

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN CONSERVACIÓN DE LA
BIODIVERSIDAD Y RESTAURACIÓN DEL MEDIO MARINO Y
TERRESTRE**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO ACADÉMICO [2021-2022]

TÍTULO:

**Aprovechamiento de las poblaciones del cangrejo exótico
Callinectes sapidus para obtención de quitosano**

AUTORA:

Bárbara Iváñez Rugero

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi tutora, María del Carmen Barbera Cebrián, a mi cotutor Federico Lopez Moya y a Luis Vicente Lopez Llorca, director del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada de la Universidad de Alicante, por sus consejos, ideas, y sugerencias. A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y por haber sido amables y pacientes conmigo, han sido mis referentes por su disciplina y actitud y gracias a ellos he aprendido mucho sobre los procesos que se desarrollan en el laboratorio de Fitopatología.

A todos ellos y en especial a mi tutora las gracias por su apoyo.

RESUMEN

Este trabajo pretende optimizar un método para la extracción del quitosano del *Callinectes sapidus* o el cangrejo azul, que es una especie nativa de la costa occidental del Atlántico. Su hábitat natural se localiza desde el Norte hacia el Sur de América. Se ha introducido como especie invasora en el Mar Mediterráneo a través de las aguas de lastre de los barcos, causando un efecto negativo sobre la diversidad de invertebrados y vertebrados autóctonos de las costas mediterráneas españolas, teniendo también impactó en la pesca artesanal. Una forma de controlar su población, es introducirlo en el mercado de pesca con la finalidad de utilizarlo en nuestra gastronomía. Sin embargo, como en todo uso comercial, causa el aumento de los desechos de crustáceos contribuyendo a la contaminación del medio ambiente.

Por lo tanto, en este Trabajo Fin de Máster, se ha creado un protocolo experimental con la ayuda de diferentes artículos científicos que estudian la obtención de la quitina y del quitosano de esta especie invasora. La finalidad del proceso en el laboratorio es observar si el quitosano puede ser eficiente en el control de la germinación de conidios del *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4). El FocTR4 es un hongo patógeno que parasita a los cultivos de plátanos y bananos. La finalidad de este proceso es comparar los resultados que se obtienen con la extracción del quitosano del *Callinectes sapidus* de mi estudio con el quitosano comercial que se encuentra depositado en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales de la Universidad de Alicante. También se ha comparado las diferencias obtenidas entre el uso de *Callinectes sapidus* según el sexo, machos y hembras maduras, con el objetivo de marcar la eficiencia de su utilización según el sexo. Para ello fue necesario caracterizar físicamente los biopolímeros de los sexos del *Callinectes sapidus* y del comercial mediante el FTIR (Infrarrojo Transformado de Fourier) para analizar sus similitudes y diferencias.

Palabras claves: *Callinectes sapidus*, quitina, quitosano, FocTR4, FTIR.

ABSTRACT

This thesis was written to optimise a method for the extraction of chitosan from *Callinectes sapidus* (more commonly known as the blue crab). The *Callinectes sapidus* is a native species of the western Atlantic coast. Its natural habitat is located from North to South America. It was introduced as an invasive species in the Mediterranean Sea through the ballast water of ships, causing a negative effect on the diversity of invertebrates and vertebrates native to the Spanish Mediterranean coasts, as well as small-scale fishing. One way of controlling the *Callinectes sapidus* population is to introduce it into the fishing market with the aim of using it in local gastronomy. However, as with all commercial use, it causes an increase in crustacean waste which contributes to environmental pollution.

Therefore, in this Master's Thesis, an experimental protocol has been created with the help of different scientific articles that study the obtaining of chitin and chitosan from this invasive species. The aim of the laboratory process is to observe whether chitosan can be efficient in controlling the germination of conidia of *Fusarium oxysporum* sp f. *cubense* tropical race 4 (FocTR4). FocTR4 is a pathogenic fungus that parasitizes banana and plantain crops. The purpose of this process is to compare the results obtained with the extraction of chitosan from the *Callinectes sapidus* of this study with the commercial chitosan deposited in the Phytopathology laboratory of the Department of Environmental Sciences and Natural Resources of the University of Alicante. This thesis also compared the quality of the chitosan obtained from *Callinectes sapidus* males versus mature females. The biopolymers of male and female *Callinectes sapidus* (both commercial and non commercial) were physically characterised by FTIR (Fourier Transform Infrared) to analyse their similarities and differences.

