción (Waters 410). Se emplean dos columnas en serie: Ultrahydrogel 250TM y Ultrahydrogel 2000TM, ambas de la casa comercial Waters, que abarcan un rango total de peso molecular de $0 - 7 \times 10^6$ Dalton.

Aspersor de solución de diseño propio acoplado a un compresor de aire con una presión de 0,5psi.

Capsulas de Petri.

Autoclave vertical (Phoenix. Linea AV-Plus).

Campana de flujo laminar (EACI-Envirco).

Cámara de crecimiento.

Balanza analítica (adventuer) cap 210g y 0.001g

4.4.- Desarrollo experimental

4.4.1.- Caracterización del quitosano

a. Determinación del grado de N-acetilación (GDA):

Espectroscopia infrarroja: el espectro de FTIR del quitosano comercial de partida se obtuvo mediante la preparación de una pastilla por trituración y pulverizado de 1,5mg de quitosano y 65mg de KBr hasta obtener un fino polvo homogéneo. Los datos se procesaron con el software Spectrum 2000.

Titulación conductimétrica: la determinación del grado del GDA del quitosano se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: se disolvieron 40,1mg del polímero en 20mL agua desionizada (Millipore Milli Q18) y 4mL de HCl \approx 0,115N con agitación continua por 24 horas. Esta solución se tituló con NaOH \approx 0,1210N. Adicionalmente se tituló un blanco (en ausencia del polímero) con 20mL agua desionizada y 4mL de HCl 0,1150N (Lárez, 1998).

b. Determinación del peso molecular

Viscosimetría: se prepararon 100mL de una solución de quitosano madre de concentración 0,125g/dL, en una solución reguladora de ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2M). Seguidamente, se agregó una alícuota de 10mL de esta solución en el viscosímetro Ubbelohde capilar tipo Ostwald y después de lograr el equilibrio térmico en $25\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ se midió el tiempo de elución de la misma. Finalmente, se preparó cuatro soluciones por *dilución in situ* de la solución madre de quitosano. Para ello, se agregó cantidades aditivas del buffer de: 5, 5, 10 y 10 mL. Se tomó el tiempo de elución de cada una de soluciones preparadas por quintuplicado.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): se inyectaron 200 μL de una solución tamponada de quitosano (4mg/mL) y se dejan correr en el sistema por corrida de 30 min.; las condiciones usadas en el equipo fueron: presión de bomba de 1.900psi, flujo 1mL/min, temperatura del detector 30°C y un buffer de ácido acético/acetato de sodio (pH=4,5) como fase móvil. Se preparó una curva de calibración usando estándares de polióxido de etileno (POE) con una concentración de 1mg/mL en el buffer de trabajo.

Se prepararon 6 soluciones patrones de diferentes pesos moleculares (2×10^3 , 3×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 6×10^5 g/mol).

4.5.-Despolimerización del quitosano con KIO_4 .

La despolimerización química del quitosano se realizó a través de una ligera modificación del procedimiento descrito por Lárez y Zambrano (2011), la cual se puede resumir de la siguiente manera:

1.- Se preparó una solución madre de 2,5% (p/v). Para ello, $2,500 \pm 0,001$ g de quitosano comercial y 1mL de ácido acético concentrado se aforan a 250mL con agua desionizada, se deja disolver con agitación continua durante 12 horas para, finalmente, filtrarse al vacío a través de un embudo de vidrio poroso (Sovirel 2).

2.- Dos de las tres de soluciones madres preparadas se someten a despolimerización química con KIO_4 . Para ello, cada una se trata con la cantidad estequiométrica de KIO_4 necesaria para lograr el porcentaje de oxidación predeterminado, es decir, 2% y 5% de equivalentes de sus grupos $-NH_2$. Se adicionaron 0,068 y 0,1700g de KIO_4 , respectivamente, con agitación continua por un periodo de 3 horas. La solución de quitosano despolimerizado con 2% de KIO_4 se codificó como C2 y la solución de quitosano despolimerizado con 5% de KIO_4 como C5; la solución madre, sin adición del KIO_4 , se codificó como CO.

La disminución del peso molecular de C2 y C5 fue confirmada por SEC. La inyección de las soluciones despolimerizadas se realizó inmediatamente después de terminado su tiempo de tratamiento con KIO_4 . Las condiciones de SEC fueron similares a las usadas en la caracterización del quitosano de partida.

3.- Se prepararon soluciones de cada una de los quitosanos (CO, C2 y C5) por dilución de las muestras iniciales a concentraciones finales de 0,1; 0,23; 0,55; 0,87 y 1% (p/v) tal como lo estableció el DCCR.

4.6.- Proceso de esterilización de las semillas

La esterilización se llevó a cabo tal como se ilustra en la **Figura 12**, donde se observa también el procedimiento detallado de la preparación de las semillas:

(a) Secado por 24 horas.

(b) Selección de semillas en función de la textura y tamaño

(c) Remoción de la capa superficial de la semilla.

(d) Tiempo inmersión en la solución de hipoclorito de sodio

(e) 5 lavados continuos con agua destilada estéril para, eliminar todo el hipoclorito. Posteriormente las semillas fueron colocadas, con la ayuda de pinzas, en papel absorbente estéril para su secado en el campana de flujo laminar.

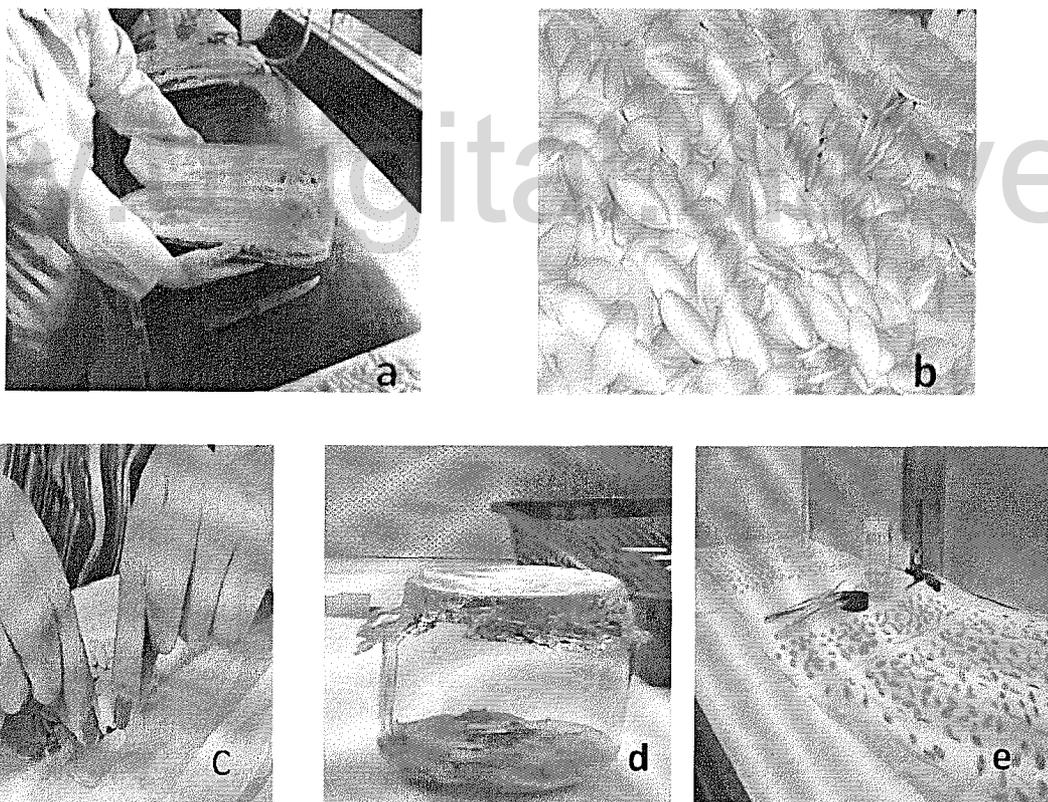


Fig. 12: Proceso de preparación de las semillas de calabacín: (a) extracción de las semillas del fruto, (b) selección, (c) remoción de la capa superficial de la semilla, (d) adición de hipoclorito de sodio, (e) secado de las semillas en la campana de flujo laminar.

4.7.- Recubrimiento de las semillas

Se realizó un estudio de germinación previo para optimizar el número de capas de quitosano que se aplica a las semillas, mediante el uso de 1, 2 y 3 capas de C0 al 0,87% (p/v). El procedimiento típico para cubrir las semillas se puede resumir de la siguiente manera:

(a) las semillas secas fueron dispuestas en un rejilla de plástico, donde se aplicó un primer recubrimiento, uniforme, por el lado expuesto de las semillas, usando un aspersor de vidrio acoplado un compresor a una presión de 0,5psi que contiene la solución de quitosano adecuada;

(b) después de 20 minutos de secado al aire, tal como se muestra en la **Figura 13**, se procedió a girar las semillas para ser asperjadas por el lado no cubierto, este procedimiento se repitió dos veces más para obtener una cobertura de 3 capas.

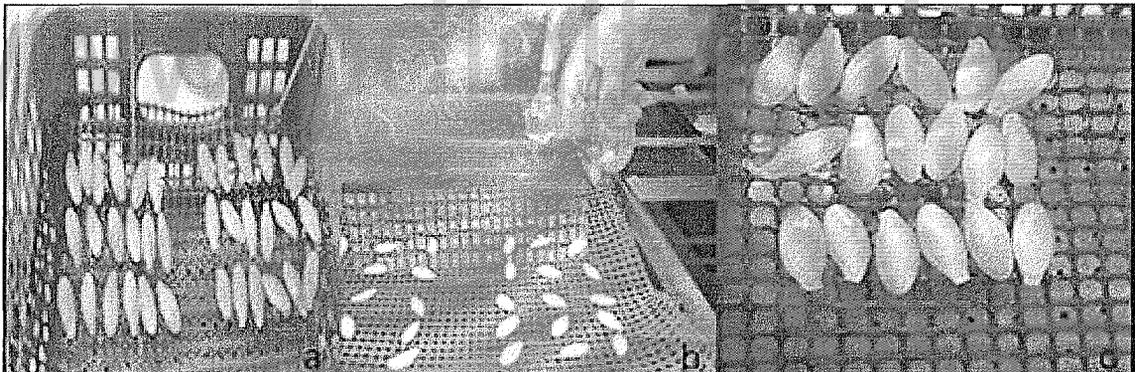


Fig. 13: Proceso de aspersión directa de semillas estériles de calabacín con solución de quitosano: (a) disposición de las semillas en la rejilla, (b) aspersión con las soluciones de quitosano y (c) secado al aire de las semillas

Para determinar si la cobertura de las semillas fue uniforme se tomaron fotografías que permitieron comparar el brillo en su superficie y micrografías usando un microscopio electrónico de barrido. Para ello una muestra de semillas fue secada a temperatura ambiente durante un día. De estas se seleccionó aleatoriamente una semilla la cual después de ser seccionada transversalmente fue metalizada con oro en atmosfera inerte para ser analizada con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB),

4.8.- Proceso de germinación

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, colocando 5 semillas no tratadas (semillas controles y semillas tratadas con diferentes soluciones de quitosano, según lo establecido por en el DCCR ,) en cada una de las cápsulas de Petri; éstas contienen el sustrato de cultivo (algodón y papel absorbente) previamente esterilizado en autoclave (120°C y 15 libras de presión durante 1 hora). Se añadieron 20mL de agua esterilizada y se procedió a sellar las capsula de Petri con parafilm (Pechiney PM-996) bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar. Luego se colocaron en condiciones de germinación para semillas fotoblásticas negativas (sin luz), posteriormente se verificó el proceso de respuesta de la semillas tratadas por 24 horas durante 4 días con el fin de obtener el día pico de germinación diaria y con ello obtener los valores del porcentaje de germinación acumulada (%GA) y tiempo de germinación (tg). La germinación se consideró alcanzada cuando se observó la emergencia de la radícula tal como se muestra en la **Figura 14**. Los valores seleccionados para el tiempo de preservación (TP) y la concentración de quitosano (CQ) durante el estudio se presentan en la **Tabla 4**, estos valores surgieron de la aplicación del DCCR que considera un rango CQ de 0,1 – 1% (p/v) y para el TP un rango 1 a 6 meses

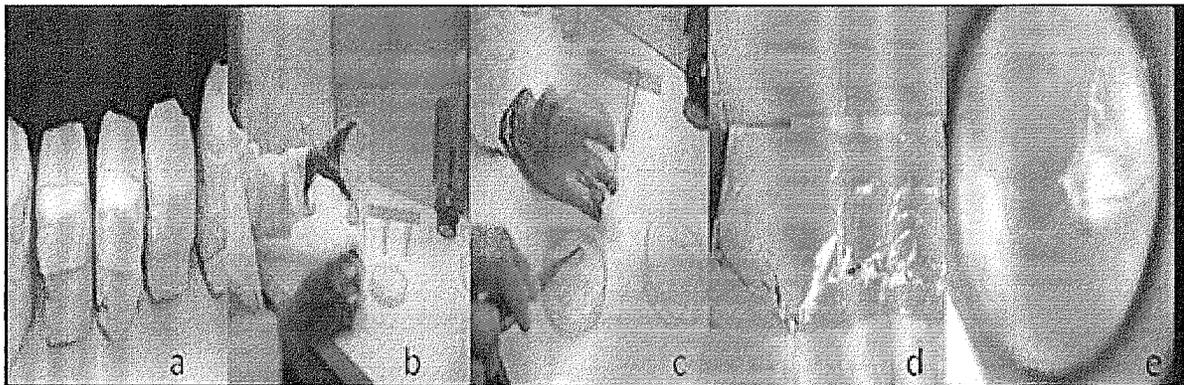


Fig. 14: Procedimiento de germinación del calabacín: (a) capsulas de Petri esterilizadas, (b) hidratación del sustrato, (c) siembra de semillas, (d) condiciones de germinación para semillas fotoblásticas negativas y (e) emergencia de la radícula (germinación de la semilla).

