



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON OPCIÓN A: AGRONÓMICAS O VETERINARIAS

TESIS

EXTRACCIÓN DE QUITOSANO DE CUCARACHA DE MADAGASCAR
(*Gromphadorhina portentosa*) Y SU EFECTO SOBRE *Meloidogyne incognita*

QUE PRESENTA

VÍCTOR LAURENCIO DÍAZ DE LEÓN CAMACHO

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGRONÓMICAS

COMITÉ TUTORAL

COTUTOR: DR. ALBERTO MARGARITO GARCÍA MUNGUÍA

COTUTOR: DR. CIRO LUIS ANTONIO TURCIOS PALOMO

ASESOR: DRA. LAURA EUGENIA PÉREZ CABRERA

Jesús María, Aguascalientes, junio de 2022



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 17/05/2022

NOMBRE: Víctor Laurencio Díaz de León Camacho ID: 96830

PROGRAMA: **Maestría en Ciencias con opción a: Agronómicas o Veterinarias** (del postgrado): Producción e Inocuidad Agroalimentaria.

TIPO DE TRABAJO: Teoría Trabajo Práctico

TITULO: EXTRACCIÓN DE QUITOSANO DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (*Gromphadorhina portentosa*) Y SU EFECTO SOBRE *Meloidogyne incognita*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se logró producir quitosano, que es importante como nematocida y representa una fuerte alternativa para disponer de más opciones para aplicarlo a diferentes cultivos agrícolas.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
X				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de postgrado
X				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
X				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema sobre sus cada apartado
X				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
X				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
X				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
X				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
N.A.				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
X				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
X				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
X				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, profesora, etc)
X				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Tutor
X				Concide con el título y objetivo registrado
X				Tiene congruencia con cuerpos académicos
X				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
X				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceza)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
N.A.				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base en estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado. Sí No

Elaboró: **FIRMAS**
 * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGUN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: DR. JOAQUÍN COSA RAMÍREZ
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ
 * En caso de conflicto de intereses, firma a un tercer miembro del MAB de la LGAC correspondiente diferente al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano
 Revisó: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ
 Autorizó: DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante VICTOR LAURENCIO DÍAZ DE LEÓN CAMACHO con ID 96830 quien realizó la tesis titulada: **EXTRACCIÓN DE QUITOSANO DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (*Gramphadorhina portentosa*) Y SU EFECTO SOBRE *Meloidogyne incognita***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 15 día de junio de 2022.

DR. ALBERTO MARGARITO GARCÍA MUNGUÍA
Cotutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DD-SEE-FO-07
Actualización: 05
Emisión: 17/05/19

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante VICTOR LAURENCIO DÍAZ DE LEÓN CAMACHO con ID 96830 quien realizó la tesis titulada: **EXTRACCIÓN DE QUITOSANO DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (*Gromphadorhina portentosa*) Y SU EFECTO SOBRE *Meloidogyne incognita***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 15 día de junio de 2022.



DR. CIRO LUIS ANTONIO TURCIOS PALOMO
Cotutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEC-FD-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS


P R E S E N T E

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **VICTOR LAURENCIO DÍAZ DE LEÓN CAMACHO** con ID 96830 quien realizó la tesis titulada: **EXTRACCIÓN DE QUITOSANO DE CUCARCHA DE MADAGASCAR (*Gromphadorhina portentosa*) Y SU EFECTO SOBRE *Meloidogyne incognita***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., a 15 día de junio de 2022



DRA. LAURA EUGENIA PÉREZ CABRERA
Asesora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-01
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por la oportunidad para cursar mis estudios.

A mi comité el Dr. Alberto Margarito García Munguía, el Dr. Ciro Luis Antonio Turcios Palomo y la Dra. Laura Eugenia Pérez Cabrera por la oportunidad de trabajar con ellos.

Al Dr. Ernesto González Gaona por el apoyo y las asesorías brindadas.

A la Dra. Mariana Beltrán por la ayuda en laboratorio.

Al Dr. Meraz por el apoyo que me dio en cada momento.

A mis profesores y compañeros por aprender a trabajar remotamente conmigo.

A mi familia por la paciencia.

DEDICATORIAS

A mi abuelita y mi tía que ya no están.

A mi mamá, mi esposa y mi hija.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL 1

ÍNDICE DE TABLAS 6

ÍNDICE DE FIGURAS 7

RESUMEN 10

ABSTRACT 11

INTRODUCCIÓN GENERAL 12

I. MARCO TEÓRICO 14

 1.1 NEMATODOS 14

 1.1.1 GENERALIDADES DEL CICLO DE VIDA DE LOS NEMATODOS
FITOPATÓGENOS 15

 1.1.2 *Meloidogyne spp.* 16

 1.1.3 EFECTOS NEGATIVOS DEL NEMATODO EN LAS PLANTAS 17

 1.1.3.1 CICLO DE VIDA DE *Meloidogyne spp.* 18

 1.1.3.2 DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *Meloidogyne* EN MÉXICO 20

 1.1.3.3 CONTROL DE NEMATODOS 23

 1.1.3.3.1 CONTROL CULTURAL 23

 1.1.3.3.2 CONTROL QUÍMICO 24

 1.1.3.3.3 CONTROL BIOLÓGICO 25

 1.1.3.3.4 CONTROL FÍSICO 25

 1.2 QUITOSANO 26

 1.2.1 FUENTES DE EXTRACCIÓN DEL QUITOSANO 28

1.2.1.1	QUITINA Y QUITOSANO EN INSECTOS.....	28
1.2.2	PROCESOS DE OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO	30
1.2.2.1	DESPROTEINIZACIÓN.....	31
1.2.2.2	DESMINERALIZACIÓN.....	32
1.2.2.3	PURIFICACIÓN.....	32
1.2.2.4	DESACETILACIÓN	32
1.2.3	CARACTERÍSTICAS DEL QUITOSANO	33
1.2.3.1	DISOLUCIÓN EN MEDIO ÁCIDO	34
1.2.3.2	GRADO DE N-DESACETILACIÓN	35
1.2.3.3	CONTENIDO DE CENIZAS	36
1.2.3.4	PORCENTAJE DE NITRÓGENO.....	36
1.2.4	PROPIEDADES Y USOS DEL QUITOSANO.....	36
1.3	OBJETIVOS.....	39
1.3.1	OBJETIVO GENERAL.....	39
1.3.2	OBJETIVOS PARTICULARES	39
1.4	HIPÓTESIS.....	40
1.4.1	HIPÓTESIS GENERAL	40
1.4.1.1	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	40
II.	OBTENCIÓN DE QUITOSANO	41
2.1	RESUMEN.....	41

2.2	INTRODUCCIÓN	41
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
2.3.1	CRÍA Y TRATAMIENTOS DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (<i>Gromphadorhina portentosa</i>).....	43
2.3.1.1	CRÍA DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (<i>Gromphadorhina portentosa</i>)	43
2.3.1.2	SACRIFICIO DE CUCARACHAS.....	45
2.3.1.3	TRATAMIENTO DE CUCARACHAS SACRIFICADAS PARA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO	46
2.3.2	OBTENCIÓN DE QUITOSANO.....	48
2.3.2.1	PRUEBA INDICATIVA DE PRESENCIA DE QUITOSANO	50
2.3.2.2	CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS	51
2.3.2.2.1	DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (<i>Gromphadorhina portentosa</i>).....	51
2.3.2.2.2	DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA.....	51
2.3.2.2.3	DETERMINACIÓN DE CENIZAS.....	52
2.3.2.2.4	DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS	52
2.3.2.2.5	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE N-DESACETILACIÓN	53
2.4	RESULTADOS.....	55
2.4.1	COMPOSICIÓN DE CUCARACHA.....	55
2.4.2	OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO.....	55

2.4.3	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE N-DESACETILACIÓN MEDIANTE POTENCIOMETRÍA	57
2.4.4	RENDIMIENTO.....	60
2.5	DISCUSIÓN.....	60
2.6	CONCLUSIÓN.....	62
III.	EFFECTO DE QUITOSANO DE CUCARACHA SOBRE HUEVECILLOS DE <i>Meloidogyne incognita</i>	63
3.1	RESUMEN	63
3.2	INTRODUCCIÓN.....	63
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
3.3.1	OBTENCIÓN DE HUEVECILLOS	66
3.3.1.1	AISLAMIENTO DE HUEVECILLOS	69
3.3.1.2	IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS	70
3.3.2	BIOENSAYO.....	72
3.3.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	72
3.4	RESULTADOS.....	72
3.4.1	IDENTIFICACIÓN DEL NEMATODO COLECTADO.....	72
3.4.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL QUITOSANO EN LA ECLOSIÓN DE HUEVECILLOS	74
3.4.2.1	ANALISIS ANOVA.....	75
3.4.2.1.1	PRUEBA DE TUKEY.....	77
3.5	DISCUSIÓN.....	78

3.6 CONCLUSIÓN 80

IV. CONCLUSIONES GENERALES..... 81

V. REFERENCIAS..... 82

VI. ANEXOS..... 90



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de Cucaracha de Madagascar (Oonincx & Dierenfeld, 2012) 42

Tabla 2. Materia seca de Cucaracha de Madagascar 55

Tabla 3. Porcentaje de proteína en muestras de diferentes etapas en la producción de quitosano 56

Tabla 4. Porcentaje de nitrógeno de quitina de cucaracha, quitosano de cucaracha y quitosano comercial 56

Tabla 5. Contenido de ceniza de quitosano de cucaracha y quitosano comercial. 57

Tabla 6. Proporción de grupos amino en las muestras de quitosano 60

Tabla 7. Rendimientos de quitina y quitosano con respecto a peso inicial de cucarachas secas 60

Tabla 8. Estadísticos descriptivos de Huevecillos Eclosionados en función del Tratamiento 74

Tabla 9. Resultados ANOVA de Efectos Fijos, usando Huevecillos Eclosionados como criterio 76

Tabla 10. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% 77

Tabla 11. Programación de actividades del proyecto durante los cuatro semestres del programa 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (Agrios, 1996)..... 19

Figura 2. Fotografías de las especies más comunes de nematodo agallador (Eisenback & Project, 1981)..... 20

Figura 3. Porcentaje correspondiente a cada especie en el muestreo (Cid *et al.*, 2001) 20

Figura 4. Morfología de los patrones perineales de las especies de nematodos agalladores más comunes (Eisenback & Project, 1981)..... 21

Figura 5. Distribución de *Meloidogyne* spp. en México (Cid *et al.*, 2001) 22

Figura 6. Especie de *Meloidogyne* preponderante por estado de la república (Cid, 2021) 22

Figura 7. Estructura de (a) quitina y (b) quitosano (Latil, 2017) 27

Figura 8. Esquema de la obtención de quitina y quitosano a partir de residuos de crustáceos (Lárez, 2006)..... 31

Figura 9. Reacción de la desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano (Colina *et al.*, 2015). 33

Figura 10. Enlaces de hidrógeno entre los monómeros de quitina (Giraldo, 2015)34

Figura 11. Mapa Campus Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Google, s/f) 43

Figura 12. (a) Ninfas saliendo de ooteca. (b) Cucarachas de Madagascar (adultos y jóvenes)..... 44

Figura 13. (a) Cajas plásticas grandes para cría de cucaracha. (b) Cajas plásticas chicas para cría de cucaracha. (c) Cucarachas fuera de refugio 45

Figura 14. (a) Cucarachas aisladas para su procesamiento previo a la extracción del quitosano. (b) Cucarachas congeladas..... 46

Figura 15. Seccionado y lavado de cucarachas..... 47

Figura 16. (a) Horno secador. (b) Charolas con cucarachas troceadas secándose 47

Figura 17. Molino pulverizador utilizado..... 48

Figura 18. Fotografías en microscopio estereoscópico. (1) Muestra de quitosano de cucaracha y (2) gel formado después de prueba indicativa 50

Figura 19. Equipo para analizar fibra ANKOM 51

Figura 20. Analizador de Nitrógeno/Proteína LECO FP-528 52

Figura 21. Imágenes representativas de cada una de las 7 etapas en la producción de quitosano. (a) Molino pulverizador utilizado. (2) Lavado de harina de cucaracha con agitación. (3) Disolución con extracción de minerales. (4) Disolución con extracción de proteínas. (5) Disolución con extracción de minerales en reproceso. (6) Disolución con extracción de carbonato de calcio y proteínas residuales. (7) Disolución resultante de proceso de desacetilación 54

Figura 22. Fotografías en microscopio estereoscópico de muestras de filtrado recuperado de cada etapa de producción de quitosano 54

Figura 23. Curva de titulación del quitosano comercial marca Sigma (a) y criterio de la primera derivada (b) 58

Figura 24. Curva de titulación del quitosano de cucaracha de Madagascar (a) y criterio de la primera derivada (b) 59

Figura 25. Mapa de ubicación de invernadero de donde se sustrajeron las plantas con raíces infestadas 67

Figura 26. Plantas de jitomate con síntomas causados por *Meloidogyne incognita* 68

Figura 27. Material vegetal seleccionado (raíces infestadas) 69

Figura 28. (a) De raíces con agallamiento. (b) Proceso de tamizado re raíces 70

Figura 29. Mapa INIFAP–Pabellón (Google, 2022)..... 71

Figura 30. Imágenes en estereoscopio: (a) nódulos en raíz. (b) hembra de nemátodo. (c) corte para liberación de hembras..... 71

Figura 31. Vista dorsal de *M. incognita* con objetivo 40 x localizado en la muestra 73

Figura 32. Vista microscópica de masa de huevecillos y eclosión de los mismos. 73

Figura 33. Corte perianal coincidente con *Meloidogyne incognita*..... 73

Figura 34. Gráfica de efectos principales de las medias de cada tratamiento..... 75

Figura 35. Grupos y rangos de tratamientos administrados 77

Figura 36. Intervalos de confianza simultáneos de Tukey 78

RESUMEN

En México, *Meloidogyne incognita* es el fitoparásito más importante que ataca a los cultivos, debido principalmente al porcentaje de pérdidas que ocasiona. La forma más sencilla de combatirlo es el uso de plaguicidas de amplio espectro; sin embargo, son contaminantes persistentes debido a su alta toxicidad y resistencia a la degradación. Como alternativa al uso de estos, se extrajo quitosano de cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) realizando modificaciones a los procedimientos revisados en literatura de extracción en otros insectos. El grado de *N*-desacetilación y el contenido de ceniza determinados fueron similares a los obtenidos del quitosano comercial (Sigma- Aldrich $\geq 75\%$ GD). Se evaluó el efecto de un quitosano comercial y el quitosano obtenido en la eclosión de huevecillos de nematodo agallador *M. incognita*. Se realizó un experimento *in vitro*, administrando quitosano de cucaracha en cinco diferentes concentraciones (25, 50, 100, 700 y 1000 mg/l), junto con un quitosano comercial en dos concentraciones diferentes (100 y 500 mg/l) y dos testigos: uno absoluto y uno con ácido acético 0.01% (solvente utilizado para administrar los quitosanos). Se observó un efecto inhibitorio significativo a la eclosión de huevecillos a partir del tratamiento de 50 mg/l.

Palabras clave:

Gromphadorhina portentosa, *Meloidogyne incognita*, Cucaracha, Nematodo, Quitina, Quitosano

ABSTRACT

In Mexico, *Meloidogyne incognita*. is the most important phytoparasite that attacks crops, mainly due to the percentage of losses it causes. The easiest way to combat it is the use of broad-spectrum pesticides, however, they are persistent pollutants due to their high toxicity and resistance to degradation. As an alternative to the use of these pesticides, chitosan was extracted from the Madagascar cockroach (*Gromphadorhina portentosa*), making modifications to procedures reviewed in literature for the extraction of other insects. The degree of N-deacetylation and ash content determined were like those obtained from commercial chitosan (Sigma-Aldrich $\geq 75\%$ GD). Effect of a commercial chitosan and the chitosan obtained on the hatching of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs was evaluated. An in vitro experiment was carried out, administering cockroach chitosan in five different concentrations (25, 50, 100, 700 and 1000 mg/l), together with a commercial chitosan at two different concentrations (100 and 500 mg/l) and two controls, one absolute and one with 0.01% acetic acid (solvent used to administer chitosans). A significant inhibitory effect on egg hatch was observed starting at the 50 mg/l treatment.

Key words:

Gromphadorhina portentosa, *Meloidogyne incognita*, Cockroach, Nematode, Chitin, Chitosan

INTRODUCCIÓN GENERAL

Globalmente el género más importante de nematodos fitoparásitos es *Meloidogyne*. Daña a más de 3 000 especies vegetales y es clasificado como el de mayor importancia, por el porcentaje de pérdidas que ocasiona al dañar el sistema radicular del cultivo con la formación de nódulos. (Escobar *et al.*, 2013; Salazar & Guzmán, 2013).

La forma más simple de controlar este nematodo es mediante el uso de agroquímicos plaguicidas. Estos son sustancias tóxicas originadas para interferir o alterar mecanismos fisiológicos de estos organismos. El problema es que estas sustancias podrían permanecer por décadas en concentraciones ambientalmente perjudiciales (Andrés, 2002).

Actualmente se cuenta con una limitada cantidad de sustancias de origen natural, que sean efectivas para el tratamiento de nematodos y que no sean dañinas para el ambiente, por lo que se considera área de oportunidad para la investigación.

Dentro de los métodos usados para reducir el efecto perjudicial del uso de plaguicidas para el control de fitoparásitos en las plantas, se encuentra la utilización de polímeros naturales biodegradables, tal como el quitosano. Sus propiedades tienen efectividad práctica y económica óptima, en comparación con otros mejoradores de crecimiento que son usados de manera tradicional (Kong *et al.*, 2010; Ravi, 2000; Rinaudo, 2006; Younes & Rinaudo, 2015).

El quitosano es un biopolímero obtenido al tratar la quitina. Este biopolímero no es tóxico y es biodegradable. La quitina se encuentra de manera natural en caparazones de crustáceos, insectos y algunos hongos. Actualmente se puede obtener de manera comercial a distintas concentraciones para cumplir distintos propósitos (Ayala, 2015; Hansen, 1994; Lárez, 2006).

Varios estudios se han centrado en los fuertes efectos antimicrobianos del quitosano contra diferentes grupos de microorganismos, desde bacterias hasta hongos,

parásitos y levaduras. Por lo tanto, las investigaciones sobre el quitosano y su potencial antimicrobiano han sido recientemente de particular interés. Se han realizado diferentes investigaciones del uso de quitosano como tratamiento para controlar plagas en plantas con resultados benéficos, siendo el quitosano extraído de residuos de industria camaronera el que se ha estudiado de manera frecuente (Hernández *et al.*, 2009; Velasco *et al.*, 2019).

Como ya se mencionó, el quitosano se puede obtener de los insectos (Ocier, 1823); tomando en cuenta su alta tasa de reproducción, el espacio reducido que se requiere para criarlos, el hecho de que se pueden alimentar con residuos de casi todas las industrias alimentarias y la facilidad con la que se puede extraer este biopolímero de interés, se sugiere utilizar cucarachas de Madagascar como fuente de quitosano para su estudio.

Por lo anterior, en esta investigación se evaluará el efecto del quitosano extraído de la cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) para control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 NEMATODOS

Los nematodos se consideran como el “*phylum*” del reino animal con mayor diversidad, tiene más de un millón de especies. Son los organismos multicelulares más abundantes en el mundo. En los agroecosistemas se han detectado de 10 a 30 millones por m². La mayoría pasan inadvertidos debido a su tamaño microscópico, y no se pueden percibir a simple vista (González, 2009).

