

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EFFECTO DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN Y FRACCIÓN MOLAR DE
ACETILACIÓN DEL QUITOSANO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EL
CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MAÍZ**

POR

ARIANA FRANCESCA PEÑA MEDINA

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CONCEPCIÓN – CHILE
2024**

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**EFFECTO DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN Y FRACCIÓN MOLAR DE
ACETILACIÓN DEL QUITOSANO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EL
CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MAÍZ**

POR

ARIANA FRANCESCA PEÑA MEDINA

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CONCEPCIÓN – CHILE
2024**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Mauricio Schoebitz Cid
Ing. Agrónomo, Dr.

Guía

Profesor Auxiliar, Juan D. Giraldo Pedraza
Ing. Químico, Dr.
Universidad Austral de Chile

Co-guía

Profesora Asistente, Analí Rosas Gajardo
Ing. Agrónoma, Dra.

Asesora

Profesor Asociado, Guillermo Wells Moncada
Ing. Agrónomo, Mg. Sc.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo gracias al proyecto Fondecyt Postdoctoral 3210599 adjudicado al Dr. Juan David Giraldo.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	5
Resultados y Discusión	8
Conclusiones	22
Referencias	22

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Semillas de maíz desinfectadas con hipoclorito de sodio a distintas concentraciones.....	9
Figura 2 Influencia de la concentración del hipoclorito de sodio sobre distintas características fisiológicas de semillas de maíz.....	9
Figura 3 Análisis estadístico de la influencia de un grado de polimerización alto ($15.353 \pm 1.921,95$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.....	11
Figura 4 Influencia del grado de polimerización alto ($15.353 \pm 1.921,95$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.....	12
Figura 5 Análisis estadístico de la influencia de un grado de polimerización medio ($9.733 \pm 555,52$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.....	14
Figura 6 Influencia del grado de polimerización medio ($9.733 \pm 555,52$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.....	15
Figura 7 Análisis estadístico de la influencia de un grado de polimerización bajo ($5.694 \pm 131,38$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.....	17
Figura 8 Influencia del grado de polimerización bajo ($5.694 \pm 131,38$) y distintas fracciones molares de acetilación y	

	concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.....	18
Tabla 1	Características de cada muestra de quitosano.....	6
Tabla 2	Materiales a utilizar.....	6

EFFECTO DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN Y FRACCIÓN MOLAR DE ACETILACIÓN DEL QUITOSANO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MAÍZ

EFFECT OF THE DEGREE OF POLYMERIZATION AND MOLAR FRACTION OF ACETYLATION OF CHITOSAN ON THE GERMINATION OF SEEDS AND THE GROWTH OF CORN SEEDLINGS

Palabras índice adicionales: quitina, peso molecular, grado de acetilación.

RESUMEN

El quitosano es un biopolímero resultante de la deacetilación de la quitina, el cual es utilizado en la agricultura como bioestimulante o biocida. En la literatura se reporta su aplicación en la germinación de semillas. Sin embargo, es esencial conocer los parámetros de caracterización del quitosano a emplear y correlacionar sus efectos sobre las semillas. Es por esto que el objetivo de esta memoria fue determinar los rangos del grado de polimerización y de acetilación del quitosano en los cuales se obtienen mejores resultados en la germinación de semillas de maíz. Para esto, se usaron quitosanos con distintos grados de polimerización y de acetilación para elaborar soluciones a distintas concentraciones (0,25 - 1,00 % p/p), generando un recubrimiento en semillas de maíz y así evaluar los efectos sobre su porcentaje de germinación, biomasa fresca y seca, número de raíces y longitud de raíces y del epicótilo. En cuanto a esto, el control (agua) generó mejores resultados en todas las características de las semillas evaluadas, o bien, no hubo diferencias significativas entre el control y las semillas recubiertas. Si se ignora el control, los mejores resultados se presentan en semillas recubiertas con quitosanos de menor grado de polimerización y de acetilación y a baja concentración. Se concluye que los quitosanos evaluados no generaron los efectos esperados en acuerdo a la literatura.

SUMMARY

Chitosan is a biopolymer resulting from the deacetylation of chitin, and is used in

agriculture as a biostimulant or biocide. Its application in seed germination has been reported in literature. However, it is essential to determine the characterization parameters of the chitosan for use and to correlate its effects on seeds. Therefore, this study aimed to determine the ranges of the degree of polymerization and acetylation of chitosan, in which the best results were obtained for the germination of corn seeds. Chitosans with different degrees of polymerization and acetylation were used to prepare solutions at different concentrations (0,25 – 1,00 % w/w), generating a coating on corn seeds and thus evaluating the effects on their percentage of germination, fresh and dry biomass, number of roots and length of roots, and epicotyl. The control (water) generated better results in all the characteristics of the seeds evaluated, or there were no significant differences between the control and the coated seeds. If the control is ignored, the best results are obtained for seeds coated with chitosans with a lower degree of polymerization and acetylation and at a low concentration. It was concluded that the chitosans evaluated did not generate the expected effects according to the literature.

INTRODUCCIÓN

La industria pesquera es una de las más grandes industrias del mundo. Según la FAO, se estimó que en el año 2018 se produjeron 178 millones de toneladas de productos marinos, cuya producción se concentró principalmente en 10 países, los cuales, en conjunto, representan el 95,7 % de la producción mundial. Países dentro de los que se encuentra Chile con el 12,5 % de la producción (FAO, 2020; Zhan *et al.*, 2021). Por su parte, la industria procesadora de crustáceos es una gran generadora de desechos sólidos. Específicamente, alrededor de un 75 - 85 % del peso vivo de estos productos son desechos, los cuales generan problemas medioambientales debido a la descomposición de los restos de origen cárnico adosados a los residuos (Giraldo, 2015).

Estos residuos están compuestos de proteínas, lípidos, carotenoides, minerales y quitina. Este último, es un polímero natural que forma parte del soporte estructural de numerosos organismos vivos, como crustáceos, hongos e insectos (Sastoque-Cala *et al.*, 2007). Posee una estructura lineal de alto peso molecular constituida

principalmente por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces 1-4-glicosídicos. Es insoluble en diversos solventes orgánicos y agua debido a la rigidez de su estructura (Yan y Chen, 2015; Franca *et al.*, 2011).

Por otra parte, la forma deacetilada de la quitina como mínimo en un 50 %, es el quitosano, el cual posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad que la quitina (Mármol, 2003). En esta deacetilación de la quitina se pueden obtener diferentes tipos de quitosanos en función del tiempo, que varían en su grado de polimerización (o peso molecular) y fracción molar de acetilación (o grado de acetilación) (Giraldo, 2015). El grado de polimerización se refiere al número de unidades repetitivas que existe en una cadena macromolecular (Mier *et al.*, 1997). Mientras que la fracción molar de acetilación corresponde al porcentaje de unidades de *N*-acetil- β -D-glucosamina que hay en el polímero (Alsharabasy, 2016), donde es importante definir este parámetro previo a su utilización, ya que su valor dependerá del origen y del método de obtención de este (Hirano y Nagao, 1989). Siendo ambos parámetros de caracterización relevantes debido a su influencia en las propiedades fisicoquímicas de este polímero (Harish y Tharanathan, 2007; Domard, 2011).

Este biopolímero posee gran potencial en distintas aplicaciones, como el área de la medicina, alimentos y aplicaciones agrícolas (Cota-Arriola *et al.*, 2013). En este sentido, los materiales quitinosos pueden satisfacer distintas necesidades de la industria agrícola, ya que poseen propiedades biocidas, de resistencia sistémica inducida en plantas y bioestimulantes (Waliszewski *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2003; Nge *et al.*, 2006). Estos además, son biopolímeros que generan un menor daño ambiental, por lo que los bioproductos provenientes de estos no son tóxicos, son biodegradables y pueden generar respuestas biológicas aceptables durante diversos tratamientos (Giraldo y Reyes, 2022). Lo que ha llevado a que la quitina y el quitosano sean empleados en distintas aplicaciones agrícolas; como agente de tratamiento foliar, como enmienda en el suelo y como agente de recubrimiento de semillas con acción bioestimulante (Lárez, 2008).