Keywords: *Callinectes sapidus*, chitin, chitosan, FocTR4, FTIR.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. ¿Qué es la quitina?	10
1.2. ¿Qué es el quitosano?	11
1.3. Aplicaciones de quitosano	11
1.4. Quitosano comercial y otras alternativas	16
1.5. <i>Callinectes sapidus</i> como especie invasora: biología y aprovechamiento	17
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	26
3.1. Área de muestreo y método de captura de cangrejo azul	26
3.2. Preparación de las muestras del cangrejo para la obtención de biopolímeros	28
3.3. Extracción de quitina	30
3.4. Extracción de quitosano	32
3.5. Caracterización de la quitina y del quitosano	33
3.6. Solubilizar el quitosano obtenido	34
3.7. Preparación de placas de PDA	36
3.8. Protocolo de extracción de conidios de FocTR4 en placa y su preparación en placas húmedas	37
3.9. Análisis estadístico	41
4. RESULTADOS	41
4.1. Pesos triturados y tamizados de los exoesqueletos de los cangrejos azules (<i>Callinectes sapidus</i>)	41
4.2. Resultados de los procesos experimentales para la obtención de quitina y quitosano del <i>Callinectes sapidus</i>	42
4.3. Rendimiento de quitina y de quitosano	43
4.4. Caracterización de la quitina y del quitosano	44

4.5. Resultados de la germinación de los conidios en las cinco disoluciones	52
5. DISCUSIÓN	53
6. CONCLUSIÓN	54
7. INCIDENCIAS	56
8. BIBLIOGRAFÍA	57
9. ANEXO	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la quitina.	10
Figura 2. Estructura química del quitosano.	11
Figura 3. Imagen de un cangrejo azul o <i>Callinectes sapidus</i> , hembra y madura.	17
Figura 4. Dimorfismo sexual entre los cangrejos azules machos y hembras.	18
Figuras 5 y 6. Los cangrejos azules antes y después de ser hervidos.	19
Figura 7. Estados de madurez de huevos en <i>Callinectes sapidus</i> .	21
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Callinectes sapidus</i> .	22
Figura 9. Imagen de la <i>Anodonta anatina</i> .	24
Figura 10. Imagen de las nasas.	27
Figuras 11 y 12. Imágenes de los órganos del <i>Callinectes sapidus</i> .	28
Figura 13. Tres cangrejos azules, machos y maduros siendo hervidos en la olla.	29
Figuras 14 y 15. Batidora y tamices.	30
Figura 16. Una muestra siendo decolorada por la lejía del 2%.	31
Figuras 17 y 18. Imágenes de la quitina de las hembras maduras de la tercera réplica.	32
Figuras 19 y 20. Desacetilación y quitosano de la última réplica de machos maduros.	33
Figura 21. Bote del quitosano líquido comercial (T8).	35
Figuras 22, 23 y 24. Botes de quitosano líquido de los cangrejos azules hembras maduras, de los cangrejos azules machos maduros y tampón líquido.	36
Figura 25. Bote de PDA autoclavado.	37
Figura 26. El hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4).	38
Figura 27. Quince placas para las 24 horas.	40
Figura 28. Quince placas para las 48 horas.	40
Figura 29. Imagen del tamaño de los granos del exoesqueleto del <i>Callinectes sapidus</i> .	42
Figuras 30, 31 y 32. Caracterización de las quitinas de los machos maduros.	45
Figuras 33, 34, 35 y 36. Caracterización de las quitinas de las hembras maduras.	46