Los nematodos (del griego *Nema* “hilo” y *Oidos* “con aspecto de”) son invertebrados, pseudocelomados, y aun contando con apariencia de gusano, taxonómicamente son diferentes de estos y de otros grupos de invertebrados con el mismo nombre. Se conocen alrededor de 25 000 especies, algunos se relacionan con la salud humana y animal, como *Enterobius vermicularis* y *Ascaris lumbricoides*; causan enfermedades y parasitosis como la filarisis , triquinosis, anquilostomiasis, anisakiasis, ascariasis, estrogiloidiasis y toxocariasis (Armendariz *et al.*, 2015).

Se han encontrado en todos los nichos con vegetación y aunque en general necesitan del agua para poder sobrevivir, ciertas especies de nematodo toleran sequías prolongadas. Incluso se han detectado en registros fósiles por lo que tienen presencia desde hace millones de años (Andrés, 2002).

Casi todos los nematodos parásitos de plantas son vermiformes y elongados. Se pueden distribuir por cualquier elemento que traslade partículas de suelo, como equipos cultivo, riego, inundaciones y agua de drenaje. Aunque muy lentamente, pueden moverse en el suelo por sí mismos, solo unos cuantos centímetros por temporada (Bernal, 2010).

De acuerdo con Armendariz *et al.* (2015) se pueden clasificar en estos grupos:

- I. Fitopatógenos. Son plagas muy importantes que perjudican a los cultivos. Se trata de alrededor de 4 000 especies, de las que sobresalen

Meloidogyne, *Belonolaimus*, *Longidorus*, *Trichodorus*,
Hemicriconemoides, *Paratylenchus*, *Paratrichodorus*, *Criconema*,
Xiphinema, *Criconemella*, y *Helicotylenchus*.

- II. Entomopatógenos. Son algunas especies de nematodos con la capacidad de infectar insectos y otras plagas, controlando sus poblaciones. Dentro de este grupo destacan *Steinernema* y *Heterorhabditis*.
- III. De vida libre. Tienen la labor de equilibrar y desarrollar el medio, así como una participación fundamental en las dinámicas del suelo. Dentro de este grupo se localiza la mayor parte de las especies de nematodo. De acuerdo con su alimentación se pueden asociar en diferentes grupos tróficos, como omnívoros, predadores, bacteriófagos, fitófagos y fungívoros, encontrándose en ambientes terrestres y acuáticos. Una estimación del número de estas especies asciende a un millón.

1.1.1 GENERALIDADES DEL CICLO DE VIDA DE LOS NEMATODOS FITOPATÓGENOS

La mayor parte de los nematodos fitoparásitos tienen un ciclo de vida semejante. Su desarrollo parte de huevecillos, siguiendo cuatro estadios juveniles (o larvales) para convertirse posteriormente en adultos. En la mayoría de los géneros, los juveniles son parecidos a los adultos, con la excepción de la estructura de los caracteres sexuales. En su mayoría, los nematodos eclosionan de los huevecillos en su estadio juvenil J₂. Los juveniles se mueven con ayuda del agua alrededor de las partículas del suelo y las superficies de las plantas en busca de un hospedero y un lugar para alimentarse. Casi todas las especies se alimentan en cualquiera de los estadios posteriores a su eclosión, aunque excepcionalmente en determinadas especies los machos y juveniles no se alimentan. Los machos pueden o no ser necesarios para la fertilización de los huevecillos. Los que se cruzan se denominan amfimícticos y los que no lo hacen partenogenéticos. El ciclo de vida de casi todas las especies de nematodos se completa en un periodo de entre tres y seis semanas cuando hay suficiente humedad y la temperatura del suelo se encuentra en el rango óptimo (entre 20 y 30°C), aunque hay excepciones que les toma un año. En ciertas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

especies los juveniles pueden entrar en un estado de quiescencia y así sobrevivir largos períodos de desecación. La muda de diferentes estadios de algunas especies de nematodos puede ser inducida por exudados de raíces de plantas hospederas cercanas (Jones *et al.*, 2013).

Los nematodos no se distribuyen de manera uniforme en el suelo. Normalmente se agrupan, siendo mucho más numerosos cerca de las regiones radiculares, y en menor cantidad en otras partes del campo, esto debido a los tipos de suelo, a la humedad y a diversas circunstancias biológicas y físicas (Bernal, 2010).

1.1.2 *Meloidogyne spp.*

Globalmente el género más importante de nematodos fitoparásitos es *Meloidogyne*. Parasita a más de 3 000 especies vegetales y es clasificado como el de mayor importancia, por el porcentaje de pérdidas que ocasiona (Martínez *et al.*, 2019).

Se denominan nematodos formadores de nudos, nódulos o agallas. Estas últimas son destructivas y pueden causar daños extensos a las plantas que las presentan. Esto dependerá de las condiciones de humedad, temperatura, disposición del suelo y tipo de hospedero. Entre los cultivos más afectados se encuentran el tomate, el banano, el maní, el tabaco, el café, el cacao, el algodón, el coco y la soja. En regiones templadas, en cereales como papas, remolachas, maíz y frijoles y otras hortalizas. En las raíces se encuentran las fases sedentarias, que comprenden hembras adultas, larvas J₃ y J₄ y huevecillos. En suelos infectados sin cultivo se localizan estadios juveniles J₂, machos adultos y huevecillos en diversos estadios (Andrés, 2002).

Según Bernal (2010) los nematodos no se distribuyen de manera homogénea en el suelo, sino agregada, por lo que antes de plantar un cultivo hortícola, es recomendable realizar análisis de suelo para evaluar la población de juveniles J₂. En plantas susceptibles, una infestación baja al inicio se convierte en una infestación alta a mitad del cultivo.

El desarrollo de *Meloidogyne* se ve influenciado directamente por su alimentación. En ausencia de alimento, los juveniles J₂ agotan sus reservas, envejecen y su infectividad disminuye. Cuando la comida es abundante, la mayoría de las larvas se convierten en hembras, y cuando la comida es limitada, las larvas se convierten en machos. La infectividad de las larvas decrece conforme son más viejas. Sus condiciones óptimas de temperatura están entre 15 y 30° C. Las temperaturas inferiores a 5° C y superiores a 35° C son desfavorables. Las variaciones en el pH del suelo entre 5 y 8 no tienen ningún efecto. La eclosión de las etapas juveniles está influenciada por la humedad del suelo, la sequía excesiva puede ralentizar o incluso matarlos. Los huevecillos al estar rodeados por una capa mucilaginosa que los protege pueden sobrevivir a las sequías. (Bernal, 2010).

1.1.3 EFECTOS NEGATIVOS DEL NEMATODO EN LAS PLANTAS

Meloidogyne produce nódulos en el sistema radicular de las plantas. Estos impiden la absorción de agua y nutrientes, provocando el marchitamiento y amarillamiento de los bordes de las hojas, reduciendo la producción del cultivo hasta que finalmente mata la planta. También existe una acción sinérgica de los nematodos con enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus, lo que provoca daños más graves que los que provoca cada agente por separado. (Agrios, 1996; Bernal, 2010; González, 2009).

Meloidogyne spp. se caracteriza por ser polífago y tener un rango amplio de hospederos, particularmente en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas en las regiones aéreas de las plantas por ataque de *Meloidogyne spp.* no son específicos, se pueden confundir con aquellos ocasionados por ataques de otros organismos, como pueden ser insectos, bacterias, hongos, virus o incluso por insuficiencias nutricionales. Estos síntomas son un tamaño menor al usual, falta de vigor, marchitamiento y deficiencias nutricionales (Salazar & Guzmán, 2013).

Estos nematodos forman agallas o nódulos en las raíces de las plantas hospederas, lo que les otorga un aspecto muy característico. Debido a esto, se considera importante promover la práctica de inspeccionar las raíces de las plantas que presentan la sintomatología descrita anteriormente.

Las raíces infestadas por *Meloidogyne spp.* son más cortas y tienen menor cantidad de pelos radiculares y raíces laterales. Las raíces agalladas por este nematodo no pueden absorber ni transportar agua ni nutrientes, por lo que la planta detiene su crecimiento y comienza a marchitarse. Además, la infestación predispone a las plantas al ataque de hongos y bacterias, ya que utilizan las heridas como vía de entrada. Además de lo anterior, *Meloidogyne* provoca necrosis en raíces y tubérculos muy infestados; cuando los elementos vasculares de las branquias se rompen, el flujo de nutrientes y agua se interrumpe mecánicamente. Todo esto se debe a que fisiológicamente el ataque de estos nematodos aumenta la producción de proteínas en los nódulos y provoca funcionamiento incorrecto de los mecanismos de crecimiento entre el tallo y la raíz. (Bernal, 2010; J. Á. Martínez *et al.*, 2019; Salazar & Guzmán, 2013; Sánchez, 2010).

Villar *et al.* (2009), demostró que la resistencia de algunos cultivares a determinados hongos y oomicetos del suelo puede inhibirse si son previamente infectados por nematodos agalladores como *Meloidogyne spp.* por lo que evitar esta infestación se considera de importancia también para evitar otros patógenos.

1.1.3.1 CICLO DE VIDA DE *Meioiodogyne spp*

El ciclo de vida de *Meioiodogyne spp.*, dura de tres a cuatro semanas en hospedantes susceptibles presentes en suelos livianos con temperaturas que entre 25 y 30°C, y puede ocurrir entre tres y diez generaciones por año. Su ciclo biológico comienza con el huevecillo, luego pasa por cuatro estados larvales para convertirse en adulto. El huevecillo lo deposita una hembra parcial o totalmente incrustada en la raíz de la planta hospedera, en una masa gelatinosa que los mantiene agregados en ella o en

sacos, con hasta mil huevecillos en una misma masa, que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra. El desarrollo del huevo comienza unas pocas horas después de la oviposición, dando como resultado dos, cuatro, ocho o más células, hasta que se desarrolla una larva, que tiene un estilete enrollado en la membrana del huevo. Esta larva de primer estadio puede moverse dentro del huevo, pero no es muy activa. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil ver la cutícula del primer estadio desprendida, sobresaliendo más allá de la cabeza de la larva del segundo estadio. Poco después, la larva de segundo estadio (J₂) emerge a través de un agujero en un extremo del huevo, que perfora mediante pinchazos repetidos con el estilete. Cuando está completamente desarrollado con temperatura y humedad favorables, puede o no abandonar inmediatamente la masa mucilaginosa. Varias larvas emergidas generalmente se encuentran en la masa de huevos junto con huevos en varias etapas de desarrollo (Sánchez, 2010).

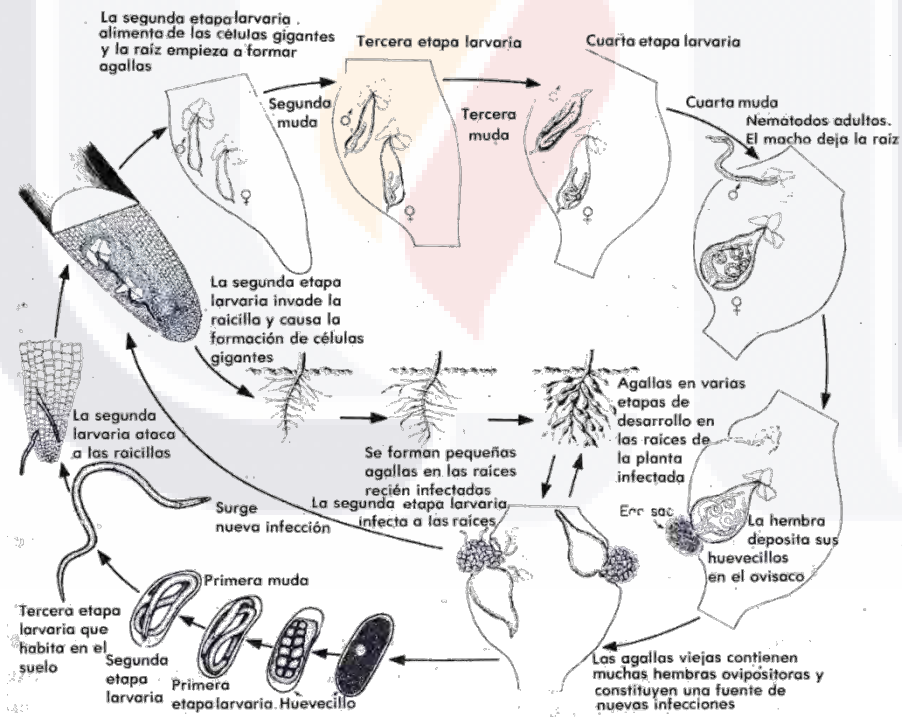


Figura 1. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (Agrios, 1996)

1.1.3.2 DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *Meloidogyne* EN MÉXICO

Las especies de nematodos agalladores más comunes son las que se observan en la Figura 2, y la clave para su identificación está basada en la morfología de los patrones perineales que se pueden ver en la Figura 4

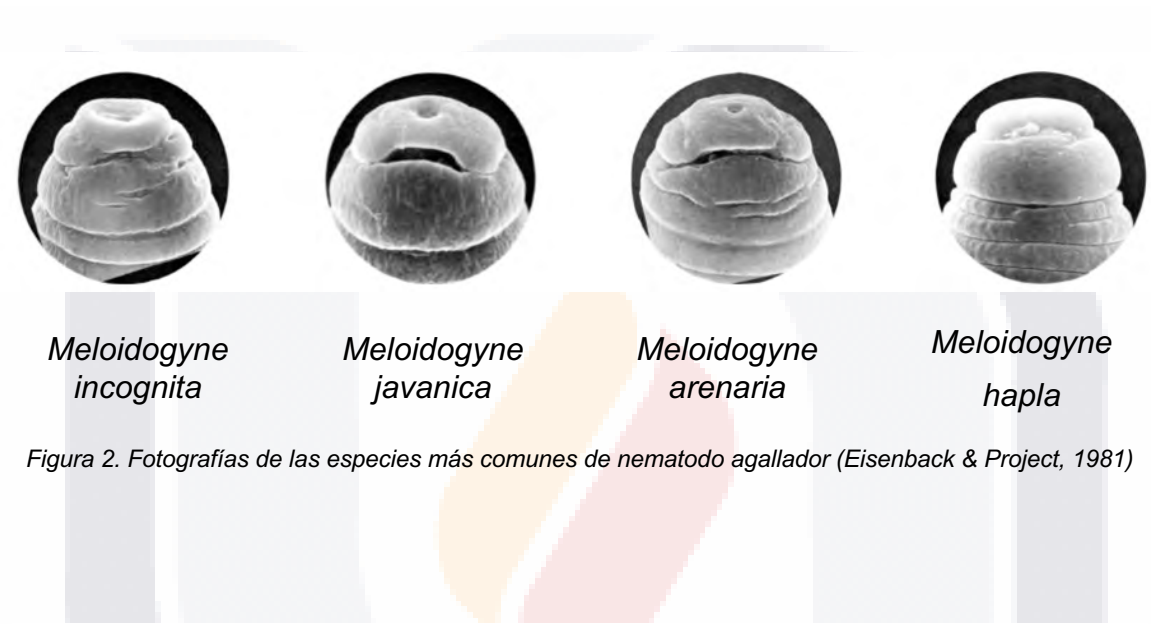


Figura 2. Fotografías de las especies más comunes de nematodo agallador (Eisenback & Project, 1981)

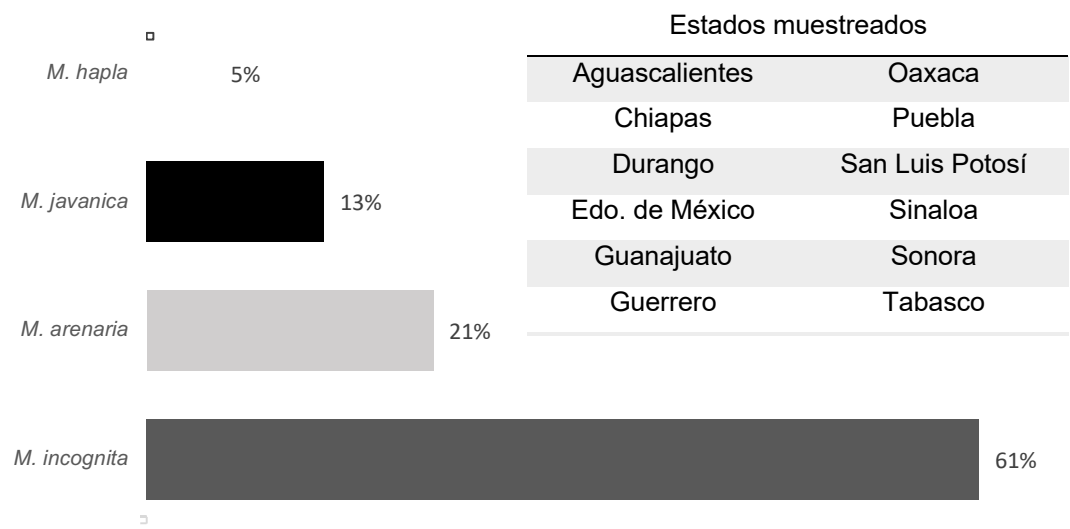


Figura 3. Porcentaje correspondiente a cada especie en el muestreo (Cid et al., 2001)

En 2001, a partir de cultivos agrícolas, Cid obtuvo 56 poblaciones de nematodos, muestreadas aleatoriamente en 47 localidades, distribuidas en 18 estados de la república (Figura 3 y Figura 5). Como se observa en la Figura 5, existe más de una especie de *Meloidogyne* en cada estado muestreado, y *Meloidogyne incognita* es la más preponderante.