Los bioestimulantes son sustancias o microorganismos que se aplican a las plantas con diversos objetivos, como mejorar la eficiencia de su nutrición y la tolerancia a estreses abióticos (du Jardin, 2015). En el caso del quitosano, dentro

de sus propiedades estimulantes se encuentran sus características como promotor del crecimiento y del rendimiento de las plantas (Chakraborty *et al.*, 2020), donde sus propiedades bioestimuladoras han sido demostradas en el aumento de la germinación de semillas y del crecimiento de raíces y hojas (Bhaskara *et al.*, 1999).

En este último punto, es importante mencionar la investigación de Guan *et al.* (2009), que examinó el uso de quitosano para bioestimular semillas de maíz (*Zea mays*) y en donde se observaron varios efectos significativos bajo estrés por temperatura; como la reducción del tiempo medio de germinación, el aumento del índice de germinación y el aumento de la altura de los brotes, de la longitud de las raíces y del peso seco de los brotes y de las raíces, mejorando además la tolerancia al frío de las plántulas de maíz. El recubrimiento de las semillas se usó para controlar el nivel de hidratación dentro de estas, para que pueda ocurrir la actividad metabólica necesaria para la germinación (Guan *et al.*, 2009). La razón de este efecto se debe a que el quitosano preserva la humedad de las semillas, facilitándoles agua suficiente para su germinación. Además, esto contribuye a que se genere un ambiente benéfico para los microorganismos del suelo (Wang y Zhuang, 2022). Por su parte, Saharan *et al.* (2016) determinó que el uso del quitosano aumenta el crecimiento de plántulas de maíz debido a que regula las enzimas responsables de la movilización de reservas almacenadas. Además concluyó que muestran una actividad antifúngica y de protección contra enfermedades transmitidas por semillas y por el suelo (Saharan *et al.*, 2016). Por otra parte, los efectos de este biopolímero no solo se pueden observar en los primeros estadios del maíz. En cuanto a esto, Boonlertnirun *et al.* (2011) realizó una aplicación de quitosano a plantas de maíz, la cual aumentó el área foliar, el tamaño de la mazorca y el rendimiento final del maíz (Boonlertnirun *et al.*, 2011).

El cultivo de maíz es de gran importancia a nivel mundial debido a la diversidad en su utilización, que implica la alimentación humana y principalmente la nutrición animal, ya que es un alimento muy energético que aporta 330 kcal por cada 100 g, pero que también es empleado en procesos industriales como la producción de bioetanol y polímeros biodegradables (Izquierdo y Cirilo, 2013; Saavedra, 2014). Es un cereal de gran rendimiento ya que al ser una planta C4 utiliza carbono de manera

eficiente, facilitando su crecimiento y desarrollo (Saavedra, 2014). En Chile, en el año 2020, se cultivaron cerca de 60.000 hectáreas, con una producción anual de 566.000 toneladas, siendo producido principalmente en la Región de O'Higgins (García y Laval, 2021).

Es por esto que la hipótesis de esta investigación es que considerando los beneficios de la aplicación de quitosano en las semillas de maíz, se espera que al determinar los rangos de grado de polimerización y fracción molar de acetilación del quitosano donde existe mayor actividad biológica beneficiosa para las semillas, se generen incrementos con relación a la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas de maíz. El objetivo general es determinar los rangos de grado de polimerización y fracción molar de acetilación del quitosano óptimos para obtener mejores resultados en la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas de maíz. Mientras que los objetivos específicos son (1) evaluar el efecto de soluciones de quitosano con un grado de polimerización en un rango de 5.558 a 17.161 en la germinación y crecimiento del maíz, (2) evaluar el efecto de soluciones de quitosano con una fracción molar de acetilación en un rango de 0,07 a 0,33 en la germinación y crecimiento del maíz y (3) evaluar el efecto de soluciones de quitosano con una concentración en un rango de 0,25 a 1,00 % en peso en la germinación y crecimiento del maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

La experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de microbiología de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, campus Concepción.

Se seleccionaron nueve muestras de quitosano con distintos grados de polimerización y fracciones molares de acetilación, con la finalidad de elaborar soluciones a distintas concentraciones (0,25 a 1,00 % p/p), generando un recubrimiento en semillas de maíz 'Jubilee' y así evaluar los efectos del quitosano sobre el porcentaje de germinación, biomasa fresca y seca, número de raíces y longitud de raíces y del epicótilo de las semillas de maíz. En este caso se utilizaron polímeros de quitosano.

A continuación se exponen las características de las muestras de quitosano:

Tabla 1. Características de cada muestra de quitosano.

Muestra	Grado de polimerización (X)	Fracción molar de acetilación (f_A)	Concentraciones a evaluar (% p/p)			
Q16H	17.161	0,16	0,25	0,50	0,75	1,00
Q25H	15.563	0,25				
Q33H	13.334	0,33				
Q09M	10.231	0,09				
Q24M	9.834	0,24				
Q32M	9.134	0,32				
Q07L	5.703	0,07				
Q23L	5.558	0,23				
Q27L	5.821	0,27				

El número al lado de la letra Q (quitosano) corresponde a la fracción molar de acetilación. Mientras que la letra al lado de este número representa la clasificación del grado de polimerización. H: High. M: Medium. L: Low.

A continuación se presentan los materiales utilizados:

Tabla 2. Materiales a utilizar.

Material biológico	Material esterilizado	Reactivos	Instrumentos	Equipos
Semillas de maíz 'Jubilee'	Vasos precipitados Placas Petri de vidrio	Soluciones de quitosano (0,00 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % y 1,00 % p/p)	Pie de metro	Cámara de germinación Cámara de flujo laminar
Quitosano	Espátula Agua destilada Colador Papel filtro Probeta Pinza	Soluciones de KOH (10 % y 50 % p/p) Ácido acético (100 %) Hipoclorito de sodio (0,8 %, 1,0 % y 1,5 % v/v)	Micropipeta (10 μ l)	Balanza digital pH-metro Estufa de secado

Evaluación de un método de desinfección de semillas eficiente contra la proliferación de hongos.

Se realizó un ensayo de desinfección de semillas utilizando hipoclorito de sodio con una concentración de 4,9 % v/v, el cual se llevó a 0,8 %, 1,0 % y 1,5 % v/v con la finalidad de determinar cuál era la concentración más adecuada para evitar la proliferación de hongos en semillas de maíz. El rango de concentración se seleccionó ya que en experimentos preliminares con hipoclorito de sodio al 0,5 % v/v, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Las semillas de maíz se mantuvieron en agitación en las soluciones de hipoclorito de sodio y agua destilada por 10 minutos, donde posteriormente fueron lavadas y expuestas al contacto con agua destilada estéril. Luego en placas Petri con papel filtro con 1 mL de agua destilada se colocaron 3 semillas por placa, con 3 repeticiones por concentración. Las cuales se incubaron en una cámara de germinación a 28 °C por 8 días, donde cada día se evaluó la presencia de hongos.

Finalmente el día 8 se evaluó el porcentaje de germinación, número de raíces, longitud de raíces y longitud del epicótilo.

Evaluación del recubrimiento con quitosano sobre los efectos fisiológicos en semillas de maíz.

Con la finalidad de generar un ambiente de mayor esterilidad, los materiales se autoclavaron y, con el mismo objetivo, la mayoría de los procesos se realizaron bajo una cámara de flujo laminar.

Para cada una de las nueve muestras se preparó una solución de 50 mL de quitosano para cada concentración (0,25 %, 0,50 %, 0,75 % y 1,00 % p/p), además de un control (agua). Cada solución contaba inicialmente de quitosano y agua destilada estéril, la cual se agitó por 5 minutos utilizando un agitador magnético, para luego agregar un 1,00 % p/p de ácido acético (100 %) y agitar por 15 minutos en el agitador magnético. Una vez lista las soluciones, se midió el pH inicial con un pH-metro y se llevó a pH 5 utilizando una solución de KOH al 10 % o al 50 % p/p, dependiendo del pH inicial de la solución.

Posteriormente las semillas desinfectadas se mantuvieron en las soluciones durante 4 horas con el fin de generar el recubrimiento de las semillas, donde

pasadas las 4 horas las semillas se colaron. Luego en placas Petri de vidrio se colocó papel filtro con 2 mL de agua destilada y fueron puestas 10 semillas por placa, con tres repeticiones para cada concentración. Posteriormente se llevaron a una cámara de germinación a 28 °C en oscuridad, por 8 días, donde se agregó 1 mL de agua según la humedad de las placas.

