



INSTITUTO POLI TÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS

CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS INDUCIDOS EN  
*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. POR EFECTO DEL QUITOSANO,  
OLIGOQUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

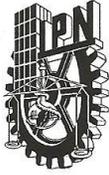
EN

MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES  
PRESENTA

IVONNE CAROLINA ALFARO GUTIÉRREZ



YAUTEPEC, MORELOS, DICIEMBRE DE 2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 11:25 horas del día 11 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi para examinar la tesis titulada:  
"Cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales"

Presentada por el alumno:

<u>ALFARO</u>	<u>GUTIÉRREZ</u>	<u>IVONNE CAROLINA</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
	Con registro:	<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; text-align: center;">B</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">0</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">9</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">1</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">3</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">1</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">6</td> </tr> </table>	B	0	9	1	3	1	6
B	0	9	1	3	1	6			

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES

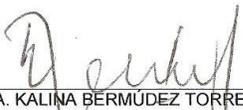
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

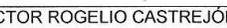
### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
DR. MIGUEL GERARDO VELÁZQUEZ DEL VALLE

  
DRA. MARIA GUADALUPE GUERRA SÁNCHEZ

  
DRA. KALINA BERMÚDEZ TORRES

  
DR. VÍCTOR ROGELIO CASTREJÓN GÓMEZ

  
M. EN C. LETICIA BRAVOLUNA

  
DR. FEDERICO CASTREJÓN AYALA

### PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

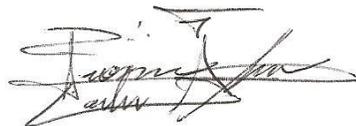
  
DR. ANTONIO RUPERTO JIMÉNEZ APARICIO  
SEP IPN  
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIOTICOS  
YAUTEPEC. MOR.

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Yauatepec, Morelos, siendo el día 12 del mes de Diciembre del año 2011, la que suscribe IVONNE CAROLINA ALFARO GUTIÉRREZ, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades, con número de registro B091316, adscrita al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Doctores MIGUEL GERARDO VELÁZQUEZ DEL VALLE Y MARÍA GUADALUPE GUERRA SÁNCHEZ y cede los derechos del trabajo intitulado “CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS INDUCIDOS EN *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill POR EFECTO DEL QUITOSANO, OLIGOQUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo, sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6.0, Calle CeProBi No.8, Col. San Isidro, C.P. 62731 Yauatepec, Morelos, México, Fax: (01) (55) 57296000 ext. 82512 ó 01-7353941896, e-mail: [ceprobi@ipn.mx](mailto:ceprobi@ipn.mx) (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



---

Biol. IVONNE CAROLINA ALFARO GUTIÉRREZ



## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS INDUCIDOS EN *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. POR EFECTO DEL QUITOSANO, OLIGOQUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES” es responsabilidad de los Directores de tesis Dr. Miguel Gerardo Velázquez del Valle y Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez y la estudiante Ivonne Carolina Alfaro Gutiérrez, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos a 12 de Diciembre del 2011

ATENTAMENTE

  
Dr. Miguel Gerardo Velázquez Del Valle

Nombre y firma de director de tesis

  
Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez

Nombre y firma de director de tesis



Biol. Ivonne Carolina Alfaro Gutiérrez

Alumna

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Interacción Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Miguel Velázquez del Valle en el laboratorio de Fitopatología y en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas bajo la supervisión de la Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez. Para la realización de los estudios se obtuvo el apoyo económico de la beca CONACYT (NO. DE REGISTRO 332350), beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores y del Programa de Becas Institucionales. La investigación fue realizada con el financiamiento económico del proyecto SIP20100784 de la Secretaría de investigación y Posgrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. en C. Leticia Bravo Luna por su gran apoyo e interés para la realización de este trabajo, por su amistad y sus pacientes enseñanzas para con mi persona, en fin por la gran persona que es.

A la Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez por su gran apoyo durante mi estancia en la ENCB para la realización de este trabajo, así como sus enseñanzas, sinceridad y gran hospitalidad.

A la Dra. Kalina Bermúdez Torres por sus enseñanzas con gran admiración por sus acertadas observaciones durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Roberto Montes Belmont por su apoyo, confianza y enseñanzas durante mi estancia en CeProBi para el desarrollo de este proyecto.

A la Biol. María Esther Sánchez por su gran apoyo en los microscopios, su confianza y amistad durante mi estancia en la ENCB.

Al Dr. René Arzuffi con admiración por su cine cultural de los Miércoles, su apoyo y enseñanzas durante el desarrollo del trabajo.

A mis amigas(os) por su cariño y gran apoyo durante nuestra estancia en estos años de estudio juntos y de esfuerzos para lograr nuestras metas profesionales, así como por sus enseñanzas personales: Rosa Elba, Arely, Alejandra, Nancy, Kathia, Lucero, Elba, Leo, Adrian, Adriana, Jesús, Olga.

A los miembros del jurado revisor por su interés y observaciones para mejorar este trabajo de tesis.

Al Dr. Miguel G. Velázquez del Valle por sus enseñanzas durante la realización del proyecto de tesis.

Al Instituto Politécnico Nacional en general y al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos en particular por permitirme cumplir aquí uno de mis objetivos profesionales y por la experiencia adquirida durante mi estancia.

## **DEDICATORIAS**

Dedico la finalización de esta meta profesional:

A Dios por permitirme lograr cumplir este objetivo por dejarme existir en este tiempo y lugar permitiéndome conocer cosas y personas tan interesantes.

A mis amados Padres por su apoyo incondicional durante toda mi vida por estar siempre a mi lado por su ejemplo de fortaleza y valor, por que este logro es también el suyo.

A mis amados hermanos por compartir su vida conmigo por que este es nuestro logro, principalmente a Fer esperando darle un ejemplo que le sirva de inspiración para lograr cumplir sus metas profesionales.

A mis sobrinitos: Betito, July, “Pipeman” y “Faby” por ser motivó de alegría y esfuerzo para compartir la alegría de vivir y aprender juntos.

**A mis queridos(as) amigas por que con este logró todos aprendemos un poco más...**

**...”El hombre evolucionado e inteligente respeta todo tipo de vida existente”...**

## CONTENIDO

### ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1.- Problemática de las enfermedades postcosecha.....	3
2.2. <i>Rhizopus stolonifer</i> , agente causal de pudriciones postcosecha.....	4
2.3. Estrategias de control de las pudriciones postcosecha.....	5
2.4. Quitosano.....	6
2.5. Oligoquitosano.....	9
2.6. Aceite esencial de clavo.....	10
2.7. Aceite esencial de canela.....	11
2.8. Características celulares y fisiológicas de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	12
2.8.1. Morfología.....	12
2.8.2. Pared celular.....	14
2.8.3. Membrana plasmática.....	15
2.8.4. Respiración.....	17

<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.- Objetivo general.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Objetivos particulares.....</b>	<b>20</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>5.1 Material biológico.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2. Preparación del inóculo.....</b>	<b>21</b>
<b>5.3. Preparación de la solución de quitosano y oligoquitosano.....</b>	<b>22</b>
<b>5.4. Preparación de la solución de aceites esenciales.....</b>	<b>22</b>
<b>5.5. Evaluación de los cambios morfológicos de hifas de <i>R. stolonifer</i></b> .....	<b>23</b>
<b>5.6. Evaluación de los cambios en el pH del medio durante el crecimiento de <i>R.</i></b> <b><i>stolonifer</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>5.7. Cuantificación de la salida de proteínas Intracelulares.....</b>	<b>24</b>
<b>5.8. Determinación de la integridad de la membrana plasmática hifas de <i>R.</i></b> <b><i>stolonifer</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>5.9. Efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales sobre la</b> <b>ultraestructura de <i>Rhizopus stolonifer</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>5.10. Evaluación de los cambios de consumo de oxígeno.....</b>	<b>28</b>

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>6.1. Cambios morfológicos.....</b>	<b>29</b>
<b>6.2. Variaciones en el pH del medio durante el crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>6.3. Liberación de proteínas celulares.....</b>	<b>41</b>
<b>6.4. Integridad de la membrana de <i>Rhizopus stolonifer</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>6.5. Cambios en la ultraestructura de <i>Rhizopus stolonifer</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>6.6. Cambios en el consumo de oxígeno.....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>64</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>65</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano (Lárez, 2006).....	7
<b>FIGURA 2.</b> Diagrama de la interacción de quitosano-membrana celular fúngica, tomada y modificada de Kartsonis (2003).....	8
<b>FIGURA 3.</b> Molécula de Eugenol, componente principal del aceite esencial de clavo.....	11
<b>FIGURA 4.</b> Molécula de aldehído cinámico uno de los principales componentes del aceite esencial de canela.....	12
<b>FIGURA 5.</b> Microfotografías de hifas de <i>R. stolonifer</i> (40X) en MM (A) Testigo. (B) quitosano [0.5 mg mL <sup>-1</sup> ]. (C) quitosano [1.0 mg mL <sup>-1</sup> ]. (D) quitosano [2.0 mg mL <sup>-1</sup> ].....	30
<b>FIGURA 6.</b> Microfotografías de hifas de <i>R. stolonifer</i> (40X) en MM. (A) Testigo. (B) oligoquitosano [0.5 mg mL <sup>-1</sup> ]. (C) oligoquitosano [1.0 mg mL <sup>-1</sup> ]. (D) oligoquitosano [2.0 mg mL <sup>-1</sup> ].....	32
<b>FIGURA 7.</b> Microfotografía de las hifas de <i>R. stolonifer</i> (40X) en MM (A) Testigo. (B) aceite esencial de clavo [0.05 mg mL <sup>-1</sup> ]. (C) aceite esencial de clavo [0.1 mg mL <sup>-1</sup> ]. (D) aceite esencial de clavo [0.15 mg mL <sup>-1</sup> ].....	34
<b>FIGURA 8.</b> Microfotografías de las hifas de <i>R. stolonifer</i> (40X) en MM (A) Testigo. (B) aceite esencial canela [0.05 mg mL <sup>-1</sup> ]. (C) aceite esencial de canela [0.1 mg mL <sup>-1</sup> ]. (D) aceite esencial de canela [0.15 mg mL <sup>-1</sup> ].....	36
<b>FIGURA 9.</b> Microscopía electrónica de transmisión de <i>R. stolonifer</i> (100 000X) en MM durante 12 h (A) Testigo. (B) quitosano [2.0 mg mL <sup>-1</sup> ]. (C) oligoquitosano [2.0 mg mL <sup>-1</sup> ]. (D) aceite esencial de clavo [0.15 mg mL <sup>-1</sup> ].....	52
<b>FIGURA 10.</b> <i>R. stolonifer</i> durante 12 h en MM (40 000X) (A) Testigo. <i>R. stolonifer</i> (10 000 X) en oligoquitosano (mostrando la gran cantidad de vacuolas) (B). <i>R. stolonifer</i> + aceite esencial de canela [0.15 mg mL <sup>-1</sup> ] (C).....	53

<b>FIGURA 11.</b> Consumo de O <sub>2</sub> por <i>R. stolonifer</i> en MM con quitosano y oligoquitosano.....	<b>56</b>
<b>FIGURA 12.</b> Consumo de O <sub>2</sub> (6 h) por <i>R. stolonifer</i> en MM con aceite esencial de clavo y de canela.....	<b>58</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> Características morfológicas de <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> (tomado de Liou <i>et al.</i> , 2006).....	<b>13</b>
<b>CUADRO 2.</b> Evaluación de los cambios de pH de los medio de cultivo durante el crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> en MM y adicionados con diferentes concentraciones de compuestos naturales.....	<b>24</b>
<b>CUADRO 3.</b> Modificación del pH del medio a las 24 h de cultivo por efecto del crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> bajo tratamiento con diferentes concentraciones de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo y de canela.....	<b>38</b>
<b>CUADRO 4.</b> Integridad de la membrana plasmática de células de <i>Rhizopus stolonifer</i> sometidas durante 12 h a diferentes concentraciones de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo o aceite esencial de canela.....	<b>44</b>
<b>CUADRO 5.</b> Espesor de la pared celular de células de <i>R. stolonifer</i> crecidas durante 12 h en presencia de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo o aceite esencial de canela. Las determinaciones se realizaron mediante microscopia electrónica de transmisión.....	<b>54</b>
<b>CUADRO 6.</b> Velocidad en el consumo de O <sub>2</sub> (6h) bajo tratamiento con Quitosano (quit), Oligoquitosano (oli), aceite esencial de clavo (cla) y de canela (can).....	<b>60</b>

## RESUMEN

La demanda agrícola actual necesita de fungicidas eficientes que contrarresten las enfermedades postcosecha sin ocasionar problemas de contaminación, afectaciones al ambiente y a la salud humana. Entre algunos compuestos compatibles con el ambiente que se han estudiado se encuentran el quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales los cuales se conoce que poseen efecto antifúngico, sin embargo; es poco el conocimiento sobre el modo de acción de estos compuestos en las células fúngicas de *Rhizopus stolonifer* agente causal de la pudrición blanda en frutas y verduras por ello el presente trabajo busca profundizar en el modo de afectación sobre la morfología y fisiología de este hongo. El objetivo de este trabajo fue determinar los cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en *R. stolonifer* por quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela. Se inocularon esporas de *R. stolonifer* en medio líquido MM adicionados con quitosano, oligoquitosano o aceites esenciales de clavo o canela. Se evaluarán las siguientes variables: cambios en la morfología celular, variación en el pH del medio, liberación de proteínas celulares, cambios en la integridad de la membrana, grosor de la pared celular y afectaciones en el consumo de oxígeno. En general, los compuestos probados provocaron inhibición del crecimiento y cambios morfológicos en las hifas de *R. stolonifer*. La presencia de oligoquitosano provocó que *R. stolonifer* fuera incapaz de acidificar el pH del medio de cultivo y el quitosano incluso indujo que el hongo incrementara el pH. No se demostró que los compuestos probados indujeran la salida de proteínas celulares ni que afectaran la integridad de la membrana plasmática. El quitosano, oligoquitosano y el aceite esencial de clavo indujeron incrementos significativos en el grosor de la pared celular. El oligoquitosano provocó una elevada vacuolización. Concentraciones bajas e intermedias de oligoquitosano y de los aceites de clavo y canela provocaron aceleración en la respiración. El aceite esencial de canela provocó un incremento notable en el consumo de oxígeno. Se demostraron significativos cambios celulares y fisiológicos en *R. stolonifer* por efecto del quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela.

## ABSTRACT

The current agricultural demand efficient fungicides need to counter the post-harvest diseases without causing pollution problems affecting the environment and human health. Among some compounds compatible with the environment that have been studied include chitosan, oligochitosan and essential oils which are known to possess antifungal effect, however, there is little knowledge about the mode of action of these compounds in fungal cells *Rhizopus stolonifer* causal agent of soft rot in fruits and vegetables this paper therefore seeks to deepen involvement in how the morphology and physiology of this fungus. The aim of this study was to determine the cellular and physiological changes induced on *R. stolonifer* by chitosan, oligochitosan and essential oils of clove and cinnamon. *R. stolonifer* spores were inoculated in liquid medium MM containing chitosan, oligochitosan or essential oils of clove or cinnamon. The following determinations were evaluated: changes on cell morphology, variations on pH of the medium, release of cellular proteins, changes in membrane integrity, ultrastructural and effects on oxygen consumption. In general, the compounds tested caused growth inhibition and morphological changes on the hyphae of *R. stolonifer*. The presence of oligochitosan caused that *R. stolonifer* was unable to acidify the pH of the culture medium and chitosan even induced that the fungus increased the pH. Not demonstrated that the compounds tested induced liberation of cellular proteins or affecting the integrity of the plasma membrane. Chitosan, oligochitosan and essential oil of clove induced significant increases in cell wall thickness. The oligochitosan caused an increased vacuolation. Low and intermediate concentrations of oligochitosan, clove and cinnamon oils caused acceleration in respiration. Cinnamon essential oil caused a marked increase in oxygen consumption. Significant changes in cellular and physiology of *R. stolonifer* by the effect of chitosan, oligochitosan and essential oils of clove and cinnamon were demonstrated.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Rhizopus stolonifer* es un hongo fitopatógeno, causante de la pudrición blanda en diversos frutos y hortalizas en postcosecha (Agrios, 2001). Debido a que ocasiona grandes pérdidas económicas, se utilizan diversos métodos de control; siendo el control mediante químicos sintéticos el más usado (Tripathi y Dubey, 2004); sin embargo, esta práctica genera efectos negativos en el ambiente y en la salud humana. Por lo que, se buscan alternativas ecológicas para controlar estas enfermedades postcosecha. Entre las alternativas viables, se encuentra el empleo de compuestos como el quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales vegetales (Tripathi y Dubey, 2004).

El quitosano es un compuesto derivado de la quitina constituido por unidades de  $\beta$ -(1,4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucosa y  $\beta$ -(1,4)-amino-2-deoxi-D-glucosa. Este polímero biodegradable y no tóxico para los humanos, presenta cargas positivas que le confieren valiosas propiedades funcionales, entre las que destaca su actividad antimicrobiana (Bautista-Baños *et al.*, 2006). Las cargas positivas del quitosano le permiten la interacción con las cargas negativas de la membrana celular alterando su funcionalidad y afectando el crecimiento del microorganismo (Rabea *et al.*, 2003; Kim y Rajapakse, 2005). Se observó que el quitosano ocasiona deformaciones de las hifas de *R. stolonifer* así como una inhibición en el crecimiento miceliar (García, 2008), y un incremento en el consumo de oxígeno por parte del micelio, además; mediante microscopia electrónica se observaron alteraciones, como engrosamiento de la pared celular y desprendimiento de la membrana plasmática, así como un aumento en el número de mitocondrias (Robles, 2009).