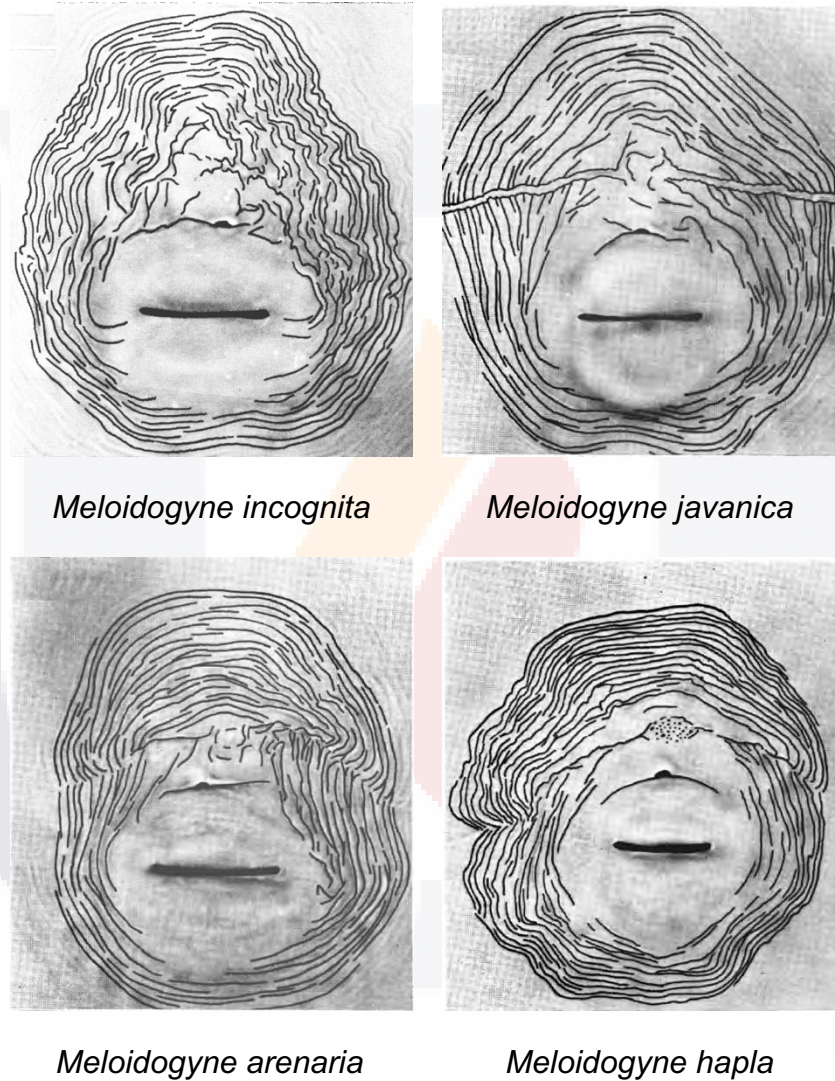


Figura 4. Morfología de los patrones perineales de las especies de nematodos agalladores más comunes (Eisenback & Project, 1981)

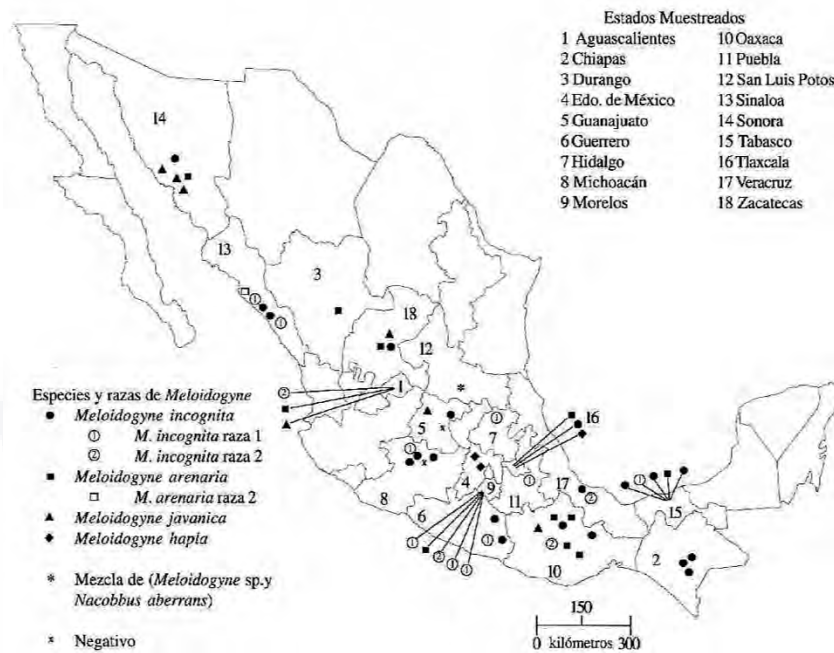


Figura 5. Distribución de *Meloidogyne* spp. en México (Cid et al., 2001)

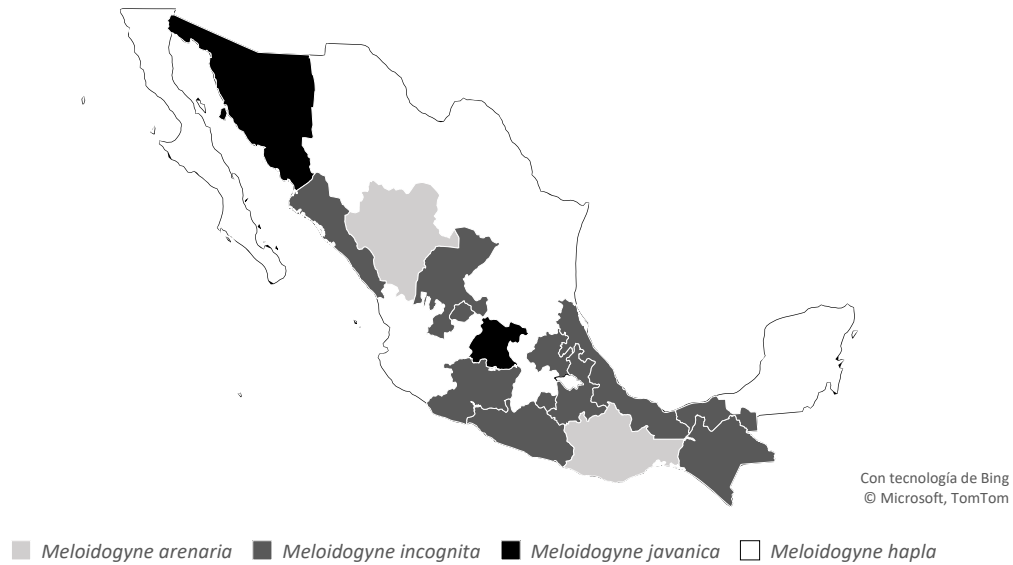


Figura 6. Especie de *Meloidogyne* preponderante por estado de la república (Cid, 2021)

Dentro de la zona se reporta en literatura la diseminación de nematodos *Meloidogyne* spp. de la siguiente manera: En áreas irrigadas y de temporal en

AGUASCALIENTES, SAN LUIS POTOSÍ Y ZACATECAS (1998-2000) (Velásquez, 2001) en chile, frijol, calabaza, cebolla, alfalfa, girasol y durazno, y la maleza *Amaranthus graecizans*. Adicional, y de manera particular en Aguascalientes, se reporta en Guayaba y vid (Cid *et al.*, 2001). Información de Cid (2021) revela cuál es la especie de *Meloidogyne* preponderante por estado de la república (Figura 6).

1.1.3.3 CONTROL DE NEMATODOS

En los últimos años se han realizado diferentes exploraciones para controlar a *Meloidogyne*. Desde la aplicación de diversos productos químicos, biológicos y orgánicos hasta el desarrollo de variedades resistentes. Esta resistencia es útil, pero no es definitiva, ya que, a temperaturas superiores a los 27° C en suelo, la resistencia cesa. Además, es casi imposible obtener una variedad que sea resistente a todas las especies de *Meloidogyne* (Bernal, 2010).

1.1.3.3.1 CONTROL CULTURAL

Prácticas culturales como inundación, barbecho, aplicación de fertilizantes orgánicos y cultivos de cobertura reducen las poblaciones de nematodos. Estas prácticas provocan condiciones hostiles, por lo que se ve afectada su capacidad para sobrevivir, multiplicarse y causar enfermedades. Se considera también la eliminación de malezas, ya que pueden ser utilizadas como hospedero para sobrevivir. La rotación de cultivos en invernaderos no es efectiva en el caso de *Meloidogyne*, ya que todos los cultivos que se rotan son susceptibles. (Bernal, 2010).

1.1.3.3.2 CONTROL QUÍMICO

En la actualidad, la opción para control de nematodos más utilizada es el uso de productos químico-sintéticos. Varios de estos productos son de doble acción y son utilizados contra insectos y nematodos. Es reconocida la eficacia de algunos pesticidas como el carbofurano, fenamifos, el oxamil, el aldicarb y el etoprop, que protegen a las plantas del ataque de los nematodos y previenen la disminución de rendimientos cuando se usan correctamente (Bernal, 2010).

Estos nematicidas químicos se pueden clasificar por su volatilidad. Los fumigantes (hidrocarburos halogenados o precursores de isotiocianatos), que ofrecen un control superior de estos fitopatógenos, y los no fumigantes (organofosforados o carbamatos inhibidores de la acetilcolina) que poseen un espectro de acción más estrecho. Actúan matando o desorientando el comportamiento de los nematodos debido a su efecto sobre su sistema nervioso. El tiempo de aplicación, la ubicación, la distribución del suelo, la retención de componentes volátiles, el lavado del producto y la degradación microbiana acelerada debido a aplicaciones repetidas son los factores que afectan la eficacia de estos nematicidas (Bernal, 2010).

Andrés (2002) afirma que el uso de todos los compuestos químicos que tienen actividad nematicida, en mayor o menor medida, tienen un alto riesgo de contaminación ambiental y pueden llegar a ser altamente tóxicos tanto para el productor como para el consumidor.

Los agricultores suelen utilizar bromuro de metilo para desinfectar el suelo. Este biocida no debe usarse, porque daña la capa de ozono, y existen compromisos (Protocolo de Montreal) firmados por varios países para deshacerse de esta sustancia. Existen alternativas químicas a este último, como inline (1,3 dicloropropeno 67%, cloropicrina 33%) y Midas (yoduro de metilo) (Bernal, 2010).

1.1.3.3.3 CONTROL BIOLÓGICO

Según Sanchez (2010), es una de las opciones más inocuas para el medio ambiente. Hay una serie de agentes biológicos, incluidos algunos hongos, bacterias y extractos de algas que pueden limitar el aumento de la población de nematodos. Uno de los grupos de hongos nematófagos a destacar son los atrapadores de nematodos, principalmente de los géneros *Arthrobotrys*, *Monacrosporium* y *Dactylaria*.

El uso de materia orgánica para el acondicionamiento del suelo es una buena opción para el manejo de *Meloidogyne spp.* (Sanchez, 2010). Utilizar enmiendas orgánicas genera un efecto positivo debido a los subproductos metabólicos tóxicos que se producen en su degradación y al incremento de hongos y bacterias antagónicas a los nematodos que conducen a una reducción del nivel de la población del nematodo. Se ha encontrado que hay un aumento significativo de *Bacillus spp.* y *Pseudomonas fluorescentes* cuando enmiendas son agregadas al suelo. De esta manera, a medio y largo plazo se crea un equilibrio que favorece a la flora beneficiosa. Los abonos frescos no se recomiendan, debido a que pueden causar quemaduras en las raíces (Bernal, 2010).

1.1.3.3.4 CONTROL FÍSICO

Los nematodos tienen resistencia limitada al estrés físico. Los límites entre las especies varían según sus características fisiológicas y la etapa de desarrollo. Los métodos más comunes son la aplicación de calor seco o húmedo y el secado. En parcelas pequeñas y en ambientes protegidos, es común el uso de vapor para esterilizar los sustratos. La termoterapia, la inmersión en agua caliente (40-50°C) por un tiempo breve, es un método eficaz para controlar los nematodos que atacan los bulbos. La desecación del suelo se produce volcando el arado durante 2-4 semanas. El número de nematodos también pueden reducirse a través de un

proceso de inundación. Consiste en producir una acumulación de amonio y reducir el oxígeno a cero durante dos semanas (Sanchez, 2010).

1.2 QUITOSANO

Dentro de los métodos que se han utilizado para evitar los efectos adversos del uso de agroquímicos pesticidas para el control de fitoparásitos en las plantas, se encuentra el uso de polímeros naturales biodegradables. Entre estos biopolímeros se han utilizado la quitina y el quitosano debido a la infinidad de aplicaciones que se les han encontrado, y, sobre todo, por su bajo impacto ambiental. Sus características demuestran una eficacia práctica y económica superior a la de otros reguladores de crecimiento utilizados tradicionalmente (Reyes *et al.*, 2019).

La quitina es precursora del quitosano, por lo que están relacionados químicamente; la quitina, es una poli(β -N-acetil-glucosamina), que, por medio de una reacción de desacetilación que elimina más del 50% de sus grupos acetilo, puede convertirse en quitosano (poli(β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100%, se conoce como quitano. La quitina y el quitosano tienen la ventaja de que se conocen en la naturaleza desde hace millones de años (Lárez, 2006).

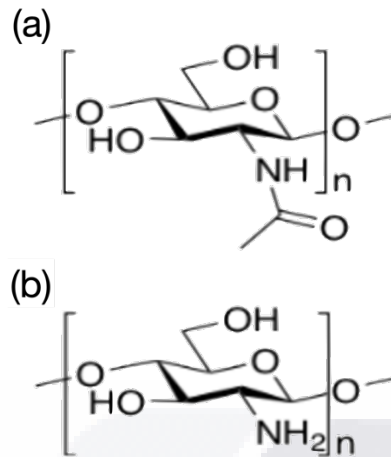


Figura 7. Estructura de (a) quitina y (b) quitosano (Latil, 2017)

Después de la celulosa, la quitina es el polímero natural más abundante en la naturaleza, con una tasa de reposición de hasta el doble que la de la celulosa. Por lo tanto, ha sido identificado como un importante recurso renovable (Escobar *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2009; Lárez, 2006).

En su forma natural, la quitina está parcialmente desacetilada. La diferencia entre quitina y quitosano es prácticamente arbitraria, ya que no existen formas completamente acetiladas o desacetiladas en la naturaleza ni como productos finales de un proceso; por tanto, en la práctica, el polímero con mayor acetilación se denomina quitina, y el más desacetilado, quitosano. (Hansen, 1994).

De hecho, si prestamos atención a innumerables demostraciones paleontológicas, se puede suponer que la quitina tiene una edad de al menos 570 millones de años, habiéndose encontrado en el exoesqueleto de artrópodos acuáticos fósiles (trilobites), que se remontan a la era Paleozoica. (Lárez, 2006).

1.2.1 FUENTES DE EXTRACCIÓN DEL QUITOSANO

La quitina y el quitosano son polímeros biofuncionales con amplias aplicaciones en el área de la biotecnología, ya que tienen una serie de propiedades, incluidas la biodegradabilidad y biocompatibilidad (Colina *et al.*, 2015).

La quitina se asocia con sales inorgánicas, como carbonatos de calcio, pigmentos, proteínas y lípidos. Así, el proceso convencional por métodos químicos para la obtención de quitina consta principalmente de tres etapas: eliminación de lípidos y proteínas con disolventes, desmineralización con ácidos diluidos, y finalmente blanqueo con una solución de hipoclorito de sodio (Sánchez, 2010).

Las principales fuentes comerciales de la quitina y el quitosano proceden de los desechos de la producción de la industria de alimentos marinos, los cuales se obtienen solo por temporada (Monter *et al.*, 2016). Pero es fundamental resaltar que este material puede extraerse a partir de las paredes celulares de hongos y levaduras, así como del exoesqueleto de artrópodos, como lo son los insectos. Los insectos como la cucaracha son posibles fuentes de quitosano, debido a su alta tasa de reproducción (Velasco *et al.*, 2019).

1.2.1.1 QUITINA Y QUITOSANO EN INSECTOS

La quitina rara vez existe en forma pura en la naturaleza, generalmente se encuentra en una matriz compleja con otros compuestos. La cutícula de crustáceos, como cangrejos, camarones y cangrejos de río se compone generalmente de quitina en una matriz con proteínas y minerales (principalmente calcio). Por el contrario, la cutícula de los insectos está compuesta de quitina en una matriz con proteínas cuticulares, lípidos y otros compuestos. Aunque la mayoría de los insectos contienen solo cantidades insignificantes de minerales en su cutícula, hay algunas especies como las pupas de la mosca de la cara (*Musca autumnalis*) y las larvas de la mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) que contienen cantidades significativas de calcio en su cutícula. Aunque la fibra detergente ácida (FDA) o la fibra cruda (FC)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pueden ser una estimación precisa de la quitina de los mariscos, las diferencias estructurales entre la cutícula de los insectos y la cutícula de los mariscos significa que el uso de FDA o FC puede no resultar en una estimación precisa de la quitina de los insectos. Existen pocos datos cuantitativos sobre el contenido de quitina de los insectos completos, pero usando un ensayo enzimático. Cauchie (2002) informó que las larvas de insectos acuáticos contenían entre 2.9 y 10.1% de quitina en peso seco (Finke, 2007).

Los insectos contienen cantidades significativas de fibra medida por fibra cruda, fibra detergente ácida (FDA) o fibra detergente neutra (FDN). Siempre se ha asumido que la fibra de los insectos representa quitina en base a la similitud estructural entre la celulosa y la quitina, y el hecho de que la fracción FDA de los insectos contiene nitrógeno (Finke, 2007).

Varios autores han sugerido que la quitina podría contribuir con una cantidad significativa de nitrógeno de los insectos y, por lo tanto, estimar la proteína usando nitrógeno 6.25 podría resultar en una sobreestimación del verdadero contenido de proteína de un insecto (la suma de los aminoácidos). En la mayoría de los casos, cuando se analizan insectos en busca de aminoácidos y donde se informan todos los aminoácidos, la recuperación relativamente alta de nitrógeno como aminoácidos sugiere que el nitrógeno de la quitina es una fracción relativamente pequeña del contenido total de nitrógeno del insecto. La quitina está presente solo en la exocutícula y endocutícula del insecto y en la mayoría de los insectos; la proteína, no la quitina, es el compuesto predominante en la cutícula (Kramer *et al.*, 1995). Estos datos respaldan el hecho de que el nitrógeno de la quitina representa una fracción bastante pequeña del nitrógeno total del insecto. Aunque se prefiere un análisis detallado de aminoácidos, parece que el nitrógeno 6.25 proporciona una estimación razonable de la proteína total para la mayoría de los insectos (Finke, 2007).

Existe gran cantidad de información sobre la producción de quitina y quitosano a partir de insectos (Basseri *et al.*, 2019; Kaya *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Monter *et al.*, 2016; Shahraki *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2018; Wanule *et al.*,

2014; Wu, 2011), los rendimientos reportados (Kim *et al.*, 2017; Shahraki *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018) van de 5-20% para la quitina y del 1-10% para el quitosano con respecto al peso seco, aunque no se encuentran datos que informen sobre el porcentaje de quitina o quitosano que representa de la fibra detergente ácida o fibra cruda puntualmente. Kim (2017) reporta que un rendimiento de 61% de quitosano con respecto a la quitina, de igual manera Shahraki (2018) reporta un rendimiento entre 70-80% y Song (2018) 74%.

1.2.2 PROCESOS DE OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO

Las técnicas de extracción varían en la literatura y dependen en gran medida de las características de la fuente. La mayor parte de las técnicas desarrolladas son procesos químicos de hidrólisis de proteínas y eliminación de materia inorgánica (Colina *et al.*, 2015).

Químicamente, los procesos de obtención de quitina y quitosano son bastante sencillos, aunque el tratamiento con álcali concentrado a una temperatura relativamente alta conlleva muchos riesgos y efectos nocivos para el medio ambiente (Lárez, 2006). Además, ambos procesos pueden concatenarse fácilmente (Figura 8).