Figuras 37, 38, 39 y 40. Caracterización de los quitosanos de las machos maduros.	48
Figuras 41, 42, 43 y 44. Caracterización de los quitosanos de las hembras maduras.	50
Figuras 45, 46 y 47. Caracterización del quitosano comercial (T8) del laboratorio.	51
Figura 48. Boxplot donde se representa las diferencias de las disoluciones.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. La suma de cada cuadrado, la suma total y la media.	38
Tabla 2. Diferentes pesos de los exoesqueletos triturados del <i>Callinectes sapidus</i> .	42
Tabla 3. Diferentes pesos de quitina y de quitosano.	43
Tabla 4. Diferentes rendimientos de quitina (%), quitosano (%) y medios de quitosano (%).	44
Tabla 5. Resultados del ANOVA.	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿Qué es la quitina?

La quitina (Figura 1.) es un biopolímero compuesto por cadenas de N-acetil-D-glucosamina unidas por β -(1-4). Este biopolímero se presenta en tres formas polimórficas que difieren en la presentación de las cadenas, con tres clases: alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La quitina alfa tiene cadenas antiparalelas, la quitina beta las tiene paralelas y en la gamma quitina hay dos cadenas que están hacia arriba y una que está hacia abajo (Ghosh et al., 2019). Fue descubierta en 1811 por el químico y farmacéutico francés Henri Braconnot (Palmeira et al., 2020) y es el segundo polímero más común después de la celulosa en la tierra (Amalraj et al., 2020). Se encuentra comúnmente en los exoesqueletos de los artrópodos, caparazones de crustáceos y cutículas de insectos, también están presentes en las paredes celulares de la mayoría de los hongos, algas verdes, levaduras y en las conchas de los bivalvos y de los gasterópodos (Zentz et al., 2001).

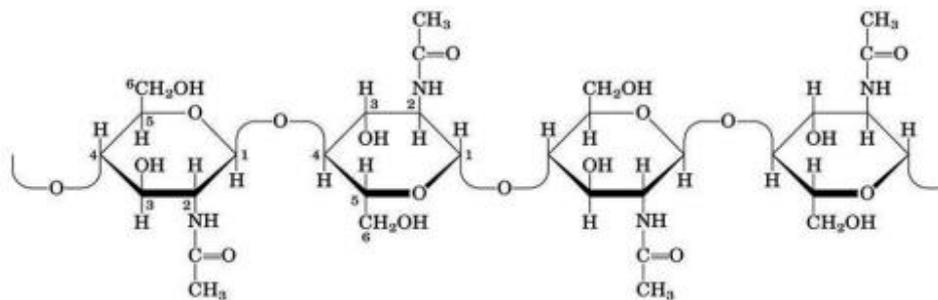


Figura 1. Estructura de la quitina. Fuente: Mármol et al., 2011.

Los crustáceos son importantes en el sector pesquero e industrial, ya que son alimentos utilizados en el consumo humano. El aumento de la población conduce a un mayor consumo de este tipo de alimento. Y el aumento está generando una gran cantidad de caparazones o cualquier parte de su cuerpo que no sea carne y por tanto sea desechada, produciendo abundantes residuos de crustáceos que no son aprovechados contribuyendo a la contaminación del medio ambiente. Por este motivo se están estudiando e investigando medidas para reutilizar los desechos de los crustáceos, con la finalidad de minimizar los daños al medio ambiente y a la salud humana. Estos compuestos bioactivos, como es el caso de la quitina, puedan ser utilizados en distintas aplicaciones, pertenecientes al mercado económico.

El proceso de obtención de quitina requiere varios procedimientos, primero se tiene que eliminar el carbonato de calcio mediante la desmineralización, mientras que las proteínas serán eliminadas por la desproteínización. Tanto la desmineralización como la desproteínización se

puede realizar mediante tratamientos químicos o enzimáticos en los que se puede invertir el orden de los dos pasos (Oyatogun et al., 2020). A veces, se tiene que hacer un tercer proceso que es la decoloración para eliminar los pigmentos residuales, porque hay especies de crustáceos que tienen una pigmentación muy fuerte. Pero el problema que tiene la quitina es que es insoluble en solventes comunes debido a su alta estructura cristalina y al tener una fuerte red de enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, estas características proporcionan a este polímero que sea insoluble hacia aquellos solventes orgánicos e inorgánicos comunes (Amalraj et al., 2020). Por esta razón, se decide utilizar un cuarto proceso llamado desacetilación para convertir a la quitina en quitosano.