El oligoquitosano es otra molécula inocua y biodegradable obtenida de la hidrólisis del quitosano y con un menor peso molecular, lo que lo hace más soluble en agua y en algunos trabajos se muestra que tiene una mayor actividad antimicrobiana que el quitosano (Kim y Rajapakse, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Por otra parte, los aceites esenciales son moléculas biodegradables con actividad antimicrobiana (Burt, 2004), se presentan como líquidos oleosos, aromáticos y volátiles que son obtenidos de distintas partes de las plantas y constituidos por una mezcla compleja de compuestos. Algunos aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana y pueden presentar diversos modos de acción (Tripathi y Dubey, 2004; Burt 2004).

Específicamente, los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) poseen una elevada actividad antifúngica (Barrera-Necha *et al.*, 2009).

Actualmente, se conoce poco acerca de los efectos que ocasionan estos compuestos a nivel morfológico y fisiológico así como de sus modos de acción sobre hongos fitopatógenos como *Rhizopus stolonifer*, por ello se desea probar de forma comparativa sus efectos entre los compuestos antes mencionados sobre *R. stolonifer*. El conocimiento básico de la actividad y los mecanismos de acción de estos compuestos podría favorecer la utilización más eficiente de los mismos, para proponer formulados y/o compuestos que contribuyan en la conservación del ambiente y la salud humana junto con una alta efectividad.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Problemática de las enfermedades postcosecha

Los productos hortofrutícolas son los alimentos más perecederos debido a los altos contenidos de agua y a la elevada actividad metabólica que presentan aún después de la cosecha. Las pérdidas postcosecha no pueden calcularse con precisión, pero en países industrializados se estima que el 25% del total se pierde durante esta etapa; mientras que en países en desarrollo, las pérdidas postcosecha pueden exceder el 50% del total del producto (Spadaro y Lodovica, 2004).

El mayor porcentaje de las pérdidas de los productos postcosecha se debe a las pudriciones causadas por hongos fitopatógenos (Tripathi y Dubey, 2004). Se han reportado varios géneros fúngicos tales como *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Gloeosporium*, *Monilia* y *Rhizopus* como los principales agentes causales de las enfermedades postcosecha (Viñas *et al.*, 2006).

En las regiones con clima seco el daño reportado no rebasó el 10%; en tanto que para regiones subtropicales se encontró entre 25 y 40% de daño con pérdidas entre 10 y 20% y en las regiones tropicales el grado de daño superó el 80% con pérdidas entre 20 y 40%. Al analizar los ambientes subtropicales se encontró una enorme influencia de la temperatura y la humedad relativa en los niveles de daño y pérdida (García-Lara y Bergvinson, 2007).

Las pérdidas postcosecha en México han sido cuantificadas solo parcialmente y se reporta que el 70% del comercio internacional se concentra en siete productos: papa, tomate, cebolla, sandía, pepino, lechuga y melón, por estar incluidos en la dieta nutrimental a la

población. De los cuales se estima, a nivel mundial, las pérdidas postcosecha en el cultivo de tomate (*Lycopersicon sculentum*) más del 25% y gran parte de esto se debe a la podredumbre por hongos (Wang, et al, 2008).

La superficie nacional dedicada a cultivos agrícolas asciende a un total de 20,031 millones de hectáreas y la producción agrícola obtenida en esta superficie alcanza \$ 113,765 millones de pesos (Promedio 1989-1996., SAGAR, 1998).

Entre los factores bióticos se incluyen las enfermedades ocasionadas por hongos postcosecha siendo *Rhizopus stolonifer* uno de los principales (Wang *et al.*, 2008).

## **2.2. *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de pudriciones postcosecha**

Este hongo pertenece a la Subdivisión: Zygomycotina, Clase: Zygomycetes, Orden: Mucorales, Género: *Rhizopus* y Especie: *Rhizopus stolonifer* (Agrios, 2001). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza sobreviviendo de manera saprófita en el suelo y en residuos orgánicos invadiendo potencialmente los tejidos vegetales. Es uno de los mucorales más frecuentes y tiene una distribución amplia en todo el planeta. Su temperatura de crecimiento fluctúa de los 10 ° C hasta los 33 ° C, con una temperatura óptima de 25 ° C. Sus principales características son: crecimiento rápido, micelio aéreo cenocítico, esporangióforos que presentan en sus puntas esporangios esféricos donde se alojan las esporangiosporas, las cuales presentan diferentes formas: globosas, elipsoidales y angulares con superficies lisas o estrías distintivas (Schipper, 1984; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006).

En la etapa de postcosecha los hongos penetran los frutos dañados y generan la pudrición (González-Aguilar *et al.*, 2005), *R. stolonifer* aprovecha las heridas, magulladuras o aberturas naturales que presentan los tejidos vegetales vivos para infectar, después las hifas secretan enzimas pectinolíticas que degradan las sustancias pécticas de la lámina media de las células, ocasionando la pérdida de cohesión entre las células, dado que se rodean de una sustancia líquida y al momento de aplicar cierta presión pueden moverse, esto provoca la denominada “pudrición blanda” (Agrios, 2001).

Entre los productos hortofrutícolas que ataca este fitopatógeno se encuentran: el tomate, jitomate, camote, durazno, melón, fresa y papaya; adicionalmente afecta: cacahuete, gladiolo, tulipán, todas las cucurbitáceas, betabel, brócoli, col china, coliflor, zanahoria, sandía, frijón, chícharo, cebolla, berenjena y chile piquín (Herrera y Ulloa, 1998; Agrios, 2001; Korsten y Wehner, 2003).

### **2.3. Estrategias de control de las pudriciones postcosecha**

Durante muchos años se han empleado compuestos químicos sintéticos para controlar las pudriciones postcosecha, entre los principales fungicidas sintéticos se encuentran el dicloran, iprodione, fludioxonil y tebuconazole (Adaskaveg *et al.*, 2002).

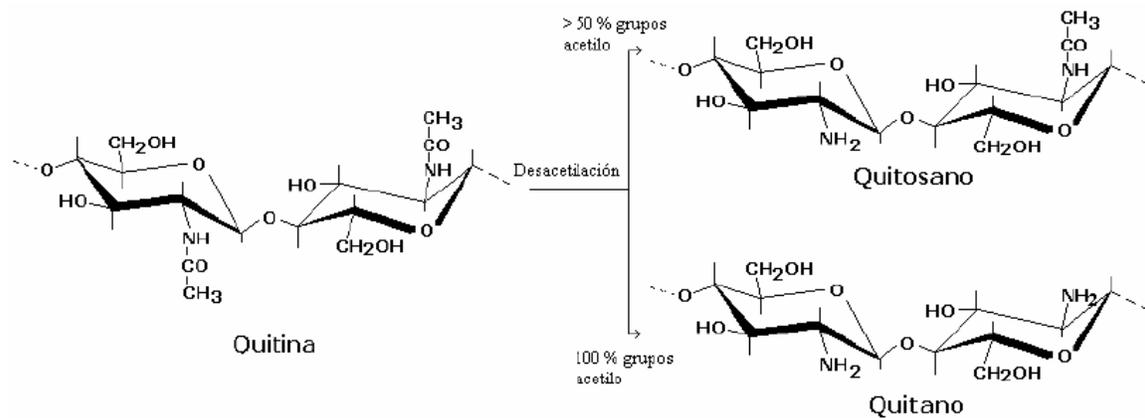
En estudios *in situ* realizados en frutos de durazno (*Prunus persica* Batsch), el dicloran redujo la pudrición del 87 al 100% (Northover y Zhou, 2002). El iprodione provocó una reducción del 59% en la pudrición del jitomate (Abdel-Mallek *et al.*, 1995); no obstante, en 1996 fue cancelada la producción de este compuesto debido a su poca efectividad; por lo que se han desarrollado otros fungicidas como el fludioxonil y tebuconazole (Adaskaveg *et*

*al.*, 2002). Algunos resultados demostraron que el fludioxonil redujo en un 90, 95.2 y 75% la incidencia de *R. stolonifer* en frutos de durazno, nectarina (*Prunus persica* L. var. nectarina) y ciruela (*Spondias purpurea* L.), respectivamente y el tebuconazole controló la pudrición en estos frutos en un 81, 69 y 79.2% (Förster *et al.*, 2007). Sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado cepas resistentes y además representan un riesgo potencial para la seguridad ambiental y la salud humana (Tripahi y Dubey, 2004), por lo que se han valorado otras opciones, podemos mencionar el empleo de atmósferas controladas y modificadas, radiaciones gamma ( $\gamma$ ) y luz ultravioleta (UV) (Bustos y Luna, 1996; Brecha *et al.*, 2003; Lydakis y Aked, 2003).

Debido a lo anterior, se ha incursionado en la búsqueda de alternativas naturales para controlar las pudriciones ocasionadas por *R. stolonifer* estas prácticas han cobrado importancia debido a los efectos nocivos que han causado los métodos tradicionales en el control de las enfermedades postcosecha. Entre las más importantes se encuentran el uso del quitosano y de algunos aceites esenciales. (Velázquez-Del Valle *et al.*, 2008).

#### **2.4. Quitosano**

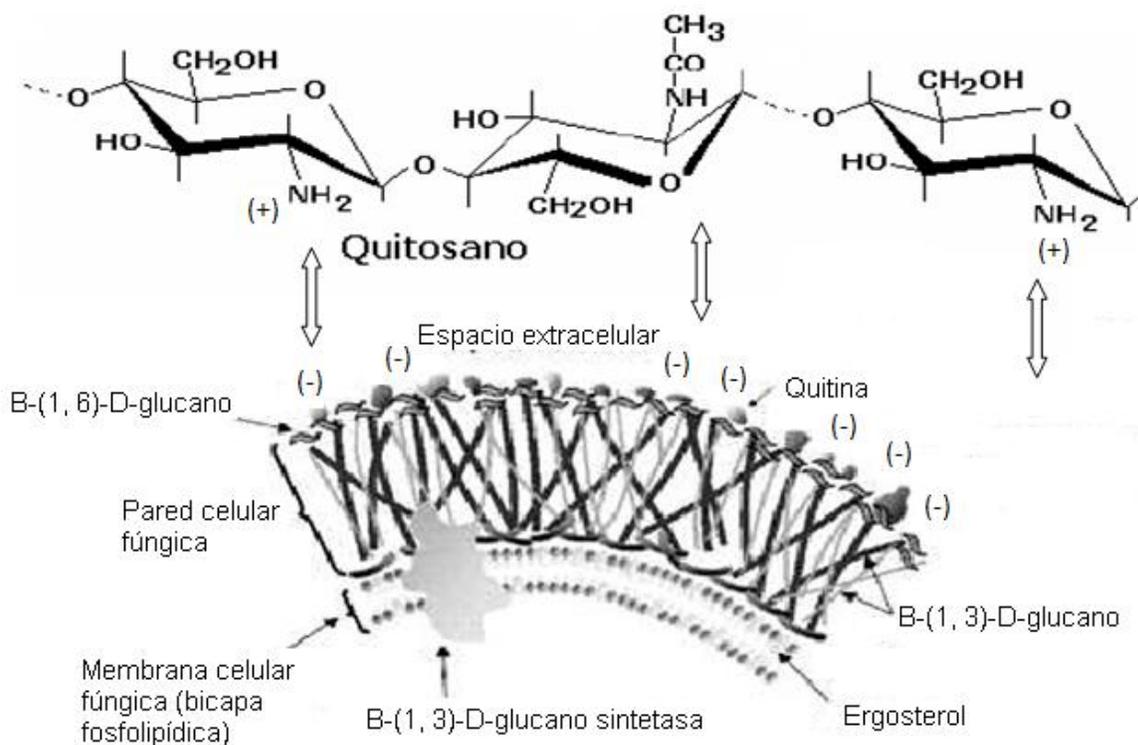
El quitosano es un compuesto derivado de la quitina constituido por unidades de  $\beta$ -(1,4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucosa y  $\beta$ -(1,4)-amino-2-deoxi-D-glucosa (Figura 1). Este polímero biodegradable y no tóxico para los humanos presenta múltiples cargas positivas que le confieren valiosas propiedades funcionales, entre las que destaca su actividad antimicrobiana (Bautista-Baños *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano (Lárez, 2006).

Se propone que el modo de acción del quitosano, se debe a las cargas positivas del grupo  $\text{NH}_3^+$ , que permiten la interacción con las cargas negativas de las membranas celulares (Figura 2) alterando su funcionalidad y afectando el crecimiento de los microorganismos (Rabea *et al.*, 2003; Kim y Rajapakse, 2005); además se ha reportado que el quitosano presenta un efecto antifúngico asociado al peso molecular y a su grado de desacetilación (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). Otras investigaciones han demostrado que la aplicación de películas de quitosano en productos frutícolas, tiene el potencial de inhibir su descomposición y prolongar la vida útil de almacenamiento (Han *et al.*, 2004). Trabajos donde se han realizado observaciones microscópicas indican que el quitosano tiene un efecto directo sobre la morfología de los microorganismos tratados ((El Ghaouth, 1992b; García, 2008; Robles, 2009), lo cuál refleja su potencial fungistático o fungicida, en otros estudios sugieren que el quitosano induce una serie de reacciones de defensa relacionada con la actividad enzimática y se ha demostrado que aumenta la producción de glucanohidrolasas, compuestos fenólicos y la síntesis de fitoalexinas específicas con

actividad antifúngica, y también reduce las enzimas de maceración como poligalacturonasas, pectina metil esterasa, etc. Además, se menciona que induce a las barreras estructurales, un ejemplo de ello es, la inducción de la síntesis de la lignina. Para algunos productos hortícolas y ornamentales, ya que aumentó la producción de la cosecha y debido a su capacidad para formar una capa semipermeable, el quitosano extiende la vida útil de las frutas y los vegetales tratados, reduciendo al mínimo la tasa de respiración y la pérdida de agua. (Bautista-Baños *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Diagrama de la interacción de quitosano-membrana celular fúngica, tomada y modificada de Kartsonis (2003).

Su actividad inhibidora parece aumentar con el nivel de desacetilación. Además de provocar fugas de los aminoácidos y las proteínas en *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*

también causó los cambios morfológicos anteriormente mencionados. Un estudio ultraestructural mostró que el quitosano ocasiono profunda erosión y aumento del espesor de la pared celular. A pesar de que el tratamiento con quitosano no afectó la distribución de quitina en la pared de *R. stolonifer*, estimuló las actividades de la quitina deacetilasa, una enzima implicada en la biosíntesis de quitosano. Esto puede alterar el equilibrio entre el volumen de la biosíntesis de quitina (El Ghaouth, 1992b). Por otro lado García (2008) observó que en presencia de quitosano había deformaciones de las hifas de *R. stolonifer* y una inhibición del crecimiento micelial además de un incremento del pH medio de cultivo.

## **2.5. Oligoquitosano**

Por su tamaño y naturaleza química, el quitosano es un compuesto que presenta poca solubilidad en agua, característica que limita la utilización de este polímero. Por lo anterior, se realizan investigaciones para encontrar derivados de este compuesto que presenten una mayor solubilidad en el agua (Bhatt *et al.*, 2009). El oligoquitosano es un compuesto obtenido de la hidrólisis del quitosano que tiene un peso molecular muy bajo y es soluble en agua. Trabajos han demostrado que el efecto del quitosano (350 kDa) y oligoquitosano (6 kDa) sobre hongos fitopatógenos inhiben la germinación de las esporas y el crecimiento micelial, sin embargo; el oligoquitosano mostró mejores efectos sobre la patogenicidad *in vitro* de los hongos fitopatógenos probados (Meng *et al.*, 2010); en otros trabajos se demostró que el oligoquitosano inhibió significativamente el crecimiento micelial de *R. stolonifer* (Robles, 2009), estos y otros resultados sugieren que el quitosano y el

oligoquitosano provocan mecanismos diferentes para controlar la enfermedad e inhibir la patogenicidad.

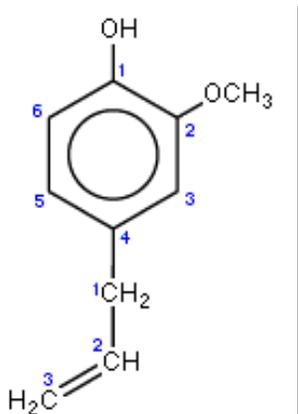
## **2.6. Aceite esencial de clavo**

Los Aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de plantas aromáticas una definición dice que son una parte del metabolismo de un vegetal, están compuestos generalmente por terpenos que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos son volátiles, que generan en conjunto el olor de dicho vegetal. Dentro de las propiedades fisicoquímicas más destacables de los aceites esenciales se encuentran la volatilidad, inestabilidad ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de agentes oxidantes y reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición, etc. (Bandoni, 2000), por esto se puede mencionar que sufren degradación por intemperización.

El árbol del clavo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perr.) es perenne y puede alcanzar entre 12 y 15 m (Weier *et al.*, 1983). En los botones florales de este árbol hay una cantidad de 15-20% de aceite esencial, el cual está compuesto principalmente de un fenilpropanoide que es el eugenol (Figura 3), (Kubeczka y Formacek, 2002).

Se ha demostrado la actividad antifúngica del aceite esencial de clavo sobre hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Rhizoctonia* (Beg y Ahmad, 2002); otros trabajos realizados sobre el efecto del aceite esencial de clavo mostraron una inhibición total del crecimiento micelial a la cantidad de

300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Alvarado, 2009). Por lo anterior, se considera que el aceite de clavo tiene potencial para sustituir a los fungicidas químicos en productos hortofrutícolas.

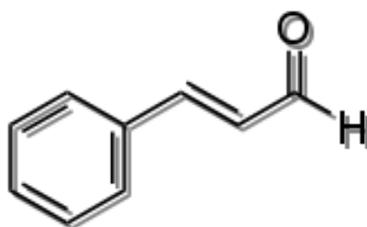


**Figura 3.** Molécula de Eugenol, componente principal del aceite esencial de clavo

## 2.7. Aceite esencial de canela

El árbol de la canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) es un árbol de hojas perennes, que puede alcanzar los 10 m. Su corteza se aprovecha como un aditivo alimentario y saborizante (Weier, *et al.*, 1983). La FDA (The Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de América lo cataloga como “seguro” y se menciona que el compuesto puede ser utilizado como plaguicida, sin presentar efectos adversos para la salud y con un olor agradable (Tzortakis, 2009), el cual es debido al aceite esencial aromático constituido principalmente por el aldehído cinámico (Marcano y Hasegawa, 2002).