Finalmente el día 8 se realizó la medición del porcentaje de germinación y biomasa fresca de las semillas. Luego las placas Petri se abrieron y se seleccionaron 5 semillas al azar en cada repetición para medir número de raíces, longitud de raíces y del epicótilo utilizando un pie de metro. Posteriormente se llevaron a una estufa de secado a 70 °C durante 24 horas para así obtener el peso seco de las semillas.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis estadístico (ANOVA) y la prueba de rango de Tukey, utilizando el software estadístico InfoStat. Se utilizó un nivel significativo de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de un método de desinfección de semillas eficiente contra la proliferación de hongos.

Considerando que el objetivo del estudio fue determinar cuál era la concentración de hipoclorito de sodio más propicia para que no se presentasen hongos en las semillas de maíz, lo cual se cumplió en las tres concentraciones evaluadas y teniendo en cuenta que en la mayoría de los parámetros evaluados no existieron diferencias significativas, se determinó que la solución de 0,8 % v/v de hipoclorito de sodio era la más adecuada para realizar la desinfección de las semillas de maíz, ya que es la concentración mínima de hipoclorito de sodio con la que se cumple el objetivo planteado.

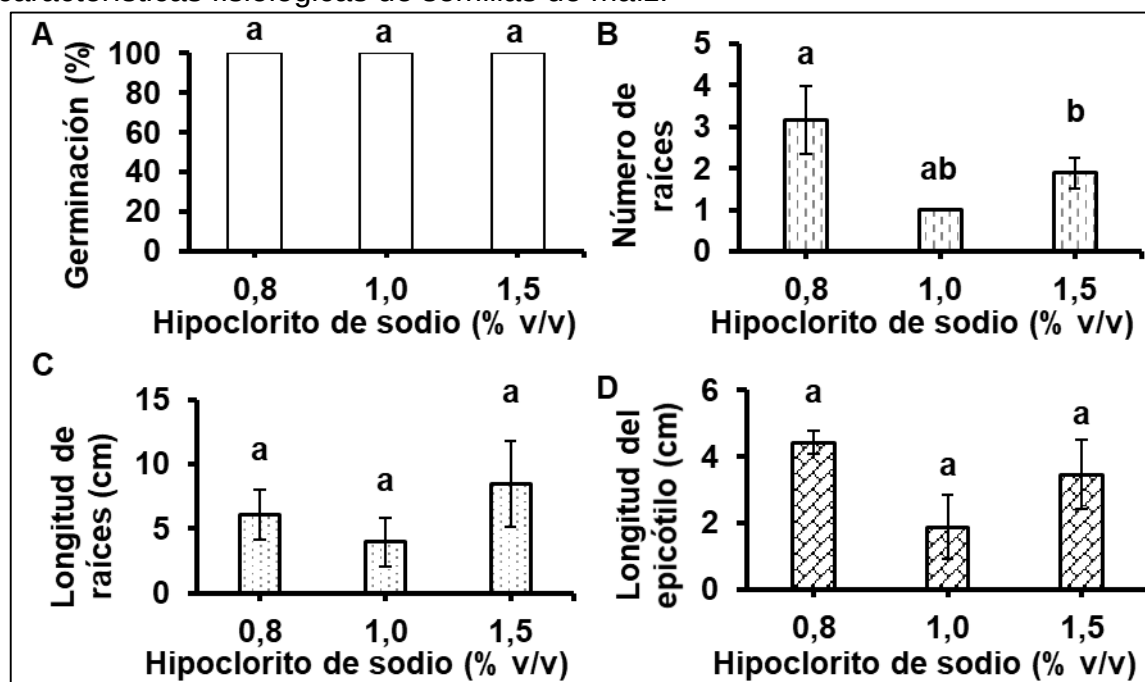
A continuación se presentan los resultados de la evaluación del método de desinfección eficiente contra la proliferación de hongos al día 8 de haber comenzado la experimentación:

Figura 1. Semillas de maíz desinfectadas con hipoclorito de sodio a distintas concentraciones.



A. Semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,8 % v/v. B. Semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1,0 % v/v. C. Semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1,5 % v/v.

Figura 2. Influencia de la concentración del hipoclorito de sodio sobre distintas características fisiológicas de semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Número de raíces de las semillas. C. Longitud de las raíces de las semillas. D. Longitud del epicótilo de las semillas.

Evaluación del recubrimiento con quitosano sobre los efectos fisiológicos en semillas de maíz.

Para determinar cómo afecta el grado de polimerización, fracción molar de acetilación y concentración del quitosano en los parámetros fisiológicos de las semillas y plántulas de maíz, se agruparon las muestras según su grado de polimerización, donde cada una presentaba diversas fracciones molares de acetilación.

Grado de polimerización alto: En una primera instancia se evaluaron las muestras con un alto grado de polimerización ($15.353 \pm 1.921,95$), correspondientes a las muestras Q16H, Q25H y Q33H, que presentan una fracción molar de 0,16, 0,25 y 0,33, clasificándose como baja, media y alta, respectivamente.

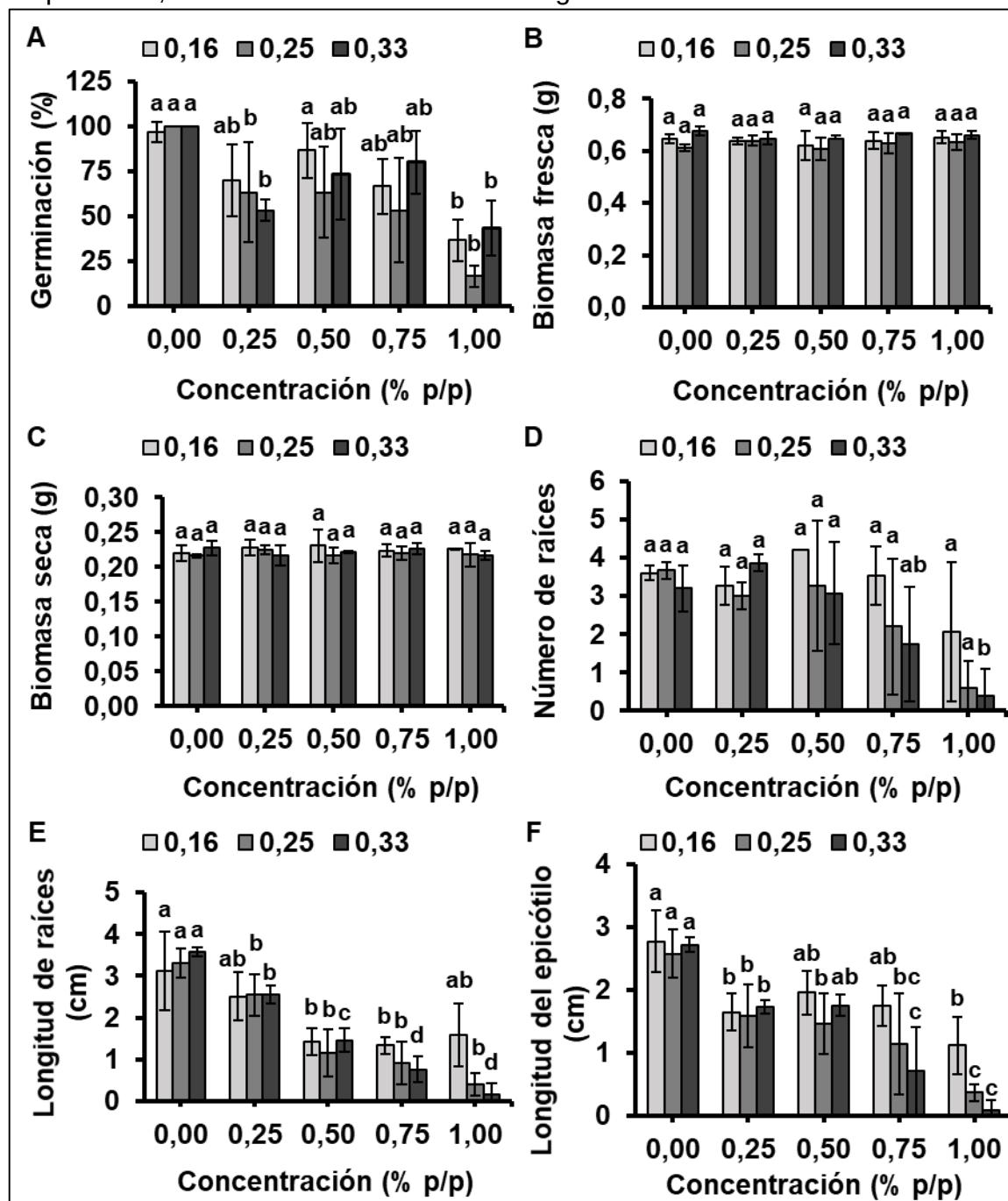
En relación a las figuras 3 y 4, se evidencia que fracciones molares de acetilación media y baja generan una disminución más paulatina del porcentaje de germinación. Además, se observa que mayores concentraciones de quitosano traen consigo un menor porcentaje de germinación, lo que se refleja más evidentemente a una fracción molar de acetilación media.