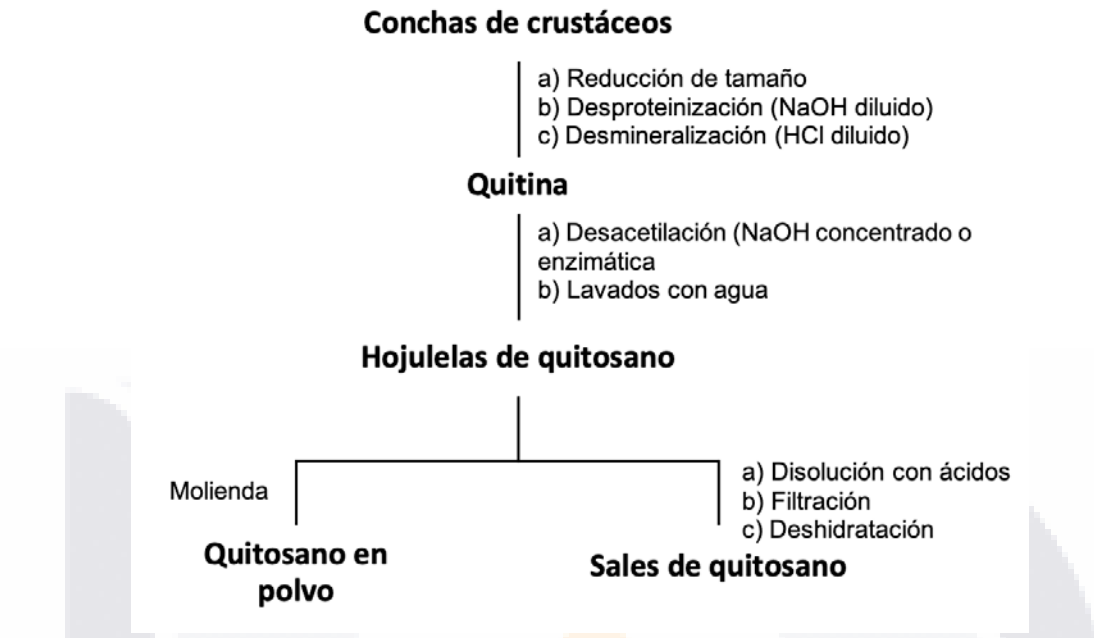


Figura 8. Esquema de la obtención de quitina y quitosano a partir de residuos de crustáceos (Lárez, 2006)

1.2.2.1 DESPROTEINIZACIÓN

El proceso para desproteínizar consiste en tratar los exoesqueletos con una solución acuosa diluida de NaOH a altas temperaturas (65-100°C) con el fin de disolver las proteínas. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0.5 y 72 horas. (Kim *et al.*, 2017; Monter *et al.*, 2016; Radwan *et al.*, 2012; Y. Song *et al.*, 2018; Wanule *et al.*, 2014) Hay que tener en cuenta que tratamientos prolongados o a muy altas temperaturas pueden provocar la rotura de cadenas y la desacetilación parcial del polímero. También se ha reportado el uso de otros agentes para este proceso, entre los que se mencionan Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, Na₃PO₄ y Na₂S (Colina *et al.*, 2015).

1.2.2.2 DESMINERALIZACIÓN

El principal componente inorgánico es el CaCO_3 , que puede eliminarse mediante soluciones diluidas de HCl (hasta 10%) a temperatura ambiente. También se han utilizado otros ácidos como HNO_3 , HCOOH , HNO_3 , H_2SO_4 , y CH_3COOH . El tiempo de tratamiento y la concentración de ácido dependen de la fuente. Es importante evitar tratamientos a temperaturas muy elevadas, ya que estas provocan la degradación del biopolímero (Monter *et al.*, 2016). El uso del agente acomplejante EDTA puede reducir la degradación (Colina *et al.*, 2015) Una vez finalizada esta etapa se obtiene la quitina.

1.2.2.3 PURIFICACIÓN

Para obtener una quitina libre de residuos de carbonato de calcio, Escobar *et al.* (2013) llevó a cabo una etapa adicional a las mencionadas anteriormente. Consiste en sumergir a la quitina en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a concentraciones del 3-3.5%, en una relación 1:5, a una temperatura de 100°C durante 1 hora.

1.2.2.4 DESACETILACIÓN

La desacetilación se realiza por hidrólisis de los grupos acetamida en medio alcalino concentrado, a altas temperaturas (Kim *et al.*, 2017; Monter *et al.*, 2016; Radwan *et al.*, 2012; Y. Song *et al.*, 2018; Wanule *et al.*, 2014). La reacción se lleva a cabo utilizando soluciones concentradas de NaOH o KOH (30–50%) a temperaturas superiores a 100°C, de preferencia en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras, como el NaBH_4 o el Na_2SO_3 , con la finalidad de impedir la despolimerización. Las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, como el material de partida, el pretratamiento, y el grado de desacetilación requerido. El grado máximo de desacetilación no suele superar el 75 al 85% (Colina *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Monter *et al.*, 2016; Radwan *et al.*, 2012; Y. Song *et al.*, 2018; Wanule *et al.*, 2014).

La quitina es un polímero semicristalino, por lo que cuando tiene lugar la desacetilación, la reacción ocurre principalmente en las regiones amorfas. Los tratamientos prolongados provocan la degradación del polímero, sin que se produzca un aumento significativo del grado de desacetilación (Colina *et al.*, 2015).

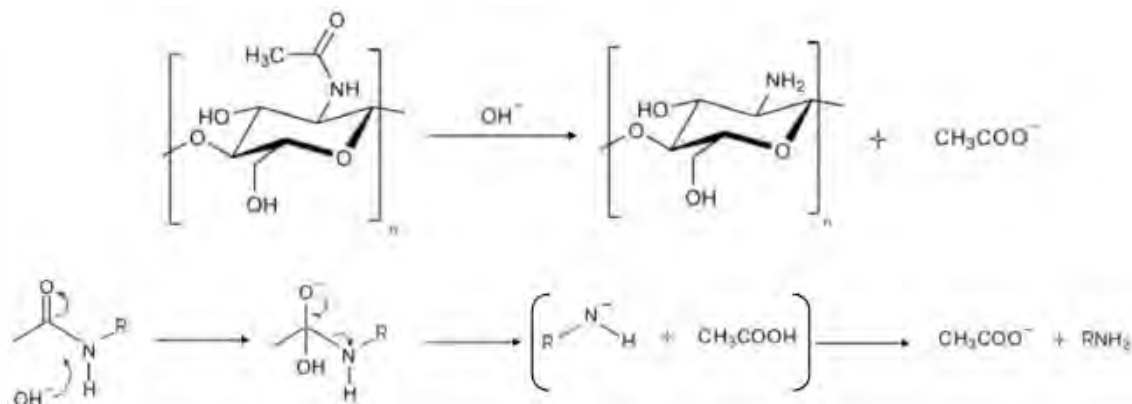


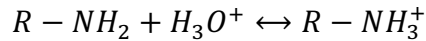
Figura 9. Reacción de la desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano (Colina *et al.*, 2015).

1.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL QUITOSANO

La quitina y el quitosano son poliglucosaminas que se distinguen por el grado de acetilación de los grupos amino. La quitina generalmente tiene un grado de acetilación entre 70 y 95%, lo que corresponde a un contenido de acetilo de un 15-20.7%, mientras que el quitosano tiene un grado de *N*-acetilación entre 15 y 25%, lo que corresponde a 3.2-5.3% del contenido de acetilo. El grado de *N*-acetilación es el parámetro más importante que determina sus características funcionales y fisiológicas y lo hace adecuado para su aplicación en diversos campos (Escobar *et al.*, 2013).

1.2.3.1 DISOLUCIÓN EN MEDIO ÁCIDO

Giraldo (2015) afirma que cuando se agrega quitosano a una solución ácida, sus grupos amino se ionizan con los iones H_3O^+ de la solución, como se observa en la reacción:



Al protonar los grupos amino, el quitosano se convierte en un polielectrolito catiónico soluble. Lo que ocurre físicamente es que, al estar ionizadas las aminas, no pueden formar puentes de hidrógeno con los ácidos carboxílicos del siguiente monómero (Figura 10), reduciéndose el impedimento a la rotación; además, la molécula de acetilo es más pesada que la amina y, al reducir su presencia, se ofrece una mayor rotación estérica, aumentando la flexibilidad de la cadena polimérica y facilitando que el quitosano se transforme en fluido. Por otra parte, el paso al estado líquido también se produce gracias a que se altera el estado de carga del quitosano, y este pasa a ser un poli ión positivo, y, por tanto, empieza a formar parte de los iones disueltos en el medio acuoso (Wang *et al.*, 2006).

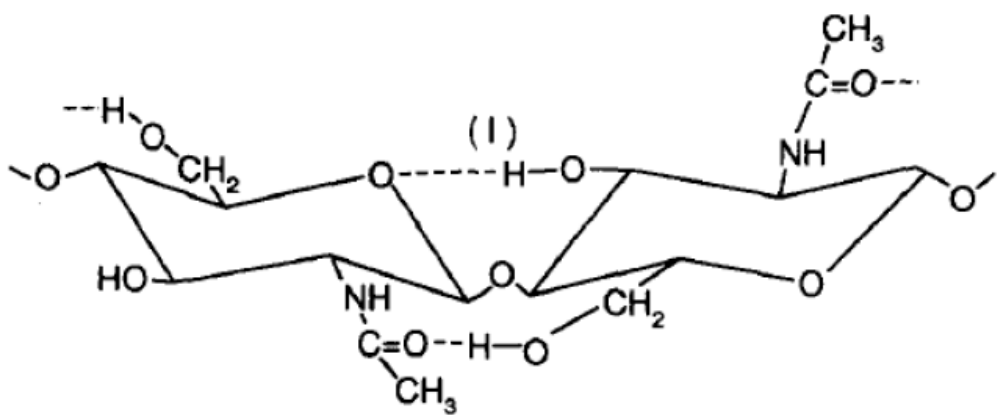


Figura 10. Enlaces de hidrógeno entre los monómeros de quitina (Giraldo, 2015)

El quitosano normalmente es soluble a un pH inferior a 6, y los factores que deben tenerse en cuenta a la hora de solubilizarlo son el grado de desacetilación y la distribución de los grupos acetilo y amino a lo largo de la cadena. El grado de

ionización también es importante y, por lo general, el quitosano se disuelve alrededor de un valor de 0.5 (Giraldo, 2015).

El mejor solvente para solubilizar el quitosano es el ácido fórmico, el más utilizado es el ácido acético, también es soluble en ácido clorhídrico, nítrico y cítrico e insoluble en ácido sulfúrico y fosfórico (Giraldo, 2015).

El quitosano es soluble en ácido, pero no en agua. La viscosidad difiere según el tipo de ácidos utilizados para disolverlo. El ácido acético al 0.5% es un solvente adecuado de quitosano al 2.0% (Du *et al.*, 1997).

1.2.3.2 GRADO DE N-DESACETILACIÓN

El procedimiento para la determinación del grado de *N*-Desacetilación (Escobar *et al.*, 2013; Velasco *et al.*, 2019) consiste en disolver el quitosano con un exceso de HCl para promover la protonación del grupo amino libre del quitosano. Esta disolución se titula con una solución de NaOH. Así se obtiene una curva de pH contra ml de NaOH añadidos, que tiene dos puntos de inflexión; la diferencia entre ellos se corresponde a la cantidad de ácido requerida para protonar los grupos amino del quitosano; El grado de *N*-desacetilación se calculará utilizando la siguiente expresión:

$$\%NH_2 = \frac{16.1 (y - x)}{w} f \quad (1)$$

Donde:

y es el punto de inflexión mayor

x el menor (como volúmenes)

f es la molaridad de la solución de NaOH

w es la masa en gramos de la muestra

16.1 es un factor que está asociado al tipo de proteína presente.

1.2.3.3 CONTENIDO DE CENIZAS

El contenido de cenizas indica de la efectividad del proceso de desmineralización. Estas cenizas (concretamente el calcio) también afectan la solubilidad del quitosano, y su contenido está relacionado con las propiedades, el origen y las condiciones del procesamiento. Por esto se puede afirmar que el contenido de cenizas demuestran la pureza del quitosano (Colina *et al.*, 2015). Hernández (2009) reportó porcentajes de ceniza en tres quitosanos diferentes, con valores de 1.4, 0.48 y 0.61.

1.2.3.4 PORCENTAJE DE NITRÓGENO

Martínez (2019) determinó contenidos de nitrógeno de 5.96 y 5.55% para quitosano extraído de exoesqueletos de camarón estero y de altamar respectivamente. Dentro del mismo estudio determinó el contenido de nitrógeno en la quitina precursora de estos quitosanos, con valores de 5.28% para la quitina de camarón estero y 5.77% para la quitina de camarón de altamar. Por su parte Briceño (2008) determinó un contenido de nitrógeno de 4.96% en un proceso de recuperación de quitina de residuos del procesamiento industrial del cangrejo azul (*Callinectis sapidus*) y del camarón (*Litopenaeus vannamei*).

1.2.4 PROPIEDADES Y USOS DEL QUITOSANO

El quitosano es un polímero catiónico caracterizado por una gran cantidad de grupos amino y, a diferencia de la quitina, es soluble en medios ácidos (Monter *et al.*, 2016).

El quitosano se caracteriza por poseer una carga positiva, debido a sus enlaces β -1-4 de la N-acetil-D-glucosamida, lo cual le confiere potenciales aplicaciones en diversos campos de investigación. Este biopolímero es biodegradable, no es tóxico, y es biocompatible con humanos y animales. Gracias a las propiedades funcionales y fisicoquímicas del quitosano, ha sido posible identificar un gran número de aplicaciones en diversos campos como: alimentación, agricultura, medicina, cosmética y farmacia. Se han reportado varios métodos fisicoquímicos para su producción y caracterización; su aplicación se limita de acuerdo a la variación en su composición química, grado de desacetilación, tamaño de la cadena polimérica y pureza. La fuente de quitina y los procesos de desacetilación descontrolados son los principales factores que afectan las propiedades finales del quitosano (Hernández *et al.*, 2009).

Está ampliamente comprobado que el quitosano estimula el crecimiento de las plantas, acelera el ciclo del cultivo, ayuda a mantener el equilibrio hídrico, tiene un fuerte efecto en el aumento del rendimiento, y alarga la vida poscosecha de los frutos. Su acción tiene una clara relación en la defensa de las plantas frente a microorganismos patógenos y en la potenciación de la actividad de los mecanismos de defensa de las plantas en condiciones de estrés (Reyes *et al.*, 2019).

El quitosano es, como otros polisacáridos, susceptible a una variedad de mecanismos de degradación, incluyendo oxidativo-reductor, despolimerización por radicales libres, hidrólisis ácida, alcalina y catalizada enzimáticamente (Khalil & Badawy, 2012). El efecto antimicrobiano del quitosano es atribuido a su capacidad quelante y a la presencia de un grupo amino cargado positivamente que puede interactuar con compuestos con carga opuesta presentes en las superficies microbianas. Algunos autores han reportado que el grupo amino en la posición del carbono 2 del residuo de glucosamina es el que le da la característica antimicrobiana al quitosano (Ayala, 2015).

El quitosano y sus derivados han sido utilizados en una gran variedad de aplicaciones, pero las propiedades y la eficacia de estos materiales dependen de su tamaño molecular. Se ha empleado en solución para inhibir el crecimiento de

microorganismos como *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y patógenos postcosecha comunes, además de que se ha reportado que disminuye el crecimiento de los hongos *Trichophyton equinum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopusstolonifer* y *Aspergillus niger*.



1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

1. Producir quitosano a partir de exoesqueletos de la cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) y evaluar su efecto nematocida en huevecillos de *Meloidogyne incognita*.

1.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un procedimiento de obtención de quitosano partiendo de cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*).

2. Determinar el grado de desacetilación del quitosano obtenido mediante titulación potenciométrica.

3. Comparar el efecto inhibidor de eclosión del quitosano de cucaracha de Madagascar (*G. portentosa*) y un quitosano comercial contra huevecillos de *Meloidogyne incognita*.

1.4 HIPÓTESIS

1.4.1 HIPÓTESIS GENERAL

Se puede obtener quitosano a partir de Cucaracha de Madagascar (*G. portentosa*) y este impide la eclosión de huevecillos de *Meloidogyne incognita*.

1.4.1.1 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. El quitosano obtenido a partir de Cucaracha de Madagascar (*G. portentosa*) tiene características fisicoquímicas similares al quitosano comercial.
2. El quitosano extraído de Cucaracha de Madagascar (*G. portentosa*) tiene un efecto inhibitor similar al de un quitosano comercial en la eclosión de huevecillos *Meloidogyne incognita*.

II. OBTENCIÓN DE QUITOSANO

2.1 RESUMEN

Se extrajo quitosano de cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) realizando modificaciones a los procedimientos revisados en literatura (Basseri *et al.*, 2019; Shahraki *et al.*, 2018; Wanule *et al.*, 2014). Estas modificaciones consistieron en variar concentraciones, tiempos y temperaturas, así como realizar un reproceso de desmineralización para promover la solubilidad del quitosano (Colina *et al.*, 2015) y una purificación con NaOH para eliminar sales de calcio persistentes (Escobar *et al.*, 2013).

Se comprobó la presencia de quitosano de cucaracha al disolver una muestra en ácido acético 0.01% y formar un gel. El grado de *N*-desacetilación y el contenido de ceniza del quitosano extraído fueron similares a los obtenidos del quitosano comercial (Sigma- Aldrich $\geq 75\%$ GD).

Con la finalidad de alcanzar una caracterización óptima del quitosano obtenido, se sugiere realizar una caracterización por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y medidas viscosimétricas para la determinación de peso molecular.

2.2 INTRODUCCIÓN

No hay información previa sobre extracción de cucaracha a partir de Cucaracha de Madagascar (*G. portentosa*), pero hay información de extracción a partir de otras especies:

Basseri (2019) encontró un grado relativamente alto de desacetilación del quitosano obtenido de la cucaracha alemana *Blattella germanica* y la cucaracha americana *Periplaneta americana*. El peso del rendimiento de quitosano, así como el grado de desacetilación dependieron de la etapa de los insectos y especies. Descubrió que

el quitosano de cucaracha tiene una actividad más fuerte contra las bacterias que contra los hongos. Además, la actividad bactericida y fungicida del quitosano y el rendimiento fueron considerables y, por lo tanto, el quitosano de esas cucarachas podría usarse como un agente antimicrobiano natural poderoso y seguro. Shahraki *et al.* (2018) también llegó a conclusiones similares con respecto a las mismas especies. Wanule *et al.* (2014), de la misma manera, demostró que era posible la extracción, pero únicamente con *Periplaneta americana*.

Ooninx y Dierenfeld (2012), describieron la composición química de la Cucaracha de Madagascar, información que es relevante debido a la relación que tiene en la extracción de quitosano.

Tabla 1. Composición química de Cucaracha de Madagascar (Ooninx & Dierenfeld, 2012)

Especie	Tamaño de la muestra	Materia seca %	Proteína cruda	Grasa cruda	FDN	FDA	Ceniza
<i>G. portentosa</i>	5 4.0-6.0cm	38.95 ± 2.99	62,52 ± 3.05	24.56 ± 5.67	34.61 ± 5.81	10.22 ± 2.34	4.06 ± 0.26

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La producción del quitosano, la prueba indicativa de presencia y la determinación del grado de *N*-Desacetilación se realizaron en el Laboratorio de Parasitología Agrícola, dentro del campus Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Figura 11), ubicada en Camino a La Posta, La posta, 20900, Jesús María, Ags. 21.97000562948269, -102.37339309170243.



Figura 11. Mapa Campus Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Google, s/f)

2.3.1 CRÍA Y TRATAMIENTOS DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (*Gromphadorhina portentosa*)

Con la finalidad de realizar la extracción de quitosano, se criaron cucarachas de Madagascar (*Gromphadorhina Portentosa*) durante el periodo comprendido entre enero y julio de 2020. Se realizó un cuidado de los insectos buscando obtener un elevado número de especímenes para contar con materia prima suficiente para obtener la mayor cantidad posible de quitosano al finalizar este periodo.

2.3.1.1 CRÍA DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (*Gromphadorhina portentosa*)

Las cucarachas, como se aprecia en la Figura 12, se mantuvieron en cajas plásticas en condiciones de laboratorio, a temperatura ambiente. Se les proporcionó agua y croquetas de perro (*ad libitum*) y se colocó cartón como refugio y peat moss, como

sustrato, como se observa en la Figura 13 (c) (Khalil & Badawy, 2012; Pérez-Altamirano *et al.*, 2019).



Figura 12. (a) Ninfas saliendo de ooteca. (b) Cucarachas de Madagascar (adultos y jóvenes)

El sustrato y cartones se cambiaron cada 15 días, y las cucarachas se iban distribuyendo de tal forma que las cajas de plástico chicas, como las observadas en la Figura 13 (b) no tuvieran más de 20 adultos, los cuales se distribuían en las cajas de plástico grandes que se observan en la Figura 13 (a).