Se ha demostrado que el aceite esencial de canela presenta una elevada actividad antifúngica (García *et al.*, 2006) y respecto a los trabajos realizados sobre *R. stolonifer* con el aceite esencial de canela se demostró que a una concentración de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  se inhibe totalmente el crecimiento micelial (Alvarado, 2009), por lo que existen investigadores que lo proponen como alternativa para preservar frutos sustituyendo a los fungicidas químicos sintéticos (Tzortzakakis, 2009).



**Figura 4.** Molécula de aldehído cinámico uno de los principales componentes del aceite esencial de canela.

## 2.8. Características celulares y fisiológicas de *R. stolonifer*

### 2.8.1. Morfología

El género de *Rhizopus* parece ser bastante grande por ello para su estudio se divide en tres grupos: el grupo de *Rhizopus stolonifer*, grupo de *R. oryzae* y el grupo de *R. microsporus*; según datos de las tablas clasificación de Schipper (1984), aquí se menciona que entre las características que resaltan de *R. stolonifer* están la presencia de esporangióforos erectos, normalmente de mas 1 mm de largo cuyos rizoides tienen ramificaciones secundarias cuyos

esporangios son de hasta 275  $\mu\text{m}$ . Algunos datos morfológicos importantes se representan en el Cuadro 1.

<b>Cuadro 1.</b> Características morfológicas de <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> (tomado de Liou <i>et al.</i> , 2006)	
<b>Morfología de esporangióforos</b>	Erecto
<b>Longitud de los esporangióforos</b>	Arriba de 3181 $\mu\text{m}$
<b>Esporangios</b>	120-280 $\mu\text{m}$
<b>Columella</b>	100-170 x 95-150 $\mu\text{m}$
<b>Esporangiosporas</b>	6-11.5 x 5.5-10 $\mu\text{m}$
<b>Máxima temperatura de crecimiento</b>	33 ° C
<b>Espécimen examinado</b>	BCRC 32002; BCRC 32003

*Rhizopus stolonifer* es un hongo filamentoso, que presenta un micelio que carece de septos visibles y produce esporangióforos largos, aéreos sin ramificar, de color café oscuro los cuales nacen de un nudo de rizoides bien desarrollados; sus esporangios, son esféricos, negros y brillantes, con columela la cual contiene en su interior a las esporangiosporas también de color negro las cuales pueden tener diferentes formas. Sus colonias son de crecimiento rápido (cubren toda la superficie de una caja Petri en tres días a 25 °C) de aspecto consistente, con denso micelio aéreo, algodonosas, al principio blancas, después gris oscuras (gris o café). Se reconoce fácilmente por sus estolones hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos (Candelas-Cadillo *et al.*, 1994; Agrios 2001).

### 2.8.2. Pared celular

La pared celular mantiene la forma y la integridad de la célula frente al estrés ambiental, brinda protección principalmente de tipo mecánica tal como la regulación del flujo de agua, también permite una permeabilidad selectiva a solutos menores de 600 Da, además permite interactuar a las células con su entorno y media la adhesión a un sustrato apropiado (Bowman y Free, 2006).

La pared celular fúngica está compuesta de glicoproteínas y polisacáridos, principalmente de glucano y quitina los cuales son sintetizados a partir de sustratos nucleótidos de carbohidratos formados por la enzima pirofosforilasa. La síntesis de glucano implica la asociación de la membrana plasmática a la glucano sintetasa para el montaje de enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 en ramas de glucano. La quitina (polímero de N-acetilglucosamina) es un importante componente estructural de la pared celular fúngica y está involucrado en el proceso de la levadura y en la transición de levadura a formas filamentosas. La quitina sintetasa cataliza la transferencia de la N-acetilglucosamina de UDP-N-acetilglucosamina a un polímero de crecimiento de quitina dentro de la pared celular del hongo. Las manoproteínas sobre todo de forma unicelular son pre-ensamblados en el aparato de Golgi y se entregan a la pared celular a través de vesículas del centro de la fuente de la vesícula. Las vesículas contienen diferentes componentes de la pared celular, enzimas sintéticas, enzimas líticas de la pared, activadores enzimáticos y ciertos componentes de la pared preformados que son transportados a la punta donde se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido, los cuales junto con los sustratos transportados en el citosol, facilitan la síntesis de la pared celular (Kavanagh, 2011). Otro componente

estructural de la pared celular de los hongos son los pigmentos, los cuales proporcionan a la pared mayor resistencia a la lisis enzimática, incrementan la fuerza mecánica, la protege de radiaciones y ayuda a resistir el ataque por el sistema inmunitario humano en el caso de hongos parásitos de vertebrados. La composición de la pared está sujeta a cambios y puede variar de una célula a otra dependiendo de las condiciones y etapa de crecimiento. También cambia de acuerdo con la función que presenta la hifa en un tiempo y espacio particular, por lo que el desarrollo de las hifas está definido en función de la estructura de la pared celular (Bowman y Free, 2006). Dado el papel vital de la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse una diana muy importante de los hongos para la acción de antifúngicos (Heitman, 2005).

### **2.8.3. Membrana plasmática**

La membrana plasmática de los organismos eucariotas es la parte externa de la célula que envuelve al citoplasma, es la que permite el intercambio entre la célula y el medio que la rodea. La célula no puede funcionar apropiadamente y permanecer viva a menos que su membrana regule el intercambio de compuestos. Las membranas biológicas están compuestas por una bicapa lipídica de aproximadamente 7.5 nm de grosor donde la parte hidrofóbica de cada una de las capas queda enfrentada y la zona hidrofílica se orienta hacia el entorno acuoso. Las proteínas de la membrana pueden ser integrales o periféricas. Las primeras se insertan en la bicapa lipídica y son parte integral de ésta, las periféricas se unen a los extremos polares de los fosfolípidos ó a las proteínas integrantes de la membrana. Los

carbohidratos a su vez, se adhieren a los lípidos y a las proteínas de la membrana en la superficie extracelular (Tortora *et al.*; 2007), el contenido de lípidos de la membrana es complejo y altamente regulado, porque éstos juegan una función importante en la actividad de proteínas de la membrana (Van Der Rest *et al.*, 1995).

La membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, puede contener de  $10^5$  a  $10^6$  moléculas transportadoras, de las cuales el 50% son proteínas. La enzima ATPasa es la principal proteína de membrana y está involucrada en varios procesos, principalmente en el transporte primario, en el cual interviene la hidrólisis del ATP (Van Der Rest *et al.*, 1995).

Los sistemas de transporte de tipo primario derivan de la energía del ATP, la hidrólisis de ésta molécula es llevado cabo por la ATPasa, ubicada en la membrana plasmática de hongos. El resultado de la actividad de esta enzima es la generación del gradiente electroquímico de protones (Van Der Rest *et al.*, 1995). Las ATPasas intercambian cationes ( $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) por protones ( $\text{H}^+$ ) a través de la membrana. Los sistemas intercambiadores desempeñan un papel fundamental en la regulación del pH y en la concentración de cationes monovalentes en el interior celular (Ramírez y Peña, 2000).

Una técnica para determinar la integridad de la membrana plasmática es la reportada por (Paasch *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007). La cuál utiliza Ioduro de propidio (IP), el cuál es un compuesto colorante que se une al ADN, intercalándose entre las bases, con una preferencia por 4-5 pares de bases, una vez que el colorante se une a los ácidos nucleicos, la fluorescencia se incrementa 20 a 30 veces y se excita con luz de una longitud de onda de 488 nm, emite fluorescencia de color rojo y se detecta con filtro de 562-588 nm. El IP es

impermeable a través de la membrana y generalmente es excluido de células viables por ello se utiliza comúnmente para la identificación de las células muertas en una población.

#### **2.8.4. Respiración**

La respiración es el proceso celular de obtención de energía mediante la oxidación de sustancias orgánicas, por tanto, la síntesis de nuevos materiales y el desarrollo celular requieren de la energía que provee la respiración. La respiración aeróbica consume oxígeno y genera dióxido de carbono y agua como productos finales (Weier *et al.*, 1983), entre los organismos con respiración aerobia encontramos a los hongos; que son organismos aerobios estrictos donde el fenómeno de la respiración se realiza en las mitocondrias, organelos celulares de forma variable con diámetro de 0.5 – 1.0  $\mu\text{m}$  y hasta 7  $\mu\text{m}$  de longitud. Su número depende de las necesidades energéticas de la célula. Las mitocondrias tienen dos membranas que son diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. En la membrana interna se encuentra la cadena de transporte de electrones (Scheffler 2001). La principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa que es dependiente de la cadena transportadora de electrones (Griffin, 1994).

Para el caso de *R.stolonifer* se ha experimentado el consumo de oxígeno de esporas normales a las 6 y a las 12 h de crecimiento y demostró ser similar, lo que indicó que el consumo de oxígeno es constante una vez que se inicia la germinación, de la misma forma se observó esta tendencia en células tratadas con quitosano y oligoquitosano pero a

diferencia de las esporas normales el consumo de oxígeno por parte de las células tratadas con los quitosanos fue más rápido, en las células tratadas con oligoquitosano el oxígeno se agotó más rápido que las cultivadas en quitosano (Robles, 2009).

También se mencionan trabajos hechos con los hongos *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus oryzae*, donde se observó que la esporulación fue suprimida por el contacto gaseoso con aceites de cidra, la lavanda y el tomillo, lo cuál parece estar relacionado con la inhibición de la respiración (Inouye *et al.*, 2001).

Por ello teniendo en cuenta las afectaciones que podrían tener los compuestos a utilizar en el presente trabajo sobre la funcionalidad de diversos aspectos fisiológicos y morfológicos en *R. stolonifer* se plantea profundizar en dichos conocimientos, teniendo en cuenta estos antecedentes.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades postcosecha ocasionan pérdidas en los alimentos que pueden ser superiores al 50% en países subdesarrollados, para su control se han utilizado comúnmente fungicidas químicos, sin embargo; estos han ocasionado contaminación y afectaciones al ambiente y al humano así como la creación de cepas microbianas resistentes, por esta razón se buscan alternativas naturales mas compatibles con el ambiente y la salud humana. Entre las alternativas que presentan mayor potencial de aplicación se encuentran el quitosano, el oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela. Se conoce el efecto antifúngico que poseen estos compuestos naturales, sin embargo; la manera con que actúan contra hongos causantes de pudriciones postcosecha como *Rhizopus stolonifer* no está del todo claro, se sabe que los quitosanos ocasionan cambios morfológicos y una reducción en el crecimiento fúngico pero se desconoce el modo de acción por el cual ocasionan esto, tampoco se sabe si los aceites esenciales de clavo y canela, en particular; poseen este mismo efecto sobre este hongo, o el efecto que tienen sobre otros aspectos fisiológicos del mismo, por ello se analizara de forma comparativa los cambios morfológicos y fisiológicos ocasionados por los compuestos antes mencionados. El conocimiento básico que se obtendrá en este trabajo sobre la interacción de estos compuestos con el hongo será útil para obtener bases que permitan desarrollar compuestos antifúngicos eficaces que contribuyan a la conservación de productos hortofrutícolas sin afectar al ambiente ni a la salud humana.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar los cambios morfológicos y fisiológicos en *Rhizopus stolonifer* por efecto del quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de canela y clavo.

### **4.2. Objetivos particulares**

1. Evaluar el desarrollo y la morfología de las hifas de *R. stolonifer* expuestas a diferentes concentraciones de quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales de clavo y canela.
2. Evaluar los cambios en el pH del medio de cultivo provocados por *R. stolonifer* debido a la presencia de quitosano, oligoquitosano y de los aceites esenciales de clavo y canela.
3. Determinar el efecto del quitosano, oligoquitosano y de los aceites esenciales sobre la salida de proteínas celulares de *R. stolonifer*.
4. Evaluar los cambios de forma indirecta en la integridad de la membrana plasmática por la presencia de las diferentes concentraciones de los compuestos probados.
5. Determinar el efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales sobre la ultraestructura de las hifas de *R. stolonifer*
6. Cuantificar los cambios en el consumo de oxígeno por efecto de los tratamientos sobre las células de *R. stolonifer*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Interacciones Planta-Insecto del Centro de Desarrollo en Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional y en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

### **5.1. Material biológico**

Se utilizó cepa *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. R3 aislada de frutos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tipo “Saladette” infectados naturalmente y cosechados en el municipio de Yautepec, Morelos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006).

### **5.2. Preparación del inóculo**

La cepa R3 de *R. stolonifer* se cultivó en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA) a 25 ° C ± 4 ° C hasta que cubrió la superficie de la caja Petri (100 x 15 mm). Posteriormente, se aplicó agua destilada estéril y con una varilla de vidrio se raspó el micelio para obtener las esporangiosporas, mismas que se recuperaron en un vaso de precipitado. Las esporas se cuantificaron en una cámara de Neubauer y se diluyeron hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup> como lo utilizó Alvarado (2009), para su uso en los bioensayos.

Se utilizó el medio mínimo líquido (MM) para evaluar todas las variables a analizar como respuesta de *R. stolonifer* por el efecto de los tratamientos de quitosano, oligoquitosano y de los aceites esenciales. La descripción del medio MM (Guerra-Sánchez *et al.*, 2009) se

presenta en el anexo 1. Se colocó 50 mL de MM en matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL y se esterilizaron a 15 lb por 20 minutos posteriormente se les adicionaron los diferentes tratamientos a las diferentes concentraciones probadas y por último se inocularon con *R. stolonifer*. Los matraces se colocaron en una incubadora orbital INO650V-7 a 25°C y 140 rpm.

### **5.3. Preparación de la solución de quitosano y oligoquitosano**

Para preparar la solución concentrada de 20 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, con un grado de desacetilación del 75 – 85 %) se pesaron 2 g del polímero en una balanza analítica y se disolvieron en 50 mL de agua destilada estéril después se añadieron 2 mL de ácido acético, se homogenizó por agitación constante durante 24 h. Posteriormente, se ajustó el pH a 5.6 adicionando NaOH (1N). La solución se filtró con una gasa y se aforó hasta 100 mL con agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. A partir de esta solución de quitosano (20 mg mL<sup>-1</sup>) se prepararon las soluciones 0.5, 1.0 y 2.0 mg mL<sup>-1</sup> (Guerra-Sánchez *et al.*, 2009).

El oligoquitosano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sólido, se disolvió directamente en el MM para obtener las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg mL<sup>-1</sup> en 50 mL de MM (concentraciones utilizadas por Robles, 2009).

### **5.4. Preparación de la solución de aceites esenciales**

Los aceites esenciales de clavo y canela grado reactivo (MEYER), se pesaron 100 mg y se mezclaron con 20 mg de Tween 80 (como dispersante), se aforaron a 20 mL con agua

destilada estéril de forma independiente. A partir de estas soluciones concentradas (5 mg mL<sup>-1</sup>) se prepararon las concentraciones finales de 0.05, 0.1 y 0.15 mg mL<sup>-1</sup> diluyéndolas en 50 mL de MM.

### **5.5. Evaluación de los cambios morfológicos de hifas de *Rhizopus stolonifer***

Los cambios morfológicos en *R. stolonifer* ocasionados por los tratamientos se evaluaron de acuerdo a lo reportado previamente por García (2008).

Los 13 matraces previamente inoculados con *R. stolonifer* (punto 5.2.) se colocaron en una incubadora a 25°C. Después de 24 h se tomaron tres muestras del micelio de cada tratamiento y cada concentración, se colocaron sobre un portaobjetos, se aplicó azul de metileno y se observaron a 4, 10 y 40X en un microscopio óptico (marca Nikon Alphaphot-2 YS2). Se realizaron tres observaciones de cada tratamiento. Las variables de respuesta fueron: forma, grosor y ramificaciones (cualitativas).

### **5.6. Evaluación de los cambios en el pH del medio durante el crecimiento de *Rhizopus stolonifer***

Matraces con medio MM y esterilizados se les aplicaron los tratamientos como se indica en el cuadro 2 posteriormente se inocularon con *R. stolonifer*, se colocaron sin agitación a una temperatura de 25 ° C ± 4 ° C. Después de 24 h, se colectó el medio de cultivo, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min para eliminar las esporas y se determinó el pH del medio de cultivo con un potenciómetro (Accumet pH meter 910®). Se utilizaron 3

repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Se obtuvo el promedio y el error estándar de cada tratamiento. La variable de respuesta fue el valor de pH, para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una sola vía, se usó el programa Sigma Stat 3.5.

**Cuadro 2.** Evaluación de los cambios de pH de los medios de cultivo durante el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* en MM y adicionados con diferentes concentraciones de compuestos naturales

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	COMPUESTO	mg mL <sup>-1</sup>
T0	3	Medio Mínimo	-
T1	3	<i>R. stolonifer</i>	-
T2	3	<i>R. stolonifer</i> + quitosano	(0.5, 1.0, 2.0)
T3	3	<i>R. stolonifer</i> + oligoquitosano	(0.5, 1.0, 2.0)
T4	3	<i>R. stolonifer</i> + aceite esencial de clavo	(0.05, 0.1, 0.15)
T5	3	<i>R. stolonifer</i> + aceite esencial de canela	(0.05, 0.1, 0.15)

Nota: A cada matraz se le adicionó una solución de  $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>, con excepción el tratamiento testigo (T0).

### 5.7 Cuantificación de la salida de proteínas celulares

Los experimentos posteriores se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Microbiana del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Matraces con MM esterilizados se les aplicaron los tratamientos como se indica en el Cuadro 2 y posteriormente se inocularon con *R. stolonifer*. Los matraces se incubaron a 25 ° C en agitación constante (140 rpm) durante 24 h, posteriormente, en condiciones de esterilidad, se vació el contenido del matraz (biomasa y

medio de cultivo) en tubos y se centrifugaron a 10 000 rpm a 4 °C durante 5 min, el sobrenadante se recuperó en tubos de plástico tipo Falcon y se almacenaron a -70 °C hasta su posterior uso, para este experimento se establecieron seis repeticiones por tratamiento.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) (Anexo 2) Para esta prueba se utilizó albúmina de suero de bovino (BSA) como proteína estándar con la que se construyó una curva tipo con el stock de BSA (0.5 mg mL<sup>-1</sup>). Para elaborar la curva tipo, diferentes volúmenes del stock de BSA y los reactivos A y B del kit comercial (Kit-comercial 500-0114 BioRad) (Anexo 2), fueron mezclados en un Vortex y se incubaron a 25 ± 2° C durante 10 min, posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 655 nm, el equipo se ajustó a 0 con el tubo 1 (blanco de reactivos). La curva tipo se realizó por duplicado. Posteriormente, se interpolaron las lecturas de absorbancia obtenidas para cada sobrenadante en la curva tipo y se convirtieron las absorbancias en µg µL<sup>-1</sup>.