1.2. ¿Qué es el quitosano?

El quitosano (Figura 2.) es un polímero lineal de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que se puede obtener por la desacetilación de la quitina (Lee et al., 2017). Este biopolímero es biocompatible, biodegradable, no tóxico, posee buenas características antimicrobianas contra muchas bacterias, hongos y levaduras (Kaya et al., 2016), buena capacidad de formación de películas, buena quelación y buenas propiedades de absorción (Oyatogun et al., 2020). En consecuencia, el quitosano está siendo utilizado con diferentes aplicaciones en diferentes campos científicos y económicos.

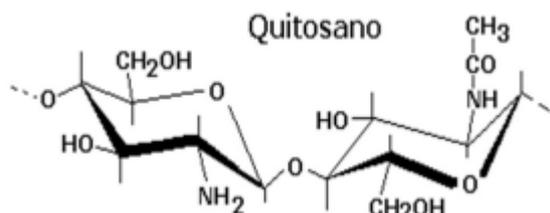


Figura 2. Estructura química del quitosano. Fuente: Mármol et al., 2011.

1.3. Aplicaciones de quitosano

Como se ha dicho en el apartado anterior el quitosano está siendo utilizado en diferentes aplicaciones biomédicas, industriales y agrícolas.

1.3.1 Aplicaciones biomédicas

1.3.1.1 Ingeniería de tejidos

El quitosano ha demostrado su utilidad para ser un bioandamio para la ingeniería de tejidos, especialmente para la piel y el hueso, debido a que se degrada a medida que se forman los nuevos tejidos sin sufrir reacciones inflamatorias y ni degradación tóxica. También estimula la adhesión, la proliferación y la viabilidad de las células del tejido (Bakshi et al., 2020).

1.3.1.2. Farmacología

El quitosano está siendo utilizado en los productos farmacéuticos, ya que pueden encapsular activos farmacéuticos, protegerlos contra la degradación y permitir su liberación durante un periodo prolongado, es decir, el recubrimiento de productos farmacéuticos con quitosano proporciona una liberación controlada de muchos fármacos con diferentes especialidades como son los fármacos anticancerígenos, antibióticos, antiinflamatorios, antidiabéticos y agentes gastrointestinales (Hamed et al., 2016).

1.3.1.3. Terapia génica

La terapia génica es una estrategia terapéutica basada en la inserción de material genético en la célula con el objetivo de dar solución a afecciones generadas por genes defectuosos, mediante la cual se puede corregir los defectos genéticos, sintetizar el componente biológico necesario para la terapia o interrumpir el efecto causado por el gen que provoca la enfermedad. Para que el gen llegue hasta la correspondiente célula y se sintetice el componente biológico adecuado es fundamental contar con un portador que proteja al gen de la degradación enzimática, que facilite su entrada en la célula y que una vez dentro le facilite el camino hasta el núcleo. Y en esta terapia se ha observado que los complejos de quitosano-ADN son fáciles de sintetizar y son más eficaces que los complejos poligalactosamina-ADN. El contenido de quitosano y la longitud de la cadena desempeñan un papel importante en la estabilización de los complejos quitosano-ADN. Al aumentar el peso molecular y la concentración de quitosano se obtienen complejos más estables, lo que indica que la longitud de la cadena de quitosano es un parámetro importante para controlar la capacidad del polímero de transportar vectores genéticos terapéuticos a las células (Mittal et al., 2018).

1.3.1.4. Curación de heridas

El quitosano se está utilizando en la curación o cicatrización de heridas debido a sus actividades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes (Gao y Wu, 2022).