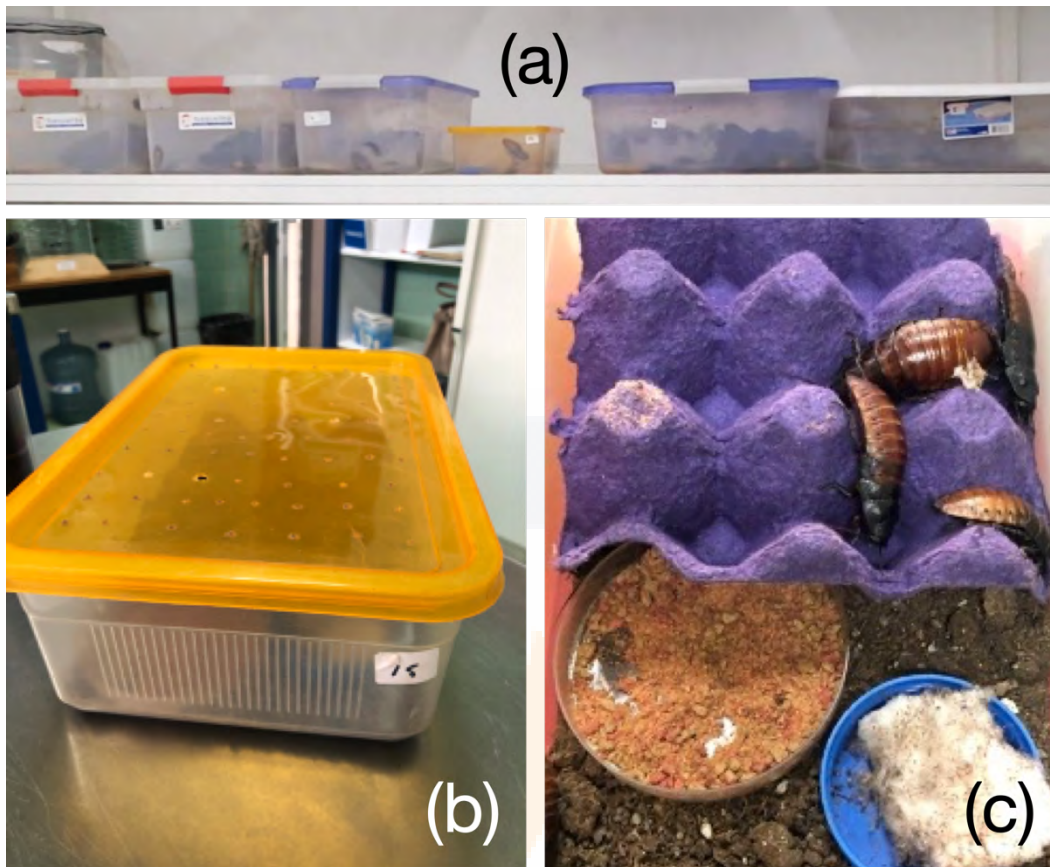


Figura 13. (a) Cajas plásticas grandes para cría de cucaracha. (b) Cajas plásticas chicas para cría de cucaracha. (c) Cucarachas fuera de refugio

2.3.1.2 SACRIFICIO DE CUCARACHAS

Khalil y Badawy en 2012 proponen que cuando se desea sacrificar animales, se realice una eutanasia humanitaria. La congelación es humana, rápida, eficaz y segura. La congelación tiene limitaciones, ya que puede producir daño tisular. Afortunadamente, la mayor parte del daño inducido por congelación se produce a escala microscópica y no afecta negativamente a las estructuras del exoesqueleto.

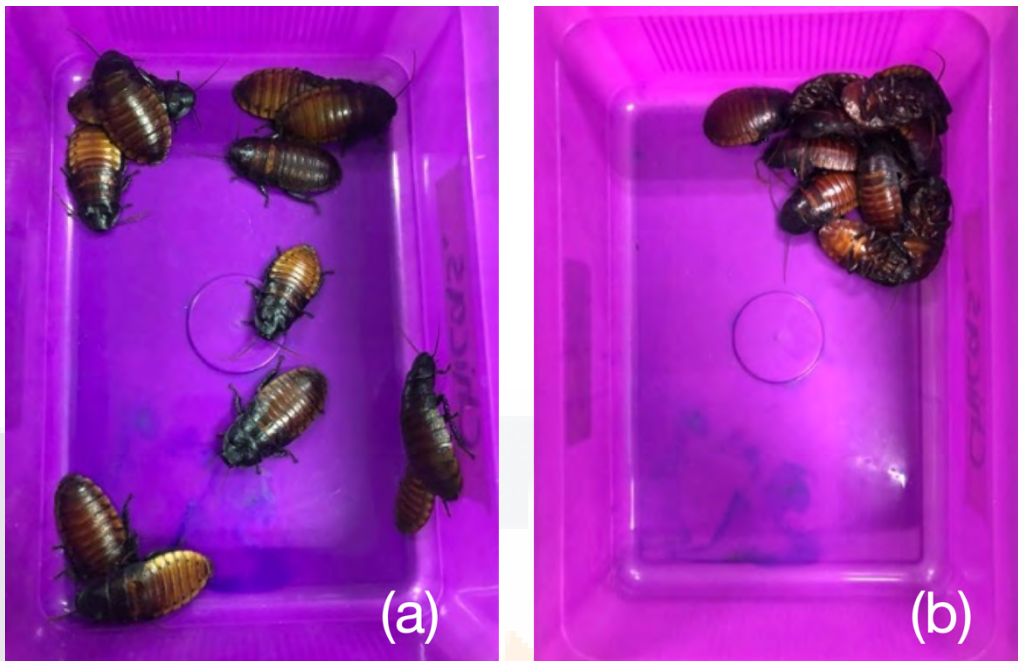


Figura 14. (a) Cucarachas aisladas para su procesamiento previo a la extracción del quitosano. (b) Cucarachas congeladas

Se seleccionaron cucarachas adultas, de sexo indistinto, procurando que fueran del mismo tamaño (un peso promedio de 4.95 gramos y una longitud promedio de 57.9 mm), de sexo indistinto, y se procedió a aislarlas durante 48 horas para vaciar su tracto intestinal, previo al sacrificio por congelación (Figura 14).

2.3.1.3 TRATAMIENTO DE CUCARACHAS SACRIFICADAS PARA EXTRACCIÓN DE QUITOSANO

Se realizó un tratamiento primario, como indica Kim (2017): Se seccionaron las cucarachas, y los trozos fueron lavados con agua varias veces, hasta que el líquido dejó de verse turbio (Figura 15). Posteriormente, los trozos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio, al 7%, y finalmente se lavaron con agua destilada.

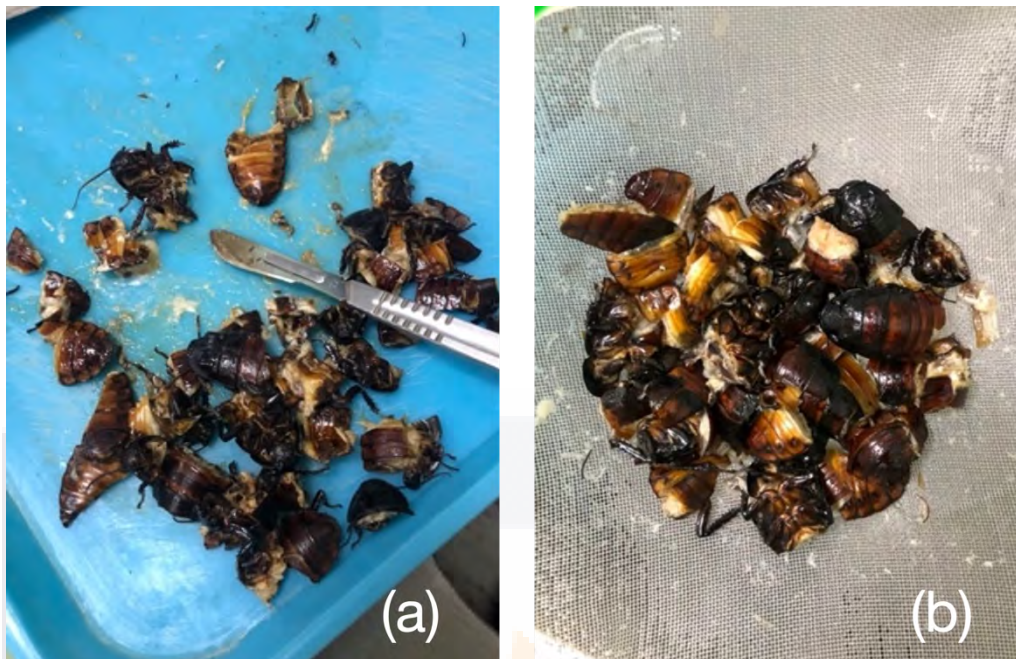


Figura 15. Seccionado y lavado de cucarachas

Los trozos se secaron a 60-70°C durante 48 horas hasta peso constante en un horno secador marca LINDBERG / BLUE M (Figura 16).



Figura 16. (a) Horno secador. (b) Charolas con cucarachas troceadas secándose

2.3.2 OBTENCIÓN DE QUITOSANO

En un principio se utilizaron cuatro métodos de extracción, uno reportado para *Blattella germanica* (Basseri et al., 2019), *Periplaneta americana* L. (Kim et al., 2017), otro de, uno de *Brachystola magna* (Monter et al., 2016) y otro de *Tenebrio molitor* (Song et al., 2018).

Sin embargo, es importante aclarar que ninguno de los métodos anteriores resultó, por lo que se procedió a realizar modificaciones a los diferentes tratamientos, variando el tamaño de partícula, las concentraciones de HCl, NaOH; el tiempo, temperatura y velocidades de agitación, para encontrar la combinación que diera como resultado un producto soluble en ácido acético.



Figura 17. Molino pulverizador utilizado

El proceso mediante el cual se obtuvo quitosano consistió en siete etapas (Figura 21).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(1) Se pulverizaron las cucarachas durante 30 minutos en un molino marca COSUA (Figura 17) hasta obtener una harina de partículas de 1 mm, aproximadamente [Figura 22 (1)].

(2) Estas se lavaron en agua potable y se filtraron hasta que el agua dejó de salir turbia. Posteriormente, se secaron en horno secador a 40°C hasta peso constante [Figura 22 (2)].

(3) Posteriormente la harina seca se sometió a un proceso de desmineralización durante 16 horas, con HCl 8% con relación 1:5 a temperatura ambiente con agitación constante; se filtró con una bomba de vacío y los sólidos recolectados se lavaron con agua destilada hasta que el pH del agua de enjuague fue neutro. Se secó en horno secador a 40°C hasta peso constante [Figura 22 (3)].

(4) Después se realizó un proceso de desproteínización con NaOH 8% con relación 1:5 durante 10 horas, a 80°C con agitación constante; se filtró con una bomba de vacío y los sólidos recolectados se lavaron con agua destilada hasta que el pH del agua de enjuague fue neutro. Se secó en horno secador a 40°C hasta peso constante [Figura 22 (4)].

(5) Se repitió la desmineralización con HCl a 10% con relación 1:5, durante 17 horas, a temperatura ambiente con agitación constante; se filtró con una bomba de vacío y los sólidos recolectados se lavaron con agua destilada hasta que el pH del agua de enjuague fue neutro. Se secó en horno secador a 40°C hasta peso constante [Figura 22 (5)].

(6) Se realizó una purificación con NaOH 4% con relación 1:5, durante 3 horas, a 90°C con agitación constante, proceso que realizó Escobar (*et al.*, 2013) para obtener quitina completamente libre de residuos de carbonato de calcio. Se filtró con una bomba de vacío y los sólidos recolectados se lavaron con agua destilada hasta que el pH del agua de enjuague fue neutro. Se secó en horno secador a 40°C hasta peso constante. Como resultado de esta etapa se obtuvo quitina [Figura 22 (6)].

(7) Por último, se desacetilaron los sólidos recuperados de la etapa anterior con NaOH 60% con relación 1:5, durante 2 horas, a 110° con agitación constante; se filtró con una bomba de vacío y los sólidos recolectados se lavaron con agua destilada hasta que el pH del agua de enjuague fue neutro. Se secó en horno secador a 40°C hasta peso constante. Como resultado de esta, se obtuvo quitosano [Figura 22 (7)].

2.3.2.1 PRUEBA INDICATIVA DE PRESENCIA DE QUITOSANO

Como prueba indicativa de la presencia de quitosano en las muestras obtenidas después de cada proceso, se tomó 0.1 gr y se mezcló con 2 ml de ácido acético al 3%. La presencia de quitosano se confirma con la formación de un gel.

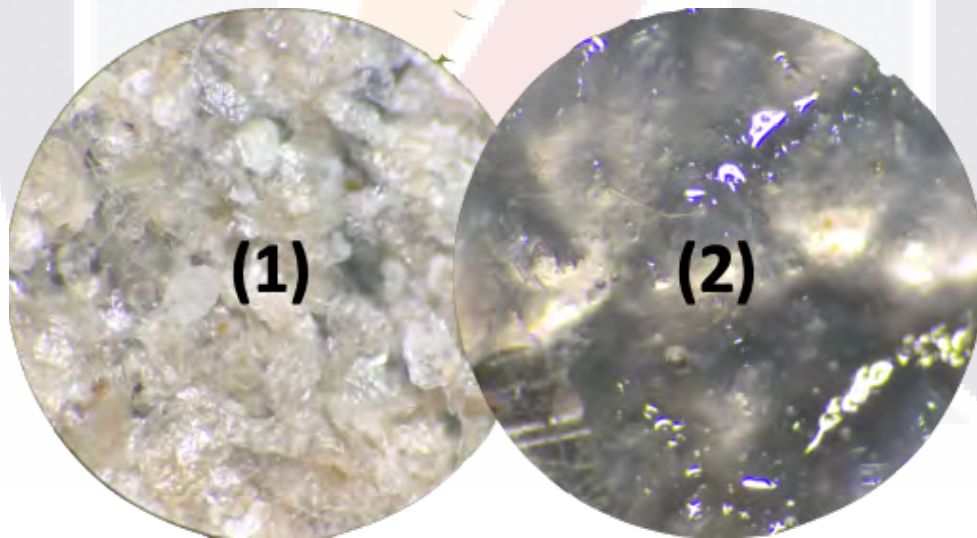


Figura 18. Fotografías en microscopio estereoscópico. (1) Muestra de quitosano de cucaracha y (2) gel formado después de prueba indicativa

2.3.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

2.3.2.2.1 DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA DE CUCARACHA DE MADAGASCAR (*Gromphadorhina portentosa*)

Adicional, se realizó el sacrificio de tres grupos de cucarachas, dos grupos con once y uno con diez individuos, se pesaron antes y después de someterlos a un proceso de secado en el horno secador de la Figura 16 (a) para determinar el porcentaje de materia seca promedio.

2.3.2.2.2 DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA

Se realizó en un equipo ANKOM (Figura 19) de acuerdo con su protocolo, que consiste en realizar una digestión con una solución de ácido sulfúrico y posteriormente con una solución de hidróxido de sodio, para finalmente calcinar el residuo. La diferencia entre los pesos después de la calcinación indica la cantidad de fibra presente.



Figura 19. Equipo para analizar fibra ANKOM

2.3.2.2.3 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Se desecaron las muestras y posteriormente se calcinaron en una mufla a 600°C hasta peso constante. Las determinaciones de las muestras se realizaron por duplicado.

2.3.2.2.4 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS

Se determinó mediante el análisis elemental de nitrógeno proteico siguiendo la metodología de Dumas en un analizador de Nitrógeno/Proteína LECO FP-528 (Figura 20), este se basa en la liberación de nitrógeno por pirolisis y la sucesiva combustión total, utilizando un detector de conductividad térmica. Se utilizó el factor de conversión según protocolo para la determinación de proteína según fuera el caso.



Figura 20. Analizador de Nitrógeno/Proteína LECO FP-528

2.3.2.2.5 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE N-DESACETILACIÓN

Siguiendo la metodología de Escobar *et al.* (2013), se realizó una titulación potenciométrica utilizando un potenciómetro Milwaukee. Se diluyeron 0.3 g de quitosano en 20 ml de ácido clorhídrico 0.3 M; se tituló la disolución con una solución de NaOH 0.1 M, midiendo el cambio de pH por cada ml de solución de NaOH añadida. Por último, se elaboró una curva de titulación de pH contra ml de NaOH añadido. Para calcular el grado de N-desacetilación del quitosano se empleó la ecuación (1):

$$\%NH_2 = \frac{16,1 (y - x)}{w} f \quad (1)$$

El mismo procedimiento se realizó para la muestra de quitosano comercial.



Figura 21. Imágenes representativas de cada una de las 7 etapas en la producción de quitosano. (a) Molino pulverizador utilizado. (2) Lavado de harina de cucaracha con agitación. (3) Disolución con extracción de minerales. (4) Disolución con extracción de proteínas. (5) Disolución con extracción de minerales en reproceso. (6) Disolución con extracción de carbonato de calcio y proteínas residuales. (7) Disolución resultante de proceso de desacetilación

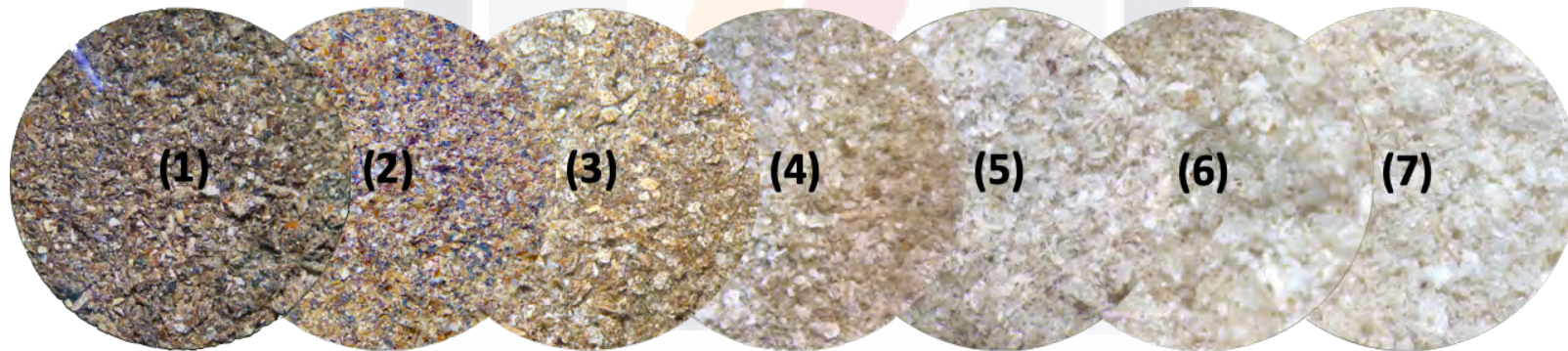


Figura 22. Fotografías en microscopio estereoscópico de muestras de filtrado recuperado de cada etapa de producción de quitosano

2.4 RESULTADOS

2.4.1 COMPOSICIÓN DE CUCARACHA

Los resultados de la determinación de porcentaje de materia seca de los tres grupos de cucarachas de Madagascar se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Materia seca de Cucaracha de Madagascar

Número de individuos	Longitud promedio (mm)	Peso promedio (gr)	Peso materia seca (gr)	% de materia seca
11	50.43	4.71	1.99	42
10	52.50	5.31	2.07	39
10	52	5.14	2.21	43

La determinación de fibra cruda de las cucarachas de Madagascar utilizadas para la extracción del quitosano fue de 40.62 ± 4.6 %, similar a la reportada por Ooninx y Dierenfeld (2012).