4.9. Diseño compuesto central rotatable (DCCR)

Siguiendo la metodología del DCCR se establecieron los tratamientos de las variables independientes, es decir las distintas combinaciones CQ/TP bajo las condiciones de almacenamiento de las semillas: nevera (~4°C) y ambiente (~20°C). Las condiciones establecidas por el DCCR fueron consideradas para las diferentes muestras obtenidas de quitosano (C0, C2 y C5). Mediante este diseño se optimizan los factores, maximizando la cantidad de información que puede ser obtenida con un menor número de experimentos individuales, determinando así las variables de las cuales depende el %GA y Tg. Para el análisis de los datos se emplea el programa estadístico R, versión 2.13 (R Development Core Team., 2010)

a.- Construcción de la matriz del diseño

Para la construcción del diseño se tomó en cuenta un $K = 2$ (variables o factores independientes, CQ y TP):

Puntos estrella axiales = $2k$

Fracción factorial = 2^k

Puntos centrales: 1

Partiendo de la fórmula $2^k + 2K + 1$ y sustituyendo en ella tenemos:

$$2^2 + 2 * 2 + 1 = 4 + 4 + 1 = 9 \text{ tratamientos}$$

Polinomio de dos factores: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 + \varepsilon$

b.- Cálculo de los niveles de los factores CQ y TP

Los dos factores (X_1 y X_2) corresponden a la concentración de quitosano (CQ) y el tiempo de preservación de las semillas (TP), en rangos de exploración de 0 a 1 %p/v y de 1 hasta 6 meses, respectivamente. La obtención de los niveles se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$X_r = \frac{(X_c - V_{lc})}{i_c} * tr + V_{lr} \quad (13)$$

Donde X_r representa el valor real de concentración esperado, X_c el valor codificado, V_{ic} el valor mínimo codificado, V_{ir} es el valor de la concentración mínima, I_r el intervalo de niveles de concentraciones (concentración máxima menos la mínima) e I_c es el intervalo o rango para los niveles codificados ($[1,414 - (-1,414)] = 2,828$). Tomando como ejemplo el factor 1 (CQ) se determinan los niveles o valores reales X_r correspondientes, si su valor codificado (X_c) es de -1; en este caso se tiene la siguiente información: $V_{ic} = -1,414$; $I_r = 0,90$; $I_c = 2,828$ y $V_{ir} = 0,1\%$ (p/v); al sustituir en la fórmula dada se tiene:

$$X_r = \frac{-1 - (-1,414)}{2,828} * 0,9 + 0,1 = 0,23 \% p/v \quad (14)$$

En la **Tabla 4**, se muestran los valores y los niveles de las variables independientes (CQ y TP)

Tabla 4: Rango experimental y niveles de variables independientes.

Variable	Factor	Unidad	Niveles de valores codificados y reales ^(a)				
			-1.414	-1	0	1	1.414
CQ	X1	%p/v	0.1	0.23	0.55	0.87	1.0
TP	X2	meses	1.0	1.7	3.5	5.3	6.0

(a) La transformación de valores codificados a los valores reales se realizó aplicando la ecuación 13

La **Tabla 5**, muestra el número total de tratamientos, combinaciones y los niveles de CQ y TP. Es importante señalar que para completar el diseño del experimento se establecieron 2 tratamientos controles: el primer control se tomó a un tiempo cero, es decir en el mismo momento que se realizó la cobertura de las semillas de calabacín con las soluciones de quitosano; el segundo control consistió en tomar semillas sin soluciones quitosano por cada tiempo de preservación establecido por el diseño.

El número de tratamiento establecido fue de 10, la unidad experimental (UE) estuvo definida por una capsula de Petri con 5 semillas, por triplicado, lo que representa 15 semillas por cada tratamiento; al haberse utilizado 80 UE durante el trabajo se necesitaron un total de 1200 semillas.

Tabla 5: Combinaciones de los valores reales de CQ y TP.

Tratamientos	Valores codificados		Valores reales		Combinaciones (CQ/TP)
	CQ	TP	CQ	TP	
	%v/v	meses	%p/v	Meses	
1	-1	-1	0,23	1,7	0,23/1,7
2	-1	1	0,23	5,3	0,23/5,3
3	1	-1	0,87	1,7	0,87/1,7
4	1	1	0,87	5,3	0,87/5,3
5	0	0	0,55	3,5	0,5/3,5
6	1,414	0	1,0	3,5	1,0/3,5
7	-1.414	0	0,1	3,5	0,1/3,5
8	0	1,414	0,55	6,0	0,55/6,0
9	0	-1.414	0,55	1,0	0,55/1,0

4.10.- Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos derivados de un experimento tiene como propósito proveer información referente a la manera en que las unidades experimentales responden a los tratamientos aplicados. Inicialmente, como paso previo a la aplicación del DCCR, se realizó un análisis de varianza para verificar la normalidad y la homogeneidad de la varianza y así poder establecer las diferencias significativas entre los tratamientos a aplicar. Seguidamente, se realizó una prueba de comparación de medias mediante el método de la mínima diferencia significativa (MDS) entre los tratamientos y grupos.

Al establecer la significancia estadística entre los tratamientos aplicados para cada variable respuesta, se procedió a hacer una comparación entre medias mediante la metodología de la mínima diferencia significativa de Fisher (MDS). En esta metodología, se compararon las medias dentro de tratamientos (T1, T2, T3, T4) para cada grupo (C0, C2, C5) y entre grupos (condiciones de almacenamiento: nevera y ambiente) en función de las variables respuestas %GA y Tg. Dicha comparación permitió determinar el tratamiento y grupo que presentó una mayor respuesta.

Por último, se optimizaron los valores de las variables independientes (CQ y TP) en función de las variables respuestas (%GA y Tg), aplicando la metodología de superficie de respuesta solo para el tratamiento y grupo que tuvo el mejor resultado.

www.bdigital.ula.ve

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Caracterización del quitosano

a.- Determinación del grado de N-acetilación:

Espectroscopia infrarroja:

En la **Figura 15** y la **Tabla 6**, se muestran con detalle las bandas características de los grupos funcionales presentes en la estructura del quitosano (Lárez, 2006; Eliyahu *et al.*, 2005). Allí se aprecian las tensiones de los grupos OH y NH ($3.600-2.400\text{cm}^{-1}$), características de los grupos hidroxilos y aminas correspondientes al quitosano desacetilado al igual que las bandas del C=O y NH, correspondientes a las amidas. Entre 1.660 y 1.555cm^{-1} aparecen las bandas de vibración característica de la amida I (1.655cm^{-1}) y la amida III (1.313cm^{-1}), respectivamente (Baxter *et al.*, 1992; Brugnerotto, *et al.*, 2001;(Hernández *et al* 2009) Estos resultados corroboran la identidad química del quitosano en estudio (Lárez, 2006).

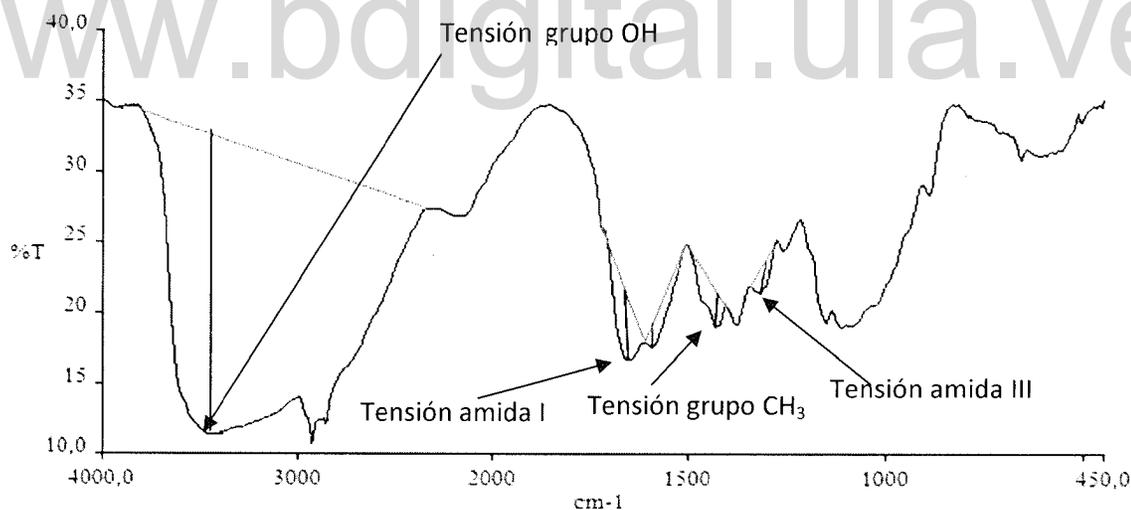


Fig. 15: Espectro infrarrojo del quitosano comercial (Fluka, BioChemika) en pastilla de KBr.

En la determinación del grado de acetilación por espectroscopia infrarroja se correlacionan las absorbancias de dos bandas de absorción determinadas; la selección de las bandas involucra normalmente una de las bandas de amida (I o III) y otra que sirve de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración en las

pastillas de KBr. (Brugnerotto *et al.*, 2001) tomaron como banda característica la amida III localizada a 1.320cm^{-1} y como referencia la banda de flexión de los grupos metilenos a 1.420cm^{-1} reportando una correlación lineal expresada por la ecuación:

$$GA (\%) = 31,92*(A_{1320}/A_{1420}) - 12,20 \quad (15)$$

Tabla 6: Asignaciones de las bandas del espectro infrarrojo del quitosano.

Banda (cm^{-1})	Asignación.
3.600 a 2.800	Tensión grupos (-OH), (-NH), (-CH ₂), (-CH ₃).
1.633	Tensión de carbono carbonílico.
1.525	Vibración de doblaje (-NH ₂).
1.322	Tensión grupo amida.
1.537	Tensión del puente glucósidico (C-O-C).
1.100 a 1.030	Vibración anillo sacárido.
901	Tensión (-C-H) grupo anoméricos.