En la biomasa fresca se observa que no existe una variación considerable de masas, independiente de la fracción molar de acetilación y de la concentración de quitosano, siendo esto lo mismo que sucede con la biomasa seca. Para ambos parámetros fisiológicos de las semillas, en ninguna fracción molar de acetilación existen diferencias significativas entre el control y las concentraciones de quitosano.

En el número de raíces, se observa que una fracción molar de acetilación alta y media provocan una disminución más pronunciada en este parámetro en la medida que aumenta la concentración. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de quitosano y su control en las fracciones molares de acetilación media y baja. Por su parte, en la longitud de raíces la fracción molar de acetilación alta provoca una disminución de la longitud a medida que aumenta la concentración de quitosano. Lo mismo sucede con una fracción molar de acetilación media. Mientras que una fracción molar de acetilación baja genera mejores resultados, con respecto a la fracción molar de acetilación alta y media, donde a

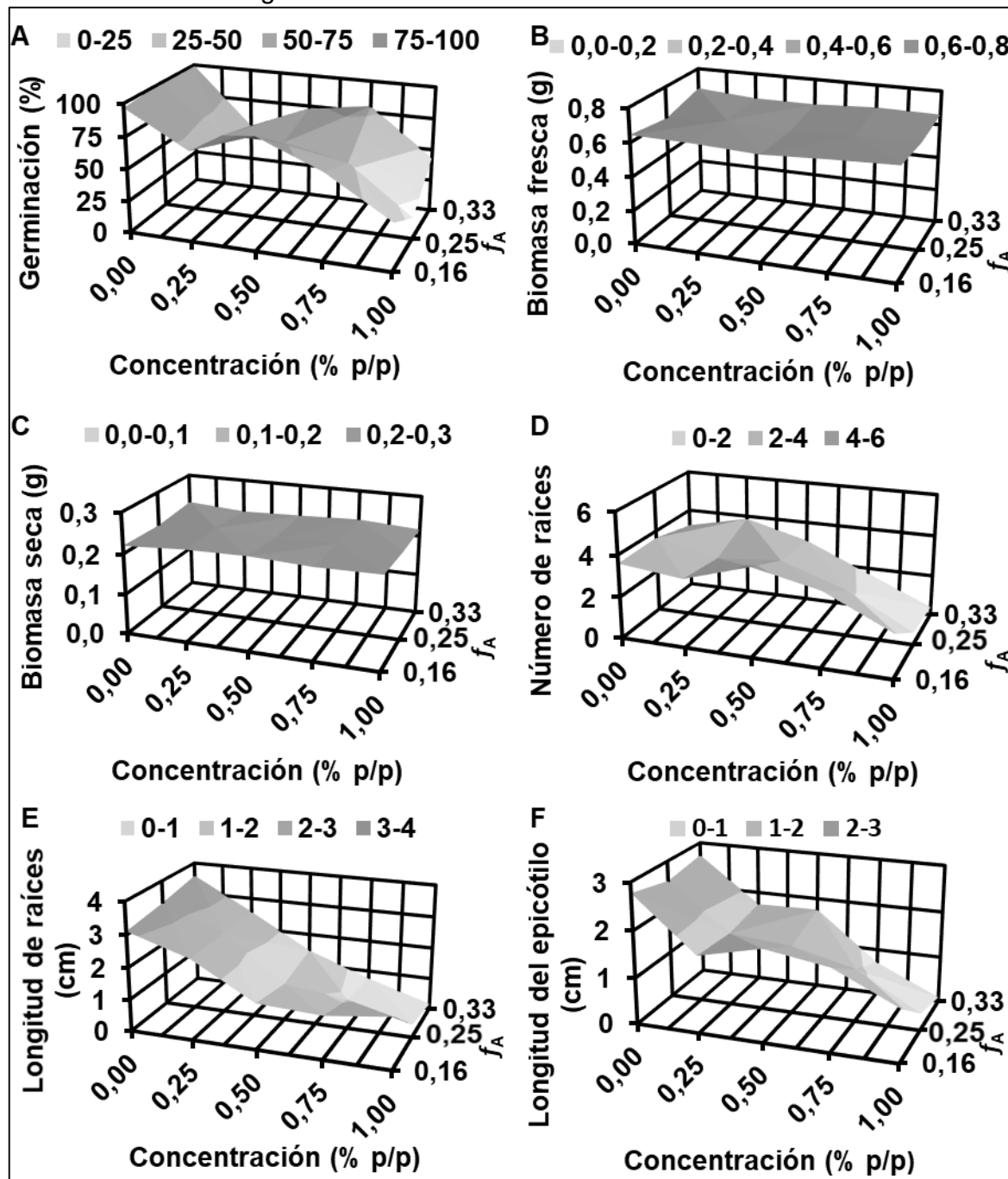
una concentración de 0,25 y 1,00 % p/p de quitosano, no hay diferencias significativas con su control.

Figura 3. Análisis estadístico de la influencia de un grado de polimerización alto ($15.353 \pm 1.921,95$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Biomasa fresca de las semillas. C. Biomasa seca de las semillas. D. Número de raíces de las semillas. E. Longitud de raíces de las semillas. F. Longitud del epicótilo de las semillas.

Figura 4. Influencia del grado de polimerización alto ($15.353 \pm 1.921,95$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Biomasa fresca de las semillas. C. Biomasa seca de las semillas. D. Número de raíces de las semillas. E. Longitud de raíces de las semillas. F. Longitud del epicótilo de las semillas.

En la longitud del epicótilo existe una disminución a medida que aumenta la concentración de quitosano. Sin embargo, a concentraciones de 0,50 y 0,75 % p/p

de quitosano a una fracción molar de acetilación baja y una concentración de 0,50 % p/p a una fracción molar de acetilación alta, no se presentan diferencias significativas con su respectivo control.

Grado de polimerización medio: Se evaluaron las muestras de grado de polimerización medio (9733 ± 555.52), que corresponden a las muestras Q09M, Q24M y Q32M y que presentan una fracción molar de 0,09, 0,24 y 0,32, clasificándose como baja, media y alta, respectivamente.

En base a las figuras 5 y 6, se tiene que una fracción molar de acetilación alta y media generan un mayor porcentaje de germinación, con respecto a una fracción molar de acetilación baja, en donde, específicamente en una fracción molar de acetilación media, no existen diferencias significativas entre el control y las concentraciones de quitosano. Por otra parte, a una fracción molar de acetilación baja se observa una disminución del porcentaje de germinación muy marcadamente a medida que aumenta la concentración de quitosano, llegando inclusive casi a un 0 % de germinación a una concentración de 1,00 % p/p.