### **5.8. Determinación de la integridad de la membrana plasmática de hifas de *Rhizopus stolonifer***

Matraces con MM previamente esterilizados se les aplicaron los tratamientos como se marca en el Cuadro 2, y posteriormente se inocularon con *R. stolonifer*, los matraces se incubaron a 25 ° C en agitación constante (140 rpm) durante 12 h, las muestras fueron tratadas de acuerdo a lo descrito en (Molecular Probes, 1999). En condiciones de esterilidad se vació el contenido del matraz (esporas germinadas y medio de cultivo) en

tubos y se centrifugo (10 000 rpm durante 10 min), se elimino el sobrenadante y las esporas germinadas se lavaron con un regulador de fosfatos (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.0) para eliminar residuos del medio de cultivo y posteriormente se les adicionó como colorante ioduro de propidio a una concentración de 10 µg mL<sup>-1</sup>; se incubaron durante cinco minutos a 25 °C para después lavarlas con el regulador de fosfatos tres veces para eliminar restos del colorante y se dejaron finalmente en el regulador de fosfatos.

En un microscopio de fluorescencia (40 X). Se tomaron alícuotas de 5 µl y se observaron las esporas, se cuantificó el número de esporas y la cantidad de esporas teñidas de tres campos aleatorios. La variable de respuesta fue el porcentaje de integridad de membrana (% IM) calculado a partir de las esporas teñidas con la formula que se muestra a continuación:

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{No. esporas totales} - \text{No. esporas teñidas} \times 100}{\text{No. esporas totales}}$$

### **5.9. Efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales sobre la ultraestructura de las hifas de *Rhizopus stolonifer***

A matraces con MM esterilizados, se aplicaron las concentraciones más altas de los diferentes tratamientos que se muestran en el cuadro 2 y posteriormente se inocularon con 1 mL de una suspensión de esporas de 3 X 10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup> de *R.stolonifer*. Los cultivos se incubaron a 25°C en agitación constante (140 rpm). Después de 12 h el contenido de cada tratamiento se colocó por separado en tubos y se centrifugó (10 000 rpm durante 10 minutos); la biomasa de cada tratamiento se recuperó en tubos eppendorf con capacidad de

1.5 mL, las muestras de micelio se trataron de acuerdo a lo descrito por Bozzola *et al.*, (1999), para ello se lavaron las muestras tres veces con un regulador de fosfatos y se les aplicó glutaraldehído disuelto al 6 % en un regulador de fosfatos. Las muestras se incubaron a 4° C por 24 h, posteriormente, se lavaron tres veces con una “solución de lavado” constituido por el regulador de fosfatos, sacarosa (5 %) y una gota de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) al 1 %. Las muestras se colocaron durante 2 h en una solución de tetraóxido de osmio al 1% y a 4 °C. Después se deshidrataron gradualmente con etanol al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 %, haciendo los cambios cada 10 min, seguido de tres deshidrataciones con alcohol absoluto durante 10 minutos. Al término, las muestras, se colocaron en una mezcla de alcohol absoluto: óxido de propileno durante 20 minutos en diferente relación (2:1, 1:1 y 1:2). Posteriormente, se colocaron en una mezcla de óxido de propileno: resina (Epon) (relación 2:1, 1:1 y 1:2) por 1 h en cada mezcla y después se dejaron polimerizar en la resina a 60 °C por 24 h.

Una vez que las muestras se deshidrataron y polimerizaron, se realizaron cortes de 70 nm en micrótopo, y se colocaron en una rejilla de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo acuoso y acetato de uranilo etanólico durante 15 min por separado, se enjuagaron de 20-30 veces con agua destilada estéril en cada cambio; finalmente se colocaron en una solución de plomo al 1% en agua con alcohol al 1% durante 20 minutos después se enjuagaron con agua destilada estéril. Las muestras se secaron a temperatura ambiente y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión TEM JEOL-1010 a 60 kV. Se midieron seis células tomadas al azar de cada tratamiento, cada célula se dividió en cuatro cuadrantes (superior, inferior, derecho e izquierdo) y se midió el grosor de la pared en seis puntos de

cada cuadrante de cada célula, por medio de la imagen obtenida con el microscopio conectado a un ordenador, mediante un sistema de cámaras de transmisión electrónica, con el programa AMT. La variable de respuesta fue el grosor de la pared celular (nm). El análisis estadístico realizado consistió en un Kruskal-Wallis.

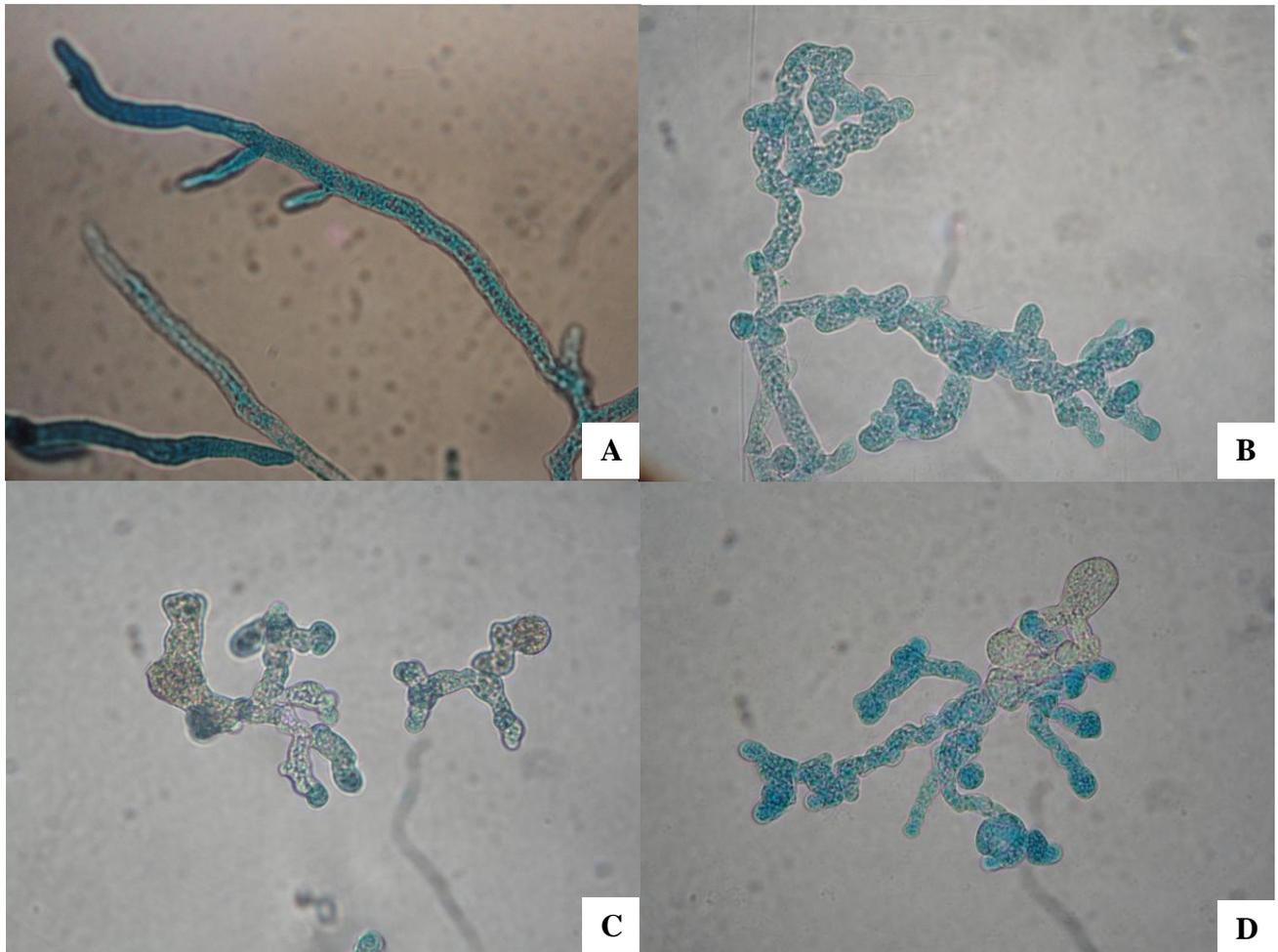
### **5.10. Evaluación de los cambios en el consumo de oxígeno**

Para determinar los cambios en el consumo de oxígeno se siguió la metodología utilizada por Robles (2009) para lo cual matraces con MM previamente esterilizados e inoculados de la forma que se indica en el cuadro 2 se incubaron a 25 ° C en agitación constante (140 rpm), después 6 h, el contenido de los matraces se colocó en tubos y se centrifugaron (10 000 rpm) durante 10 minutos a 4 ° C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se colocó en tubo eppendorf donde se lavó tres veces con agua destilada estéril, el peso del pellet se determinó por diferencia de peso, es decir; se pesó el tubo eppendorf antes y después de colocar el pellet. Finalmente al pellet se le agregó su mismo peso en buffer de respiración (20 mM HEPES-KOH pH 7.0, 5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 135 mM KCL y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se homogenizó en Vortex. De esta solución se tomaron 25 ml y se colocó en una cámara de respiración la cual se aforó a 1 mL de reacción con el regulador de fosfatos (20 mM HEPES-KOH pH 7.0, 5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 135 mM KCL y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se incubó a 25° C. El consumo de oxígeno se midió polarográficamente empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Oxímetro Equipar YSI, unido a un Biological Oxygen Monitor 5 300A), unido a un ordenador para graficar la cantidad de O<sub>2</sub> consumido/segundo. La variable de respuesta fue cantidad de O<sub>2</sub> consumido/minuto (nmol O<sub>2</sub>/min).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Cambios morfológicos

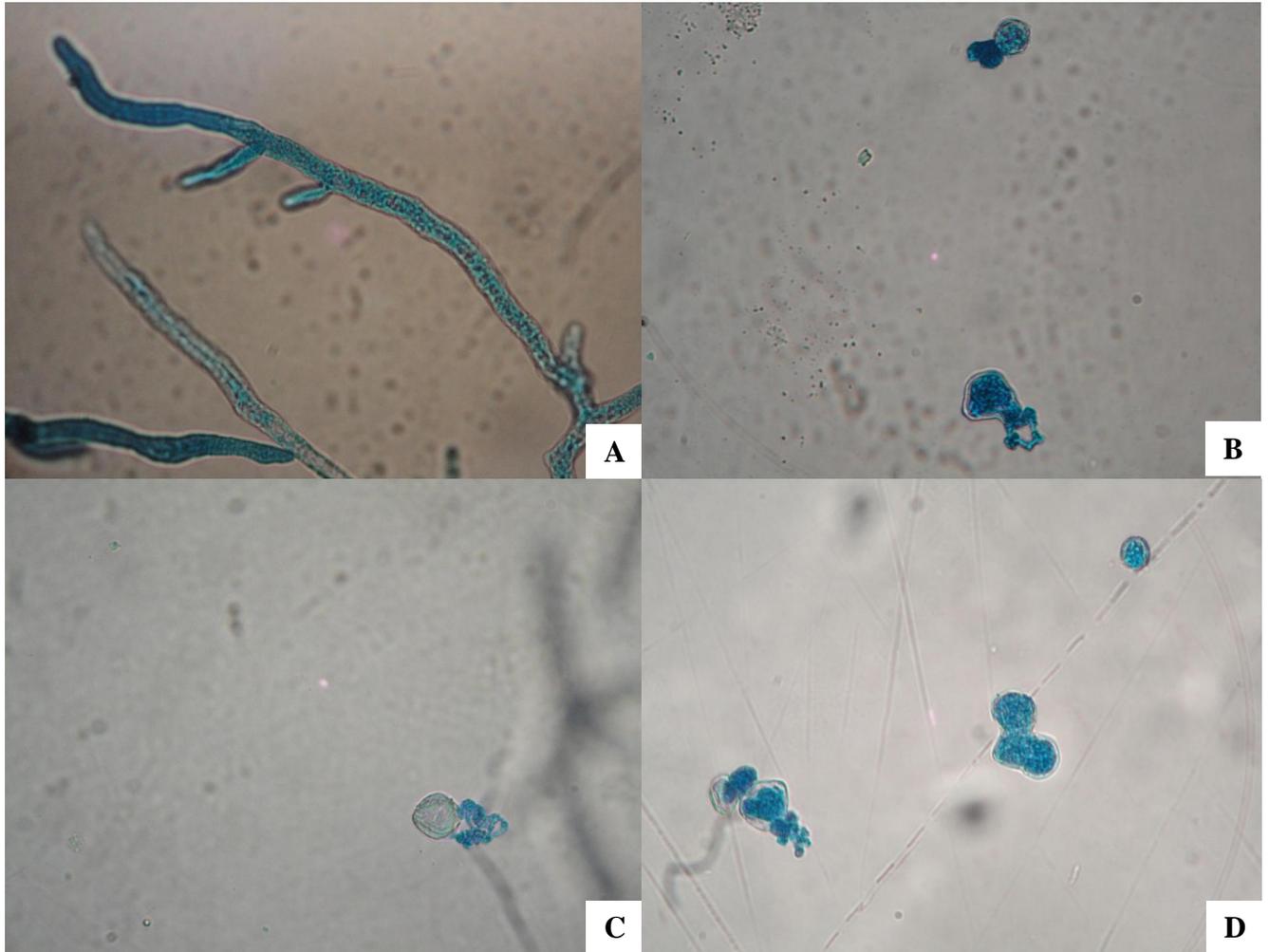
El quitosano en las tres concentraciones produjo cambios morfológicos en las esporas y/o hifas de *R. stolonifer* observándose pequeñas masas y menor desarrollo del micelio, además malformaciones como engrosamiento de las hifas y ramificaciones muy cortas (Figuras 5B, 5C, 5D), en cambio en el testigo se observó una pequeña masa miceliar laxa (Figura 5A). Estos resultados concuerdan con El Ghaouth *et al.* (1992b) quienes reportaron que el quitosano ocasiona modificaciones morfológicas en *R. stolonifer*, así como también García (2008) reportó modificaciones en la morfología de esporas de *R. stolonifer* al ser tratadas con quitosano en las mismas concentraciones de quitosano reportadas en este trabajo. Adicionalmente, estas observaciones concuerdan con lo reportado por Robles (2009) quien reportó malformaciones semejantes en células de *R. stolonifer* tratadas con quitosano u oligoquitosano ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), durante las primeras 3 y 6 h.



**Figura 5.** Microfotografías de hifas de *R. stolonifer* (40X) en MM (A) Testigo. (B) quitosano [0.5 mg mL<sup>-1</sup>]. (C) quitosano [1.0 mg mL<sup>-1</sup>]. (D) quitosano [2.0 mg mL<sup>-1</sup>].

Las esporas de *R. stolonifer* tratadas con las tres concentraciones de oligoquitosano se observó mayor inhibición en la germinación de las esporas y una inhibición total en el desarrollo de hifas y micelio (Figura 6B, 6C y 6D), al compararlas con el quitosano. Estos resultados, concuerdan con Meng *et al.* (2010) quienes reportaron que la germinación de las esporas y la elongación del tubo germinal de las esporas de *Alternaria kikuchiana* y *Physalospora piricola* fueron significativamente inhibidos por oligoquitosano y este afectó fue mayor en comparación del quitosano, como fue el caso en este trabajo.

Las esporas tratadas con oligoquitosano mostraron una afectación mas marcada, seguidas por las tratadas con quitosano, posteriormente las tratadas con aceite esencial de clavo; las tratadas con aceite de canela fueron las que presentaron las menores afectaciones.