Por otro lado Baxter *et al.* (1992) correlacionaron las bandas características de la amida I localizada a 1.655 cm^{-1} y como referencia la banda de grupos hidroxilos a 3.450cm^{-1} obteniendo la siguiente relación lineal:

$$GA (\%) = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115 \quad (16)$$

Con los valores de absorbancias de interés y de las líneas bases seleccionadas (representadas con las líneas azules en la **Figura 15** determinados con el programa Spectrum 2000) y aplicando las ecuaciones 15 y 16 se obtiene un valor promedio de %GA = 21,23%; correspondiente a un grado de desacetilación %GDA = 78,77%.tal como se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Absorbancias de interés del espectro infrarrojo del quitosano y valores obtenidos para el GDA (Lárez, 2006)

Método	Bandas (cm^{-1})	Absorbancias	Línea base ($V_{\text{inic.}} - V_{\text{fin.}}$)	GDA	GDA promedio	GDA%
Baxter <i>et al.</i> (1992)	3.450	0.94	3.840 – 2.338	0,2202	0,2131	21,23
	1.655	0.18	1.711 – 1.509			
Brugnerotto <i>et al.</i> (2001)	1.420	0.71	1.500 – 1.397	0,2061	0,2131	21,23
	1.320	0.74	1.397 – 1.337			

Titulación conductimétrica:

Esta técnica permite monitorear los cambios en la conductividad de una solución debidos a la distinta movilidad que representan los iones hidrógeno e hidróxido en el medio, en función del volumen del titulante añadido. Se tituló una muestra de quitosano acuoso disuelto en exceso de HCl, utilizando como titulante NaOH; las lecturas de conductividad se grafican en función del volumen de titulante como se muestra en la **Figura 16**, en donde también se muestra la titulación del blanco (solución acuosa de HCl usada para preparar la solución de quitosano)

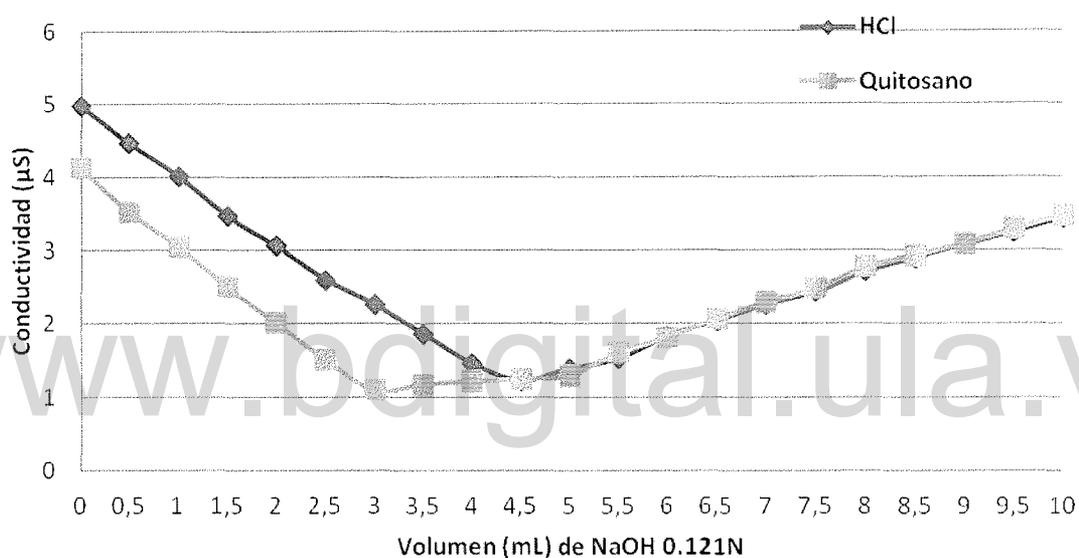


Fig. 16: Curva de titulación conductimétrica para el quitosano comercial (Fluka, BioChemika).

En la curva de titulación se muestran varias etapas: al inicio la solución de quitosano presenta una caída inicial de la conductividad que corresponde a la neutralización de los iones H^+ del HCl en exceso. La siguiente etapa presenta un leve ascenso atribuido a la neutralización de los protones provenientes de la disociación de los grupos amino protonados del quitosano y, finalmente, la última etapa corresponde al incremento en la conductividad debido al exceso de iones hidroxilo de la base agregada. La diferencia encontrada entre estos dos puntos de cambio de pendiente corresponde al volumen de la base requerida para neutralizar los grupos aminos protonados (Sánchez,2004). Para

determinar la concentración de grupos amino protonados (eq/g) se utilizó la ecuación 1) obteniendo una $[\text{NH}_3^+] = 4,79 \times 10^{-3} \text{ eq/g}$.

$$[-\text{NH}_3^+] = (\text{N} \times \text{V}) / \text{m}_q \times \text{F}_c \quad (17)$$

Seguidamente, el grado de acetilación se calcula con la ecuación 18, relacionado la concentración obtenida mediante la ecuación 17 con la concentración de grupos amino presentes. Se obtuvo un GDA=77,11% y un %GA de 22,88 %. Los cálculos detallados se presentan en el Anexo 1.

$$\text{GDA} = [-\text{NH}_3^+] \times \text{PE}_{\text{ur}} \times 100 \quad (18)$$

b.- Determinación del peso molecular

Método viscosimétrico usando la ecuación de Huggins:

Los valores experimentales promedios de los tiempos de elución se transforman en valores de viscosidad relativa (η_r), viscosidad específica (η_{sp}) y viscosidad reducida (η_{red}), según las ecuaciones 5, 6 y 7 (Petrucci *et al.*, 1999; Katime, 1994). Los resultados de dicha transformación, para cada una de las concentraciones de trabajo, se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Valores calculados de las magnitudes utilizadas en viscosimetría.

c (g/dL)	t _{eluc.} (s)	η_r	η_{sp}	$\eta_{\text{red/c}}$ (dL/g)
0,0000	29,99±0,02	-----	-----	-----
0,1250	76,46±0,02	2,54	1,549	12,392
0,1000	66,55±0,04	2,152	1,152	11,518
0,0830	57,06±0,02	1,902	0,902	10,829
0,0624	48,91±0,05	1,631	0,631	10,088

La determinación de la viscosidad intrínseca, se realizó mediante el procedimiento gráfico que hace uso de la ecuación de Huggins. La **Figura 17**, muestra la viscosidad reducida (η_{sp}/c_p) en función de la concentración del polímero (c_p) para la determinación de la viscosidad intrínseca utilizando el método gráfico.

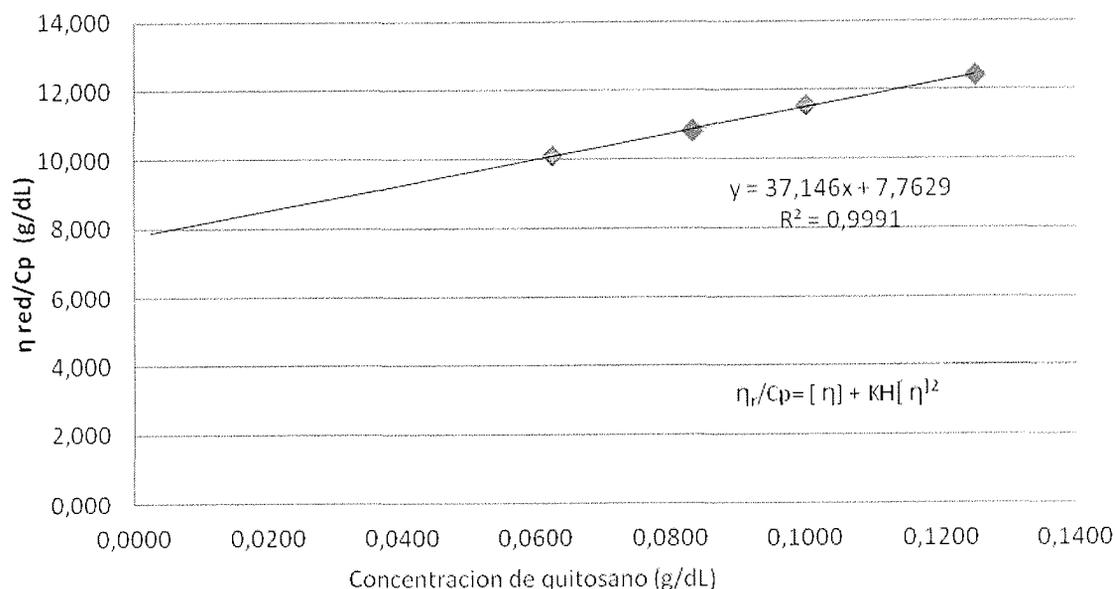


Fig. 17: Gráfico de η_{red} en función de c_p (g/dL) para el quitosano comercial.

Al graficar los valores de η_{red} reportados en la **Tabla 8** en función de c (g/dL) se obtiene una línea recta que permite determinar directamente:

Del punto de corte con el eje “y”, el valor de la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) del polímero y de la pendiente, la constante de Huggins (k_H) como se reportan en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Resultados obtenidos a partir del gráfico de Huggins

$[\eta]$ (dL.g ⁻¹)	m (dL ² .g ⁻²)	k_H	R^2
7,762	37,14	0,6164	0,999

El valor obtenido de 0,6164 ($k_H > 0.5$) es indicativo de que el polímero está sufriendo procesos de agregación en las condiciones experimentales estudiadas (Petrucci *et al.*, 1999; Katime, 1994). En la **Tabla 10**, se muestra el valor obtenido del peso molecular promedio viscoso del quitosano (M_v) utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (ecuación 10) (Katime, 1994) empleando los valores de α y K reportados por (Rinaudo *et al.*, 1993). La ecuación MHS se define mediante dos parámetros que son constantes y que dependen de cada par polímero/disolvente y de la temperatura a la cual se hagan las medidas.

Tabla 10: Determinación del peso molecular promedio viscoso a partir de la ecuación de MHS

a	$K \times 10^5$ (dL/g)	$[\eta]$ (dL/g)	M_v (g/mol)	M_v reportado* (g/mol)
0,76	74	7,762	195.216	~150.000

* Reportado por Fluka

Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC):

Para el análisis por SEC se realizó una curva de calibración con muestras patrones de poli(óxido de etileno), con el fin de determinar el peso molecular de las muestras del quitosano por cromatografía de exclusión por tamaño (presentada en el Anexo 2), la cual puede ser bien ajustada mediante el polinomio de orden tres:

$$\text{Log}M_w = -0,014t^3 + 0,75t^2 - 13,5t + 86,60 \quad (19)$$

con un valor $R^2 = 0,9993$ y una desviación estándar de $\sigma = 0,036$. Los resultados obtenidos en la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) para el quitosano comercial se muestran en la **Figura 18** y en la **Tabla 11**, respectivamente.

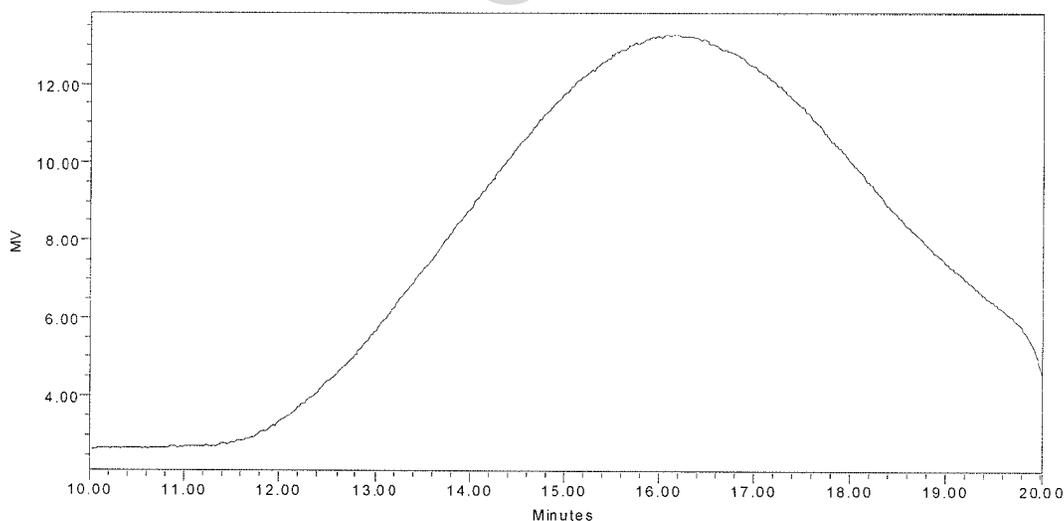


Fig. 18: Trazado cromatográfico de la solución de quitosano (4mg/mL en buffer ácido acético (0,3M)/acetato de sodio (0,2M)).

Tabla 11: Resultados de la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de la solución de quitosano (4mg/mL en ácido acético (0,3M)/ acetato de sodio (0,2M)).

Muestra	$t_{\text{retención}}$ (min.)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	M_p (g/mol)	Polidispersidad
Quit.Fluka	16,07	23.011	170.133	46.132	7,39

M_n : peso molecular promedio en número; M_w peso molecular promedio en peso; M_p peso pico del cromatógrama.

5.2.- Despolimerización del quitosano con KIO_4 .