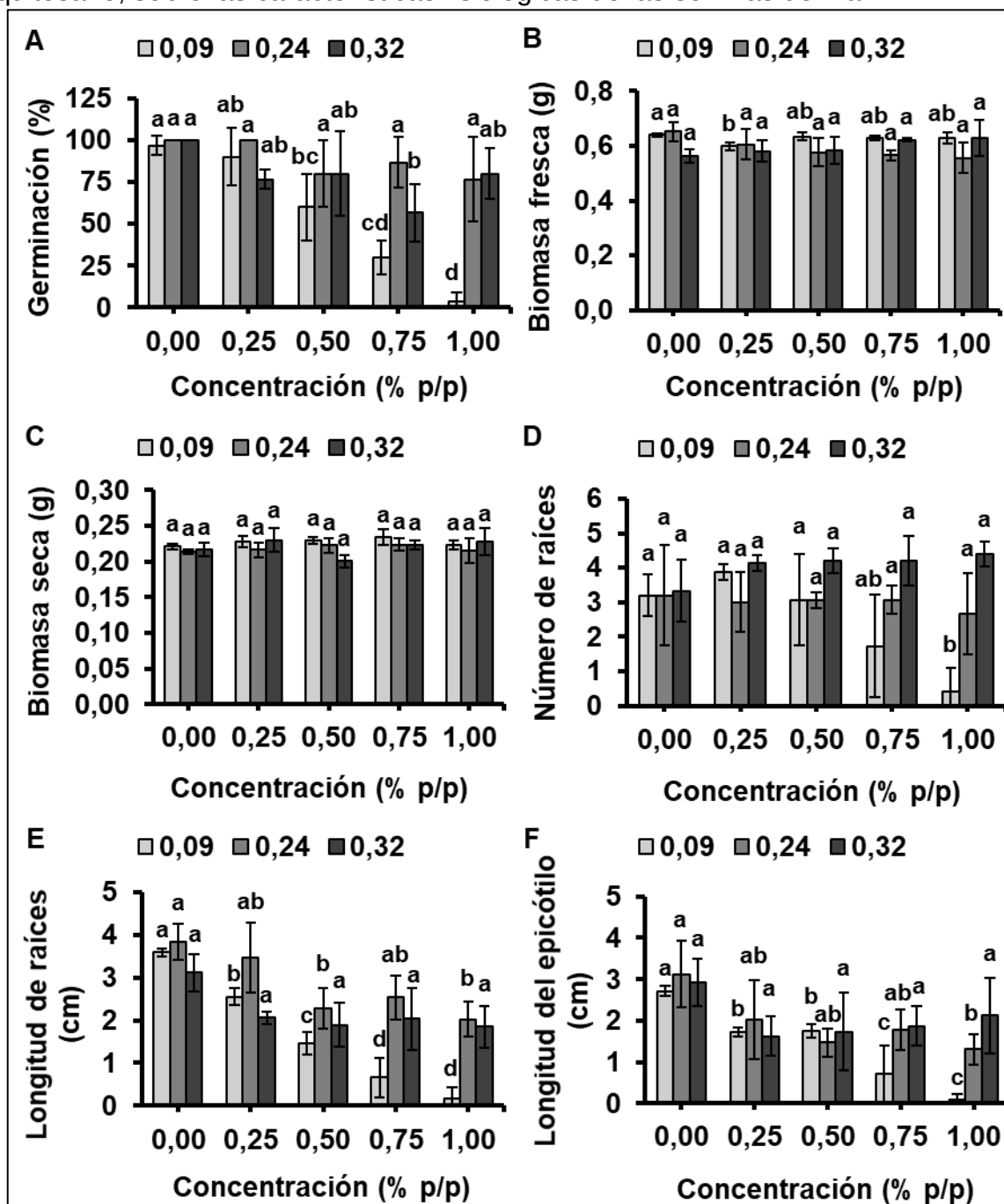
En cuanto a la biomasa fresca se observa que no existe mayor influencia de la fracción molar de acetilación y de la concentración de quitosano sobre las masas. Lo mismo sucede con la biomasa seca, donde las masas obtenidas a distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones son similares, sin presentar diferencias significativas entre las concentraciones y el control en las distintas fracciones molares de acetilación.

El número de raíces es mayor con una fracción molar de acetilación alta y media, donde existe una relación más bien lineal con la concentración de quitosano. Contrario a lo que sucede con una fracción molar de acetilación baja, donde a mayor concentración de quitosano se evidencia una disminución del número de raíces, existiendo diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 1,00 % p/p.

Por su parte, la longitud de raíces se ve favorecida por una fracción molar de acetilación media y alta en comparación con una fracción molar de acetilación baja; que provoca una disminución de la longitud a medida que aumenta la concentración

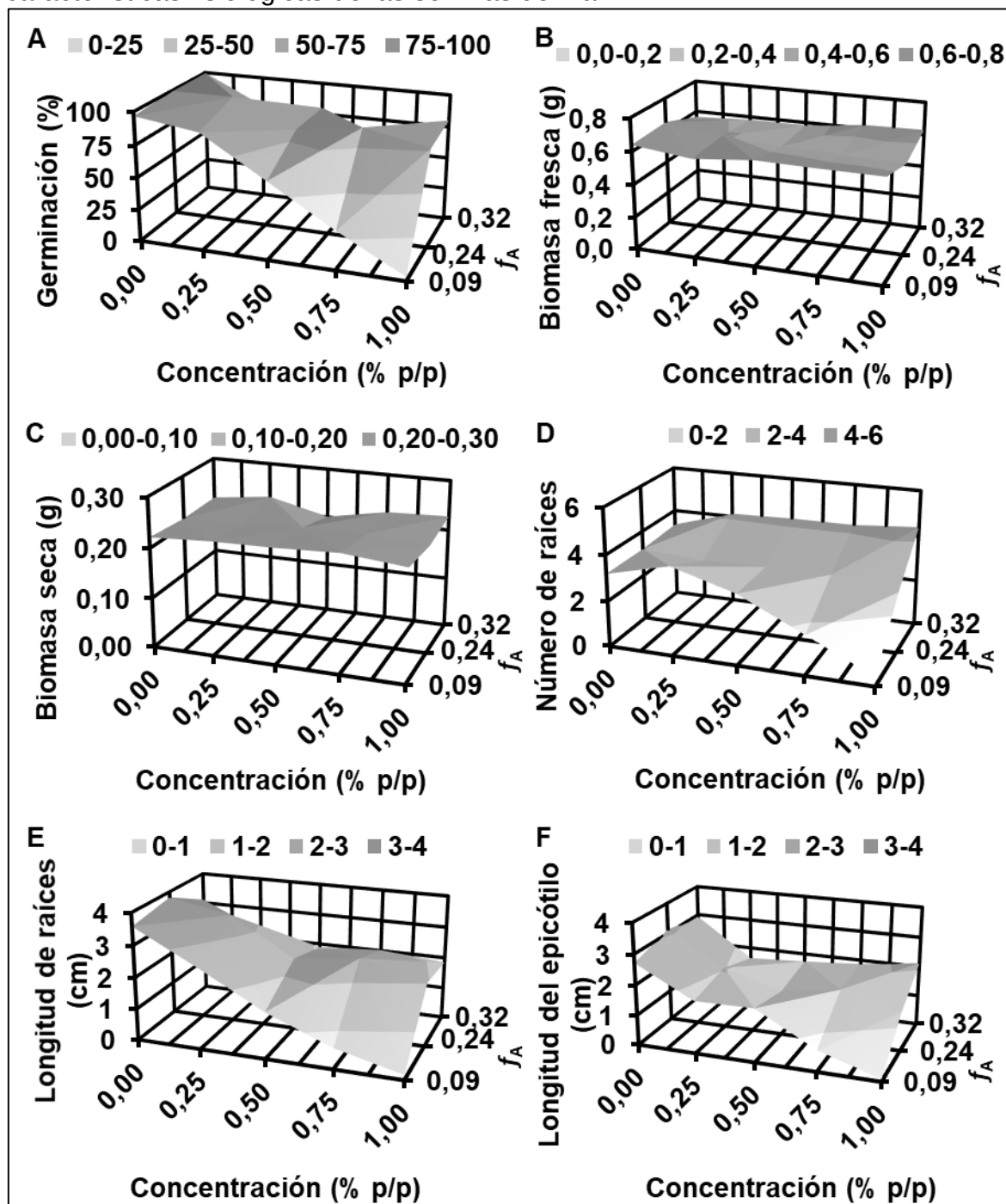
de quitosano.

Figura 5. Análisis estadístico de la influencia de un grado de polimerización medio (9.733 ± 555.52) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Biomasa fresca de las semillas. C. Biomasa seca de las semillas. D. Número de raíces de las semillas. E. Longitud de raíces de las semillas. F. Longitud del epicótilo de las semillas.