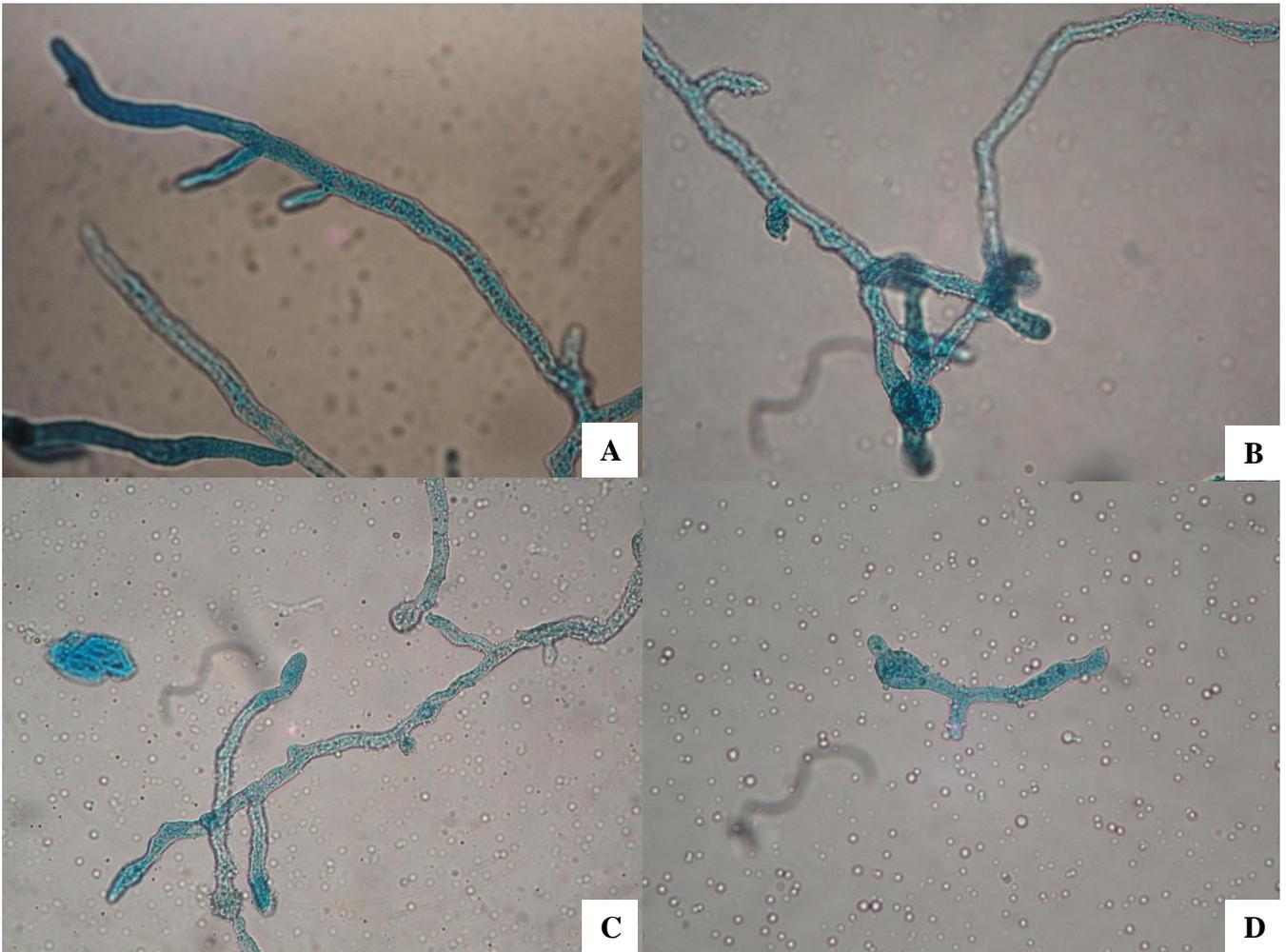


**Figura 6.** Microfotografías de hifas de *R. stolonifer* (40X) en MM. (A) Testigo. (B) oligoquitosano [0.5 mg mL<sup>-1</sup>]. (C) oligoquitosano [1.0 mg mL<sup>-1</sup>]. (D) oligoquitosano [2.0 mg mL<sup>-1</sup>].

Las esporas tratadas con aceite esencial de clavo a las tres concentraciones, se observó un menor desarrollo de las hifas ya que lograron germinar con algunos contornos irregulares (Figura 7B, 7C); en la concentración de 0.15 mg mL<sup>-1</sup> la inhibición del desarrollo de las hifas fue mas marcado en comparación con el testigo (7D y 7A).

Beg y Ahmad (2002) reportaron que el efecto fungicida del aceite esencial de clavo al 5% contra: *Alternaria alternata*, *Fusarium chlamydosporum*, *Helminthosporium oryzae* y *Rhizoctonia bataticola* fue de una lisis de los conidios del 20 al 40% e inhibición del crecimiento micelial a las 72 h de incubación. Sin embargo, a mayor concentración del aceite de clavo (10 a 20 %), los conidios se lisaron entre las 24 h de incubación.

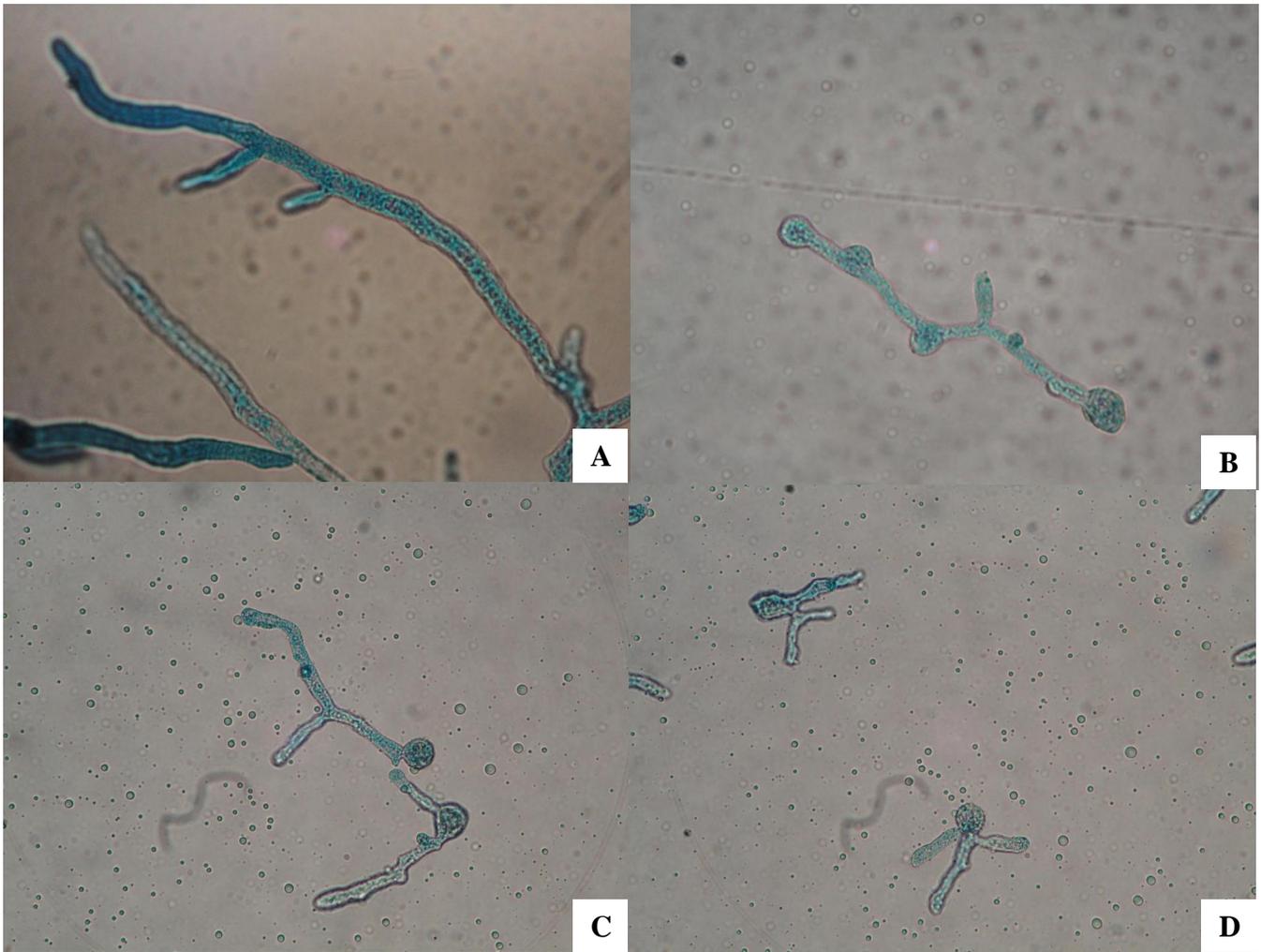
Algunos aceites esenciales con actividad antimicrobiana poseen modos de acción que incluyen desde una reducción del crecimiento de hifas, inducción de lisis, cambios en la composición de la célula, ruptura de la membrana plasmática, desorganización estructural de las mitocondrias e interferencia de las reacciones enzimáticas de la membrana mitocondrial (Tripathi y Dubey, 2004; Burt 2004), en el presente experimento se observó inhibición del crecimiento micelial ocasionado por el aceite esencial de clavo sobre *R. stolonifer*. Barrera-Necha *et al.* (2008), reportaron que de nueve aceites esenciales evaluados contra *Colletotrichum gloeosporioides*, el aceite de clavo estuvo entre los que poseen mejor inhibición en la germinación de los conidios y crecimiento micelial.



**Figura 7.** Microfotografía de las hifas de *R. stolonifer* (40X) en MM (A) Testigo. (B) aceite esencial de clavo [ $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ ]. (C) aceite esencial de clavo [ $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ]. (D) aceite esencial de clavo [ $0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ].

Las esporas en el aceite esencial de canela en las tres concentraciones se observó, como en los casos anteriores; un acortamiento en el desarrollo de las hifas, lográndose la germinación sin llegar al desarrollo de micelio (Figuras 8B, 8C, 8D).

El aceite esencial de canela fue efectivo en el control de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* que a partir de la dosis mínima de  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  presentó inhibición de los hongos (Senanayake *et al.*, 1978; García *et al.*, 2006); esta reportado que el compuesto fungitóxico más activo del aceite de canela es el aldehído cinámico, sin embargo se han reportado hasta 17 compuestos (Jham *et al.*, 2005).



**Figura 8.** Microfotografías de las hifas de *R. stolonifer* (40X) en MM (A) Testigo. (B) aceite esencial canela [0.05 mg mL<sup>-1</sup>]. (C) aceite esencial de canela [0.1 mg mL<sup>-1</sup>]. (D) aceite esencial de canela [0.15 mg mL<sup>-1</sup>].

## **6.2. Variaciones en el pH del medio durante el crecimiento de *R. stolonifer***

El pH del medio del cultivo mostró diferencias significativas por efecto de los tratamientos. En el Cuadro 3 se muestra que el MM sin inocular que fungió como testigo se mantuvo sin cambios en el pH (4.4), que es el pH que inicialmente tuvieron todos los tratamientos; mientras que el crecimiento de *R. stolonifer* en el MM disminuyó el pH del medio (3.5). Una disminución similar se observó cuando el hongo creció en presencia de los aceites esenciales de clavo (3.7 – 4.0) y canela (3.7). Sin embargo, el crecimiento de *R. stolonifer* en presencia de oligoquitosano evitó la acidificación adicional del medio de cultivo, manteniéndose el pH en valores promedio de 4.3, sin diferencias estadísticas al testigo (MM sin inocular). Finalmente, el crecimiento del hongo en presencia de quitosano provocó incrementos estadísticamente significativos en el pH del medio (5.3 y 5.4)

**Cuadro 3.** Modificación del pH del medio a las 24 h de cultivo por efecto del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* bajo tratamiento con diferentes concentraciones de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo y de canela.

<b>Tratamiento (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>pH</b>
<b>MM sin <i>R. stolonifer</i></b>	<b>4.4 ± 0.0 b</b>
<b>MM con <i>R. stolonifer</i></b>	<b>3.5 ± 0.05 d</b>
<b>Quitosano 0.5</b>	<b>5.3 ± 0.05 a</b>
<b>Quitosano 1.0</b>	<b>5.4 ± 0.01 a</b>
<b>Quitosano 2.0</b>	<b>5.4 ± 0.02 a</b>
<b>Oligoquitosano 0.5</b>	<b>4.3 ± 0.12 b</b>
<b>Oligoquitosano 1.0</b>	<b>4.3 ± 0.03 b</b>
<b>Oligoquitosano 2.0</b>	<b>4.3 ± 0.03 b</b>
<b>Aceite esencial clavo 0.05</b>	<b>3.8 ± 0.30 cd</b>
<b>Aceite esencial clavo 0.1</b>	<b>3.7 ± 0.20 cd</b>
<b>Aceite esencial clavo 0.15</b>	<b>4.0 ± 0.28 bc</b>
<b>Aceite esencial canela 0.05</b>	<b>3.7 ± 0.05 cd</b>
<b>Aceite esencial canela 0.1</b>	<b>3.7 ± 0.05 cd</b>
<b>Aceite esencial canela 0.15</b>	<b>3.7 ± 0.19 cd</b>

Media y desviación estándar n=3. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas P<0.050 de acuerdo a la comparación de medias de Tukey.

Los hongos en general y *R. stolonifer* en particular, tienden a acidificar los medios de cultivo donde se desarrollan (García-Rincón *et al.*, 2010; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2011). Esta acidificación puede ser debida a la salida del interior de las células de moléculas ácidas o por la elevada actividad de la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa la cual bombea una gran cantidad de protones al exterior celular para generar y mantener un potencial eléctrico transmembranal (Scarborough, 2000), el cual es fundamental para el transporte activo celular.

La presencia de los aceites esenciales de clavo o canela en el medio de cultivo, no afectó el comportamiento de *R. stolonifer* en relación a la acidificación del medio de cultivo, al parecer los aceites esenciales de clavo y canela no afectan la fisiología de *R. stolonifer* a este nivel. No se encontraron estudios que reporten este comportamiento en algún hongo fitopatógeno.

Por otro lado, la presencia del oligoquitosano en el medio evitó que el crecimiento del hongo disminuyera el pH, es decir, que el oligosacárido afectó el comportamiento fisiológico de *R. stolonifer*. Este compuesto podría estar afectando la integridad de la membrana, su funcionalidad o la actividad de la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa. Este efecto del oligoquitosano no ha sido reportado. Tampoco se ha reportado una actividad amortiguadora o de “buffer” del oligoquitosano, sin embargo; los compuestos que acidifican el medio de cultivo productos del metabolismo de *R. stolonifer*, podrían estar interaccionando con las cargas positivas de los grupos amino del oligoquitosano.

En el caso del quitosano, se observó que este compuesto no solo evitó la acidificación adicional del medio de cultivo sino que incluso indujo el incremento del pH del mismo. Este efecto del quitosano sobre *R. stolonifer* ha sido reportado recientemente (García-Rincón *et al.*, 2010). Se ha propuesto que las cargas positivas del quitosano interactúan con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana del hongo afectando la estructura y funcionalidad de la misma. Hernández-Lauzardo *et al.* (2011) concluyeron que el daño causado por el quitosano en la membrana plasmática de *R. stolonifer* puede alterar la actividad de la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa afectando las funciones fisiológicas y metabólicas de este hongo fitopatógeno. Se sugiere que el quitosano pudiera estarse uniendo a la membrana formando una especie de capa que impide que se lleve a cabo el transporte a través de la membrana de forma normal. Tal vez al haber una inhibición en la enzima ATPasa sea la razón de que suceda un incremento del pH del medio.

El quitosano indujo una mayor diferencia en el cambio del pH del medio de cultivo en *R. stolonifer* y presentó un comportamiento distinto o mecanismos de acción diferentes con respecto a los otros compuesto naturales probados en este trabajo.

### 6.3. Liberación de proteínas celulares

Los resultados obtenidos en los ensayos de evaluación de la liberación de proteínas celulares por la técnica de Lowry mostraron que la cantidad de proteínas totales que se detectaron en los tratamientos con quitosano fluctuaron entre 0.01-0.09  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y el método de Lowry no es suficientemente sensible para determinar con precisión cantidades inferiores a 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteínas (Fernández, 1986).

Por ello se procedió a realizar un ensayo para detectar otras interferencias en la técnica, habiendo varios compuestos y sustancias capaces de ocasionar dichas interferencias (Peterson, 1979), debido a los compuestos utilizados para los tratamientos, se demostró que los tratamientos que contenían únicamente quitosano ocasionaban interferencia, y los tratamientos que contenían aceites esenciales ocasionaron una interferencia aún mayor, arrojando lecturas en el espectrofotómetro con mucha fluctuación; al parecer las moléculas aromáticas que integran los componentes de los aceites esenciales ocasionan interferencia en los ensayos de técnicas para proteínas y en las lecturas espectrofotométricas (Winters y Minchin, 2005). Por lo anterior se concluyó que con la técnica utilizada y las condiciones experimentales empleadas, no fue posible de obtener resultados concluyentes.

Hay otra técnica para cuantificación de proteínas “Método Kjeldahl” o el “Método Dumas” que podría ser utilizada para cuantificar las proteínas, en los tratamientos que utilizan aceites esenciales o el quitosano, ya que se basa en determinar la cantidad de nitrógeno en ciertos compuestos orgánicos (Espinoza *et al.*, 2000) sin embargo debido a que esta técnica lleva tiempo no fue posible llevarla a práctica por ello se sugiere llevarla a

cabo en trabajos posteriores para obtener resultados concluyentes, sobre la cantidad de proteínas liberadas por *R. stolonifer*.

Rabea *et al.* (2003) indican que las cargas positivas del quitosano y sus derivados interaccionan con las cargas negativas de las membranas celulares de microorganismos generando cambios en la permeabilidad de las mismas y salida de constituyentes intracelulares. El primer estudio de este efecto sobre hongos fitopatógenos lo realizaron El Ghaouth *et al.*, (1992b) quienes reportaron en *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* que los tratamientos con quitosano durante tres a veintiún días ( $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) indujeron la salida de aminoácidos y proteínas al medio, fueron medidos mediante la técnica de Lowry, observándose cantidades de 3.5 a 11.08 mg de proteína / g de tejido; esto hace suponer que la técnica de Lowry funcionó debido a que la cantidad de proteínas era suficiente a los tres días para pasar la sensibilidad de la técnica.

Guerra-Sánchez *et al.*, (2009) demostraron en tres aislados de *R. stolonifer* que la adición de quitosano con diferentes concentraciones y pesos moleculares inducía la liberación de compuestos intracelulares que absorben a 260 y 280 nm.

No se encontraron estudios relativos a la posible inducción de liberación de compuestos intracelulares por la acción de los aceites esenciales de clavo y canela sobre hongos.

#### **6.4. Integridad de la membrana plasmática de *R. stolonifer***

En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la integridad de la membrana plasmática de células de *R. stolonifer* sometidas durante 12 h a diferentes concentraciones de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo o aceite esencial de canela.

Las esporas que no fueron sometidas a ningún tratamiento presentaron un porcentaje de 95.4% de integridad de membrana, mientras que las células tratadas con quitosano presentaron índices de 85.1 a 95.1 oligoquitosano 89.8 a 95.1 aceite de clavo 92.1 a 95.4 y aceite de canela 93.3 – 97.5. Estos datos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos probados.