La despolimerización del quitosano se realizó a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) mediante una ligera modificación del procedimiento reportado por Larez y Zambrano (2011). En el proceso de despolimerización se obtuvieron dos muestras con pesos moleculares menores a la solución sin KIO_4 . La **Figura 19**, muestra las trazas cromatográficas SEC de soluciones obtenidas después del tratamiento con KIO_4 . Los cromatogramas de las soluciones despolimerizadas con 2% y 5% de KIO_4 muestran un cambio significativo, desplazándose hacia valores de pesos moleculares menores, con un desplazamiento mayor para C5, es decir, a medida que la cantidad de KIO_4 se incrementa. Los valores calculados de M_w para C0, C2 y C5 fueron de 300, 34 y 28kDa, respectivamente. Se destaca que, aunque los valores de M_w para C2 y C5 son similares, las trazas cromatográficas SEC indican claramente que C5 contiene una fracción mayor de oligómeros que C2.

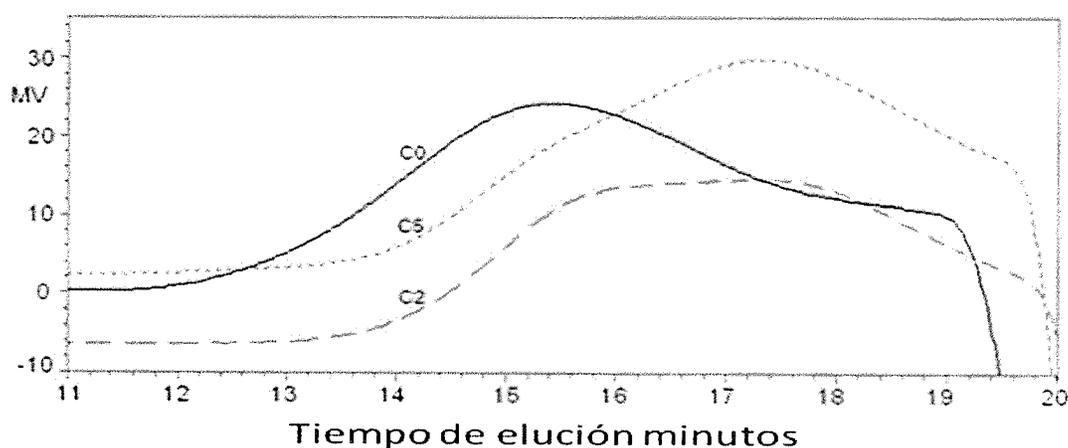


Fig. 19 Trazado de SEC para C0, C2 y C5 obtenidas después del proceso de despolimerización con KIO_4

5.3.- Cobertura de semillas

Al evaluar el recubrimiento de cobertura se alcanzó recubrir las semillas con una película fina y uniforme las semillas con una, dos y tres capas, junto con las semillas control (sin recubrir), se observó la formación de películas finas y continuas sobre la superficie de las semillas **Figura 20 (d)**. Se hizo evidente que a medida que se aumentaba el número de capas el brillo de la semilla se intensificaba. La homogeneidad en la cobertura de semillas se confirmó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido. Para ello, se obtuvieron micrografías de una semilla seccionada longitudinalmente en el centro cubierta con dos capas de solución de quitosano CO a 0,87% p/v y de otra sin cobertura (semilla control), colocándose ambas tanto de manera longitudinal y transversal.

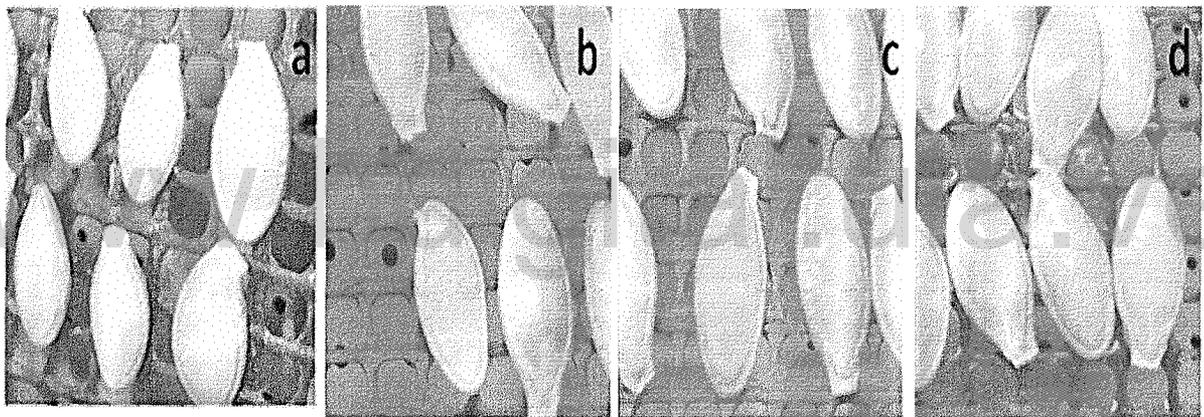


Fig. 20: Fotografías de las semillas de calabacín con recubrimientos de quitosano: (a) semilla control, (b) una capa, (c) dos capa (d) tres capas.

Las **Figuras 21 (a)** y **21 (b)** detallan el corte longitudinal de la semilla, verificándose la adhesión homogénea de la capa de quitosano a la semilla de calabacín; adicionalmente, se verificó la homogeneidad de la capa tomando micrografías de manera transversal, tal como se observa en las **Figura 21 (a')** semilla control y **21 (b')** semilla con capa de quitosano.

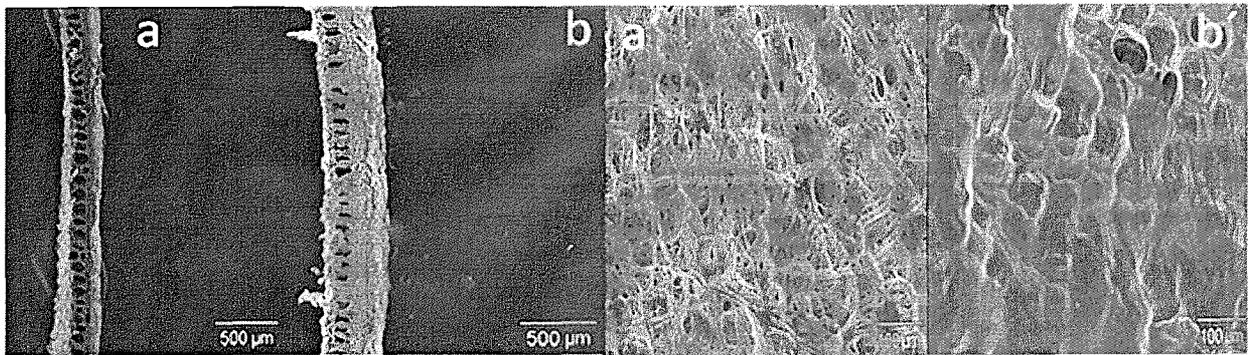


Fig. 21: Micrografías de semillas colocadas de forma longitudinal I (a) semilla control, (b) semilla con quitosano; semillas colocadas de forma transversal (a') semilla control, (b') semilla con quitosano.

Por otro lado, el estudio previo de germinación en función de números de capas demostró tal como se muestra en la **Figura 22** que con dos capas de quitosano se genera un efecto beneficioso sobre la germinación de calabacín, al ser éstas comparadas con aquellas no tratadas y con las recubiertas con una y tres capas. Por esta razón, el desarrollo de esta investigación se llevó a cabo empleando semillas recubiertas con dos capas.

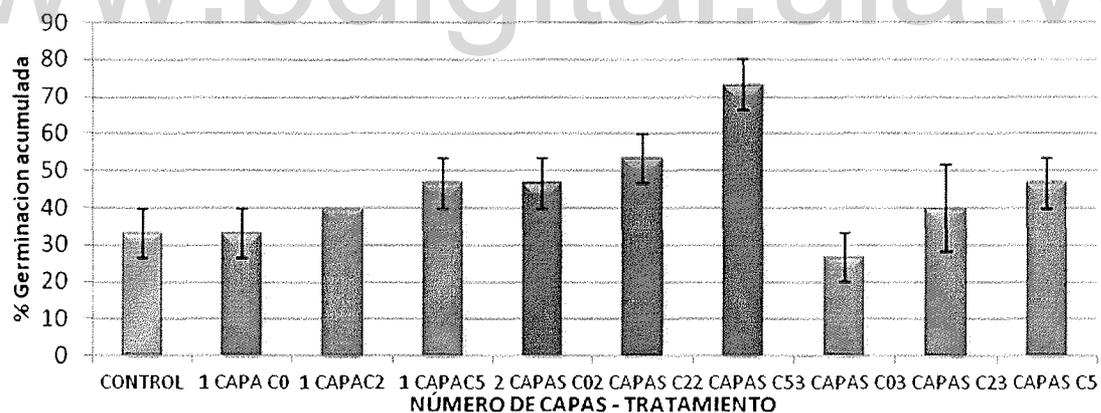


Fig. 22: Números de capas– tratamientos C0, C2, C5 en función del %GA).

Las **Tablas 12 y 13**, muestran las estadísticas descriptivas para el Tiempo de germinación (Tg) y porcentaje de germinación (%GA) de las semillas cubiertas y las controles, éstas mostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa, ya que los valores de p para C0, C2 y C5 están por debajo de 0,05 (ver Anexo 3); la muestra de quitosano que conduce a un efecto más notorio en los parámetros estudiados (valores de Tg más cortos y %GA más altos) es C5.

Tabla 12: Resultados de Tiempo de germinación (Tg) obtenidos durante los estudios de germinación de semillas control y recubiertas con quitosano. Condiciones de almacenamiento de semillas: nevera

Tratamiento con quitosano	[C] % (p/v)	t _g [días]*					
		0.0**	1.0** (-1.414)***	1.7** (-1.000)	3.5** (0.000)	5.3** (1.000)	6.0** (1.414)
Control	---	2.93±0.23	2.80±0.20	2.73±0.12	2.40±0.20	2.33±0.12	2.53±0.12
C0	0.10 (-1.414)***	2.27±0.23			2.33±0.12		
	0.23 (-1.000)	3.20±0.53		2.40±0.20		2.47±0.42	
	0.55 (0.000)	3.13±0.42	2.33±0.23		2.27±0.12		2.20±0.20
	0.87 (1.000)	2.53±0.42		2.13±0.12		1.73±0.12	
	1.00 (1.414)	2.67±0.31			2.40±0.40		
C2	0.10 (-1.414)	2.73±0.64			2.33±0.35		
	0.23 (-1.000)	2.60±0.53		2.40±0.20		1.80±0.35	
	0.55 (0.000)	3.00±0.35	2.13±0.12		2.40±0.35		2.20±0.53
	0.87 (1.000)	2.80±0.35		2.27±0.12		1.73±0.46	
	1.00 (1.414)	2.67±0.31			2.60±0.35		
C5	0.10 (-1.414)	2.33±0.12			2.00±0.00		
	0.23 (-1.000)	2.47±0.58		1.53±0.31		2.07±0.12	
	0.55 (0.000)	2.07±0.12	2.27±0.12		1.87±0.23		1.53±0.31
	0.87 (1.000)	2.20±0.35		1.80±0.00		1.87±0.40	
	1.00 (1.414)	2.47±0.31			2.00±0.00		

* Todos los valores reportados se obtuvieron a partir de 3 repeticiones (5 semillas cada una)

** Tiempo de preservación (TP)= tiempo en que se realizó ensayo de germinación (meses)

*** Los valores entre paréntesis representan niveles emergentes de CCR

Tabla 13: Resultados de porcentaje de germinación acumulada (%GA) obtenidos durante los estudios de germinación de las semillas de calabacín control y recubiertas con quitosano. Condiciones de almacenamiento de semillas: nevera

Tratamiento con quitosano	[C] % (p/v)	%GA					
		0.0**	1.0** (-1.414)***	1.7** (-1.000)	3.5** (0.000)	5.3** (1.000)	6.0** (1.414)
Control	---	33.3±11.5	26.7±11.6	26.7±11.6	60.0±20.0	66.7±11.6	46.7±11.6
C0	0.10 (-1.414)***	73.3±23.1			66.7±11.5		
	0.23 (-1.000)	20.0±20.0		60.0±20.0		46.7±30.5	
	0.55 (0.000)	6.67±11.5	66.7±23.1		73.3±11.5		73.3±11.5
	0.87 (1.000)	46.7±41.6		86.6±11.5		100±0.00	
	1.00 (1.414)	33.3±30.5			66.7±30.5		
C2	0.10 (-1.414)	46.7±46.2			66.7±30.5		
	0.23 (-1.000)	53.3±30.5		60.0±20.0		93.3±11.5	
	0.55 (0.000)	20.0±20.0	86.7±11.5		66.7±30.5		66.7±30.5
	0.87 (1.000)	33.3±23.1		73.3±11.5		86.7±23.1	
	1.00 (1.414)	46.7±11.5			53.3±23.1		
C5	0.10 (-1.414)	66.7±11.5			100±0.00		
	0.23 (-1.000)	20.0±20.0		86.7±23.1		93.3±11.5	
	0.55 (0.000)	93.3±11.5	73.3±11.5		93.3±11.5		100±0.00
	0.87 (1.000)	40.0±43.6		86.7±23.1		100±0.00	
	1.00 (1.414)	66.7±11.5			100±0.00		

* Todos los valores reportados se obtuvieron a partir de 3 repeticiones (5 semillas cada una)

** Tiempo de preservación = tiempo en que se realizó ensayo de germinación (meses)

*** Los valores entre paréntesis representan niveles de CCR

5.4.- Análisis estadístico.

a.- Análisis de varianza

Con el fin de facilitar el manejo de los resultados de las variables respuesta se establecieron codificaciones según los tratamientos (Tn), agrupados en función de la presencia o no de quitosano y el tiempo de preservación, además de los controles como se detalla a continuación:

TRATAMIENTOS SEGÚN LAS CONDICIONES DE PRESERVACIÓN DE LA SEMILLA:

T 1: Semillas con quitosano y con tiempo de preservación.