1.3.1.5. Otras aplicaciones biomédicas

En el artículo científico de Gao y Wu explican que el quitosano puede ser utilizado en otras aplicaciones biomédicas como la odontología restauradora, donde el quitosano es eficaz como adhesivo dental antibacteriano. En la terapia contra el cáncer y en la terapia contra Anti-HIV, que significa virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

1.3.2 Aplicaciones industriales

1.3.2.1. Tratamiento de aguas residuales

Las aguas residuales pertenecientes al sector industrial suponen una gran amenaza para el medio ambiente y a la salud humana debido a las grandes concentraciones de diversos contaminantes tóxicos y peligrosos. Entre los diversos procesos para tratar las aguas residuales, la adsorción es un proceso ampliamente adoptado, por su simplicidad y rentabilidad (Sheth et al., 2021). Sheth et al., demostraron que el quitosano es eficaz y tiene capacidad para la adsorción y eliminación de metales pesados en las aguas residuales. Pero es necesario investigar más para que el quitosano sea eficiente a escala industrial. No obstante, en otro artículo científico (Ahmed et al., 2021) explica como el compuesto de quitosano/carbón activado dio buen rendimiento en el saneamiento de las aguas residuales.

1.3.2.2. Industria textil

La aplicación del quitosano en la industria textil es principalmente para preparar fibras de quitosano, los cuales son biocompatibles, biodegradables, no tóxicos, buena absorción de la humedad, antiestáticos, antiarrugas y reduce el crecimiento de microorganismos como son las bacterias y los hongos. Estas fibras son utilizadas para la creación de telas centradas en la ropa interior, ropa infantil y ropa de dormir, y también se utiliza como potenciador del tinte para los textiles (Wang et al., 2020).

1.3.2.3. Industria del papel

Se ha utilizado en la fabricación de papel reduciendo los aditivos químicos y se ha aplicado para reforzar el papel reciclado y para fabricar envases respetuosos con el medio ambiente, como son los envoltorios para alimentos, papel higiénico, cartón, etc. Y las características que tiene el papel de quitosano es que es resistente a la humedad y es suave (Bakshi et al., 2020).

1.3.2.4. Cosméticos

El quitosano se añade a los cosméticos para mejorar sus propiedades hidratantes y filmógenas. Se utiliza para la preparación de emulsiones hidratantes, productos para el cuidado de la piel y máscaras faciales. Estas preparaciones con este biopolímero hacen que los productos cosméticos tengan un mejor efecto hidratante en la cutícula humana, buenas propiedades antibacterianas, mejores propiedades de absorción y retención de agua que el ácido hialurónico (Wang et al., 2020), el cual es un polisacárido muy utilizado en la hidratación de la epidermis.

Por otro lado, se añade a los champús y productos para el cuidado del cabello, porque mejoran el color del cabello debido a que el quitosano tiene la capacidad de interactuar con la queratina, la cual forma una película elástica y transparente sobre las fibras capilares. También se está añadiendo en la pasta de dientes y al enjuague bucal, por sus propiedades antibacterianas (Wang et al., 2020).

1.3.2.5. Industria de la alimentación

En la industria alimentaria, el quitosano se está utilizando para la conservación de envases y disminuir los efectos negativos de los aditivos alimentarios (Wang et al., 2020). En el caso de los envases, este biopolímero tiene capacidad de formar películas y aporta propiedades antimicrobianas. Hace los envases más resistentes a factores externos, como son los rayos ultravioletas. Ayuda a la conservación de alimentos, tanto carnes como otros productos alimentarios como son las frutas y las verduras. Mejora la biodegradabilidad en comparación con los envases de plástico tradicionales, los cuales contaminan y no siguen los principios de una economía circular y sostenible. En relación a los aditivos alimentarios, el quitosano puede absorber los pigmentos de los aditivos que puedan tener una toxicidad hacia el cuerpo humano y además puede reducir eficazmente el contenido de sólidos y metales pesados que se encuentran en los líquidos comestibles. También protege a los alimentos, tanto los sólidos como los líquidos como pueden ser los zumos de la oxidación, el enranciamiento de los lípidos, inhibe el crecimiento de microorganismos y se utiliza como conservante de alimentos para prolongar el tiempo de almacenamiento de los mismos. Por otra parte, el quitosano se utiliza como espesantes, decolorantes y estabilizadores en la industria alimentaria centrado en los aditivos alimentarios.