**Cuadro 4.** Integridad de la membrana plasmática de células de *Rhizopus stolonifer* sometidas durante 12 h a diferentes concentraciones de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo o aceite esencial de canela

TRATAMIENTO (mg mL <sup>-1</sup> )	IM (%)
<i>R. stolonifer</i>	95.4 ± 4.5
Quitosano 0.5	85.1 ± 13.7
Quitosano 1.0	90.3 ± 6.5
Quitosano 2.0	95.1 ± 4.3
Oligoquitosano 0.5	94.8 ± 4.2
Oligoquitosano 1.0	89.8 ± 0.7
Oligoquitosano 2.0	95.1 ± 1.9
Aceite esencial clavo 0.05	95.4 ± 2.4
Aceite esencial clavo 0.1	93.9 ± 3.4
Aceite esencial clavo 0.15	92.1 ± 4.3
Aceite esencial canela 0.05	93.3 ± 3.5
Aceite esencial canela 0.1	97.5 ± 1.5
Aceite esencial canela 0.15	95.4 ± 3.3

Media ± desviación estándar. n=3. Kruskal-Wallis, H=11.499 gl: 12 (P=0.487). IM

Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Liu *et al.*, (2007), quienes observaron que la integridad de la membrana la cual fue medida con la misma técnica empleada en el presente trabajo, disminuyó en los hongos *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* tratados con quitosano, siendo más sensible *P. expansum*; se ha reportado que la pared fúngica esta compuesta por un 20-30% de Glicoproteínas y un 10-20% de quitina para el caso de hongos

filamentosos (Pontón, 2008), sin embargo; aunque *B. cinérea* y *P. expansum* son hongos filamentosos al igual que *R. stolonifer* podría haber diferencias en la proporción de estos compuestos en la pared celular, lo cuál ocasione las diferencias encontradas.

Adicionalmente Hernandez-Lauzardo *et al* (2011) observaron la disminución (de 95 a 62) en la integridad de la membrana plasmática de células de *R. stolonifer* incubadas durante 6 horas en presencia de quitosano.

Otros investigadores demostraron que el quitosano permeabilizó y penetró la membrana plasmática de diferentes células fúngicas (hifas, esporas y tubos germinales) mediante un proceso dependiente de energía (ATP), los autores sugirieron que el polímero interactuó con los componentes externos de la membrana provocando cambios que implicaron la formación de poros por donde penetraron las moléculas de quitosano (Palma-Guerrero *et al.*, 2008; 2010). Se ha reportado que el quitosano genera una elevada expresión de varios RNAs mensajeros, principalmente los que codifican para proteínas en la membrana plasmática (Zakrzewska *et al.*, 2005). Es probable que en este estudio, después de 12 h de incubación con quitosano, las células hayan reparado la integridad de su membrana. Así como también es importante considerar los tiempos de incubación que se utilizan para evaluar el efecto potencial de los compuestos naturales, y la pérdida de células durante los procesos de centrifugado y lavado, por lo que quizás las lecturas puedan tener este error y que los resultados no sean los esperados.

Para el caso de los aceites esenciales no se encontraron reportes en relación a su posible efecto sobre la integridad de la membrana plasmática de hongos fitopatógenos. Existen estudios realizados con el aceite esencial de canela, que contiene el aldehído cinámico

como principal componente, destacando que éste compuesto actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular (Deans, 1995; Huerta, 2007). Para el caso del tratamiento con aceite esencial de clavo, el eugenol es el componente principal (85%) (Farag *et al.*, 1989), las concentraciones subletales de este compuesto al parecer inhiben la producción de amilasas y proteasas en el caso de *B. cereus*; también se observó el deterioro de la pared celular y un alto grado de lisis celular (Thoroski *et al.*, 1989); el grupo hidroxilo del eugenol parece que se une a las proteínas previniendo la acción enzimática en *Enterobacter aerogenes* (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). En un trabajo donde se probaron mezclas de carvacrol y timol se produjo inhibición en algunas bacterias lo cual se debió a daños en la integridad de la membrana, lo que más afecta a la homeostasis del pH y el equilibrio de los iones inorgánicos (Lambert *et al.*, 2001), siendo el timol uno de los componentes del aceite esencial de clavo (Nassar, 2007) esto hace suponer que otros aceites esenciales puedan tener modos de acción similares en otros microorganismos como es el caso de los hongos fitopatógenos.

Estudios con *B. cereus* mostró que el carvacrol, componente principal del aceite esencial del orégano y el tomillo, interactúa con la membrana plasmática donde se disuelve entre la bicapa de fosfolípidos y se cree que se alinea entre las cadenas de ácidos grasos (Ultee *et al.*, 2000). Quizás esta distorsión de la estructura física causa la expansión y la desestabilización de la membrana, lo que aumenta su fluidez y permeabilidad (Ultee *et al.*, 2002). La medición de la temperatura media de la fase de transición de los lípidos de las membranas bacterianas confirmó que instantáneamente se hizo más fluida en presencia de

carvacrol (Ultee *et al.*, 2000), quizás éste sea uno de los modos de acción de otros aceites esenciales como el caso del aceite esencial de clavo y la canela.

Los hongos tratados con aceites esenciales mostraron disminución del crecimiento micelial, tenían una forma irregular con modificaciones de la pared celular y la superficie de la célula tenía depresiones. Estas modificaciones en la morfología celular pueden estar relacionadas con la interferencia de los componentes del aceite en las reacciones enzimáticas de síntesis de la pared celular, lo cuál afecta la morfogénesis de los hongos e inhibe su crecimiento (Thobunluepop *et al.*, 2009). Para el caso de formulados en la preservación de hongos benéficos donde se utilizan aceites minerales estos son aceites derivados del petróleo, no tóxicos y esterilizados como: la parafina, vaselina o petrolato líquido que están constituidos por una mezcla homogénea de hidrocarburos saturados; también se utiliza un medio nutritivo líquido, aunque poseen la desventaja de que el hongo puede continuar su crecimiento llegando a producirse mutantes (Gato, 2010); estos preservantes están libres de compuestos aromáticos como terpenos o fenoles a los cuáles se les atribuye la propiedad antifúngica de los aceites esenciales.

El daño de los lípidos o de las proteínas de la membrana plasmática por los agentes antimicrobianos determina que el contenido celular se derrame en el medio circundante e interfiera sobre el crecimiento de la célula (Tortora *et al.*, 2007).

### **6.5. Cambios en la ultraestructura de *Rhizopus stolonifer***

En las Figuras 9 y 10 se presentan las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las esporas de *R. stolonifer* sometidas durante 12 h a las concentraciones más altas de quitosano, oligoquitosano ( $2.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), aceite esencial de clavo y aceite esencial de canela ( $0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

En general se observaron engrosamientos significativos de la pared celular (flechas rojas) de las células fúngicas en comparación con el testigo (figura 9A) tratadas con quitosano, oligoquitosano y aceite esencial de clavo, también se muestra una elevada vacuolización (flecha blanca)(Figura 10B) que fue observada en las células tratadas con oligoquitosano.

En el caso del testigo (cuadro 5) se observó la presencia de la pared celular presentando un grosor normal (70.3 nm) y la membrana celular bien definida (figura 9A).

Las imágenes de las células de *R. stolonifer* crecidas en presencia de quitosano se observó engrosamiento de la pared celular (269.3 nm) además de unas formaciones laminares (flecha verde) en el interior de la pared (Figura 9B), las cuales no se observan en las células no tratadas con quitosano (Figura 9A).

Las células tratadas con oligoquitosano se observó el engrosamiento de la pared (206.2 nm) y vacuolización (Figura 10B), cabe destacar que para este tratamiento fue difícil obtener imágenes ya que la gran mayoría de las células encontradas se hallaban huecas debido a la vacuolización la cual se incrementaba al pasar el haz de electrones del microscopio de transmisión, lo cuál indica que el daño intracelular que genera este compuesto es muy amplio corroborando las grandes variaciones morfológicas inducidos por este compuesto en las células fúngicas.

Las células tratadas con aceite esencial de clavo (Figura 9D) también mostraron engrosamiento de la pared celular (242.9 nm) (Cuadro 5), además presentaron ornamentaciones denominadas “crestas”, las cuales son propias de la spora (Figura 9D). La emergencia del tubo germinal aparece a partir de las 3 a 5 h (Van Etten *et al.*, 1974; Hess y Weber, 1972), evidenciando un severo retraso en la germinación de las mismas y una pared celular muy oscura con marcadas líneas laminares, comparando estas imágenes con las de los otros tratamientos se observó que no hay crestas en las esporas de los otros tratamientos, sin embargo; en la mayoría de las células de este tratamiento mostraron las crestas.

El engrosamiento inducido en la pared celular de *R. stolonifer* por el aceite esencial de canela, aunque fue visible no fue estadísticamente diferente al testigo (cuadro 5).

Evidentemente, el quitosano provocó el mayor engrosamiento de la pared celular de *R. stolonifer*, el incremento en el espesor de la pared fue de 283% un aumento de casi tres veces con respecto a la pared celular de las células no tratadas. Estos resultados coinciden con lo obtenido por El Ghaouth *et al.* (1992b) quienes demostraron cambios en la ultraestructura de *R. stolonifer*, en particular resaltaron el incremento en el espesor de la pared celular.

Recientemente, se ha reportado que el quitosano puede inducir el engrosamiento de la pared celular de algunos hongos (Palma-Guerrero *et al.*, 2008; Vesentini *et al.*, 2007), sin embargo; hasta ahora no existe información de este fenómeno en células de *R. stolonifer*. El engrosamiento de la pared celular de *R. stolonifer* puede ser un mecanismo de protección a la presencia del quitosano en la superficie celular o que la regulación de la actividad de

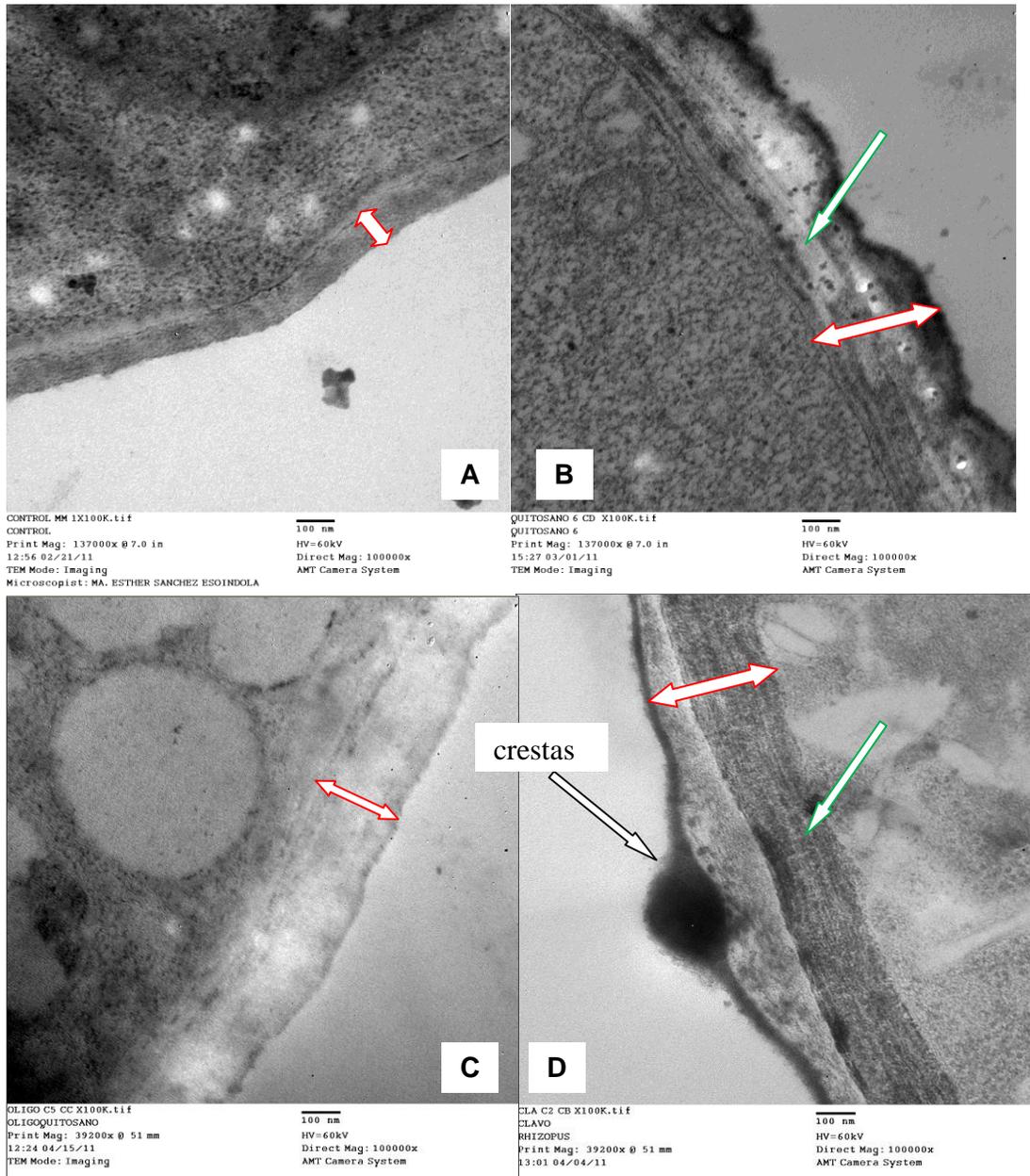
enzimas glucano sintetasa y quitina sintetasa que están involucradas en la síntesis de la pared celular, durante la morfogénesis se vea afectada debido a la presencia de los policationes en la superficie de la célula (Adams, 2004). Efectos similares de engrosamiento de la pared celular se han observado cuando las esporas de *R. stolonifer* se incubaron en condiciones de anaerobiosis (Bussel *et al.*, 1969). Posiblemente, el engrosamiento de la pared celular de *R. stolonifer* sea una respuesta celular de protección ante ciertas condiciones de estrés. Esta hipótesis se fortalece con los resultados obtenidos con el aceite esencial de clavo, donde también se observó un incremento significativo en el grosor de la pared celular.

Los resultados relativos a la vacuolización inducida por el oligoquitosano (Figura 10B) en células de *R. stolonifer* son acordes a lo reportado por Xu *et al.* (2007) quienes demostraron que el quitosano afectó la ultraestructura general de *Phytophthora capsici* y en particular indujo una severa vacuolización.

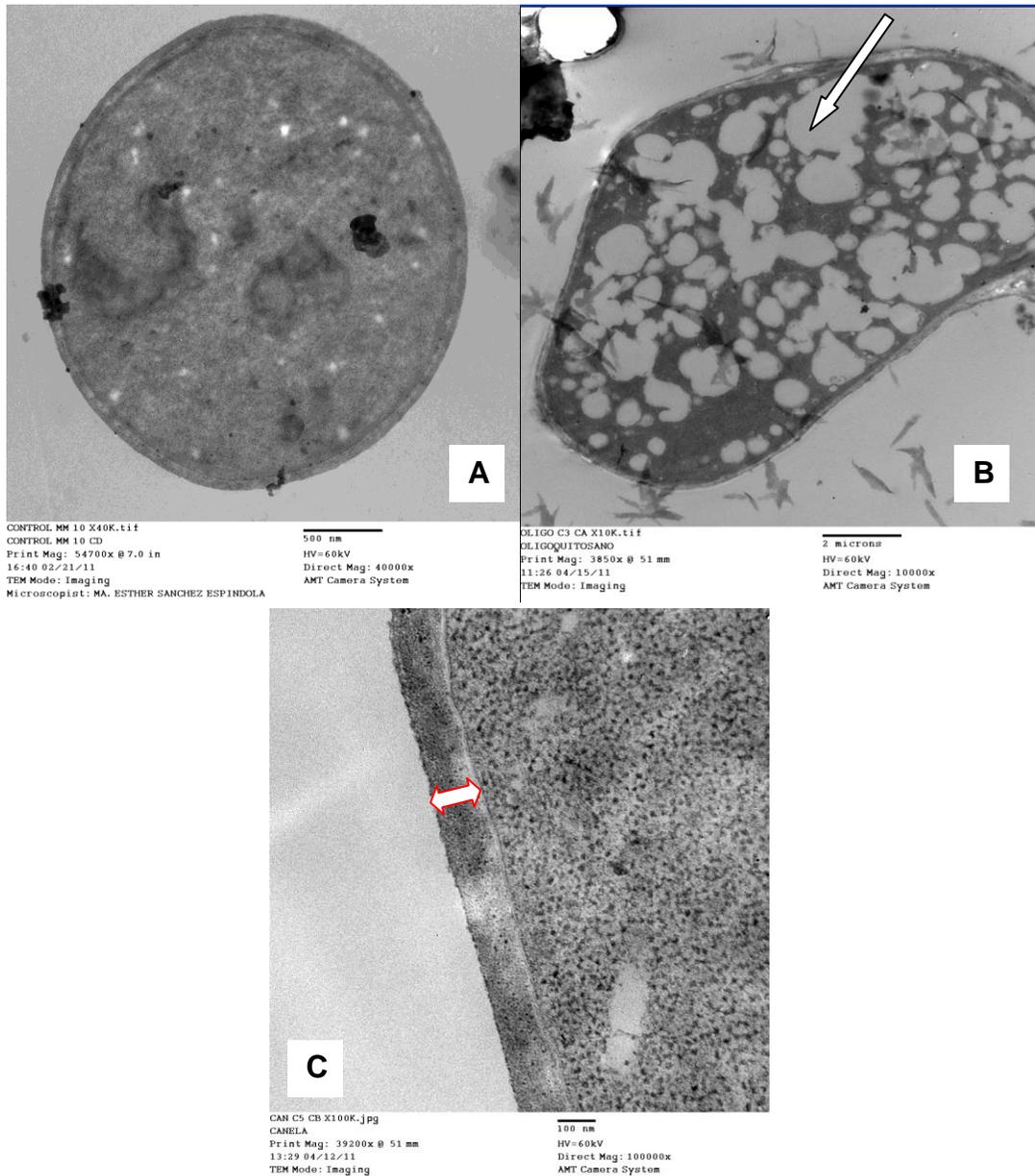
No existen en la literatura estudios de la acción de los aceites esenciales de clavo y canela sobre la pared celular de *R. stolonifer*, solamente existen algunos reportes de aceites esenciales de otros vegetales que pueden actuar sobre hongos diferentes. Recientemente se reportó de un ligero engrosamiento de la pared celular de *Phytophthora cactorum* inducido por el metileugenol, componente principal del aceite esencial de jengibre, también se reportaron invaginaciones de la membrana plasmática, pero no se observó incremento de vacuolas de estas células (Dan *et al.*, 2010).