T 2: Semillas sin quitosano con tiempo de preservación,

T 3: Semillas con quitosano sin tiempo de preservación

T 4 : Semillas controles es decir semillas sin quitosano y sin tiempo de preservación

La despolimerización del quitosano y la condición de almacenamiento se codificó de la siguiente manera:

GRUPOS SEGÚN EL GRADO DE DESPOLIMERIZACIÓN DEL QUITOSANO

CO-N: Quitosano sin despolimerizar en condición de almacenamiento Nevera

CO-A: Quitosano sin despolimerizar en condición de almacenamiento Ambiente

C2-N: Quitosano despolimerizado al 2% en condición de almacenamiento Nevera

C2-A: Quitosano despolimerizado al 2% en condición de almacenamiento Ambiente

C5-N: Quitosano despolimerizado al 5% en condición de almacenamiento Nevera

C5-A: Quitosano despolimerizado al 5% en condición de almacenamiento Ambiente

b.- Análisis de varianza de los tratamientos:

Los valores obtenidos del análisis de varianza los resultados mostrados en las **Tablas 12 y 13**, para las variables respuesta porcentaje de germinación acumulada y tiempo de germinación obtenidos se muestran en el Anexo 3. Se extrae que los valores de $-p$, para las variables respuesta porcentaje de germinación acumulada y tiempo de germinación, oscilaron entre $3,11 \times 10^{-11}$ y $1,01 \times 10^{-4}$. Todos los valores de $-p$ estuvieron por debajo del nivel de significancia establecido de 0,05 (95%), concluyendo que existen diferencias

significativas entre las varianzas de los tratamientos, es decir los tratamientos son estadísticamente diferentes. Además, esto se contrasta con la prueba F de Fisher. Los valores del F estadístico estuvieron entre 6,25 y 28,15 para todas las variables en condiciones de nevera o ambiente. Al compararlos con el valor tabulado de F (2,769) para un nivel significancia de 5%; 3 y 56 grados de libertad, se encontró que este último está por debajo del rango, es decir que $F_{\text{tab}} < F_{\text{exp}}$. Esto confirma que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados, a un nivel de significancia del 5%, para la evaluación de variables porcentaje de germinación acumulada y tiempo de germinación.

c.- Comparación de las medias mediante la mínima diferencia significativa.

Los valores obtenidos del análisis de varianza de las medias de los tratamientos para %GA y Tg indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos a un $p < 0,05$ como se observa en el Anexo 4. El tratamiento T1, correspondiente a semillas cubiertas con quitosano y con tiempo de preservación, presentó una mayor diferencia en relación a los demás tratamientos, incluyendo el control, mostrando el máximo %GA y el menor tg, de acuerdo al siguiente orden general: $T2 > T3 > T4$.

Por otro lado, la agrupación de medias se realizó con los grupos (C0, C2 y C5) con el fin de establecer la mayor respuesta de las variables independientes en estudio. Como muestran las **Figuras 23 (A) y 23(B)** el grupo que favoreció la mejor respuesta a las variables %GA y Tg fue: C5-N (a), seguido de C5-A (ab), C0-A (ab) y C2-N (b), C2-A (b), C0-N (b). Los resultados indican que el mayor estímulo en la germinación se consiguió para el grupo C5-N, es decir un producto con menor peso molecular (oligómero) y condición de almacenamiento en nevera. Los comportamientos anteriormente descritos son consistentes con lo reportado por diversos autores (Dzung, 2004 y 2011; Enríquez *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2002). Estos autores han atribuido el efecto bioestimulante que tienen estos quito-oligómeros sobre la germinación y crecimiento de la plantas a su acción como fitohormonas del tipo oligosacarina. De igual manera, se podría complementar este efecto positivo que tienen las películas de quitosano sobre la germinación y el tiempo de

preservación al servir también como agentes reguladores de los niveles de absorción de agua, respiración y consumo de nutrientes en semillas recubiertas.

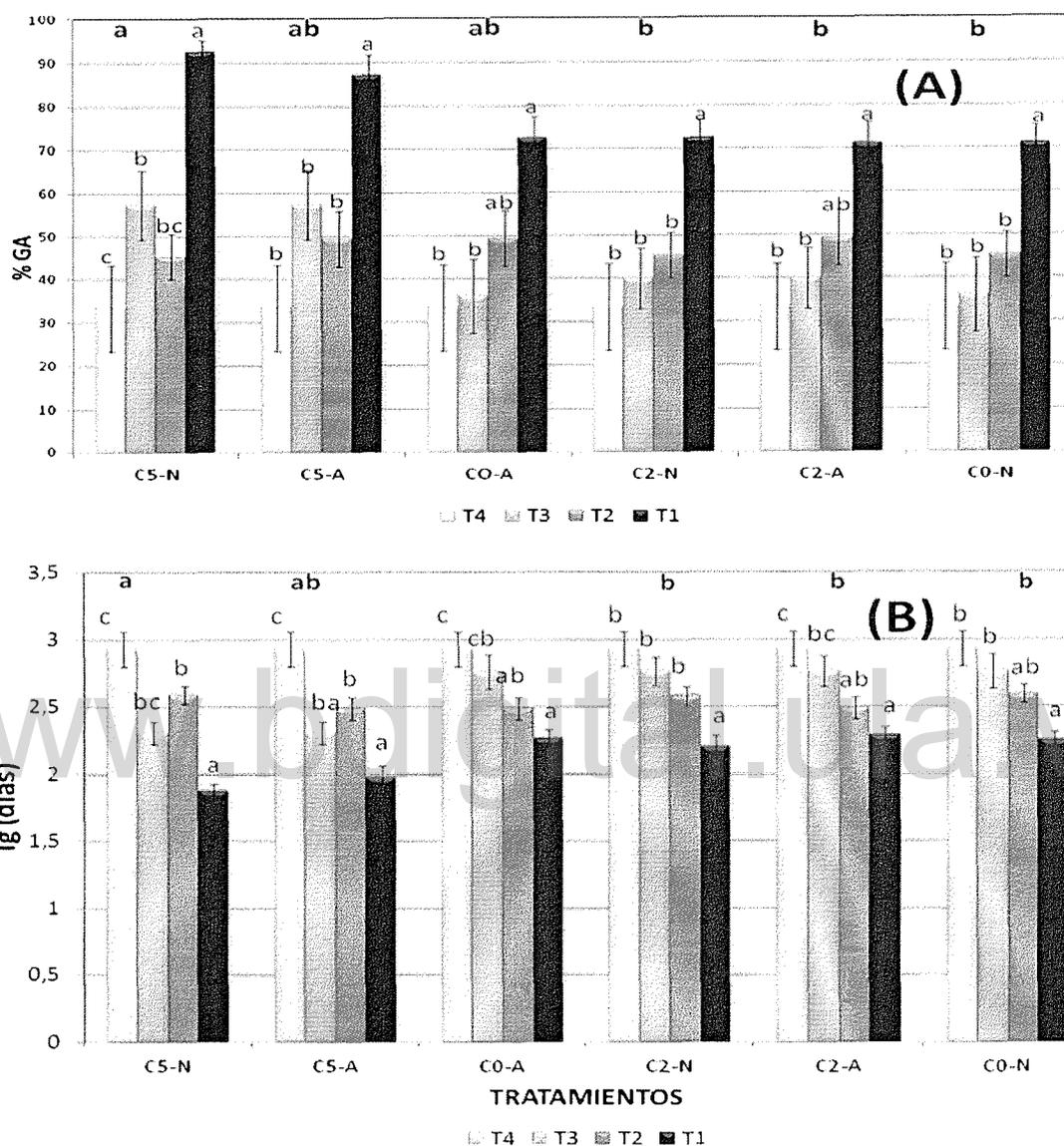


Fig. 23: Comparación de medias entre tratamientos y grupos en función de (A) porcentaje de germinación %GA; (B) tiempo de germinación (Tg). Valores de medias con la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la Mínima Diferencia Significativa MDS ($\alpha = 0,05$)

d.- Optimización de la concentración de quitosano y el tiempo de preservación.

Con base en la mayor efectividad estimulante obtenida en el grupo o C5-N, se estudiaron las dos variables concentración de quitosano y tiempo de preservación (CQ y Tp) que previamente habían mostrado un efecto significativo sobre las variables respuestas

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES/ RECOMENDACIONES

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

6.- CONCLUSIONES

- Se caracterizó el quitosano comercial en función del peso molecular y grado de N-acetilación obteniéndose valores de Mw: 170,95 y GDA=21,23, respectivamente.
- Se comprobó que la actividad estimulante de la germinación *in vitro* de semillas de calabacín guarda una relación estrecha con el tamaño de las especies moleculares presentes en la muestra de quitosano que se utiliza.
- Los resultados indican que el recubrimiento de las semillas de calabacín con dos capas fue el más estimulante para la germinación del calabacín.
- Se determinó que el quitosano despolimerizado tiene un efecto beneficioso en la germinación del calabacín, los cuales presentaron el siguiente orden, el quitosano despolimerizado al 5% con KMO_4 (C5) con una masa molar promedio en número de 28kDalton, produce tiempos de germinación menores y porcentajes de germinación acumulada mayores seguido de quitosano despolimerizado al 2% con KMO_4 (C2), con una masa molar promedio en número de 34k Dalton (similar a la de quitosano despolimerizado al 5% con KMO_4 (C5) pero con una fracción menor de oligómeros), y por último C0, con una masa molar promedio en número de alrededor de 300kDalton.
- Se optimizó los valores de concentración de quitosano (CQ) y Tiempo de preservación (TP) aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) encontrándose dentro del rango experimental estudiado, obteniéndose así el mejor valor para el quitosano despolimerizado quitosano despolimerizado al 5% con KMO_4 (C5) a una concentración de quitosano 0,65 (p/v) y tiempo de preservación de 4,5 meses para el porcentaje de germinación acumulada, y para el tiempo de germinación una concentración de quitosano de 0,58 (p/v) y 4,4 meses.

- Se determinó que las condiciones ambientales de preservación de las semillas no tienen un efecto significativo en la germinación acumulada y el tiempo de germinación en comparación con las muestras controles.