Además, se utiliza como suplemento dietético para controlar la obesidad, ya que el quitosano tiene la capacidad de unirse a la grasa, generando una masa que el cuerpo no puede absorber y es eliminada por el organismo (Bakshi et al., 2020).

1.3.3. Agricultura

Por último, la quitina y el quitosano cuya fuente de extracción son los crustáceos poseen una actividad antimicrobiana hacia bacterias y hongos patógenos. La eficiencia de la actividad agrícola se ve muy negativamente afectada por las plagas de patógenos. Para controlar las poblaciones de patógenos y que no afecten a la calidad de los cultivos se utilizan fertilizantes y pesticidas para el control de plagas y enfermedades (Reyes, 2020) y también para el desarrollo y rendimiento de los cultivos. Pero las altas dosis de pesticida y fertilizantes son factores que

provocan efectos negativos sobre el pH del suelo, desbalance nutricional, pérdida de microorganismos benéficos, efecto negativo hacia el medio ambiente como es el caso de la incorporación de estas sustancias químicas hacia aguas superficiales y subterráneas y que desencadenaría unos graves riesgos hacia la salud humana (Kashyap et al., 2015). Por estas razones las características del quitosano que hemos nombrado anteriormente lo convierten en un polímero muy importante para el sector agrícola.

El quitosano tiene actividad antimicrobiana hacia bacterias gramnegativas y grampositivas (Oyatogun et al., 2020) como es el caso de *Ralstonia solanacearum* que es una bacteria Gram-negativa y patógena a las plantas de cultivo (Muriithi et al., 2013). Por otra parte, este biopolímero ayuda a las bacterias endofíticas, que son unos microorganismos que colonizan el interior de las plantas con la finalidad de aumentar la actividad fotosintética y el crecimiento de la planta, y cuando el quitosano se combina con estas bacterias provoca un fuerte aumento del crecimiento de los cultivos y un control de las enfermedades biológicas causadas por bacterias patógenas (Kumar et al., 2019). Además, el quitosano es altamente compatible con tres tipos de metales: zinc, cobre y níquel. Estos metales tienen propiedades fungicidas, antibacterianas y desinfectantes, y cuando el quitosano de crustáceos se combina con estos iones metálicos, su actividad antimicrobiana contra las patógenos que habitan en el suelo mejora todavía más (Zhang et al., 2022).

También tiene una mayor actividad antifúngica puesto que puede interferir en la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio de los hongos patógenos al impedir su desarrollo. Puede actuar como elicitador biológico, induciendo respuestas de defensa del huésped, como la acumulación de -1,3-glucanasas y compuestos fenólicos, mediante la inducción de enzimas de maceración del tejido del huésped, lo que aumenta la resistencia del huésped, como es el caso de las cáscaras de la fruta y el efecto inhibitorio es considerablemente mayor cuando se aplica antes de que el hongo patógeno se haya establecido y crezca activamente en los cultivos frutales, aunque también puede prevenir el desarrollo de hongos incluso en frutas con infecciones fúngicas establecidas y esto significa que el quitosano de crustáceos puede aplicarse como protector de las plantas frutales antes del almacenamiento postcosecha (Munhuweyi et al., 2017). Pero es menos efectivo contra los hongos que tienen componentes de quitina o de quitosano en sus paredes celulares, y tienen capacidad de degradar el quitosano como es el caso de los hongos nematofagos o entomopatógenos. No obstante, el quitosano puede ser utilizado como nutriente para los hongos que parasitan a los nematodos como por ejemplo *Pochonia chlamydosporia* que es un hongo nematófago filamentoso y que tiene una capacidad para parasitar diferentes especies de nematodos fitopatógenos (Escudero et al., 2016), y en un

trabajo de fin de grado (Fraile, 2020), se observó que al añadir quitosano a este hongo presento un aumento de su crecimiento y esporulación, aumenta su capacidad de generar propágulos para parasitar nematodos y por lo tanto, su eficacia como agente de control biológico está siendo potenciada por este biopolímero.