Figura 6. Influencia del grado de polimerización medio ($9.733 \pm 555,52$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Biomasa fresca de las semillas. C. Biomasa seca de las semillas. D. Número de raíces de las semillas. E. Longitud de raíces de las semillas. F. Longitud del epicótilo de las semillas.

Por otro lado, la longitud del epicótilo una fracción molar de acetilación alta no presenta diferencias significativas entre el control y las distintas concentraciones de

quitosano. Mientras que la relación que existe entre la concentración de quitosano, las fracciones molares de acetilación media y baja y la longitud del epicótilo es más bien variable. Sin embargo, disminuye a medida que aumenta la concentración de quitosano.

Grado de polimerización bajo: Se evaluaron las muestras con un grado de polimerización bajo ($5.694 \pm 131,38$), que corresponden a las muestras Q07L, Q23L y Q27L y que presentan una fracción molar de 0,07, 0,23 y 0,27, clasificándose como baja, media y alta, respectivamente.

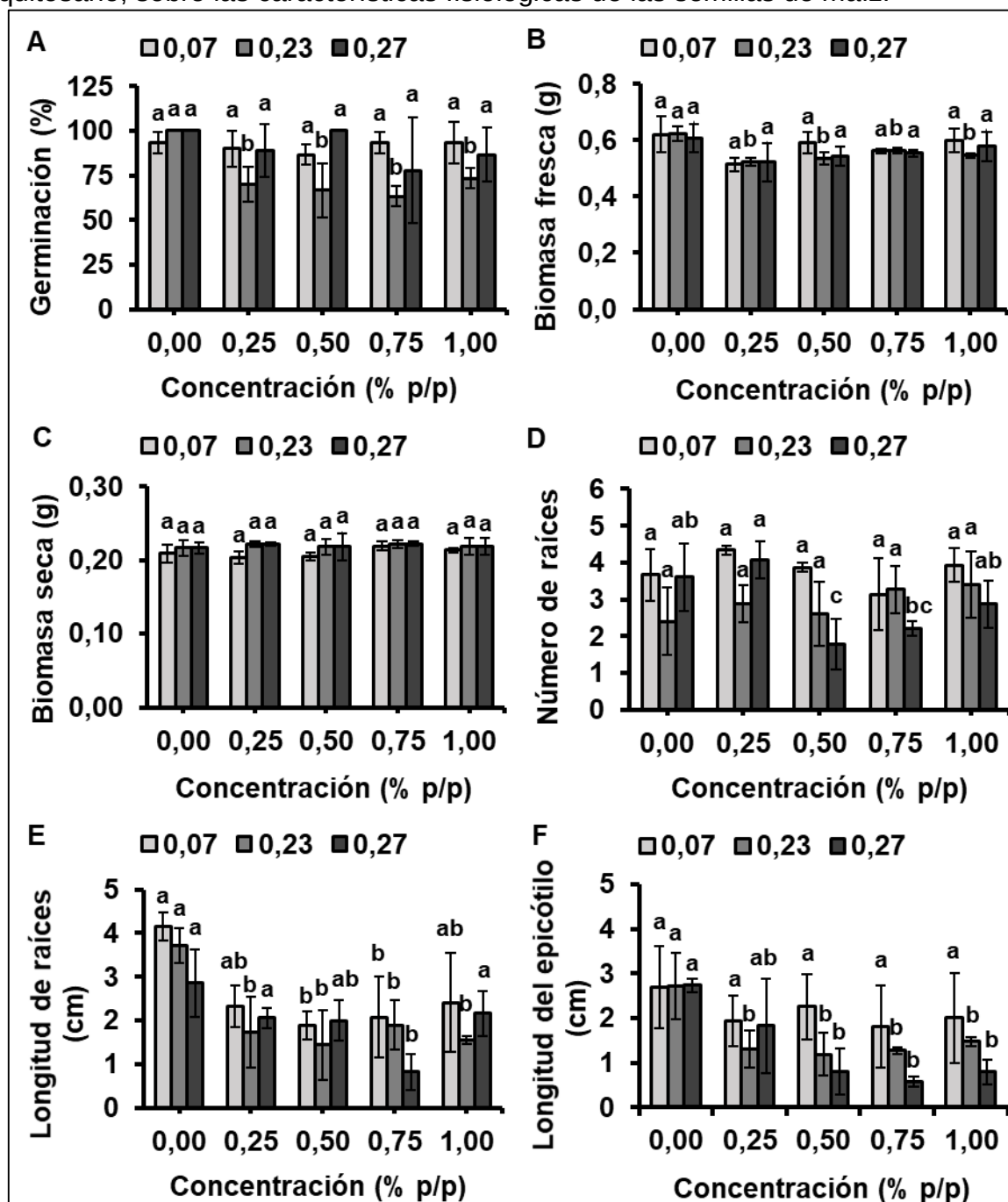
En relación a las figuras 7 y 8, el porcentaje de germinación no sufre mayores cambios con respecto a la fracción molar de acetilación baja y alta, independiente de la concentración de quitosano, donde no existen diferencias significativas entre el control y las distintas concentraciones de quitosano.

En cuanto a la biomasa fresca se observa que no sufre mayor variación de masas a medida que aumenta la concentración de quitosano en las distintas fracciones molares de acetilación. Lo mismo sucede con la biomasa seca, donde las masas obtenidas a distintas fracciones molares de acetilación y distintas concentraciones son similares, sin presentar diferencias significativas entre las concentraciones de quitosano y el control en las distintas fracciones molares de acetilación.

En cuanto al número de raíces, una fracción molar de acetilación baja y media generan mejores resultados en comparación con los generados por una fracción molar de acetilación alta, donde no se observa una diferencia significativa en el número de raíces a diferentes concentraciones de quitosano en todo el rango de la fracción molar de acetilación baja y media.

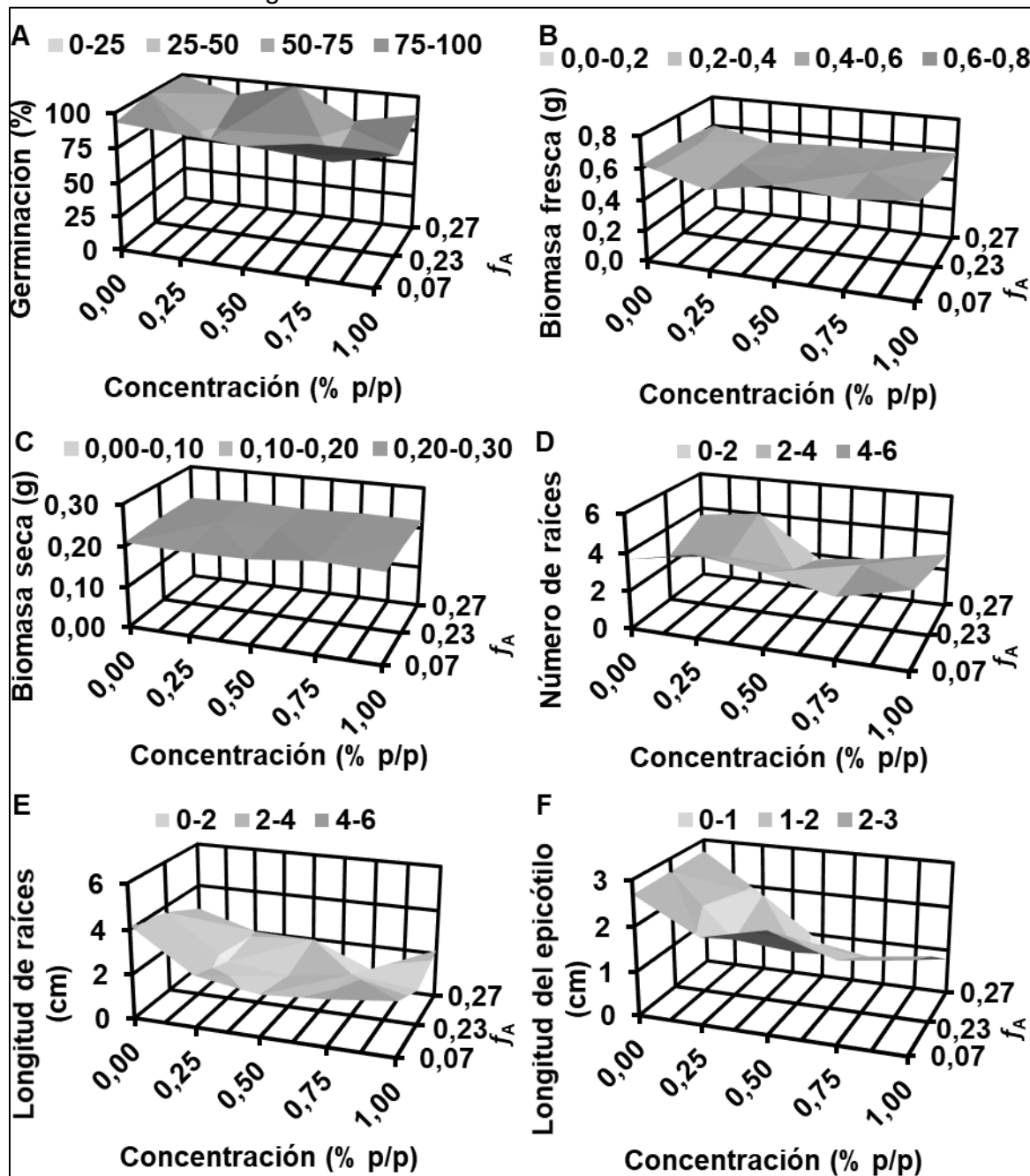
Por otra parte, una fracción molar de acetilación baja genera una longitud de raíces mayor en comparación con una fracción molar de acetilación alta y media. Mientras que en la longitud del epicótilo, una fracción molar de acetilación baja provoca una mayor longitud, que no cambia significativamente a medida que aumenta la concentración de quitosano, en comparación con una fracción molar de acetilación media y alta.