7.- RECOMENDACIONES

Se considera interesante investigar sobre los siguientes aspectos:

- Evaluar otras metodologías de despolimerización : físicas y biológicas
- Realizar un estudio con el quitosano despolimerizado optimizado al 5% (C5), considerando un rango más amplio tanto de concentración de quitosano y tiempo de preservación con las semillas de calabacín, y luego en otras semillas con alta demanda en zona.
- Realizar un estudio de bioestimulación con quitosano despolimerizado al 5% (C5) a semillas de calabacín considerando otras variables fisiológicas tales como: tamaño de raíz primaria, número de raíces secundarias , peso de la raíz,tamaño de la plántula, número de hojas.
- Evaluar la propiedad antifúngica del quitosano quitosano despolimerizado al 5% con KMO_4 al (C5) sobre semillas de calabacín considerando los valores optimizados para Cconcentracio de quitosano (CQ) y Tiempo de preservación (TP), con la finalidad de observar si a estas condiciones existe también una protección antifúngica.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

8.- REFERENCIAS

Agulló W., Heras C., Peniche C., Tapia C., Heras A., San Ramon J., Mayorga A., Millares B., Galed G., Acosta N. (2004). Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Ana Pastor Editora. Cap. 4 157-170

Aiba S. (1991). Evidence for the presence of random and block copolymers structure in partially N-Acetylated Chitosans. Studies on Chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, **13**, 40-44.

Allan C., Hadwiger, I. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental Mycology**, **3(3)**, 285-287.

Amorin R., Ledingham W., Fukushima K., Campos-Takaki G. (2005). Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (zigomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **32**, 19-23

Arago A., Cabrak A., Caldas D. (2004). Quitosana a fibra do futuro. Paeque de desenvolvimento tecnológico (PADETEC). Fortaleza-Ceará-Brazil, 2da edición.

Ascanio M., Chacín F., Machado W. (1996). Comparisson between the orthoghonal central composite designs (OCCD) and the rotatable central composite design (RCCD) in experiments with vegetable tissue culture. **Biometric Bulletin International Biometric Society**, **13:2**

Assis O., Pessoa J. (2004). Preparation of thin Films of Chitosan for use as Edible Coatings to Inhibit Fungal Growth on Sliced Fruits. **Braz. J. Food Technol.**, **7(1)**, 17-22.

Azcón J., Talón M. (1993). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana McGraw Hill.
Cap. 23, 24, 26.

Barka E., Eullaffroy P., Clement C., Vernet G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**; **22**, 608-614.

Baxter A., Dillon M., Taylor K. (1992). Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, **14**, 166-169.

Benhamou N., The riault G. (1992). Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **41**, 34–52.

Bhaskara M., Arul J., Angers, P., Couture, L. (1999). Chitosan treatment of seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. **J. Agric. Food Chem.**, **47**, 1208–1216.

Brugnerotto J., Lizardi J., Goyecoolea F., Desbrieres J., Rainaudo M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan Characterization. **Polymer**, **42(8)**, 3569-3580

Burrows F., Louime, C. Abazinge, M., Onokpise, O. (2007). Extraction and evaluation of chitosan from crab exoskeleton as a seed fungicide and plant growth enhancer. *In American-Eurasian J Agric & Environ Sci.*, vol. 2, 103-111.

Bustamante R., Vielma M. y Mora A. (2006). Aplicación del Diseño Compuesto Central Rotable en el Establecimiento In Vitro de Ápices de PlátanoMusa sp. variedad Harton (AAB) ***Agroalimentación & Desarrollo Sustentable***. **10 (1)** 01-07.

Chacín L., (1998) Análisis de regresión y superficie de respuesta. UCV. **Facultad de Agronomía**. Maracay- Venezuela. 274

Chandrkrachang S., (2002). The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. In: K. Suchiva., S. Chandrkrachang, P. Methacanon and M.G. Peter, Editors. ***Advances in Chitin Science***, **5**, 458–462. ISBN 974-229-412-7

Chirkov S., (2002). The antiviral activity of chitosan. ***Applied Biochemistry and Microbiology*** **38**: 1–8.

Christensen B., Vold I, Varum K. (2008). ***Carbohydrate Polymers***. **74**, 559-565.

Chung Y., Y Su., C Chen., G. Jia., H. Wang J., Wu and J. Lin. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. ***Acta Pharmacologica Sinica*** **25**: 932-936.

Colina M. (2010). El quitosano nacional, sus síntesis y comercialización en Venezuela. Jornada de Análisis Térmico de Materiales X Curso de aplicaciones . VII **Escuela Internacional de polímeros. Asociación Venezolana de Polímeros** . 29-1 Diciembre Universidad de Oriente, Nueva Esparta (UDO-NE) Guatamare, Isla de Margarita- Venezuela.

Crini G., Guibal E., Morcellt M., Torri G.,Badot P. (2009). Chitine et Chitosane. Dubiopolymer a l' application, **Presses universitaires de franche-comté**, cap 1

Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J.,(2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology 21**: 703–714

Domenech X., Jardim W., Litter M.,(2004).Remoción de contaminantes por fotocátalisis heterogénea. **Editorial CIEMAT, Madrid, España** (Eds.: M. Blesa, B. Sánchez). [24].

Domszy J., Roberts G., 1985.Evaluation if infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. **Makromol. Chem. 186**: p. 1671-1677.

Dzung N., (2011). Enhancing crop production with chitosan and Its derivatives. In: Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: **biological activities and applications**. Ed. Se-Kwon, K. **Taylor and Francis Group, USA. Chapter 42**, 619.

Dzung, N. (2004). Study on effect of bioactive substances on the growth and yield production of kohlrabi. In: Scientific Works for Developing Agriculture and Rural of Central Highland. **Agricultural Publisher**, Hanoi, Vietnam, 178–184.

Enríquez E., Aispuro E., Vargas I, Martínez M. (2010). Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular: Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas. Rev. **Mexicana Fitopat.**, **28(2)** 144-155

Ebert A., Fink H. (1997). Solid state NMR Spectroscopy of chitin and chitosan. **Chitin Handbook**, R.A.A. Muzarrelliy M.G. Peter Editores, **European Chitin Society**, Grottammare 137-143

Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A.J. (2005) **Polymers for DNA Delivery Molecules**. 10(1):34-64

Falk M., Smith D., McLachlan J., McInnes A. (1999). Studies on chitan (β -(1,4)linked-2-acetamidi-2-dexoxy-D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis* husted.II. Proton magnetic resonance, infrared, and X-ray studies. **Canadian journal of chemistry** **44(19):2269-2281**

Franco F., Iriti M. (2007). Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. **In Caryología**, vol. 60, (1-2), 121-124

Freepons D. (1997). Enhacing food production with chitosan seed-coating technology. En M. Goosen (Ed.) **Applications of Chitin and Chitosan**, Technomic Publishing Company. **Lancaster , Pennsylvania-USA , cap 8**

G.A.F Roberts. (1992).The tylation of chitosan Using Cond Macmillan Press Ltd. **Chitin Chemistry.**, Londonuctime: 1-53

Galvez D., Pilar G.(2002) Quitosano y derivados en la germinación de remolacha, tabaco, tomate y prevención de caída en plántulas. **Tesis pregrado** Chillan referencia 30, 32p

García J., Peniche C., Nieto J. (1983). Determination of the Degree of Acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis, **Journal Thermal Analysis**. **28(1)**: 189-193

Gonzalez W., Chacín F., García J., Ascanio M., Cobo M. (2006). Bloques incompletos en los diseños de superficie de respuesta compuestos de Box y sus aplicaciones agronómicas **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. **23**: 92-109

Goycoolea, F., Agulló E., Mato R. (2004). Fuentes y Procesos. En: Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. **Fondo Editorial del Pontificia Universidad Católica del Perú. Ana Pastor Editora. Cap 3**:105.

Gracia F. (2006). Introducción al funcionamiento de las plantas editorial de la UPC.

Valencia : 149-179

Harish P., Tharanathan R. (2007). Chitin/Chitosan: Modifications and their unlimited application potential- an overview. **Trends in Food y technology** **18(3)**:117

Helander, I. M., E. L. Nurmiäho R., Ahvenainen R., Rhoades ., Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology** **71**:235-244

Hernández M., Ramírez M., Rodríguez G. (2002). Efecto de la aplicación de la quitinasa en la germinación y crecimiento del clavel **Dianthus Caryophyllus** **4**: 1562-329

Hernández H., Almanza E., Flores A. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. **Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales** **22(3)**: 57-60

Herrera J. (2006). Germinación y crecimiento de la planta. **Universidad de costa rica** 5-29

Hirano A., Nagano N. (1989). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. **Agricultural and Biological Chemistry** **11**: 3065–3066.

How N., Chandkrachang S., Srevens W. (1996). Evaluation of the Acid Hydrolysis HPLC Method to Determine the Degree of acetylation for Chitin and Chitosan . Environmental friendly and versatile Biomaterials , W.F Stevens y M.S Rao editorea (**2nd Asia Pacific Chitin Symp, asian Inst Technol., Bangkok**) 81-89

Hsu S, Don T, Chiu W. (2002). **Polymer Degradation and Stability** **75**: 73-83.

Inoue, Y., Muzzarelli R., Peter M. (1997). NMR Determination of the Degree of Acetylation, in Chitin Handbook, **Editors European Chitin Society: Grottammare**: 133-136

Isogai A., Hand, R., Muzzarelli R. (1997). Molecular weight distribution of chitin and chitosan, chitin Peter editors (*European chitin society, Grottammare* ,) p.103-108

Jaybhay S. Chate A., Ade., A. (2010). Effect of Chitosan on Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Seed Germination. **In J. Experimental Sciences**, vol. **1(2)**: 27.

Katime I. (1994). Química Física Macromolecular. **Servicio editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao**, España.

Khor E. (2001) Chitin: Fulfilling a biomaterials promise. **Elsevier Science Ltd., Amsterdam**
The Netherlands, 1-8

Krishnendu R., Hai Q., Shau K., Kam W. (2007). *Nature Medicine.*, **5 (2)**, 381-387.

Krist J., Smid K., Strue E., Shara H. (1993). Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carries. *Int. J Pharma.* **99** :13-19

Kurita K., Tomita K., Tada T., Ishii S., Nishimura S., Shimoda K. (1993). Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer chemistry* **31**:485-491

Lárez C. (1998). Estudio con hidrogeles de quitosano. **Estudios electrolítico de Acido Salicílico. Tesis Doctoral.** Universidad de Los Andes, Mérida.

Lárez C. (2006). Quitina y quitosano materiales del pasado para el presente y futuro.

Avances en Química, **1(2)**, 15-21

Lárez C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **4 (2)**, 91-94.

Lárez C., Medina D., Torres C., Millán E. (2007) Kinetic of the enzymatic degradation of chitosan using bromelain: a study viscosimetric *Avances en Química.* **2 (2)**: 25- 32

Lárez C., Zambrano L. (2011). Despolimerización de quitosano con peryodato de potasio. *Rev. Lat. Metal. Mater.* **32(2)** 195-202.

Lárez C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *UDO Agrícola*, **8**: 1-22.

Li Q., Dunn E., Grandmaison E., Goosen M. (1997). Applications and properties of Chitin and Chitosan. En M. Goosen (Ed.) Applications of Chitin and Chitosan, Technomic Publishing Company. Lancaster , **Pennsylvania-USA , cap 1**

Liu H., Bao J., Du Y., Zhou X., Kennedy J. (2006). ***Carbohydrate Polymers* 64**: 553-59.

Liu, H., Y. Du, X. Wang and L. Sun. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. ***International Journal of Food Microbiology* 95**: 147– 155.

Liu J., S. Tian, X Menga .,Y Xua. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. ***Postharvest Biology and Technology* 44**: 300–306

Malaprade L.,(1928) ***Bull. Soc. Chim. France. (4e)***: 43, 683.

Martínez J., Monte E., Ruiz F. (2004). Fitocromos y desarrollo vegetal. Instituto de Biología Molecular de Barcelona, **Universidad de Valencia**: 1 -7

Martínez L., Castro L., Díaz L., Núñez M. (2007).Influencia del tratamiento a semillas con quitosana en el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) ***Cultivos Tropicales* 28(4)**: 79-82 **Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas**. La Habana Cuba

Meyers R. (1971). Response Surface Methodology. Allyn and Bacon, **Inc, Boston**

Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S., Mima S. (1980). Spectroscopic determination of CONH in highly deacetylated chitosan. ***Int. J. Biol. Macromol.* 2(5)**: 323-324.

Moerschbacher B., Kogel K., Noll U., Reisener J. (1986). An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. I. Partial purification and characterization. **Zeitung für Naturforschung** **41**: 830–838

Montgomery D. (1991). Diseño y análisis de Experimentos. **Editorial Iberoamérica México** Cap. 16 468-498

Moore G., Roberts, G. A. F.(1980). Determination of the degree of N-acetylation of chitosan” *.Int. J. Biol. Macromol., 2*:115-116.