Por lo tanto, el quitosano puede controlar los patógenos fúngicos y bacterianos, que se encuentran tanto en el suelo como en las plantas hortícolas. Estas ventajas que tiene el quitosano de crustáceos ayudan en el rendimiento de la cosecha, prolonga la vida útil de las frutas y hortalizas tratadas al minimizar la tasa de respiración y reducir la pérdida de agua, y tiene el potencial de convertirse en un plaguicida biológico con la finalidad de proteger y regular el crecimiento de las plantas de cultivo y esto ayudaría en alcanzar una agricultura sostenible con el medio natural (Bautista et al., 2006).

1.4. Quitosano comercial y otras alternativas

En los diferentes artículos científicos se habla que el crustáceo más utilizado para la extracción de quitosano y utilizado en el sector económico es el camarón (Pakizeh et al., 2021) (Hisham et al., 2021). No obstante, se está empezando a utilizar otras especies de crustáceos con la finalidad de disminuir el impacto ambiental que generan sus caparazones y de diversificar el uso del quitosano en diferentes aplicaciones.

Voy a enumerar diferentes especies de crustáceos y su uso actual, por ejemplo, el uso de los caparazones de *Scylla olivacea* o del cangrejo de barro para propiedades fisicoquímicos y antioxidantes (Sarbon et al., 2015) o la preparación y caracterización de quitosano a partir de los caparazones del cangrejo gazami o *Portunus trituberculatus* (Huang et al., 2020). El uso de las nanopartículas de quitosano derivadas del exoesqueleto del cangrejo *Charybdis natator* o el cangrejo de natación estriado para la administración in vivo de un fármaco poco soluble en agua como es el Ibuprofeno (Balde et al., 2022), la evaluación de biopolímeros (quitina y quitosano) extraídos a partir del caparazón de cangrejo *Procambarus clarkii* o cangrejo de río americano (Quiroga, 2019), la extracción y caracterización de la quitina, el quitosano y el hidrolizado de proteínas del *Portunus segnis* o el cangrejo azul invasor del Pacífico con potenciales actividades biológicas (Jabeur et al., 2021). Por último, señalar la extracción del quitosano del *Callinectes sapidus* o del cangrejo azul con la finalidad de obtener conocimiento de sus características y la posibilidad de actividad antifúngica. Se detallará en los siguientes apartados.

1.5. *Callinectes sapidus* como especie invasora: biología y aprovechamiento

1.5.1. Biología y descripción de la especie

El cangrejo azul o conocido científicamente como *Callinectes sapidus* (Figura 3.), Rathburn (1896), es un crustáceo decápodo de la familia Portunidae nativo de la costa occidental del Atlántico, desde Nueva Escocia (Canadá) hasta Argentina incluyendo todo el Caribe (Mocholi, 2020). En estas zonas, es un importante producto para la pesca comercial, siendo un recurso importante en pesquerías del Norte (Estados Unidos y México) y de Venezuela (FAO, 2018) (<https://www.fisheries.noaa.gov/species/blue-crab>). También es un elemento clave en la cadena trófica bentónica, información que se detallará en el siguiente apartado. Es eurihalino y euritermo y se ha encontrado tanto en aguas someras como a 90 metros de profundidad, aunque prefieren zonas inferiores a los 35 metros (Esteso, 2019). Por ese motivo puede habitar en estuarios, lagunas y otros hábitats costeros.

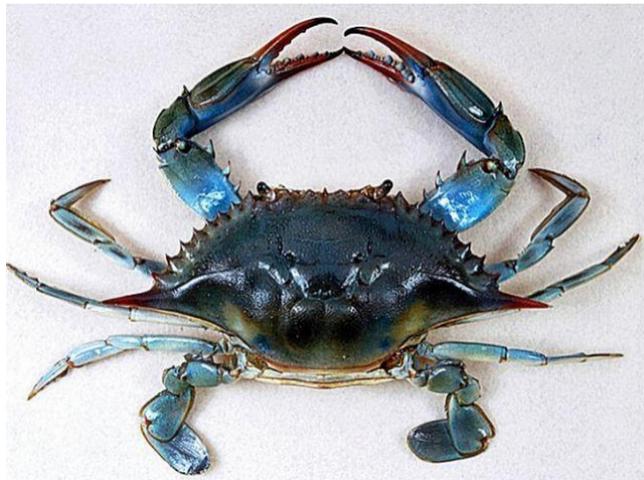


Figura 3. Imagen de un cangrejo azul o *Callinectes sapidus*, hembra y madura. Fuente: EcuRed.