Figura 7. Análisis estadístico de la influencia de un grado de polimerización bajo ($5.694 \pm 131,38$) y fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Biomasa fresca de las semillas. C. Biomasa seca de las semillas. D. Número de raíces de las semillas. E. Longitud de raíces de las semillas. F. Longitud del epicótilo de las semillas.

Figura 8. Influencia del grado de polimerización bajo ($5.694 \pm 131,38$) y distintas fracciones molares de acetilación y concentraciones de quitosano, sobre las características fisiológicas de las semillas de maíz.



A. Porcentaje de germinación de las semillas. B. Biomasa fresca de las semillas. C. Biomasa seca de las semillas. D. Número de raíces de las semillas. E. Longitud de raíces de las semillas. F. Longitud del epicótilo de las semillas.

Comparación entre los distintos grados de polimerización: Al comparar las figuras 3, 5 y 7 junto con las figuras 4, 6 y 8, se determina que un grado de polimerización bajo genera un mayor porcentaje de germinación, que además

provoca una baja variación del porcentaje de germinación a medida que aumenta la concentración, en las distintas fracciones molares de acetilación.

En general, no existen mayores diferencias en el comportamiento de la biomasa fresca y seca de las semillas en relación al grado de polimerización, ya que en ambas no hay mayor variación y los valores obtenidos son cercanos en los tres grados de polimerización evaluados.

En cuanto al número de raíces, valores más bajos de grado de polimerización provocan un mayor número de raíces. Mientras que un grado de polimerización medio genera una mayor longitud de raíces. Sin embargo, en este punto esto solo se da a fracciones molares de acetilación media. Por otra parte, un grado de polimerización bajo provoca una mayor longitud del epicótilo, pero esto se da principalmente con una fracción molar de acetilación baja.

Al evaluar la influencia del grado de polimerización del quitosano sobre las semillas de maíz, se observa que un grado de polimerización bajo genera mejores resultados sobre las características fisiológicas del maíz. En cuanto a esto, una de las prácticas que se suelen realizar es la despolimerización del quitosano con la finalidad de disminuir el peso molecular de este (Chirinos *et al.*, 2013) y, por tanto, su grado de polimerización, ya que son dos variables que están correlacionadas (Mier *et al.*, 1997), donde de esta manera aumentaría su bioactividad en aplicaciones agrícolas (Giraldo *et al.*, 2023; Chirinos *et al.*, 2013). En cuanto a esto, Chirinos *et al.* (2013), a través de la despolimerización del quitosano, demostró que un quitosano mayormente despolimerizado genera una mayor germinación en semillas de zapallo italiano (*Cucurbita pepo*) (Chirinos *et al.*, 2013).

En cuanto a este parámetro, se puede observar además que se encuentra relacionado con la fracción molar de acetilación, por lo que sus resultados pueden depender de este último.

Por otra parte, al evaluar la influencia de la fracción molar de acetilación sobre los eventos fisiológicos del maíz se entiende, igualmente, que no es un parámetro que afecte de manera independiente del grado de polimerización. Más bien, se encuentra correlacionado a este. Así es como se puede ver de los resultados mostrados que una fracción molar de acetilación baja genera mejores resultados

con un grado de polimerización bajo. Es necesario hacer notar que también se hace esencial tener en consideración que los quitosanos evaluados presentan índices de dispersidad de su grado de polimerización similares, un patrón de acetilación aleatorio, y que se desconoce el índice de dispersidad de su fracción molar de acetilación.

En cuanto a la concentración, se evidencia una disminución de la mayoría de parámetros fisiológicos a medida que aumenta la concentración del quitosano.

Así es como se observa que en los distintos parámetros evaluados, el control suele ser la muestra que provoca mejores resultados en las semillas o bien no presenta diferencias significativas con las semillas recubiertas con quitosano, uno de estos casos es el que sucede en la biomasa fresca y biomasa seca de las semillas, donde no existe una mayor influencia del quitosano.

En relación a lo expuesto por otros autores, como se mencionó inicialmente, Guan *et al.* (2009) evaluó el efecto del recubrimiento de semillas de maíz con quitosano sobre la germinación y el crecimiento del maíz bajo estrés por temperatura. Para esto, utilizó dos cultivares; uno tolerante al frío 'HuangC' y uno sensible al frío 'Mo17'. El recubrimiento se realizó con soluciones de quitosano de concentración 0,25, 0,50 y 0,75 % p/v a pH 5,1, donde las semillas fueron puestas en papel secante con la solución de quitosano en placas Petri y se mantuvieron a 15 °C en oscuridad de 48 a 64 horas según la concentración de quitosano. Luego las semillas se secaron hasta alcanzar su humedad inicial y posteriormente fueron sometidas a un estrés por temperatura. Como resultado no hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre los tratamientos y el control. Sin embargo, aumentaron el índice de germinación y disminuyeron el tiempo medio de germinación. Además, hubo un aumento de la altura de los brotes y de la longitud de la raíz con respecto al control (Guan *et al.*, 2009).

En cuanto a esto último, esta memoria se contradice con los resultados obtenidos en el estudio de Guan *et al.* (2009). Sin embargo, dentro de los parámetros esenciales sobre el efecto del recubrimiento en semillas, Guan *et al.* (2009) hace mención de las concentraciones utilizadas, tiempo de cebado y temperatura (Khan, 1992), las cuales son diferentes a las utilizadas en este trabajo.

Por lo que, si bien las semillas fueron tratadas a concentraciones similares, dentro de las razones de esta contradicción pueden encontrarse el tratamiento que recibieron las semillas.

En relación a esto, Lizárraga-Paulín *et al.* (2013) evaluó los efectos del recubrimiento y de la aspersión de quitosano en semillas y plántulas de maíz sobre sus parámetros fenológicos, donde se evaluaron dos cultivares; 'N-279' y 'QPM-374'. El recubrimiento se realizó con un quitosano con grado de deacetilación del 92 % ($f_A = 0,08$), al 2,00 % p/v de concentración, durante 12 horas, donde luego las semillas se secaron para eliminar el exceso de humedad. Como resultado se obtuvo que en la germinación, longitud de plántula, longitud de hoja y del tallo y grosor del tallo no existieron diferencias significativas con respecto al control, lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta memoria. Así mismo, Lizárraga-Paulín *et al.* (2013), expresa que esto se contradice con los resultados informados por Guan *et al.* (2009). Sin embargo, se reconoce la diferencia de concentraciones y temperatura como posibles causas de esta contradicción, así como las diferencias propias de las semillas y los parámetros de caracterización del quitosano, como su grado de deacetilación, peso molecular o su origen biológico (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2013).