2.4.2 OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO

Para establecer las condiciones de lavado y desproteización más efectivas en la obtención de quitosano de Cucaracha de Madagascar, se determinó el porcentaje de proteína y nitrógeno contenido en las muestras resultantes de las diferentes variaciones propuestas para los procesos de lavado y desproteización en los protocolos consultados en literatura para otras especies de cucaracha (Basseri *et al.*, 2019; Shahraki *et al.*, 2018; Wanule *et al.*, 2014). Aquellos en los que el

porcentaje de proteína y nitrógeno era menor, fueron los tomados en cuenta. En la Tabla 3 se indican los porcentajes de proteína y nitrógeno determinados en el método de extracción propuesto.

Tabla 3. Porcentaje de proteína en muestras de diferentes etapas en la producción de quitosano

Muestra		% de proteína
Etapa 1	Cucaracha pulverizada	71.45
Etapa 2	Harina de cucaracha lavada	64.30
Etapa 4	Harina de cucaracha desproteínizada	35.27

En el caso de la quitina y los quitosanos, y al no contener proteínas, no se toma en cuenta el factor 6.25 y se reporta como % de nitrógeno (Tabla 4). Se observa un porcentaje de nitrógeno similar en las muestras de quitosano comercial y el quitosano extraído de cucaracha de Madagascar.

Tabla 4. Porcentaje de nitrógeno de quitina de cucaracha, quitosano de cucaracha y quitosano comercial

Muestra		% de nitrógeno
Etapa 6	Quitina de cucaracha	5.64
Etapa 7	Quitosano de cucaracha	6.77
	Quitosano comercial	6.80

El porcentaje de ceniza determinado en ambas muestras de quitosano es similar (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido de ceniza de quitosano de cucaracha y quitosano comercial

Muestra	% de ceniza
Quitosano comercial	0.50
Quitosano de cucaracha	0.76

2.4.3 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE N-DESACETILACIÓN MEDIANTE POTENCIOMETRÍA

En la Figura 23 (a) se observan los resultados de la valoración potenciométrica de la muestra de quitosano comercial. Se generó una curva de titulación con dos puntos de inflexión. Estos valores se determinaron con el criterio de la primera derivada. Los puntos se muestran en la Figura 23 (b).

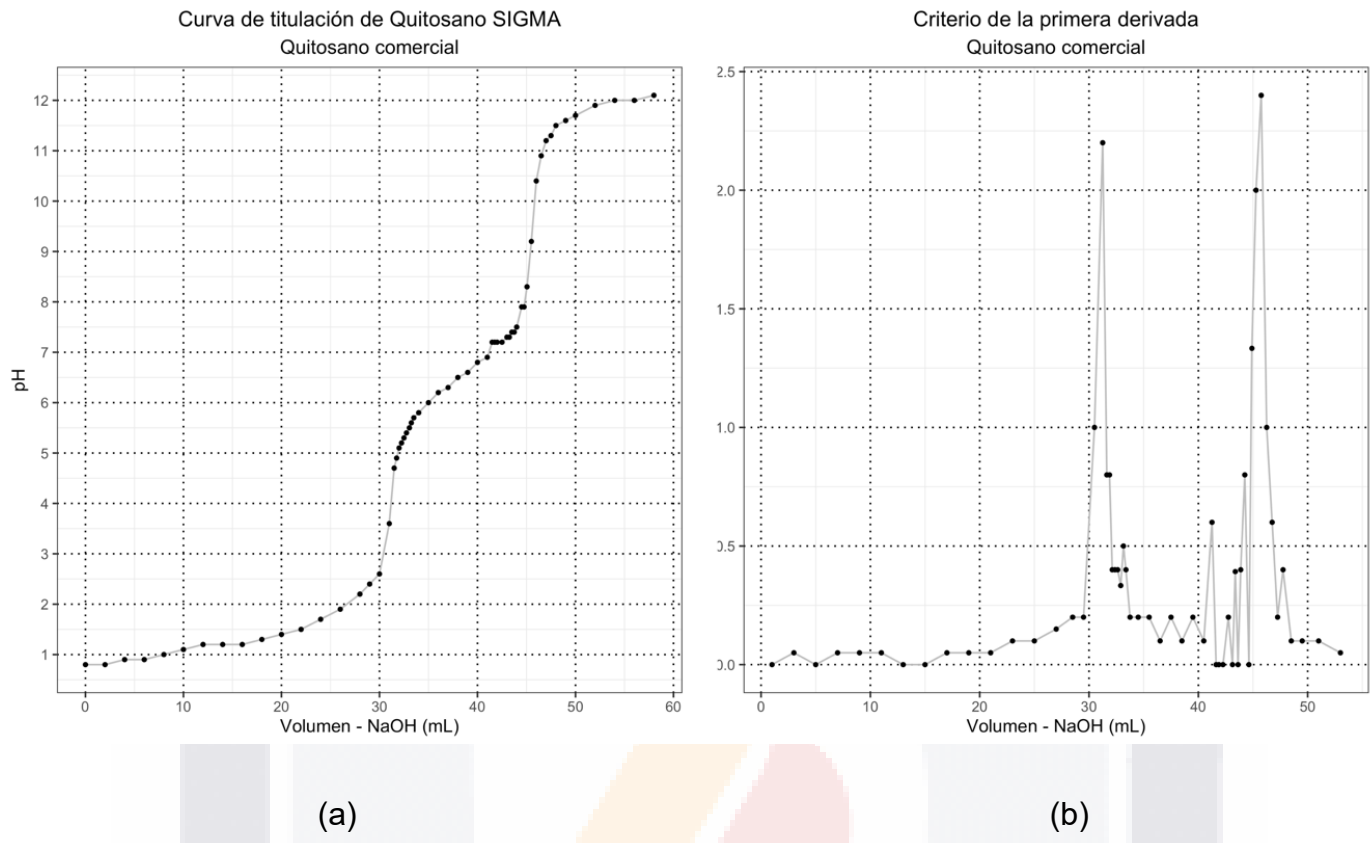
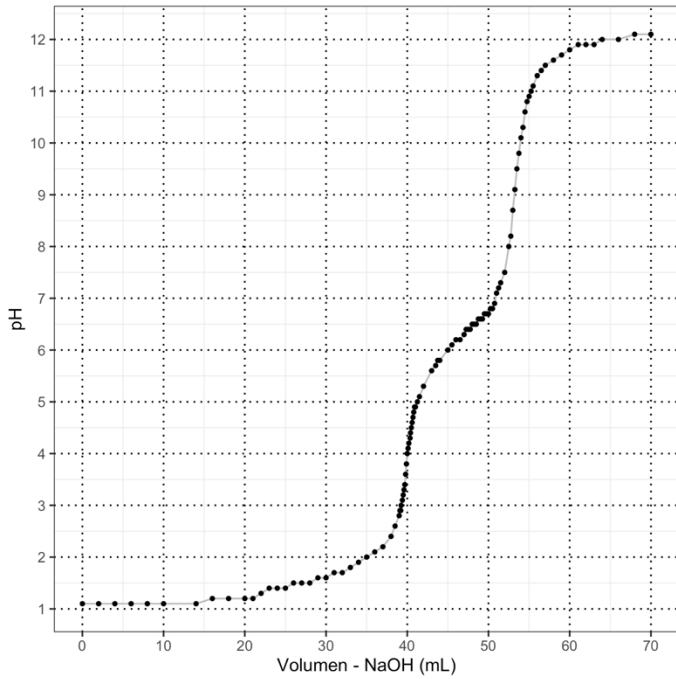


Figura 23. Curva de titulación del quitosano comercial marca Sigma (a) y criterio de la primera derivada (b)

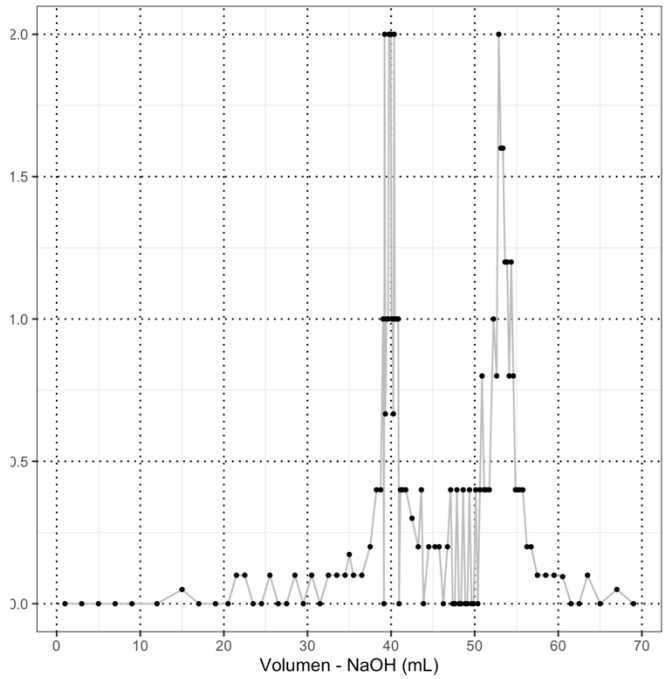
De igual manera, en la Figura 24 (a) se muestran los resultados de la valoración potenciométrica para la muestra de quitosano extraído de cucaracha. Se generó una curva de titulación con dos puntos de inflexión. Estos valores se determinaron con el criterio de la primera derivada. Los puntos se muestran en la Figura 24 (b).

Curva de titulación de Quitosano de Cucaracha
Gromphadorhina portentosa



(a)

Criterio de la primera derivada
Gromphadorhina portentosa



(b)

Figura 24. Curva de titulación del quitosano de cucaracha de Madagascar (a) y criterio de la primera derivada (b)

En la Tabla 6 se muestran los valores que corresponden a los datos graficados de las figuras Figura 23 (b) y Figura 24 (b), con los respectivos porcentajes de *N*-desacetilación calculados empleando la ecuación (1).

Tabla 6. Proporción de grupos amino en las muestras de quitosano

Muestra de quitosano	W (g)	Y (ml)	X (ml)	f (mol/L)	NH₂ (%)
Quitosano sigma	0.32	45.75	31.25	0.1	68.7
Quitosano de cucaracha	0.32	52.88	39.85	0.1	65.5

2.4.4 RENDIMIENTO

Tabla 7. Rendimientos de quitina y quitosano con respecto a peso inicial de cucarachas secas

Peso inicial cucarachas enteras secas (g)	Quitina		Quitosano	
	Peso (g)	Rendimiento con respecto al peso inicial (%)	Peso (g)	Rendimiento con respecto al peso inicial (%)
200	6.88	3.44	3.75	1.87

2.5 DISCUSIÓN

La relación entre la materia seca y el peso de las cucarachas criadas en laboratorio así como el porcentaje de fibra cruda es consistente con la información reportada por Oonincx y Dierenfeld (2012). Los datos obtenidos son una relación de 41.33%

de materia seca con respecto al peso de las cucarachas y de 40.62% de fibra cruda con respecto a esta última. La información reportada es 38.95% en el caso de la materia seca con relación al peso de las cucarachas y 44.83% de fibra cruda con relación a la materia seca.

El criterio que se utilizó para realizar una desmineralización adicional fue que las muestras resultantes de los procesos revisados en la literatura no resultaron en la extracción de un compuesto soluble, debido probablemente a la persistente presencia de minerales (Colina *et al.*, 2015).

El porcentaje de nitrógeno registrado para el quitosano y quitina de cucaracha de Madagascar son consistentes con los obtenidos para el quitosano comercial y con los reportados por Briceño (2008) y Martínez (2019). Es decir, se obtuvo un porcentaje de nitrógeno de 6.77 y 5.64 en el quitosano y quitina respectivamente y 6.8 para el quitosano comercial. Martínez (2019) determinó contenidos de nitrógeno de 5.96 y 5.55% para quitosanos y de 5.28% y 5.77% para quitinas; quitosanos y quitinas extraídos de exoesqueletos de camarón estero y de altamar respectivamente. Por su parte Briceño (2008) determinó un contenido de nitrógeno de 4.96% en un proceso de recuperación de quitina de residuos sólidos del procesamiento industrial de cangrejo azul y camarón.

El porcentaje de cenizas es consistente al obtenido para el quitosano comercial: 0.76 para el quitosano de cucaracha comparado con 0.50 del quitosano comercial. Estos a su vez son similares a los planteados por Hernández (2009), (1.4, 0.48 y 0.61% de cenizas para tres quitosanos diferentes).

Aunque el grado de desacetilación reportado por el fabricante se encuentra por encima del 75% de la muestra de quitosano comercial, el porcentaje de grupos amino obtenidos experimentalmente se encuentra dentro de los márgenes reportados (Escobar *et al.*, 2013; Hidalgo *et al.*, 2008). La muestra de quitosano de cucaracha obtenido, por su parte, tiene una proporción de grupo amino obtenidos para este es similar al quitosano comercial (Escobar *et al.*, 2013; Hidalgo *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2019).

Los rendimientos reportados (Kim *et al.*, 2017; Shahraki *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018) van de 5-20% para la quitina y del 1-10% para el quitosano con respecto al peso seco, por lo que se obtuvo un rendimiento bajo para la quitina pero dentro del rango para el quitosano (3.44 y 1.87% respectivamente). Kim (2017) reporta que un rendimiento de 61% de quitosano con respecto a la quitina, de igual manera Shahraki (2018) reporta un rendimiento entre 70-80% y Song (2018) 74%. En esta investigación se obtuvo un rendimiento de quitosano con respecto a la quitina obtenida de 54%. Cabe señalar que en ningún caso se está comparando con procedimientos realizados a cucaracha de Madagascar.

Para optimizar la extracción de quitosano de cucaracha de Madagascar se sugiere realizar un análisis de la composición química proximal de las cucarachas de Madagascar y al mismo tiempo realizar estos mismos análisis en cada etapa del proceso, para determinar con certeza las concentraciones y temperaturas ideales. Adicionalmente, considero importante estimar la concentración de minerales y proteínas en las disoluciones recuperadas en cada etapa.

De la misma manera, se sugiere una caracterización por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y medidas viscosimétricas para la determinación de peso molecular.

2.6 CONCLUSIÓN

Fue posible extraer quitosano de Cucaracha de Madagascar. Los resultados obtenidos en la caracterización del producto final nos muestran un producto con características similares con las del quitosano comercial (Sigma- Aldrich $\geq 75\%$ GD) y a aquellos consultados en la literatura.

III. EFECTO DE QUITOSANO DE CUCARACHA SOBRE HUEVECILLOS DE

Meloidogyne incognita

3.1 RESUMEN

Se obtuvieron huevecillos de *Meloidogyne* a partir de raíces infestadas de jitomate en un invernadero en el municipio de Calvillo, Aguascalientes. Posteriormente se identificó que pertenecían a la especie *Meloidogyne incognita*, usando como criterios las características del patrón perineal.

Se evaluó el efecto de un quitosano comercial y el quitosano obtenido de Cucaracha de Madagascar (*G. portentosa*) en la eclosión de huevecillos de nematodo agallador *M. incognita*. Se realizó un experimento *in vitro*, administrando quitosano de cucaracha en cinco diferentes concentraciones (25, 50, 100, 700 y 1000 mg/l), junto con un quitosano comercial en dos concentraciones diferentes (100 y 500 mg/l) y dos testigos, uno absoluto y uno con ácido acético 0.01% (solvente utilizado para administrar los quitosanos).

Se observó un efecto inhibitor significativo a la eclosión de huevecillos a partir del tratamiento de 50 mg/l.

3.2 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Sanchez (2010), el uso de quitosano en el control de nematodos fitopatógenos se conoce desde hace tiempo y existen productos que pueden ser utilizados con este propósito. El mecanismo de acción del quitosano está basado en el incremento de microorganismos quitinolíticos que se alimentan de él, y una vez consumido, pasan a consumir la quitina de otras fuentes, como nematodos y sus huevecillos. Sin embargo, considerando la composición de la cutícula y la presencia de enzimas quitinolíticas, proteolíticas y colagenolíticas, parece indicar que el quitosano juega un papel directo en la degradación de la cutícula de los nematodos.

Las diferencias en respuesta de los fitopatógenos a concentraciones altas o bajas de quitosano, hace pensar que este actúa como biocida por diferentes mecanismos:

- a) Interacción entre las cargas positivas del quitosano y las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, en el caso de nematodos constituida de una capa de lípidos, lo cual puede ocasionar una degradación de proteínas y otros constituyentes intracelulares, o bien, alteraciones en la permeabilidad de la pared celular; este último aspecto se ha relacionado a un incremento en la permeabilidad de los lípidos de la membrana de la célula, ocasionando la muerte a través de la pérdida de materiales esenciales (Chan *et al.*, 2001).
- b) Otro mecanismo propuesto se sustenta en la inhibición del crecimiento de microorganismos a través de la capacidad del quitosano para quelar selectivamente trazas de metales que son importantes para la célula.
- c) Activación de mecanismos de defensa en células huésped, relacionados con la reducción de aflatoxinas, inducción de fitoalexinas y compuestos fenólicos (Radwan, 2012), y el incremento en la producción de enzimas quitinasas, quitosanasas, glucanasas o fenilalanina amonía-liasas.
- d) Penetración del quitosano al interior de la célula microbiana e interacción entre el biopolímero con el ADN, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero, proteínas y enzimas (Vander *et al.*, 1998).

Un estudio realizado por Basseri (2019), en el que compara las propiedades fisicoquímicas, así como las características reológicas y la morfología superficial de los quitosanos derivados de insectos y quitosanos extraídos de la cáscara del camarón, indica diferencias entre ellos. También encuentra que la actividad antimicrobiana de los quitosanos es diferente entre los extraídos de las especies de cucarachas *Blattella germanica* y *Periplaneta americana*, además del grado de polimerización y cristalinidad.

Khalil (2012) analizó la actividad nematicida de cuatro quitosanos con diferentes pesos moleculares contra el nematodo agallador, *Meloidogyne incognita*, *in vitro* y en experimentos *in vivo*. En los bioensayos de laboratorio, la mortalidad del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nematodo estuvo significativamente influenciada por los tiempos de exposición y el peso molecular del quitosano. El quitosano de bajo peso molecular fue el más efectivo para matar al nematodo con EC50 de 283.47 y 124.90 mg/l después de 24 y 48 h de tratamiento, respectivamente. En un bioensayo de invernadero, todos los compuestos mezclados en el suelo en concentraciones de una y cinco veces el valor de LC50 redujeron significativamente la población, la masa de huevos y la excoiación de las raíces de las plántulas de tomate en comparación con el control no tratado. En general, la actividad nematocida de estos compuestos aumentó dramáticamente con una disminución en el peso molecular. Sugiriendo que el quitosano de bajo peso molecular puede servir como nematocida natural.

Munguía (2016) evaluó la eficacia de diferentes extractos del quitosano y nematocidas de amplio espectro, en un experimento *in vitro*. Utilizó quitosano extraído de langostino de río y quitosano comercial a diferentes concentraciones (250, 500 y 750 mg/l), un nematocida comercial con extracto de quitosano Nematrol Plus, y otros nematocidas comerciales Ditera (*Myrothecium verrucaria*), Nemover (Extracto de pino) y Nimitz (Fluensulfone). Concluyó que el efecto nematocida del quitosano en dosis media (500 mg/l) fue mejor posterior a las 24 horas después de la aplicación con una mortalidad de 95.83 a 100% de nematodos, y una eficacia del 100%, comparado con los nematocidas comerciales.