Mora A., (2000).Diseños de Tratamientos Aplicados a Ensayos de Propagación in vitro con Cultivos de Tejidos Vegetales. En: Vielma, M.T. **Cultivos de Tejidos Vegetales. Manual de Laboratorio**. Mérida.

Mourya V., (2008). Chitosan – modifications and applications :opportunities galore . **Reactive and Functional Polymers** **68(6)**:1013-1051

Muzarelli R., Muzarelli C.(2009).Chitosan chemistry:R elevance to the biomedical sciences. **Advances in Polymer Sciences** **186**:151

Muzzarelli R.,Rocchetti R., Stanic V., Weckx M. (1997). Methods for the Determination of the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan, in Chitin Handbook, **European Chitin Society Editor**: 109

Ospino S., Ramírez D., Mesa., Escobar M., Ossa C., Zapata P. (2010). Evaluación de diferentes protocolos para la extracción de quitina a partir de *Ganoderma lucidum*. *IV Iberoamericano Chitin symposium. Iberoamerican Chitin Society, Santiago – Chile.*

Ozeretskoykaya O., Vasyukova N., Tshalenko G., Gerasimova N., Grishanina A., Khromova I., Yakovleva G., Varlamov V., Skryabin K. (2002). Induction of Resistance to Phytophthora in Tubers of Transgenic Potato. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38(5): 470–473.

Painter T. (1988). *Carbohydrate Research*. 179, 259-268.

Papineau A., Hoover D., Knorr D., Farkas. D. (1991). Antimicrobial effect of atersoluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology* 5: 45–57.

Pastor A., Higuera I. (2004). Fuentes y Procesos. En: Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. **Fondo Editorial del Pontificia Universidad Católica del Perú. Ana Pastor Editora. Cap 1: 26**

Patil R., Ghormade V., Deshpande M. (2000) .*Microb. Technol.*, 36:473–483.

Pearce, R. B. and J. P. Ride. (1982). Chitin and related compounds as elicitors of the lignifications response in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 20: 119–123.

Peniche C. (2006). Estudio sobre quitina y quitosana *Tesis Doctoral*. Universidad de la Habana.

Peniche C., Arguelles W., Davidenko N., Sastre R., Gallardo A., San Roman J. (1999). Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. *Biomaterials*. **20**: 1869-1878

Pérez F., Martínez- J. (1994). *Introducción a la Fisiología Vegetal*. Editorial Mundiprensa, Madrid., ISBN: 84-71144-71-9

Petrucci R., Harwood W. (1999). *Química General. Principios y aplicaciones modernas*. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid, España.

Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J. (1989). Effect of chitosan on the hypersensitive reaction of bean to alfalfa mosaic virus. *Plant Science* **62**: 29-31.

Pospieszny. H.(1997). Antiviral activity of chitosan. *Crop Protection* **16**: 105–106

Qin, C.Q., Du, Y.M., Xiao, L., Li, Z. , Gao, X.H. (2002a). Enzymatic preparation of water soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **31**, 111-117,

Qin, C. Q., Du, Y. M., & Xiao, L. (2002). Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, **76**: 211–218.

R. Development Core Team. (2010). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Raymond L., Morin F., Marchessault R.(1993). Degree of Deacetylation of chitosan Using Conductimetric Titration and Solid-State NMR, *Carbohydr Res.* **226**, 331-336

Registros de la Estación Pico Espejo Investigación atmosférica Mérida (MARS).

Ruiz J., Martínez A. (1999). Chitin biosynthesis and structural organization in vivo. En: O. Jolles y R Muzzarelli (Eds) Chitin and Chitinases, **Library of Congress Cataloging-in Publication** Data. Birkhauser –Germany . 39-50

Sánchez J. (2004) Análisis Conductimétrico y viscosimétrico de polielectrolito en solución. **Tesis de pregrado**. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias,

Sannan T., Kurita K., Ogura K., Iwakura, Y.(1978). *Studies on chitin: 7. I.r.Spectroscopic determination of the degree of deacetylation*". **Polymer. 19(4):** 458-459.

Scott J Page., Thomas D. (1976). Spectrofluorimetric detection and measurement of hydroxyl radicals in periodate solution. **Carbohydrate Research. 52:**214-218.

Sekiguchi S., Miura Y., Kaneko H., Nishimura S.,Nishi N, Iwase M., Tokura S. (1994).Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers Food Hydro-colloids: Structure, Properties and Functions. (Eds.: K. Nishinari and E. Doi) **Plenum Press** 71-76

Sreevinasan K. (1998). Synthesis and preliminary studies on a α -ciclodextrin- coupled chitosan as a nove"l **Journal Polymer Science 69 (6):** 1051-1055

Struszczyk K., Szczęśna M, Antczak T., Rzyska M., Bielecki S., Struszczyk H. (2006) Study on catalytic activity of Mucor in the process of chitosan biodegradation, Progress on

Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. (ed. M. Jaworowska), **Monograph XI, Polish Chitin Society**. 153-158.

Symons M.C.R., (1955). Evidence for formation of free-radical intermediates in some reactions involving periodate. **Journal Chemical Society**. 2794-2796.

Tacoronte M., (1997). Cultivos in vitro: una alternativa de propagación vegetativa en *Swietenia macrophylla* King (Caoba). **Tesis de Maestría**. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

Terbojevich M., Cosani A., Conio G., Marsano E., Bianchi E. (1991). Chitosan: Chain rigidity and mesophase formation. **Carbohydrate Research** 209: 251–260.

Tommeraaas K., Strand S., Christensen B., Smidsrod O., Varum K. (2007). **Carbohydrate Research** 333, 137-144.

Tsigos., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. **Trends in biotechnology** 18(7):305-312

Varum K., Smidrod O. (1997). Specificity in Enzymic and Chemical degradation of Chitosans. **Advances in Chitin Science**, Vol II, A Domard, G.A.F. Roberts y KM Varum Editores (Jacques André Publisher, Lyon 168-175.

Varum K., Anthonsen M., Grasdalen H., Smidsrod O. (1991). Determination of degree of N- Acetylation and distribution of N-Acetyl Groups in partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High-Field NMR, **Carbohydrate Research**. 211(1) 17-23

Vold I.M.N., Christensen BE. (2005). Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions *Carbohydrate Research*. 340, 679-684

Vold I.M., (2004). Periodate oxidised chitosans: Structure and solution properties. **Doctoral thesis**. Norwegian University of Science and Technology. Faculty of Natural Sciences and Technology. Department of Biotechnology.

Wang S., Huang Q., Wang Q. (2005) Study of synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydrate Research* 340. 1143-1147.

Wang W., Xu D. (1994). Viscosity and properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *International Journal Macromoleculares* 16 149-

152

Xu, J., Zhao X., Wang X., Zhao Z., Du Y. (2007). Oligochitosan inhibits *Phytophthora capsici* by penetrating the cell membrane and putative binding to intracellular targets. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 167–175.

Yau W., Kirkland J., Bly D. (1979). Modern Size- Exclusion liquid Chromatography **Wiley and Sons** New York , 85-93

Zambrano L. (2009). Oxidación de quitosano con periodato de potasio. *Tesis de grado* Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias.

Zhang M.,Tan W. (2003). Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligochitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymer* 18: 391–400.

Ziani K., Ursula B., Maté J. (2010). Application of biocide coating based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection* 29:853-859

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

9.- ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo de la concentración de grupos amino protonados (eq/g) :

$$[\text{NH}_3^+] = (N \times V) / m_q \times F_c \quad (17)$$

donde:

N= normalidad del titulante 0.121 eq/l

$$V = (v_f - v_i) = (4,5 \times 10^{-3} - 3 \times 10^{-3}) = 1,5 \times 10^{-3}$$

m_q = masa del quitosano titulada = 0.0407g

F_c = factor de corrección por humedad de la muestra = 0,945

$$[\text{NH}_3^+] = (0.121 \text{ eq/l} \times 1,5 \times 10^{-3}) / 0.0407 \text{ g} \times 0.945$$

$$[\text{NH}_3^+] = 4,789613 \times 10^{-3} \text{ eq/g}$$

Cálculo de grado de acetilación por titulación conductimétrica.

El grado de acetilación se calcula relacionado la concentración obtenida mediante la ecuación (17) con la concentración de grupos amino para la quitina totalmente desacetilada, de acuerdo a siguiente ecuación:

$$\text{GDA} = [\text{NH}_3^+] \times \text{PE}_{ur} \times 100$$

donde :

GDA= grado de desacetilación , expresado como porcentaje de los grupos desacetilados. PE_{ur} =peso equivalente de la unidad repetitiva del polímero completamente desacetilado (g/eq)

$$\text{GDA} = 4,789613 \times 10^{-3} \text{ eq/g} \times 161 \text{ eq/l} \times 100 = 77.11$$

Obteniéndose un GDA=77.11 y un GA =100-77.11= 22.88 %

ANEXO 2

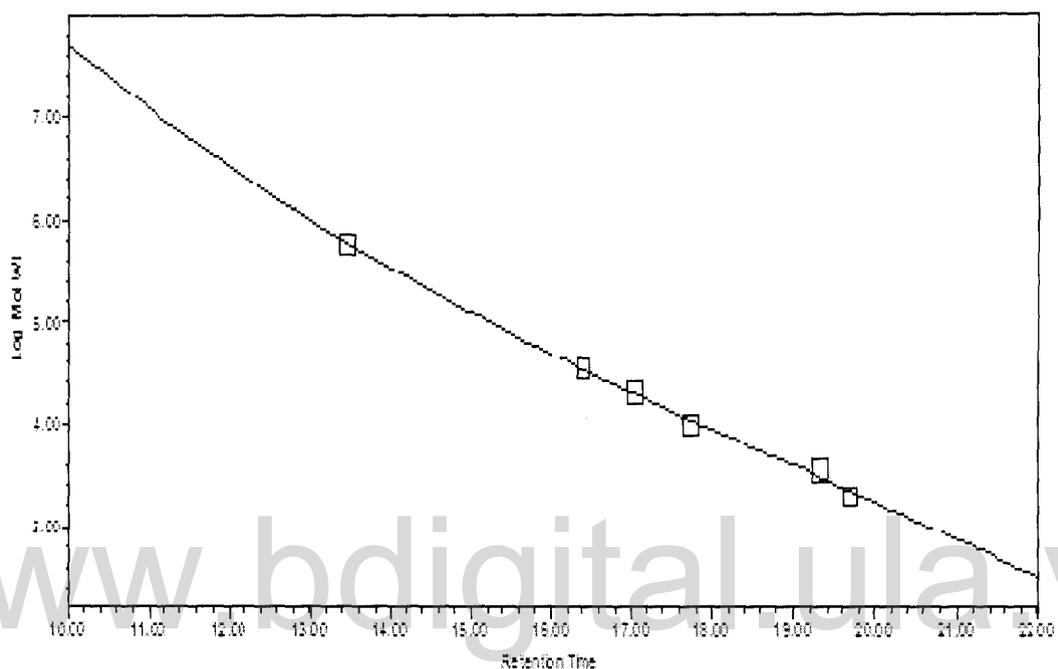


Figura. A2. Curva de calibración relativa con muestras de poli(óxido de etileno).

ANEXO 3

Tabla A 3.1 Análisis de varianza obtenida de los tratamientos, grupos y condiciones de almacenamiento en función %GA.

Parámetros (ANOVA)	GA (%)					
	CO-A	C2-A	C5-A	CO-N	C2-N	C5-N
Valor de p	4.08e-04 ***	9.69e-04 ***	1.18e-05 ***	1.01 e-04 ***	4.981e-05 ***	1.36e-09 ***
Valor de F_{exp}	7.0771	6.2587	10.683	8.3633	9.1663	22.177
Valor F_{tab}	2,7694	2,7694	2,7694	2,7694	2,7694	2,7694
Suma de cuadrados	15635	12213	20701	15173	14515	29288
Cuadrado medio	5211.6	4071	6900.5	5057.8	4838.3	9762.7
Grado de libertad (GL)	3	3	3	3	3	3
Residual	56	56	56	56	56	56

Códigos de significancia: (·) 95 (*) 99 (**) 99,99 (***) 100

Tabla A 3.2 Análisis de Varianza obtenida de los grupos de tratamientos, grupos y condiciones de almacenamiento en función Tg.