En este mismo sentido, Choudhary *et al.* (2017) evaluó el efecto de nanopartículas de Cu-quitosano (0,01 % a 0,16 % p/v) y quitosano a granel (0,01 % p/v) sobre la actividad biológica del maíz. Las semillas se recubrieron con la solución de quitosano por 4 horas, se pasaron a placas Petri y se incubaron a 28 °C. Como resultado, no hubo diferencias significativas entre el control y el quitosano a granel en cuanto al porcentaje de germinación, la biomasa fresca y seca, la longitud de los brotes y de las raíces y el número de raíces. Por otra parte, las nanopartículas de Cu-quitosano mejoraron significativamente el desarrollo de las plántulas de maíz a través del cobre como nutriente (Choudhary *et al.*, 2017).

Finalmente, una alternativa podría ser utilizar oligómeros de quitosano obtenidos a través de la despolimerización de este, lo que aumentaría su bioactividad (Giraldo *et al.*, 2023; Chirinos *et al.*, 2013). Además, en los últimos años han habido mayores avances en cuanto a la caracterización de oligómeros de quitosano, lo que no sucede de igual manera en los polímeros quitinosos (Cord-

Landwehr *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

1. Se determinó que quitosanos con un grado de polimerización bajo, de una media de 5.694, producen mejores resultados sobre la actividad biológica del maíz, donde además existe una correlación entre este parámetro y la fracción molar de acetilación.
2. Se determinó que quitosanos con una fracción molar de acetilación baja, de una media de 0,11 generan mejores resultados sobre la actividad biológica del maíz. Mientras que es importante considerar que el efecto generado por la fracción molar de acetilación sobre las semillas de maíz es dependiente del grado de polimerización del quitosano.
3. Se determinó que la concentración más adecuada para realizar el recubrimiento de quitosano en semillas de maíz es de 0,25 % p/p, pero a pesar de esto, las semillas que no se recubrieron con quitosano fueron las que obtuvieron mejores resultados en relación a quitosanos de alto y medio grado de polimerización.

REFERENCIAS

1. Alsharabasy A. 2016. Semi-Synthesis of Chitosan with High Molecular Weight and Enhanced Deacetylation Degree. *Polym. Sci.* 02 (02): 1–8.
2. Bhaskara, M. V., J. Arul, P. Angers and L. Couture. 1999. Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47: 208–1216.
3. Boonlertnirun, S., R. Suvannasara, P. Promsomboon and K. Boonlertnirun. 2011. Application of chitosan for reducing chemical fertilizer uses in waxy corn growing. *Thai Journal of Agricultural Science*. 44 (5): 22-28.
4. Chakraborty, M., M. Hasanuzzaman, M. Rahman, M. A. R. Khan, P. Bhowmik, N. U. Mahmud, M. Tanveer and T. Islam. 2020. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture (Switzerland)*. 10 (12): 1–30. <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture10120624>
5. Chirinos, A., M. Tacoronte y C. Lárez. 2013. Efecto del quitosano sobre la germinación y preservación de la semilla de calabacín (*Curcubita pepo*).

Tesis de magister, Universidad de Los Andes.
<http://dx.doi.org/10.13140/2.1.3448.2565>

6. Choudhary, R. C., A. Joshi, S. Kumari, R. V. Kumaraswamy and V. Saharan. 2017. Preparation of Cu-chitosan nanoparticle and its effect on growth and enzyme activity during seed germination in maize. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6 (4): 669-673.
7. Cord-Landwehr, S., A. Niehues, J. Wattjes and B. M. Moerschbacher. 2019. New developments in the analysis of partially acetylated chitosan polymers and oligomers. In, Issue February 2018. *Chitin and chitosan* (pp. 81–95). John Wiley & Sons, Ltd.
8. Cota-Arriola, O., M. Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández, J. Ezquerro-Brauer and M. Plascencia-Jatomea. 2013. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: Development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93 (7): 1525–1536.
9. Domard A. 2011. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 84 (2): 696-703.
10. du Jardin P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae, Biostimulants in Horticulture*. 196: 3–14.
11. FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2020. Versión resumida. La sostenibilidad en acción. Roma.
<https://doi.org/10.4060/ca9231es>
12. Franca, E., L. Freitas and R. Lins. 2011. Chitosan molecular structure as a function of N-acetylation. *Biopolymers*. 95 (7): 448–460.
13. García, A. y E. Laval 2021. Boletín de cereales.
<https://bibliotecadigital.ciren.cl/server/api/core/bitstreams/d13f7ccd-e6ef-428e-a1e3-db1fab98cb2b/content>
14. Giraldo J. D. 2015. Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *Appl. Chitosan*. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3350.9287>
15. Giraldo, J. D., K. A. Garrido-Miranda and M. Schoebitz. 2023. Chitin and its derivatives: Functional biopolymers for developing bioproducts for sustainable agriculture—A reality? *Carbohydrate Polymers*. 299: 120196.
16. Giraldo, J. D. y M. Reyes. 2022. Desafíos y potencialidades de la obtención y aplicación de los materiales Quitinosos. *Revista Versión diferente*. Vol. 34. 92-95.
17. Guan, Y. J., J. Hu, X. J. Wang and C. X. Shao. 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological

- changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10: 427-433.
18. Harish, K. and R. Tharanathan. 2007. Chitin/Chitosan: Modifications and their unlimited application potential- an overview. *Trends in Food y technology*. 18 (3):117.
 19. Hirano, A. and N. Nagao. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry*. 11: 3065– 3066.
 20. Izquierdo, N. y A. Cirilo. 2013. Usos del maíz: efectos del ambiente y del manejo sobre la composición del grano. *Jornada de Actualización. Calidad del grano de maíz para la industria y la producción en bovinos*. 83-92. <https://core.ac.uk/download/pdf/301064904.pdf>
 21. Khan A. 1992. Preplant Physiological Seed Conditioning. *Horticultural Reviews*. 13: 131-181.
 22. Khan, W., B. Prithviraj and D. Smith. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160: 859–863.
 23. Lárez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*. 8 (1): 1-22.
 24. Lizárraga-Paulín, E. G., S. P. Miranda-Castro, E. Moreno-Martínez, A. V. Lara-Sagahón and I. Torres-Pacheco. 2013. Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 14, 87-96. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.B1200270>
 25. Mármol Z. 2003. Alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de las conchas de camarón. Trabajo de Ascenso para optar a la categoría de Titular. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. Escuela de química. 56p.
 26. Mier, J., R. Artiaga y L. García Soto. 1997. Síntesis de Polímeros. Pesos moleculares. Conformación y configuración. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9638/CC_32_art_1.pdf
 27. Nge, K. L., N. Nwe, S. Chandkrachang and W. F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Journal of Plant Science* 170: 1185-1190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.006>
 28. Saavedra G. 2014. El Cultivo de Maíz Choclero y Dulce. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín N° 303. 146p.
 29. Saharan, V., R. V. Kumaraswamy, R. C. Choudhary, S. Kumari, A. Pal, R. Raliya and P. Biswas. 2016. Cu-chitosan nanoparticle mediated sustainable

approach to enhance seedling growth in maize by mobilizing reserved food. *Journal of agricultural and food chemistry*. 64 (31): 6148-6155.

30. Sastoque-Cala, L., M. Mercado-Reyes, M. Martínez-Salgado, B. Quevedo-Hidalgo y A. Pedroza-Rodríguez. 2007. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6 (2): 137-146.
31. Waliszewski, K. N., V. T. Pardio and M. Ramirez. 2002. Effect of chitin on color during osmotic dehydration of banana slices. *Drying Technology* 20: 719-726.
32. Wang, J. and S. Zhuang. 2022. Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*. 355: 131825.
33. Yan, N. and X. Chen. 2015. Sustainability: Don't waste seafood waste. *Nature*. 524 (7564): 155–157.
34. Zhan, J., J. Lu and D. Wang. 2021. Review of shell waste reutilization to promote sustainable shellfish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 14 (1): 477–488.