Radwan (2012) Caracterizó quitosano por su potencial nematocida contra el nematodo agallador, *Meloidogyne incognita*. Incorporó quitosano al suelo a razón de 1, 3, 5 y 10 g/kg, y su actividad nematocida se comparó con la del nematocida sintético oxamyl a razón de 0.01 g i.a./kg. Los resultados obtenidos muestran que el quitosano redujo las agallas de la raíz del tomate y la presencia de J₂ en el suelo dependiendo de la dosis. Sin embargo, la eficacia del quitosano para reducir el número de J₂ en el suelo fue menor que la del oxamyl. En comparación con las plantas inoculadas sin tratar, la longitud de los brotes y las raíces aumentó significativamente en el suelo tratado con quitosano.

Sánchez (2010) evaluó el efecto del quitosano comercial como regulador del nematodo *M. incognita*. Los estudios se realizaron *in vitro*, sobre la eclosión de

masas de huevecillos, huevecillos aislados, juveniles (J_2) y el efecto del quitosano sobre la invasión del sistema radicular de plántulas de chile (*Capsicum annuum* cv. Taranto). Comparó concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm. El mejor resultado obtenido en la inhibición de eclosión en masas de huevos, huevos aislados e inmovilización de J_2 fue el tratamiento de quitosano 2000 mg/l. En relación a los tratamientos *in vivo*, el menor índice de invasión se observó a los 0 días de tratamiento con quitosano a 2000 mg/l, obtuvo 24.7% de invasión comparado con los testigos donde se obtuvo un 69.9% y 100% de invasión en los puntos de crecimiento de la raíz.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 OBTENCIÓN DE HUEVECILLOS

Se utilizaron huevecillos de *M. incognita* obtenidos de raíces infestadas recolectadas en un invernadero de Calvillo, Aguascalientes, ubicado en 21.86324, -102.73249 (Figura 25).

Fueron seleccionadas 20 plantas y se trasladaron hacia las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias para su procesamiento. Los huevecillos se extrajeron mediante la técnica de tamizado de Cobb (1918).

Google Maps 21°51'47.7"N 102°43'57.0"W



Imágenes ©2022 CNES / Airbus, Maxar Technologies, Datos del mapa ©2022 INEGI 100 m

Figura 25. Mapa de ubicación de invernadero de donde se sustrajeron las plantas con raíces infestadas

La extracción del nematodo para su identificación y de los huevecillos para el experimento se realizó primeramente desinfestando las raíces con hipoclorito al 2% (NaCl), enseguida se enjuagaron con abundante agua (se mantuvo el agua para posteriormente tamizar), se trituraron para obtener una mayor liberación de huevos. Se licuaron 150 gramos de raíz agallada en 200 mL de agua corriente; la suspensión se procesó en tamices 100, 200, 325 y 400 micras. Los huevecillos se recolectaron del tamiz de 325 y los juveniles del tamiz 400.



Figura 26. Plantas de jitomate con síntomas causados por *Meloidogyne incognita*

3.3.1.1 AISLAMIENTO DE HUEVECILLOS



Figura 27. Material vegetal seleccionado (raíces infestadas)



Figura 28. (a) De raíces con agallamiento. (b) Proceso de tamizado re raíces

3.3.1.2 IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS

La identificación de la especie de nematodo y el bioensayo se realizaron en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)–Campo experimental Pabellón, ubicada en 20678, Pabellón de Arteaga, Ags. 22.16213110074459, -102.29505806286318.

Los nematodos recolectados se colocaron en una caja petri con agua destilada, evitando su deshidratación; se observó mediante un microscopio estereoscópico a un aumento de 5X, las hembras del nematodo se colocaron en portaobjetos con una gota de agua y una de glicerina. Con la aguja de disección se fijó la hembra de la parte cefálica; con una navaja se hizo un corte transversal, dejando la región del ano y la vulva para su identificación; se retiraron los restos de tejido que quedaban en el interior del cuerpo, con el fin de identificar con mayor facilidad el patrón. El cubreobjetos se colocó sobre el corte, cuidando que sus paredes se extendieran hacia afuera y facilitaran su visibilidad.

Google Maps INIFAP - Pabellón



Imágenes © 2022 CNES / Airbus, Maxar Technologies, Datos del mapa © 2022 INEGI 200 m

Figura 29. Mapa INIFAP-Pabellón (Google, 2022)

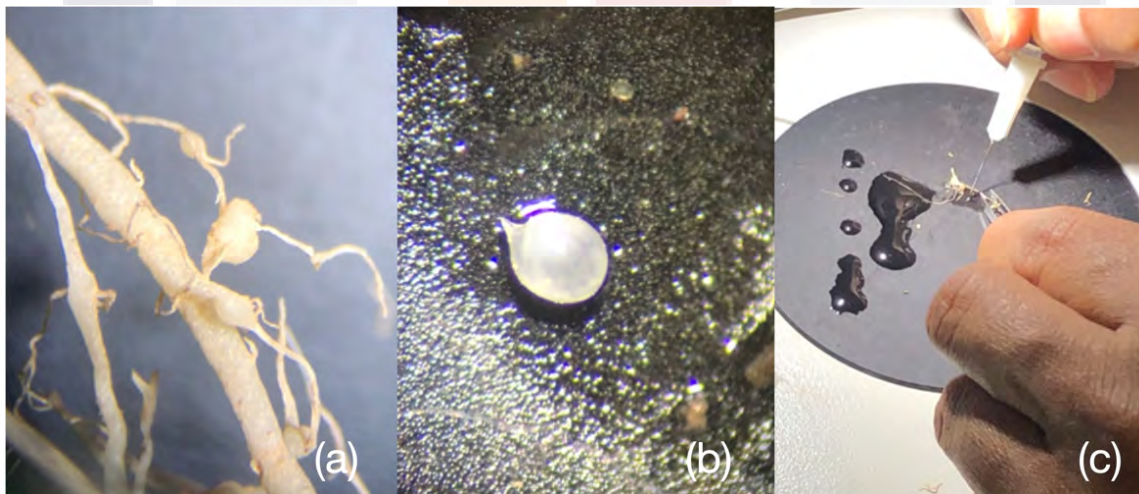


Figura 30. Imágenes en estereoscopio: (a) nódulos en raíz. (b) hembra de nemátodo. (c) corte para liberación de hembras

3.3.2 BIOENSAYO

Se prepararon compuestos de quitosano en ácido acético 0.25% (v/v), luego se diluyeron con ácido acético acuoso al 0.01%. El quitosano se utilizó en cinco diferentes concentraciones (20, 50, 100, 700 y 1000 mg/l), además de los testigos correspondientes: dos concentraciones de quitosano comercial (100 y 500 mg/l), un testigo con ácido acético 0.01% y un testigo absoluto. Luego se utilizó para tratar 20 huevecillos previo conteo en 2 ml de la suspensión de nematodos en frascos estériles que se mantuvieron en condiciones de laboratorio. Se realizaron cinco réplicas de cada tratamiento y aplicando estímulo físico se contaron los nematodos eclosionados durante 15 días.

3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los tratamientos y concentraciones respectivas del bioensayo fue determinado mediante análisis ANOVA de una vía, con un intervalo de confianza del 95%; las diferencias estadísticas entre las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$). El programa estadístico utilizado fue el complemento de R, RStudio.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 IDENTIFICACIÓN DEL NEMATODO COLECTADO

De las muestras colectadas, se corroboró el género y especie usando como criterios las características del patrón perineal de *M. incognita* (Figura 33).



Figura 31. Vista dorsal de *M. incognita* con objetivo 40 x localizado en la muestra

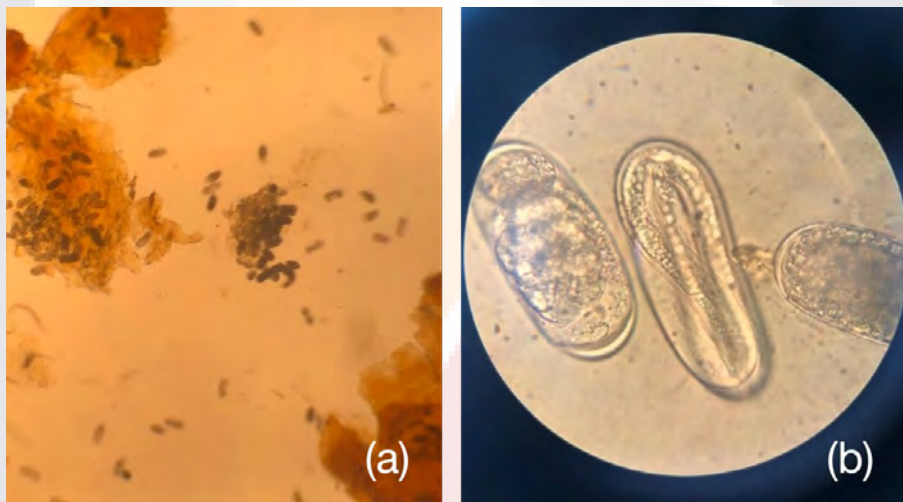


Figura 32. Vista microscópica de masa de huevecillos y eclosión de los mismos

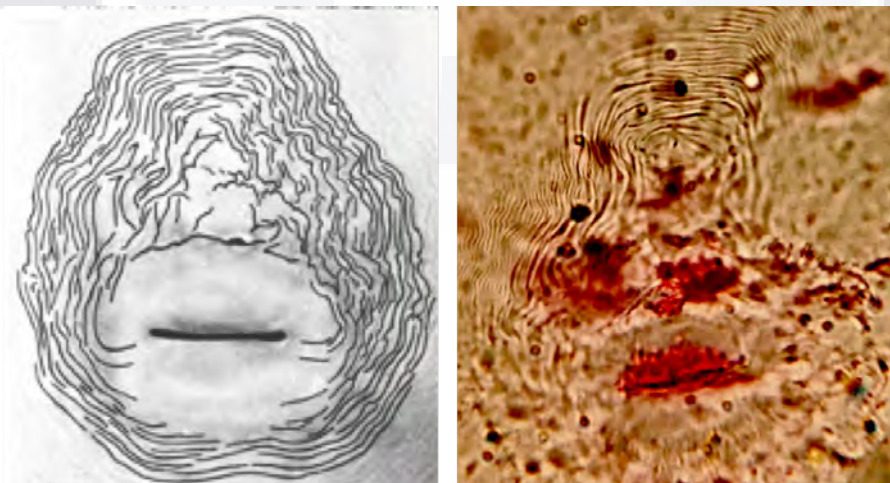


Figura 33. Corte perianal coincidente con *Meloidogyne incognita*

3.4.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL QUITOSANO EN LA ECLOSIÓN DE HUEVECILLOS

La información de las medias de eclosión para cada tratamiento se muestra en la Tabla 1.

Tabla 8. Estadísticos descriptivos de Huevecillos Eclosionados en función del Tratamiento

Tratamiento		<i>M</i>	<i>SD</i>
T1	Testigo	7.00	1.00
T2	Testigo Ác. Acético 0.01%	6.60	0.89
T3	Quitosano Sigma 100 mg/l	0.60	0.89
T4	Quitosano Sigma 500 mg/l	0.40	0.55
T5	Quitosano de cucaracha 25 mg/l	3.60	1.52
T6	Quitosano de cucaracha 50 mg/l	2.25	0.50
T7	Quitosano de cucaracha 100 mg/l	0.40	0.55
T8	Quitosano de cucaracha 700 mg/l	0.20	0.45
T9	Quitosano de cucaracha 1000 mg/l	0.00	0.00

Nota: *M* y *SD* representan la media y la desviación estándar, respectivamente.

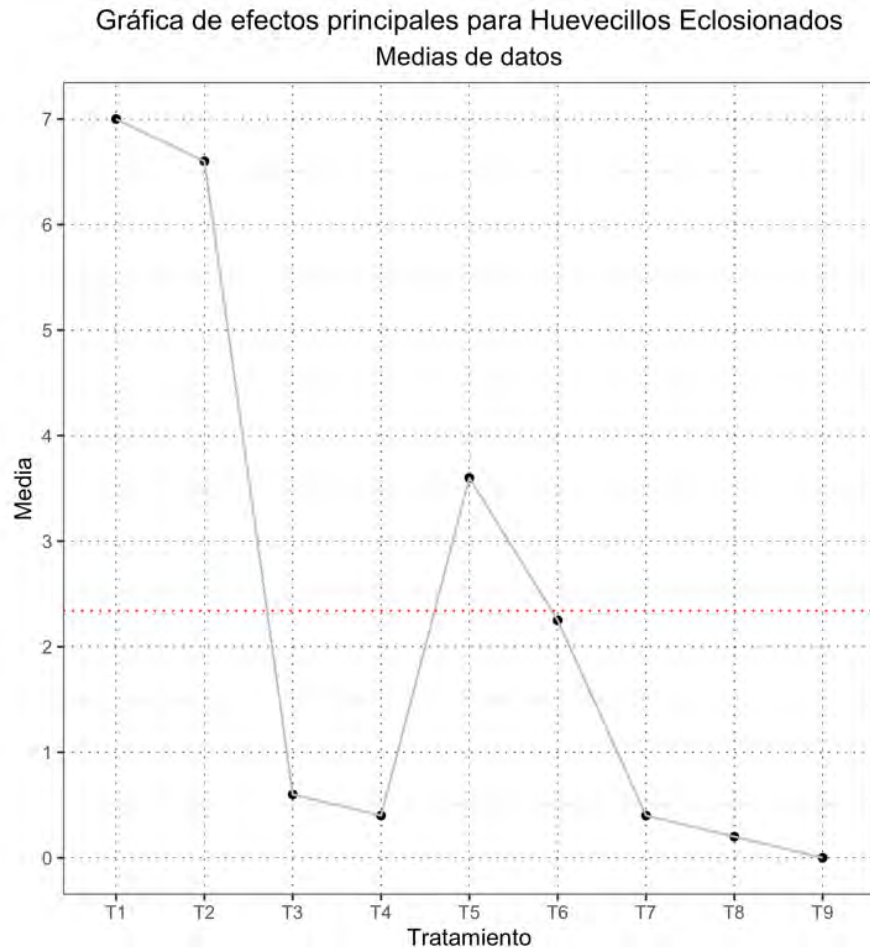


Figura 34. Gráfica de efectos principales de las medias de cada tratamiento

Los tratamientos testigo tuvieron la mayor cantidad de huevecillos ecllosionados, estos se encuentran por encima de de la media junto con el tratamiento de 25 mg/l. Todos los demás tratamientos tuvieron ecllosiones por debajo de la media general.

3.4.2.1 ANALISIS ANOVA

Según el análisis, se rechaza la hipótesis nula con nivel de significancia de 0.05; por lo tanto, hay diferencias significativas entre las medias de la cantidad de proteína.

Tabla 9. Resultados ANOVA de Efectos Fijos, usando Huevecillos Eclosionados como criterio

Predictor	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	partial η^2	partial η^2 90% CI [LL, UL]
(Intercept)	245.00	1	245.00	364.12	.000		
Tratamiento	310.34	8	38.79	57.65	.000	.93	[.86, .94]
Error	23.55	35	0.67				

Nota; LL y UL representan el límite inferior y el límite superior del parcial η^2 intervalo de confianza, respectivamente.

Se procedió a construir un contraste por pares de Tukey para determinar las diferencias significativas.

3.4.2.1.1 PRUEBA DE TUKEY

Tabla 10. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	Media de Huevecillos Ecllosionados	Grupos
T1	7	a
T2	6.6	a
T3	3.6	b
T4	2.25	bc
T5	0.6	cd
T6	0.4	d
T7	0.4	d
T8	0.2	d
T9	0	d

Grupos según probabilidad de diferencia de medias y nivel alfa (0.05); los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

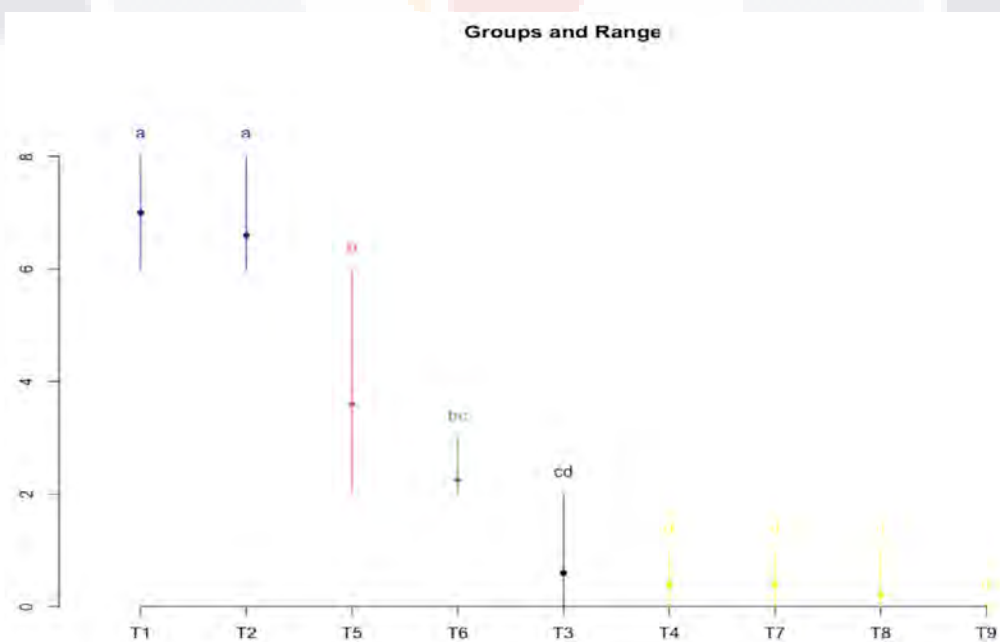


Figura 35. Grupos y rangos de tratamientos administrados

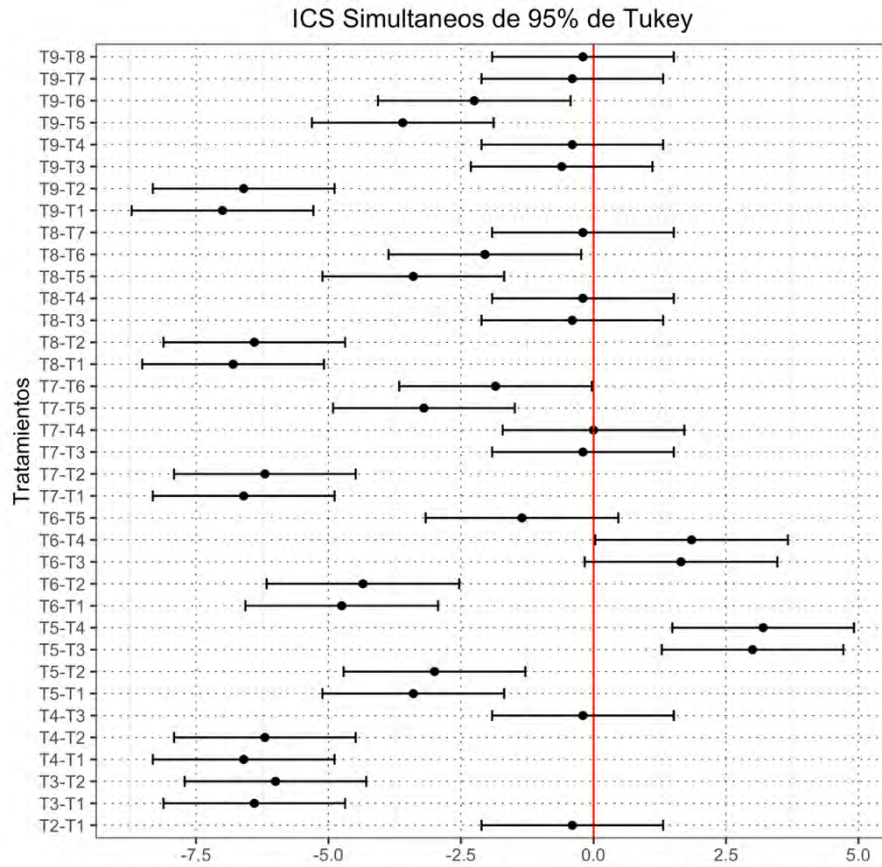


Figura 36. Intervalos de confianza simultáneos de Tukey

3.5 DISCUSIÓN

Se identificó al nematodo agallador *Meloidogyne incognita*, el cual ya había sido reportado como el preponderante en la región por Cid (2021).