Parámetros (ANOVA)	Tg (%)					
	CO-A	C2-A	C5-A	CO-N	C2-N	C5-N
Valor de p	2.66e-04 ***	1.55e-04 ***	9.414e-06 ***	4.143e-05 ***	1.992e-05 ***	3.108e-11 ***
Valor de F_{Exp}	7.492	8.0212	10.928	9.3563	10.123	28.159
Valor F_{tab}	2,7694	2,7694	2,7694	2,7694	2,7694	2,7694
Suma de cuadrados	2.9395	2.7753	4.3273	3.3519	3.9688	6.7493
Cuadrado medio	0.97983	0.92511	1.4424	1.11731	1.32294	2.24975
Grado de libertad	3	3	3	3	3	3
Residual	56	56	56	56	56	56

Códigos de significancia: (·) 95 (*) 99 (**) 99,99 (***)100,

ANEXO 4

Tabla A 4.1. Comparación entre las medias para los tratamientos y grupos basadas en la mínima diferencia significativa en función %GA en condiciones de almacenamiento

TRAT.	GA (%)											
	CO-A	Error Est	C2-A	Error Est	C5-A	Error Est	CO-N	Error Est	C2-N	Error Est	C5-N	Error Est
T 1	72.6	4.91	71.10	4.93	87.41	4.42	71.1	4.18	72.6	4.28	92.59	2.65
T 2	49.3	6.43	49.30	6.43	49.33	6.43	45.33	8.55	45.33	7.04	45.33	8.02
T 3	36.0	8.55	40.00	7.04	57.33	8.02	36.00	8.55	40.00	7.04	57.33	8.02
T 4	33.3	6.67	33.3	6.67	33.3	6.67	33.3	6.67	33.3	6.67	33.3	6.67
ANOVA												
	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Grado de libertad	Valor de F	Valor de F _{tab}	p						
Grupos	12279	2455.80	5	4.9238	2.764	3.26e-04***						
Residual	156	77807	498.77									

Códigos de significancia: (·) 95 (*) 99 (**) 99,99 (***) 100

Tabla A.4.2. Comparación entre las medias para grupos de tratamientos basadas en la mínima diferencia significativa en función del Tg en condiciones de almacenamiento

TRAT.	Tg (días)											
	CO-A	Error Est	C2-A	Error Est	C5-A	Error Est	CO-N	Error Est	C2-N	Error Est	C5-N	Error Est
T 1	2.27 ^a	0.06	2.29	0.06	1.98	0.08	2.25	0.06	2.21	0.08	1.88	0.05
T 2	2.49	0.08	2.49	0.08	2.49	0.08	2.59	0.06	2.58	0.06	2.59	0.06
T 3	2.76	0.13	2.76	0.11	2.31	0.08	2.76	0.13	2.76	0.11	2.31	0.08
T 4	2.93	0.13	2.93	0.13	2.93	0.13	2.93	0.13	2.93	0.13	2.93	0.13
ANOVA												
	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Grado de libertad	Valor de F	Valor de F _{tab}	p						
Grupos	4.0516	0.81032	5	7.3787	2.764	3.095e-06 ***						
Residual	156 1	7.1319	0.10982									

Códigos de significancia: (·) 95 (*) 99 (**) 99,99 (***) 100

variables presentaron la más alta significancia estadística, seguido de aquellos términos lineales y cuadráticos para el tiempo de preservación (Tp). Los bajos valores de p determinaron que el principal factor que afecta la respuesta germinación acumulada (%GA) y tiempo de germinación (Tg) fue el término CQ seguido de Tp.

e.- Modelos polinómicos de variables independientes

Las ecuaciones polinómicas permitieron obtener las gráficas de superficie respuesta, en la que se proyectan las variables concentración de quitosano (CQ) y tiempo de preservación (Tp) que generen el mayor estímulo a la respuesta porcentaje de germinación acumulada (%GA) y tiempo de germinación (Tg). El modelo final generado por MSR, en términos de los coeficientes reportados en la **Tabla 14** para cada respuesta, se describe mediante las siguientes ecuaciones polinómicas:

Ecuación polinómica para la germinación acumulada (%GA):

$$\%GA: 25,904 + 134,457 CQ + 17,073Tp - 105,809 CQ^2 - 1,974 Tp^2 + 0,875 CQ \cdot Tp \quad (20)$$

Ecuación polinómica para el tiempo de germinación (Tg):

$$Tg: 2,860 - 2,678 CQ - 0,208Tp + 2,265 CQ^2 + 0,024 Tp^2 + 0,0027 CQ \cdot Tp \quad (21)$$

Los valores negativos de (CQ (-2,678) y Tp (-0,208) demuestran un efecto inverso de estas variables sobre la respuesta tiempo de germinación, es decir, al incrementar la concentración de quitosano y el tiempo de preservación se disminuye el tiempo de germinación. Los términos lineales con coeficientes positivos de la ecuación 21, CQ (+134,457) y Tp (+ 17,073) tienen un efecto contrario sobre la variable germinación acumulada, es decir, el incremento de estas variables (CQ y Tp) tiene un efecto positivo directo sobre la germinación acumulada. La alta significancia estadística reportada para los efectos cuadráticos puros CQ^2 y Tp^2 de las variables respuestas porcentaje de germinación acumulada y tiempo de germinación se demuestra en la curvatura máxima y mínima observada en las **Figuras 24 (A) y 24 (B)**.

Los términos cuadráticos negativos para CQ^2 y Tp^2 mostrado en la ecuación 20, son indicativo de un máximo en la respuesta grafica del porcentaje de germinación acumulada, caso contrario se observa en el mínimo encontrado en la representación parabólica para la Tg dados los coeficientes cuadráticos positivos. En relación a los puntos críticos o estacionarios, los términos cuadráticos negativos (ó positivos) para CQ y Tp determinaron puntos ubicados en un máximo (ó mínimo) de la curva para las variables %GA y Tg , respectivamente.

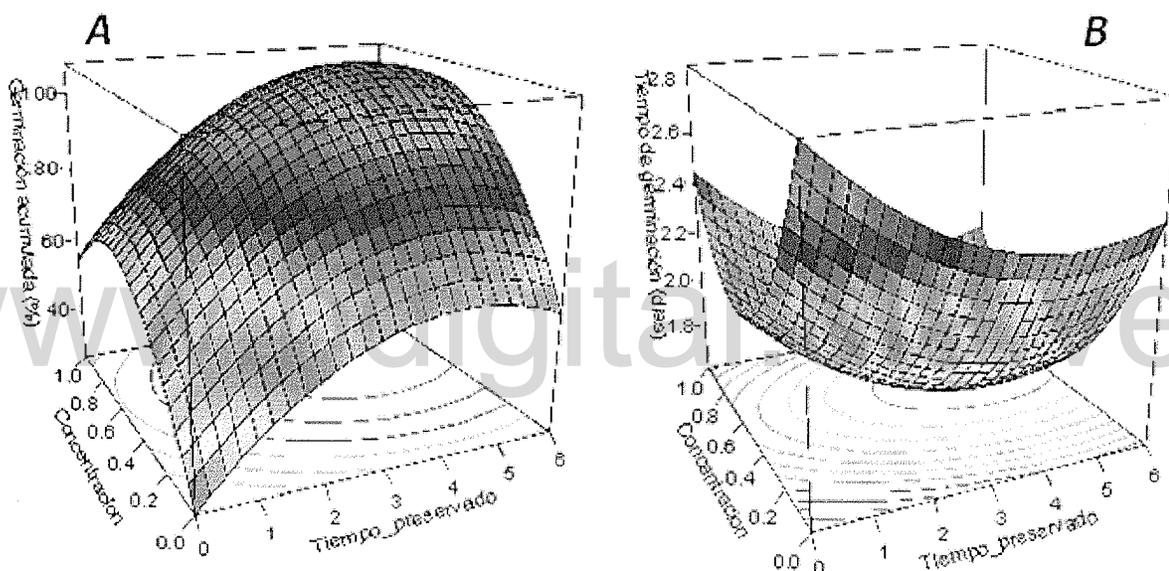


Fig. 24: Superficie de respuesta para Quitosano despolimerizado al 5% en condición de almacenamiento Nevera (C5-N): (A) porcentaje de germinación acumula y (B) tiempo de germinación.

Los puntos óptimos predichos para las variables respuesta porcentaje de germinación acumulada y tiempo de germinación, se muestran a continuación:

	Concentración de quitosano (p/v)	Tiempo de preservación (meses)
%GA=estimación máxima	0,65	4,5 (134días)
Tg= estimación minina	0,58	4,4 (132días)

Los cuales estimarían la máxima respuesta para germinación acumulada y mínima para tiempo de germinación. Los modelos matemáticos dado por las ecuaciones 20 y 21 permitieron entonces estimar las condiciones óptimas de CQ/Tp, es decir, que generan una máxima germinación en el menor tiempo posible. Se evidencia que el máximo valor para el porcentaje de germinación acumulada de semillas de calabacín se obtiene con una concentración de C5 = 0,65% (p/v), preservándolas en nevera por 4,5 meses (134 días).

Por otro lado, se logra un mínimo en el tiempo de germinación (1,61 días) en semillas de calabacín cubiertas con C5 al 0,58% (p/v), preservándolas en nevera por 4,4 meses (132 días).

De manera general, se observa una disminución del 44% en los valores de tg para las semillas que fueron almacenadas en nevera, con respecto a las semillas control (T4: semillas sin quitosano y sin preservación) y un aumento considerable en la germinación de aquellas semillas cubiertas con quitosano despolimerizado con respecto a aquellas no tratadas, evidenciándose así el efecto bioestimulante que tienen las películas de quitosano de bajo peso molecular sobre semillas de calabacín.

De esta manera, la investigación puede contribuir al desarrollo de la agricultura orgánica debido a que los agricultores podrían disponer de semillas de calabacín tratadas con un producto amigable con el ambiente que mejora potencialmente la germinación en el menor tiempo posible.

porcentaje de germinación acumulada y tiempo de germinación. Para comprender y optimizar la relación entre las variables evaluadas, los datos experimentales obtenidos para el grupo C5-N fueron ajustados a una ecuación polinomial de segundo orden por medio de Metodología de Superficie de Respuesta MSR. Como se muestra en la **Tabla 14**, el ajuste del modelo obtenido fue evaluado por análisis de varianza (ANOVA). Se observan valores de p bajos para las %GA y Tg, indicando que el modelo polinomial representa con precisión la relación entre la respuesta y las variables CQ y Tp. Por otro lado, se presentan para ambas respuestas los coeficientes de determinación (R^2) entre 54,5 y 60,15% y los ajustes del coeficiente de determinación (R^2 Ajustado), oscilando entre 50,34 y 56,46%. Estos resultados indican que la relación entre CQ/Tp, intervienen entre 50,34 y 60,15% en la respuesta %GA y Tg, respectivamente.

Tabla 14: Análisis de varianza del modelo polinomial para la optimización del grupo C5-N en función de las variables respuesta %GA y Tg.

TERMINOS MSR	Porcentaje de germinación acumulada %GA				Tiempo de germinación Tg			
	Coefficiente	Error Est.	t	P	Coefficiente	Error Est.	t	P
Intercepto	25.904	7.538	3.436	1.14E-3**	2.86024 5	0.109	28.092	2E-16 ***
Tp	17.073	5.140	3.320	1.62E-3**	-0.2080	0.070	-2.995	4.14E-3**
CQ	134.457	31.730	4.238	8.80E-5***	-2.6782	0.429	-6.249	6.78E-08 ***
Tp-CQ	0.875	3.660	0.239	0.81172	0.00273	0.049	0.055	0.95601
Tp ²	-1.974	0.810	-2.429	1.85E-2*	0.02349	0.011	2.140	3.686E-2*
CQ ²	-105.809	30.320	-3.490	9.69E-4***	2.26561	0.410	5.533	9.44E-07***
Valor de p	2.70E-8				8.91E-10			
F	12.960				16.300			
G.L	54				54			
Error residual	21.310				0.290			
R ²	0.5454				0.6015			
R ² Aj.	0.5034				0.5646			

Códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '' 0.1 ' ' 1

En general, de la **Tabla 14**, se desprende que los valores de p obtenidos del análisis de varianza mostraron que los coeficientes de los términos lineales y cuadráticos tuvieron un efecto significativo en el porcentaje de germinación y tiempo de germinación, excepto la interacción (Tp-CQ). Los términos lineales y cuadráticos para la CQ reportados para ambas