Las observaciones relativas al engrosamiento estadísticamente significativo (Cuadro 5) de la pared celular de *R. stolonifer* provocado por el quitosano, oligoquitosano y el aceite

esencial de clavo son novedosas y generan perspectivas interesantes de investigación para conocer si otros compuestos antifúngicos también tienen la capacidad de provocar el engrosamiento de la pared, lo que indicaría que este proceso de engrosamiento es una respuesta generalizada de defensa a la presencia de ciertos compuestos con actividad antifúngica. La afectación por estrés de los tratamientos podría sobreactivar la síntesis de pared celular por activación de la quitina sintetasa encargada de la producción de quitina para la formación de la pared célula. La quitina es necesaria para la integridad de la pared celular de hongos ya que proporciona fuerza a través de los enlaces de hidrógeno de las múltiples cadenas dispuestas en microfibrillas de quitina; en hongos filamentosos, la proporción de quitina puede ser del 40% (Bartnicki-Garcia y Lippman, 1969).



**Figura 9.** Microscopía electrónica de transmisión de *R. stolonifer* (100 000X) en MM durante 12 h (A) Testigo. (B) quitosano [2.0 mg mL<sup>-1</sup>]. (C) oligoquitosano [2.0 mg mL<sup>-1</sup>]. (D) aceite esencial de clavo [0.15 mg mL<sup>-1</sup>].



**Figura 10.** *R. stolonifer* durante 12 h en MM (40 000X) (A) Testigo. *R. stolonifer* (10 000 X) en oligoquitosano (mostrando la gran cantidad de vacuolas) (B). *R. stolonifer* + aceite esencial de canela [0.15 mg mL<sup>-1</sup>] (C).

**Cuadro 5.** Grosor de la pared celular de *R. stolonifer* crecidas durante 12 h en presencia de quitosano, oligoquitosano, aceite esencial de clavo o aceite esencial de canela. Las determinaciones se realizaron mediante microscopía electrónica de transmisión.

TRATAMIENTOS (mg mL <sup>-1</sup> )	GROSOR DE LA PARED CELULAR (nm)
Testigo	70.3 ± 14.1 a
Quitosano 2.0	269.3 ± 66.1 b
Oligoquitosano 2.0	206.2 ± 45.4 b
Clavo 0.15	242.9 ± 39.6 b
Canela 0.15	167.2 ± 27.9 a

Se muestra las medias ± desviación estándar. n=6. Diferentes letras indican diferencias estadísticas Kruskal-Wallis, H=17.2, gl 4 (P=0.002).

## 6.6. Cambios en el consumo de oxígeno

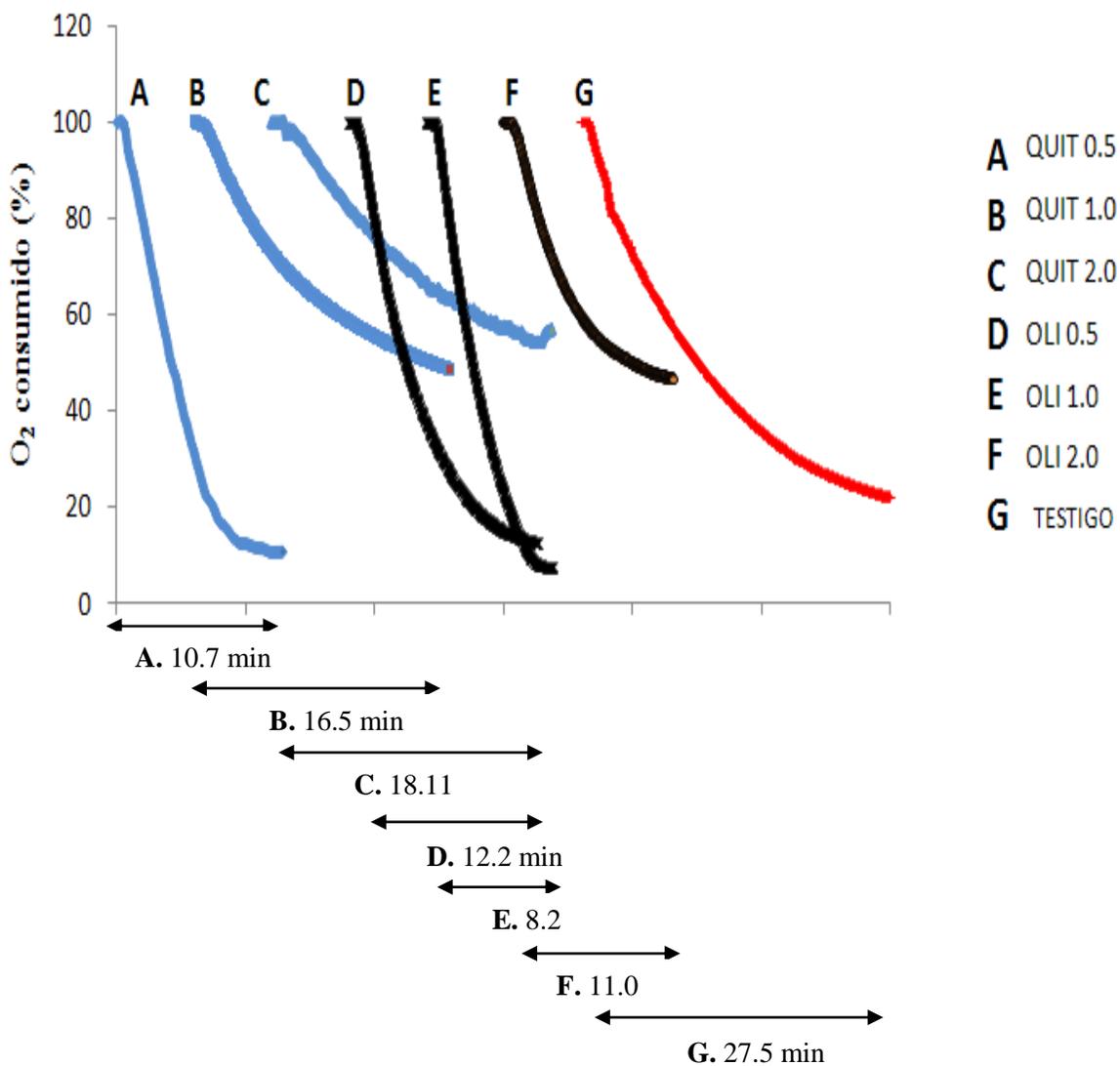
Con el propósito de analizar la capacidad respiratoria de *Rhizopus stolonifer* bajo el efecto de los tratamientos de quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales de clavo y canela, se determino el consumo de oxígeno en preparaciones expuestas a estos compuestos durante 6h.

Con las diferentes concentraciones de quitosano se observa en la Figura 11 que el consumo de O<sub>2</sub> es más rápido a concentraciones menores de quitosano (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) en comparación con las concentraciones de (1.0 y 2.0 mg mL<sup>-1</sup>).

Correspondiente al efecto del oligoquitosano las células expuestas a las concentraciones menores (0.5 y 1.0) mostrarón una mayor rapidez en el consumo de O<sub>2</sub> con respecto a la concentración de 2.0 mg mL<sup>-1</sup> y el testigo.

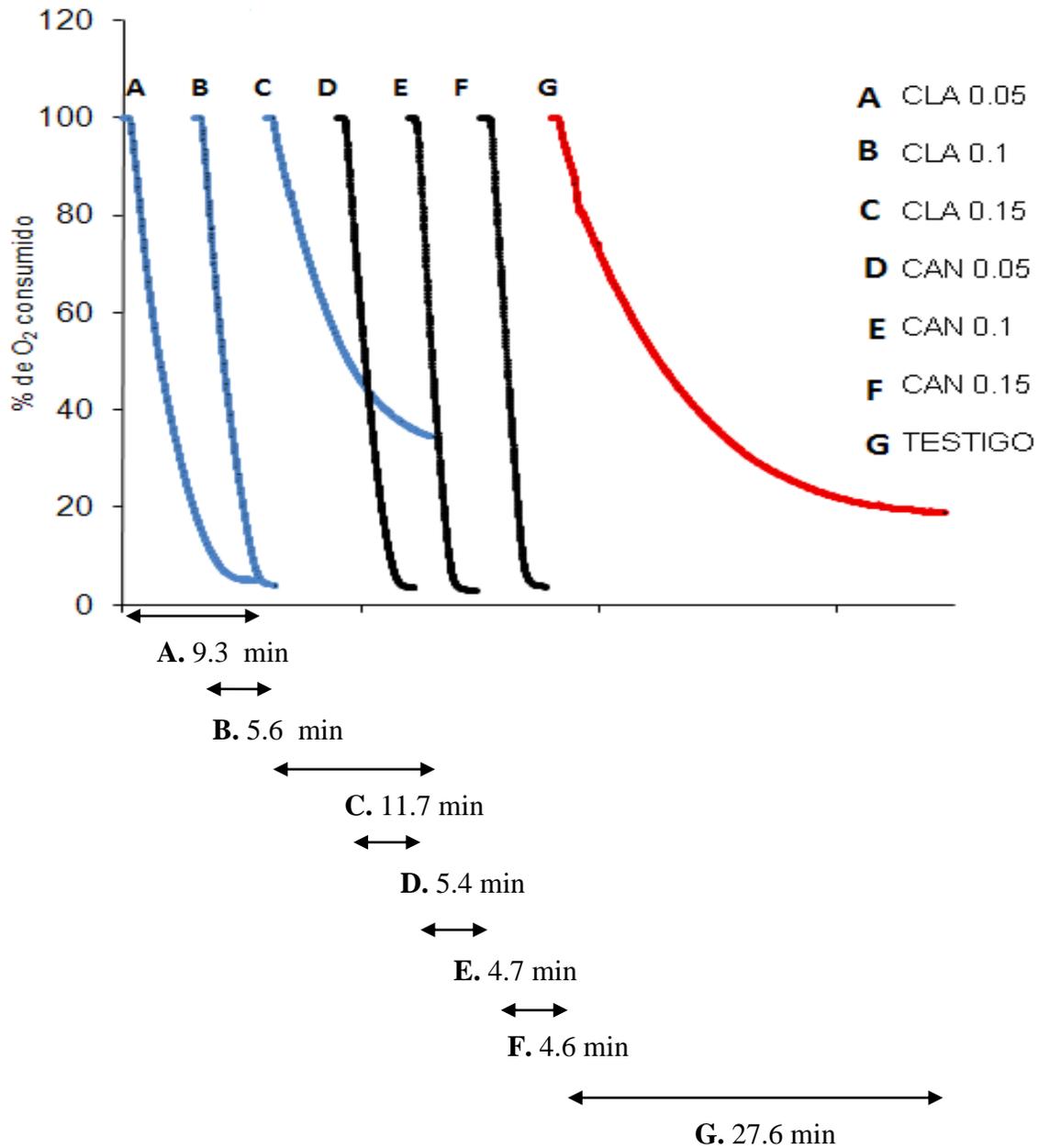
Este efecto de aceleración de la respiración se muestra con mayor de talle en el Cuadro 6, el cuál corresponde a los trazos polarográficos de las figuras 11 y 12, la cantidad de células añadidas en el testigo corresponde en peso a la mitad de la cantidad de células añadidas en los tratamientos con quitosano y oligoquitosano, se utilizó la misma cantidad de células para inocular todos los matraces como se menciona en el punto 5.2. de materiales y métodos; pero el desarrollo de las esporas al germinar provoco que se recuperaran distintas cantidades; siendo esto también influenciado por las malformaciones globosas que suceden en las esporas tratadas con quitosano y el menor desarrollo de las células tratadas con aceites esenciales, principalmente con aceite esencial de clavo. Sin embargo, hay que recordar que aunque se utilizó menor cantidad en masa de células, esto es en peso húmedo y pueden no reflejar la cantidad exacta de células, ya que en los tratamientos con los aceites

esenciales las células parecen no hubieran germinado, por lo cuál en relación al peso, probablemente se encuentren mas células en los tratamientos con aceites esenciales que en los tratamientos con quitosano y oligoquitosano.



**Figura 11.** Consumo de O<sub>2</sub> por *R. stolonifer* en MM (mg mL<sup>-1</sup>), tratamientos quitosano a 0.5 (QUIT 0.5), quitosano a 1.0 (QUIT 1.0), quitosano a 2.0 (QUIT 2.0), oligoquitosano a 0.5 (OLI 0.5), oligoquitosano a 1.0 (OLI 1.0), oligoquitosano 2.0 (OLI 2.0) y testigo (TESTIGO). Las flechas indican el tiempo (min) de consumo de O<sub>2</sub>.

En la Figura 12 se presentan los resultados de consumo de oxígeno obtenidos con las células tratadas con los aceites esenciales de clavo y canela. Se observa que los aceites esenciales ocasionan una aceleración en el consumo de oxígeno, a excepción del aceite de clavo en la máxima concentración probada ( $0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ), siendo este comportamiento producto de la menor cantidad de esporas colocadas en la cámara de respiración, sin embargo al extrapolar los datos se observa un consumo de oxígeno superior al del testigo siguiendo el patrón de los otros aceites esenciales. Todos los aceites esenciales aceleran la respiración de *R. stolonifer*, se puede observar que el aceite esencial de canela mantiene el mismo patrón de aceleración a las tres concentraciones probadas



**Figura 12.** Consumo de O<sub>2</sub> (6 h) por *R. stolonifer* en MM con aceite esencial de clavo y de canela (mg mL<sup>-1</sup>) de clavo 0.05 (CLA 0.05), clavo 0.1 (CLA 0.1), clavo 0.15 (CLA 0.15), canela 0.05 (CAN 0.05), canela 0.1 (CAN 0.1), canela 0.15 (CAN 0.15) y TESTIGO. Las flechas indican el tiempo (min) de consumo de O<sub>2</sub>.

En el Cuadro 6 se muestra el consumo de O<sub>2</sub> en nano moles por minuto por cantidad de muestra añadida en la cámara de respiración, la tabla es representativa de las Figuras 11 y 12, para ello se obtuvo la pendiente del trazo polarográfico y se multiplicó dicha pendiente por la cantidad de oxígeno presente en la cámara de respiración posteriormente se multiplicó el resultado de dicha cantidad por los miligramos de células añadidos en cada tratamiento, cabe destacar que se buscó usar una cantidad estándar de cada muestra sin embargo en el caso de los aceites esenciales hubo menor cantidad de esporas de las esperadas, siendo posible extrapolar los datos obtenidos con otras cantidades.

En un trabajo se observó que durante el proceso de germinación de *R. stolonifer* en medio agar adicionado con glucosa y sales minerales, el diámetro de las esporas aumentó de 8,8 a 15 μm aproximadamente, el volumen de las esporas aumentó alrededor de cinco veces y el consumo de oxígeno alrededor del 50% de las 0 a las 0.5 h, posteriormente, sigue aumentando linealmente hasta 10 a 12 veces a las 4 h. El consumo de oxígeno se mantuvo constante durante el resto de la germinación (Van Etten *et al.*, 1974). La evaluación del consumo de oxígeno en este trabajo se realizó a las 6 h lo cual indica que el consumo debería ser lineal y constante al menos en el caso del testigo, en los trazos se mantiene este comportamiento durante corto tiempo debido a que se consume el total de oxígeno presente en la cámara de respiración.

**Cuadro 6.** Velocidad en el consumo de O<sub>2</sub> (6h) bajo tratamiento con Quitosano (quit), Oligoquitosano (oli), aceite esencial de clavo (cla) y de canela (can).

Tratamiento mg mL <sup>-1</sup>	21 nmolO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> /s	nmol O <sub>2</sub> /min
Testigo (CT)	3.63	0.29	17.42
quit 0.5	4.91	122.77	7366.04
quit 1.0	2.17	54.18	3251.07
quit 2.0	1.00	24.95	1497.27
oli 0.5	6.61	165.22	9913.48
oli 1.0	8.46	211.5	12690.48
oli 2.0	4.26	106.39	6383.26
cla 0.05	9.75	0.78	46.82
cla 0.1	12.49	1.00	59.93
cla 0.15	3.64	0.36	21.84
can 0.05	13.19	1.06	63.32
can 0.1	16.95	1.36	81.36
can 0.15	15.92	1.27	76.41

Se muestran los resultados en nanomoles de O<sub>2</sub> consumido por minuto por mg de células en cada tratamiento. La cantidad de 21 nmol de O<sub>2</sub> es la cantidad de Oxígeno presentes en 1 mL de reacción correspondiente a la cámara de respiración utilizada.

Los datos obtenidos con el tratamiento de Quitosano concuerdan con lo reportado por Robles (2009), quien observó aumentos en la respiración de células de *R. stolonifer* tratadas con quitosano, atribuyendo esa elevación en el consumo de oxígeno a la mayor cantidad de mitocondrias observadas en las células expuestas al quitosano.

Las células tratadas el aceite esencial de canela, mantuvieron una elevada actividad respiratoria a pesar de incrementarse la concentración de este compuesto.

Posiblemente, las células de *R. stolonifer* en presencia de un compuesto antifúngico despliegan inicialmente una respuesta de defensa que genera un incremento en la actividad respiratoria, sin embargo, al incrementarse la concentración del antifúngico, esa actividad no se puede sostener por lo que decrece rápidamente provocándose la disminución del crecimiento del hongo y posteriormente se podría propiciar el inicio de la muerte del hongo.

Estos resultados indican que el quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela afectan a nivel de la fisiología del hongo y pueden tener repercusiones en el metabolismo, desarrollo y sobrevivencia del mismo.