Se ha reportado actividad antibacterial y antifúngica (Basseri *et al.*, 2019; Shahraki *et al.*, 2018) de quitosanos que han sido extraídos de camarón. Así mismo, se sabe que estas características pueden variar entre la fuente de quitosano, hablando de residuos de camarones e insectos. Estas diferencias se pueden encontrar incluso entre diferentes especies de cucaracha (Basseri *et al.*, 2019).

(Khalil & Badawy, 2012; Munguía *et al.*, 2016; Radwan *et al.*, 2012; Sánchez, 2010) realizaron experimentos para evaluar la capacidad nematocida de quitosanos

procedentes de crustáceos con resultados variados. En general utilizaron concentraciones y quitosanos con características diferentes.

Khalil (2012) encontró que un quitosano de bajo peso molecular fue el de mayor efecto nematicida contra *M. incognita* con EC50 de 283.47 y 124.90 mg/l después de 24 y 48 h de tratamiento, respectivamente. Sugiriendo que el quitosano de bajo peso molecular puede servir como nematicida.

Munguía (2016) determinó que el efecto nematicida del quitosano a 500 mg/l fue mejor posterior a las 24 horas después de la aplicación con una mortalidad de 95.83-100%.

Sánchez (2010) evaluó el efecto del quitosano en *M. incognita* sobre la eclosión de masas de huevecillos, huevecillos aislados y juveniles (J₂) concluyendo que el mejor resultado obtenido en la inhibición de eclosión en masas de huevos, huevos aislados e inmovilización de J₂ fue el tratamiento de quitosano 2000 mg/l.

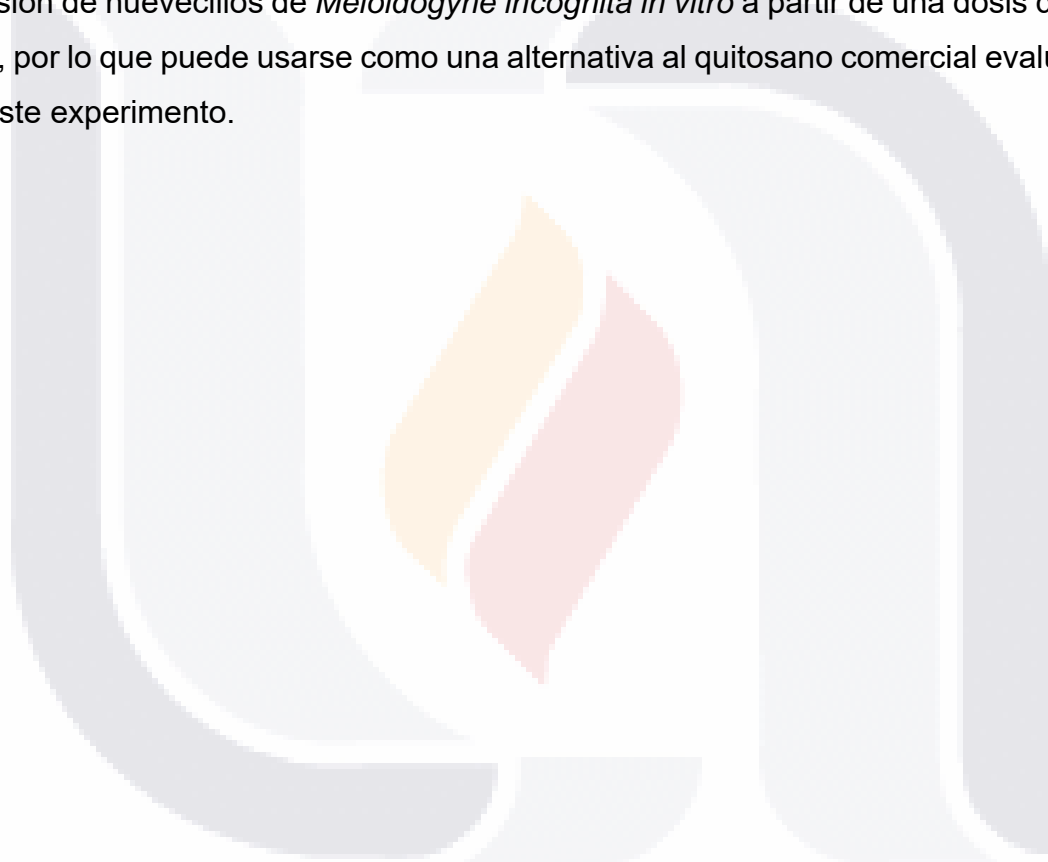
Considerando esta información, se procedió a realizar experimentos con concentraciones similares, pero no hubo eclosión significativa de huevecillos a partir de los 500 mg/l, por lo que se procedió a reducir las concentraciones y a repetir el experimento en tres ocasiones, motivo por el cual creo que la viabilidad de los huevecillos se redujo. Por esta razón sugiero realizar más pruebas con una mayor cantidad de huevecillos viables y, de ser posible, con masas de huevecillos, juveniles infectivos y realizar un experimento *in vivo*.

En este experimento todas las dosis administradas tuvieron diferencias significativas con los testigos. Hay diferencias significativas en las concentraciones de quitosano de cucaracha a partir de los 100 mg/l con respecto a la concentración de 25 mg/l, pero no entre 25 y 50 mg/l. No hay diferencias significativas entre las dosis mayores de 25 mg/l de quitosano de cucaracha y las dos dosis evaluadas de quitosano comercial (100 y 500 mg/l). La dosis que afecta la eclosión del huevecillo parece indicar que el quitosano de cucaracha de Madagascar tiene bajo peso molecular (Khalil & Badawy, 2012).

Es necesario caracterizar el quitosano con respecto a su peso molecular para de esta manera tener un parámetro más claro de la acción del quitosano sobre los huevecillos de *M. incognita*.

3.6 CONCLUSIÓN

El quitosano de cucaracha de Madagascar producido tiene un efecto inhibitor en la eclosión de huevecillos de *Meloidogyne incognita in vitro* a partir de una dosis de 50 mg/l, por lo que puede usarse como una alternativa al quitosano comercial evaluado en este experimento.



IV. CONCLUSIONES GENERALES

Fue posible extraer quitosano de cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*). El grado de *N*-desacetilación y el porcentaje de cenizas determinados para el quitosano obtenido demuestran un producto con características similares a las del quitosano comercial (Sigma- Aldrich $\geq 75\%$ GD) utilizado en el experimento *in vitro*.

Para optimizar la extracción de quitosano de cucaracha de Madagascar se sugiere realizar un análisis de la composición química proximal de las cucarachas de Madagascar y al mismo tiempo realizar estos mismos análisis en cada etapa del proceso, para determinar con certeza las concentraciones y temperaturas ideales. Adicionalmente, considero importante estimar la concentración de minerales y proteínas en las disoluciones recuperadas en cada etapa. De la misma manera, se sugiere una caracterización por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y medidas viscosimétricas para la determinación de peso molecular del quitosano obtenido.

Por otra parte, se observó que el quitosano de cucaracha de Madagascar obtenido tiene un efecto inhibitor en la eclosión de huevecillos de *Meloidogyne incognita in vitro*, a partir de una dosis de 50 mg/l, por lo que puede usarse como una alternativa al quitosano comercial evaluado en este experimento. Es importante realizar más pruebas con una mayor cantidad de huevecillos viables y, de ser posible, con masas de huevecillos, juveniles infectivos y realizar un experimento *in vivo*.

V. REFERENCIAS

- Agrios, G. (1996). *Fitopatología* (2a ed.). Limusa.
- Andrés, M. (2002). Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparasitarios. *CSIC - Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA), Ciencia y Medio Ambiente-Segundas jornadas científicas sobre medio ambiente del CCMA-CSIC*, 221–227.
- Armendariz, I., Ríos, M., Landázuri, P., & Quiñac, D. (2015). *Nematodos fitopatógenos y sus estrategias de control* (Número November). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1599.9446>
- Ayala, G. (2015). *Efecto Antimicrobiano Del Quitosano: Una Revisión De La Literatura*. 2, 32–38.
- Basseri, H., Bakhtiyari, R., Hashemi, S. J., Baniardelani, M., Shahraki, H., & Hosainpour, L. (2019). Antibacterial/antifungal activity of extracted chitosan from American cockroach (Dictyoptera: Blattidae) and German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Medical Entomology*. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz082>
- Bernal, R. (2010). Enfermedades de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) en invernaderos en las zona de Salto y Bella Union. En *Serie Tecnica 181*.
- Briceño, B., & Montiel, M. (2008). Recuperación De Quitina a Partir De Los Residuos Sólidos Generados Del Procesamiento Industrial De Crustáceos. *Revista Cubana de Química*, XX(3), 17–26.
- Cauchie, H. (2002). Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiologia*, 470(1), 63–95. <https://doi.org/10.1023/A:1015615819301>
- Chan, V., Mao, H.-Q., & LeongK.W. (2001). Chitosan-induced perturbation of dipalmitoyl-inglycero-3-phosphocholine membrane bilayer. *Langmuir*, 17(12), 3749–3756.

Cid, I. (2021). Colección e identificación de las especies de Meloidogyne y su distribución en los cultivos más importantes para México. En *Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad CONABIO*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.15468/4xft8e>

Cid, I., Hernandez, J., & Tovar, A. (2001). Distribución de Especies y Razas de Meloidogyne en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19, 32–39.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219105>

Cobb, N. (1918). *Estimating the Nema Population of Soil, with Special Reference to the Sugar-beet and Root-gall Nemas, Heterodera Schachtii Schmidt and Heterodera Radicicola (Greef) Müller: And with a Description of Tylencholaimus Aequalis N. Sp.* U.S. Government Printing Office.
<https://books.google.com.mx/books?id=1ilxAQAAMAAJ>

Colina, M., Ayala, A., Rincon, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., Vargas, J., & Montilla, B. (2015). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1).

Du, J., Gemma, H., & Iwahori, S. (1997). Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66(1), 15–22. <https://doi.org/10.2503/jjshs.66.15>

Eisenback, J. D., & Project, I. M. (1981). *A Guide to the Four Most Common Species of Root-knot Nematodes (Meloidogyne Spp.), with a Pictorial Key*. Departments of Plant Pathology and Genetics, North Carolina State University.
<https://books.google.com.mx/books?id=09VJAAAAYAAJ>

Escobar, D., Vergara, N., & Ramírez, A. (2013). Determinación de la relación entre el porcentaje del grupo amino y el grado de desacetilación del quitosano. *Revista de Ciencias*, 18(1), 73–88.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcien/v18n1/v18n1a06.pdf>

Finke, M. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26(2), 105–115. <https://doi.org/10.1002/zoo.20123>

Giraldo, J. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *University of Concepcion*, MAY. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3350.9287>

González, E. (2009). Identificación y control de nematodos que afectan al cultivo de guayabo en México. En *Fundación Produce Aguascalientes, A. C.* (1a ed., Vol. 6). INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón.

Google. (s/f). *Mapa Campus Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 2022. <https://www.google.com/maps/place/Campus+Posta+Zootécnica+UAA/@21.9697967,-102.3738437,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x8429e7dabff26d45:0xbff77b8fcb431864!8m2!3d21.9697967!4d-102.3738437>

Google. (2022). *Mapa Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) – Campo experimental Pabellón*.

Hansen, M., & Llanes, A. (1994). *Aplicaciones de los desechos de crustáceos en biotecnología. Procesamiento pesquero: aplicaciones biotecnológicas*. (AM Martin (ed.)). Chapman & Hall.

Hernández, H., Almanza, E., Flores, O., Viveros, E., & Ramos, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57–60.

Hidalgo, C., Suárez, Y., & Fernández, M. (2008). Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. Validation of potentiometric method to determine the degree of deacetylation of chitosan. *Ars Pharm*, 49(3), 245–257. <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/27636/Ara> Pharm

2008%3B49%283%29245-

257.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/
article/viewFile/4960/4768

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. En *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>

Kaya, M., Erdoga, S., Mol, A., & Baran, T. (2015). Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 797–805.

Khalil, M. S., & Badawy, M. E. I. (2012). Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root-knot nematode, *meloidogyne incognita*. *Plant Protection Science*, 48(4), 170–178. <https://doi.org/10.17221/46/2011-pps>

Kim, M.-W., Song, Y.-S., Seo, D.-J., Han, Y. S., Jo, Y. H., Noh, M. Y., Yang, Y. C., Park, Y.-K., Kim, S.-A., Choi, C., & Jung, W.-J. (2017). Extraction of Chitin and Chitosan from the Exoskeleton of the Cockroach (*Periplaneta americana* L.). *Journal of Chitin and Chitosan*. <https://doi.org/10.17642/jcc.22.2.2>

Kong, M., Chen, X., Xing, K., & Park, H. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. En *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>

Kramer, K., Hopkins, T., & Schaefer, J. (1995). Applications of Solids NMR to the Analysis of Insect Sclerotized Structures. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(10), 1067–1080.

Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15–21.

Latil, D. (2017). *Microalgae as a new source of chitosans*.

Martínez, A., Díaz, G., & Ramírez, R. (2019). Estudio comparativo de obtención , caracterización y actividad antioxidante de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón estero y camarón de altamar. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1), 1002–1013.

Martínez, J. Á., Valdés, T. D., Molar, R. A., Manjarrez, J. E. R., & Carrillo, J. A. (2019). Identificación y distribución de *Meloidogyne* spp. en tomate de Sinaloa México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(2), 453–459. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.392>

Monter, J., Tirado, J., Zamudio, P., Rios, C., Ornelas, J., Salgado, R., Espinosa, V., & Hernández, F. (2016). Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 749–761. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1644-9665\(12\)60093-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1644-9665(12)60093-4)

Munguía, A., Martínez, R. N., Barreto, C. A., Sato, M., Ferro, W. K., Cabrera, L. E., & Martínez, A. (2016). Control biológico In Vitro de nematodos agalladores (*Meloidogyne* sp.) a base de quitosano y fluensulfone. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 4, 25–31. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v4i1.17>

Odier, A. (1823). Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes. En *Mémoires de la Société D'Histoire Naturelle de Paris* (1a ed., pp. 29–42).

Oonincx, D., & Dierenfeld, E. (2012). An investigation into the chemical composition of alternative invertebrate prey. *Zoo biology*, 31(1), 40–54. <https://doi.org/10.1002/zoo.20382>

Pérez-Altamirano, A., García-Munguía, A. M., García-Munguía, C. A., Ibarra-Juárez, L. A., Munguía, O. G., & Ferro, W. K. G. (2019). Nutritional Analysis and Amino Acids of Meals of *Tenebrio molitor* and *Gromphadorhina portentosa*. *Southwestern Entomologist*, 44(4), 963–971.

<https://doi.org/10.3958/059.044.0408>

- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012). Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. *Biology and Fertility of Soils*, 48(4), 463–468. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0632-7>
- Ravi, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. En *Reactive and Functional Polymers*. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)
- Reyes, J., Enríquez, E., Ramírez, M., Rodríguez, A., & Herrada, M. (2019). Respuesta de plántulas de cultivares de tomate a la aplicación de quitosano. *Revista Centro Agrícola*, 46(4), 21–29. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=zbh&AN=141284032&site=eds-live>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. En *Progress in Polymer Science (Oxford)*. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Salazar, W., & Guzmán, T. (2013). Efecto de poblaciones de Meloidogyne sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 419. <https://doi.org/10.15517/am.v24i2.12542>
- Sánchez, J. (2010). Efecto de quitina y quitosano sobre huevos y juveniles de nematodos formadores de nódulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*. Bajo condiciones in vitro e in vivo [Colegio de Post Graduados]. En *Colegio De Postgraduados*. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-7>
- Shahraki, H., Basseri, H. R., Mirahmadi, H., Fatahi Bafghi, M., Mehravarn, A., Heidarian, P., & Rahimi Esboei, B. (2018). Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Chitosan in Integument of Cockroaches. *International Journal of Basic Science in Medicine*, 3(3), 104–108.

<https://doi.org/10.15171/ijbsm.2018.19>

- Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y., & Zhang, G. (2013). Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 347–345.
- Song, Y., Kim, M., Moon, C., Seo, D., Han, Y., Jo, Y., Noh, M., Park, Y., Kim, S., Kim, Y., & Jung, W. (2018). Extraction of chitin and chitosan from larval exuvium and whole body of edible mealworm, *Tenebrio molitor*. *Entomological Research*, *48*, 227–233. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12304>
- Vander, P., KM, V. rum, Domard, A., N, E. E. G., & Moerschbacher, B. M. (1998). Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology*, *118*(4), 1353–1359. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1353>
- Velasco, J., Días, G., Ramírez, R., & Pérez-, L. (2019). Producción de quitosano a partir de desechos de camarón generados del procesamiento industrial. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martinez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., & Zavaleta-Mejía, E. (2009). Respuesta Hipersensitiva En El Follaje De Chile Cm-334 Resistente a *Phytophthora Capsici* Infectado Con *Nacobbus Aberrans*. *Nematropica*, *39*(1), 143–155.
- Wang, Q. Z., Chen, X. G., Liu, N., Wang, S. X., Liu, C. S., Meng, X. H., & Liu, C. G. (2006). Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, *65*(2), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.001>
- Wanule, D., Balkhande, J. V., Ratnakar, P. U., Kulkarni, a. N., & Bhowate, C. S. (2014). Extraction and FTIR Analysis of Chitosan from American cockroach, *Periplaneta americana*. *International Journal of Engineering Science and*

Innovative Technology.

Wu, S. (2011). Preparation of chitosan from *Clanis bilineata* larvae skin using enzymatic methods. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1008–1010.

Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. En *Marine Drugs*.
<https://doi.org/10.3390/md13031133>



VI. ANEXOS

Tabla 11. Programación de actividades del proyecto durante los cuatro semestres del programa

ACTIVIDADES	2020												2021																						
	SEMESTRE												SEMESTRE																						
	1°						2°						3°						4°																
	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC											
Investigación bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Elaboración del protocolo	x	x	x	x	x	x																													
Cría de cucarachas	x	x	x	x	x	x																													
Acondicionamiento de invernadero	x	x																																	
Sacrificio de cucarachas								x																											
Obtención y caracterización del quitosano														x	x	x																			
Obtención de masas de huevos, huevos aislados y juveniles infectivos de nemátodos														x	x	x																			
Bioensayos <i>in vitro</i>																x	x																		
Cultivo de plántulas de jitomate														x	x																				
Bioensayos <i>in vivo</i>																		x	x																
Curso optativo Protección y manejo fitosanitario de cultivos								x	x	x	x	x																							
Curso para operación de espectrofotómetro									x																										
Capacitación técnica para obtener plántulas de jitomate										x																									
Curso optativo II													x	x	x	x	x	x	x																
Estancia																	x																		
Asistencia a congreso																				x															
Presentación de avance						x						x							x																x
Ensamble de resultados																			x	x	x	x													