## 7. CONCLUSIONES

1. El quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela inhibieron el crecimiento y provocaron cambios morfológicos en las hifas de *R. stolonifer*. El oligoquitosano fue el compuesto que indujo el mayor efecto del crecimiento y cambios en la morfología de las hifas.
2. La presencia de quitosano indujo que *R. stolonifer* incrementara el pH del medio. El oligoquitosano provocó que *R. stolonifer* fuera incapaz de disminuir el pH del medio de cultivo. La adición de los aceites esenciales de clavo y canela no indujeron cambios metabólicos en *R. stolonifer* que modificaran la acidificación que normalmente realiza este hongo en los medios de cultivo.
3. No se evidenció que la presencia de los compuestos probados provocaran la salida de proteínas de las células de *R. stolonifer*.
4. La cuantificación indirecta de integridad de membrana plasmática en células de *R. stolonifer* no mostró cambios significativos al ser expuestas a los tratamientos ya mencionados.
5. El quitosano, oligoquitosano y el aceite esencial de clavo indujeron incrementos significativos en el grosor de la pared celular de *R. stolonifer*.
6. Concentraciones bajas e intermedias quitosano, oligoquitosano y todas las concentraciones probadas de los aceites esenciales de clavo y canela indujeron aceleración en la respiración de *R. stolonifer*.

7. Se demostraron cambios celulares y fisiológicos en *R. stolonifer* por efecto del quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela.

## 8. PERSPECTIVAS

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo donde se demostró que el quitosano, oligoquitosano y los aceites esenciales de clavo y canela provocaron cambios a nivel celular y fisiológico en *R. stolonifer*, se pueden realizar algunas propuestas para profundizar en el conocimiento básico del modo de acción de estos compuestos en este hongo fitopatógeno. Este conocimiento será útil para obtener bases que permitan desarrollar compuestos antifúngicos y/o estrategias efectivas para buscar formas de control de fitopatógenos sin afectar al ambiente y a la salud humana.

Las propuestas son las siguientes:

- 1.- En relación a los cambios observados en la morfología, en el pH del medio, en la pared celular y en las tasas de respiración de *R. stolonifer* inducidos por estos compuestos naturales, estudiar si estos cambios también se obtienen con otros géneros de hongos fitopatógenos.
- 2.- Investigar desde el punto de vista enzimático y bioquímico el fenómeno de inducción de incremento del pH del medio provocado por el quitosano.
- 3.- Estudiar las bases genéticas y bioquímicas del engrosamiento de la pared y del incremento de la respiración de *R. stolonifer* inducido por estos compuestos naturales.
- 4.- Investigar si otros compuestos naturales provocan efectos semejantes a los observados con los compuestos empleados en este trabajo.
- 5.- Estudiar las posibles correlaciones de la actividad antifúngica demostrada por los compuestos empleados en este trabajo con investigaciones *in situ*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abdel-Mallek, A., Hemida, S.K. y Bagy, M.M. 1995. Studies of fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathologia*. 130: 109-116.
- Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150: 2029-2035.
- Adaskaveg, J.E., Förster, H. y Sommer, N.F. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays and edible horticultural crops. En: A. Kader (ed.) *Postharvest technology of horticultural crops*. University of California, Oakland, California, USA. pp: 163-195.
- Agrios, G. 2001. *Fitopatología*. México, D. F: Limusa. Segunda edición. pp: 332-336.
- Alvarado, H.A.M. 2009. Efecto antifúngico *in vitro* e *in situ* del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. pp: 126
- Bandoni, A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de Editoriales Universitarias, pp. 29-43, 94- 96, 149-171, 197-232.
- Barrera-Necha, L., Bautista-Baños, S., Flores-Moctezuma, H. y Rojas, E.A. 2008. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. and sacc and control, of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathology Journal* 7: 174-178.
- Barrera-Necha, L.L., Garduño-Pizana, C. y García-Barrera L.J. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f sp. *Gladioli* (Massey) Snyder and Hensen. *Plant Pathology Journal* 8: 17-21.
- Bartnicki-Garcia, S., y Lippman, E. 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*. 165: 302–304.

- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N. Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait-Barka, E., Bosquez-Molina, E. y Wilson C.L. 2006. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.
- Beg, A.Z. y Ahmad, I. 2002. In vitro fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 313–315.
- Bhatt, L.R., Kim, B.M., Nam, S.M., Oh, G.S. y Chai, K.Y. 2009. Antimicrobial activity of water soluble chitosan oligomers with different molecular weights. *Journal Chitin Chitosan*. 14: 179-181
- Bowman, S.M., y Free, S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 28: 799–808.
- Bozzola, J.J., Russell, L.D. y Bartlett. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Second edition. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 675 p
- Brecha, J.K., Chau, K.V., Fonseca, S.C., Oliveira, F.A., Silva, F.M., Nunes, M.C. y Bender, R.J. 2003. Maintaining optimal atmosphere conditions for fruits and vegetables throughout the postharvest handling Caín. *Postharvet Biology and Technology*. 27: 87-101.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
- Bussel, J., Buckley, P.M., Sommer, N.F. y Kosuge, T. 1969. Ultrastructure changes in *Rhizopus stolonifer* sporangiospores in response to anaerobiosis. *Journal Bacterial*. 98: 774-783.
- Bustos, M.E. y Luna, P.C. 1996. Factibilidad técnica y económica de la aplicación de la irradiación como tratamiento post-cosecha en frutas y hortalizas. *Horticultura Mexicana* 4: 113-118.
- Candelas-Cadillo, M.G., Alanís-Guzmán, M.G., Bautista-Justo, M., Del-Rio-Olague, F., Carlile, M.J. y Watkinson, S. 1994. En: *The Fungi*. Editorial Academic

Press. Imperial College of Science and Technology University of London. pp: 34-39.

- Dan, Y., Liu, H., Gao, W. y Chen, S. 2010. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum*. *Crop Protection*. 29: 295-299.
- Deans, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W. y Penzes, L.G. 1995. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticu* (L.) Merr Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour and Fragrance Journal*. 10: 323–328
- (Ehrenberg: Fries) Vuillemin. *Rhizopus stolonifer*. 2002. *Revista Iberoamericana de Micología*. pp: 38
- El Ghaouth, A., Arul J., Asselin, A. y Benhamou, N.1992b. Antifungal activity of chitosan on postharvest pathogens: induction of morphological and citological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*. 96: 769-779.
- Espinoza, C.S., Asencios, R.S., Román, A.G. y Moran, J.V. 2011. CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES DE LECHE POR METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS. En: *anales científicos*. XLII: 25-29.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., y Abo-Raya, S.H. 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science*. 54: 74-76
- Fernández, M.L.F. 1986. Análisis por Activación con Neutrones en la Cuantificación de Proteínas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 49 p.
- Gato, C.Y. 2010. Fitosanidad. Métodos de conservación y formulación de *trichoderma harzianum rifai*. 14: 189-195
- Förster, H., Driever, G.F., Thompson, D.C. y Adaskaveg, J.E. 2007. Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease*. 91: 209-215.
- García, E., Quezada, M., Moreno, J., Sánchez, G., Moreno, E., Pérez, M. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*

- Blume) y óregano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24: 8-12
- García, J. 2008. Efecto del quitosano sobre la membrana celular de *Rhizopus stolonifer*. Tesis de Maestría. IPN. Yautepec, Morelos. pp: 61
  - García-Lara, S y Bergvinson, D.J. 2007. Programa integral para reducir las pérdidas postcosecha en maíz. *Agricultura Técnica Mexicana*. 33: 81-189.
  - García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sánchez, M.G., Hernández-Lauzardo, A.N., Peña-Díaz, A. y Velázquez-Del Valle, M.G. 2010. Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97: 275-278.
  - Gonzalez-Aguilar, G.A., Gardea, A.A. y Cuamea-Navarro, F. 2005. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Jalisco, México. 558 pp
  - Griffin, H.D. 1994. *Fungal Physiology*. 2da ed. Copyright. 463 pp
  - Guerra-Sánchez, M.G., Vega-Pérez, J., Velázquez-del Valle, M.G. y Hernández-Lauzardo, A.N. 2009. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93: 18-22.
  - Guillén-Sánchez, D., Hernandez, T.J.C., Nieto-Angel, D., Acosta-Ramos, M., López-Martínez, V.L., Alia, T.I. y Acosta, D.C.M. 2004. Patogenicidad de *Rhizopus sp.* y *Alternaria sp.* En frutos de pera y manzana durante postcosecha. UAEM. *Investigación Agropecuaria*. 2: 43-49.
  - Han, C., Zhao, Y., Leonard, S.W. y Traber, M.G., 2004. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria×ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*. 33: 67-78.
  - Heitman, J. 2005. Cell biology, a fungal Achilles' hell. *Science*. 309: 2175-2176.
  - Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-Del Valle, M.G. y Trejo-Espino, J.L. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., causal

agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. Revista Mexicana de Fitopatología. 24: 65-69.

- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., Méndez-Montealvo, M.G., Sánchez-Rivera, M.M. y Bello-Pérez, L.A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Carbohydrate Polymers 73: 541-547.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Vega-Pérez, J., Velázquez-del Valle, M.G., Sánchez N.S., Peña, A. y Guerra-Sánchez, M.G. 2011. Changes in the Functionality of Plasma Membrane of *Rhizopus stolonifer* by Addition of Chitosan. Journal of Phytopathology. 159: 563–568
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Editoriales UNAM y Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 551 pp.
- Hess, W.M., y Weber, D.J. 1972. Ultrastructure of Dormant and Germinated Sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*. Department of Botany and Range Science. 1-19 p
- Huerta, L.B. 2007. Aceites esenciales en el control de las patologías aviarias. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. 8 p.
- Inouye, S., Uchida, K., Yamaguchi, H., Miyara, T., Gomi, T. y Amano, M. 2001. Volatile aroma constituents of three Labiatae herbs growing wild in the Karakoram- Himalaya district and their antifungal activity by vapor contact. Journal Essential Oil Research. 35: 68–72.
- Jham, G.N., Dhingra, O.D., Jardim, C.M. y Valente, V.M.M. 2005. Identification of the Major Fungitoxic Component of Cinnamon Bark Oil. Fitopatologia Brasileira. 30: 404-408
- Kartsonis, N.A., Nielsen, J. y Douglas, C.M. 2003. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. Drug Resistance Updates 6: 197-218.
- Kavanagh, K. 2011. Fungi Biology and Applications. 2da edición. Wiley. p 21

- Kim, S.K. y Rajapakse , N. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrates Polymers*. 62: 357-368.
- Korsten, L. y Wehner, F. 2003. Fungi. En Bartz y Brencht *Journal Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Second edition, Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp: 485-518.
- Kubezcka, K.H. y Formacek, V.V. 2002 *Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 nmr spectroscopy*. 2<sup>a</sup> ed. Editorial John Wiley; Nueva York; Chichester, England. 461 p
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P. y Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453–462.
- Lárez, V.C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Revista de Avances en Química*. 1: 15-21.
- Liu, J., Tian, S., Meng, X. y Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 44: 300-306.
- Liou, G.Y., Chen, S.R., Wei, Y.H., Lee, F.L., Fu, H.M., Yuan, G.F., Stalpers, J.A. 2007. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. *Mycological Research*.111: 196-203
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275
- Lydakis, D. y Aked, J. 2003. Vapour heat treatment of sultanina table grapes. I: control of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 27: 109-116.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. *Fitoquímica Organica*. 2002. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Venezuela. pp 593
- Meng, X., Yang, L., Kennedy, J.F., Tian, S. 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*. 81: 70–75.

- Molecular Probes. 1999. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain. Production Information. p 1-3.
- Nassar, M.I., Gaara, A.H., El-Ghorab, A.H., Farrag, A.R.H., Shen, H., Hug, E. y Mabry, T.J. 2007. Chemical constituent of clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity. *Revista Latinoamericana de Química*. 35: 47-57.
- Northover, J. y Zhou, T. 2002. Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatment of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24: 144-153.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H.B., Salinas, J., y Lopez-Llorca, L.V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 541–553.
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J.A., Pérez-Berná, A.J., Huang, I.C., Jansson, H.B., Salinas, J., Villalán, J., Read, N.D. y Lopez-Llorca, L.V. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*. 75: 1021–1032
- Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G. y Glander, H.J. 2003. Deterioration of Plasma Membrane Is Associated With Activated Caspases in Human Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24: 246-252
- Peterson, G.L. 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*. 100: 201-220.
- Pontón, P. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 78-8
- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smaghe, G. y Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Application and mode of action. *Biomacromolecules*. 4: 1457-1465.
- Ramírez, J. y Peña, A. 2000. Intercambiadores catión/protón en levaduras. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 181-187.

- Robles, M.L. 2009. Efecto del quitosano en la función mitocondrial de *Rhizopus stolonifer*. Tesis de Maestría. IPN. México, DF. pp:76
- SAGAR, 1998. Inocuidad Alimentaria: Propuesta de Estrategia. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México, D.F.
- Scarborough, G.A. 2000. The plasma membrane proton-translocating ATPase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 871-883
- Scheffler, I.E. 2001. Mitochondria make a come back. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 49:3-26
- Schipper, M.A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. *Studies in Mycology*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, Netherlands. 25: 34.
- Senanayake, U., Lee, T. y Wills, R. 1978. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 822-824.
- Spadaro, D. y Lodovica, G.M. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. 91: 185-194.
- Thobunluepop, P., Udomsilp, J., Piyo, A. y Khang-Khun P. 2009. Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. pp: 24-30
- Thoroski, J., Blank, G. y Biliaderis, C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. 52: 399-403
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case C.L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9° ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 988 p
- Tripathi, P., Dubey, N. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 235-245.
- Tzortzakis, N.G. 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 97-102

- Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G y Smid, E.J. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of Food Protection*. 63: 620-4
- Ultee, A., Bennik, M. H. J y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 1561-8
- Van Etten, J.L., Bulla, L.A., J.R. y Julian, G.S. 1974. Physiological and Morphological correlation of *Rhizopus stolonifer* spore germination. *Journal of Bacteriology*. 117:882-887
- Van Der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W.N. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*. 59: 304-322.
- Velázquez-del Valle, M.G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo A.N., Guerra-Sánchez, M.G y Amora-Lazcano, E. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26: 49-55.
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadias, M., Torres, R y Usall, J. 2006. Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. En: *Innovaciones Fisiológicas y Tecnológicas de la Maduración y Post-recolección de Frutas y Hortalizas*. España. CEE Limencop. pp: 363-373
- Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., Zheng, X. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*. 123: 234–239
- Weier, T.E., Stocking, R.C., Barbour, M.G. 1983. *Botánica*. 5ta edición. Edit. Limusa. México. pp 741.
- Wendakoon, C.N y Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal Food Protection*. 58: 280–283

- Winters, A.L. y Minchin, F.R. 2005. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Analytical Biochemistry*. 346:43-8.
- Xu, J., Zhao, X., Han, X. y Du, Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 87: 220-228.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, J. y Klis, F. 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukariotic Cell*. 4:703-715

Sitios Web consultados:

- (1) <http://fichas.infojardin.com/condimentos/syzygium-aromaticum-eugenia-caryophyllata-clavo-clavero.htm> 16/Agosto/2011

## X. ANEXOS

### ANEXO 1.

Composición del medio mínimo (MM)	
Medio mínimo:	Glucosa 10 g L <sup>-1</sup> , NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 3 g L <sup>-1</sup> , solución de sales y elementos trazas 62.5 mL L <sup>-1</sup> .
Solución de sales:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 16 g L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4g L <sup>-1</sup> ; KCL 8 g L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> 2g L <sup>-1</sup> ; CaCl <sub>2</sub> 1g L <sup>-1</sup> ; elementos traza 8mL L <sup>-1</sup> .
Elementos traza:	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 60 mg L <sup>-1</sup> ; MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O 140mg L <sup>-1</sup> ; ZnCl <sub>2</sub> 400 mg L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O 40 mg L <sup>-1</sup> ; FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O 100 mg L <sup>-1</sup> ; CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O 400 mg L <sup>-1</sup> .

### ANEXO 2. TÉCNICA DE LOWRY:

Para medición de proteínas:

Curva Tipo: Se realiza con una solución stock de albumina sérica bovina a una concentración de 0.5 mg/mL

Curva Muestra Problema: Se realiza con la muestra problema

Se corre con tres reactivos:

Reactivo DOC (0.4% deoxycholate ajustado a pH 12 con NaOH)

Reactivo A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 0.1N NaOH (20g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4g NaOH en 1 litro de agua).

Reactivo B: 2% Na, tartrato de K

Reactivo C: 1% CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O

Reactivo D: Se obtiene al mezclando los reactivos A+B+C

Reactivo E: Folín a 1N (stock comercial se encuentra a 2N)

El reactivo D se mezcla en las siguientes proporciones

Total (mL)	A (mL)	B (mL)	C (mL)
51	50	0.5	0.5
101	100	1.0	1.0
25	25	0.25	0.25

Para correr el ensayo

#### CURVA TIPO:

Se preparó el stock y se usan tubos de capacidad de 5 – 10 mL a cada tubo se agrega la concentración del stock 0, 10, 20, 40, 60, 80 y cada uno se afora con agua hasta 500 (todos por duplicado) como se muestra en la tabla 3

- 1.- A cada tubo se le agregan 100 de reactivo DOC
- 2.- A cada tubo se le agregan 2 mL de reactivo D (vortexeado)

Se dejan reposar 10 minutos.

Posteriormente cada tubo se agrega 200 µl de reactivo Folín y se agita inmediatamente. Se deja reposar 30 a 60 minutos, se lee en un espectrofotómetro a una absorbancia de 710 nm

#### CURVA MUESTRA:

Se agrega la muestra problema a tubos independientes en cantidad de 25 µl-100µl

Proporciones de reactivos para ensayo de Lowry

# tubo	Muestra ABS(µl)	Muestra problema (µl)	Agua (µl)	Reactivo D (mL)	Reactivo Folín (µl)	Densidad óptica
1	10		490	2	200	
2	20		480	2	200	
3	40		460	2	200	
4	60		440	2	200	

5	80		420	2	200
6	-	25	485	2	200
7	-	25	485	2	200

### ANEXO 3. ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = mx + b$$

Dónde;

y = absorbancia

m = pendiente

x = concentración de proteína

b = ordenada al origen

De cada tratamiento la concentración de proteína fue el resultado de la multiplicación del volumen total que se obtuvo de cada alícuota por el valor antes mencionado (25  $\mu$ l).