Se caracteriza por su dimorfismo sexual (Figura 4.), tanto externo como interno, puesto que el abdomen de los machos maduros tiene la forma de una T invertida, larga y delgada, y su abdomen está libre o se encuentra sostenido en su sitio por un par de pequeños tubérculos en la parte interna. No obstante, los machos inmaduros tienen los abdómenes estrechamente adheridos a la superficie ventral del tórax. Mientras que el abdomen de las hembras maduras es redondeada, casi semicircular, ancha y libre de la parte ventral del animal, muy diferente al de las hembras inmaduras, ya que su abdomen es triangular y sellado al cuerpo.

Además, su coloración representa diferencias en cuanto a su sexo, en la Figura 4. se observa que los quelípedos y pleópodos de las hembras presentan un color anaranjado intenso, mientras que en los machos presentan un color azul intenso. Por otro lado, hay diferencias en

el color de las pinzas, puesto que los quelíceros en los machos son azules con las puntas rojas, pero en las hembras tienen una coloración anaranjada con puntas moradas (Olivert,2018).

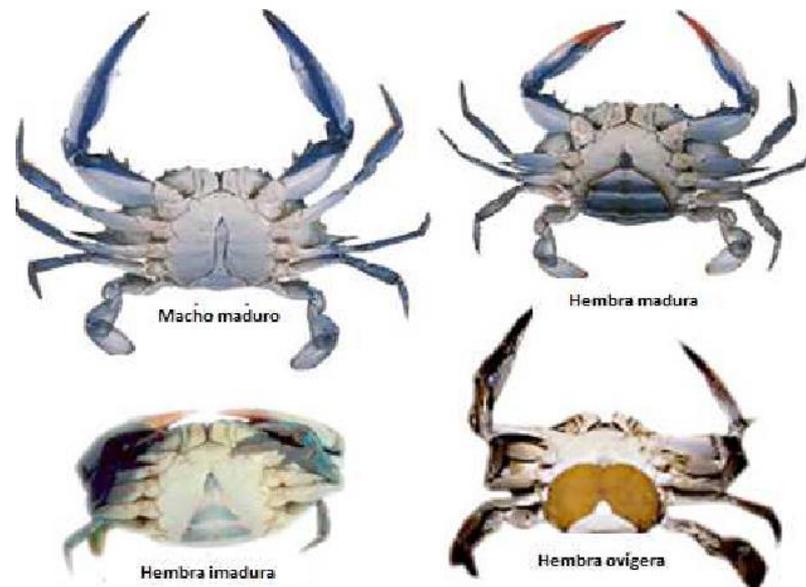


Figura 4. Dimorfismo sexual entre los cangrejos azules machos y hembras. Fuente: <http://www.virginiaplaces.org>.

La coloración verde-azulada del *Callinectes sapidus* proviene de pigmentos como son la alfa-crustacianina y la astaxantina (Olivert,2018), los cuales al interferirse entre ellos forman una pigmentación azul verdosa. Por esa razón, cuando se hierven los cangrejos azules en una olla, se observa cómo se descomponen la pigmentación azulona que la alfa-crustacianina desprende, dejando así la pigmentación rojiza de la astaxantina, de manera que quedan los cangrejos con un color rojo anaranjado o un color rosa intenso (Figuras 5 y 6.).



Figuras 5 y 6. En la imagen de arriba (Figura 5.), se observa la coloración verde-azulada del *Callinectes sapidus* antes de ser hervidos, mientras que la imagen de abajo (Figura 6.) tiene una coloración rojo anaranjado o un color rosa intenso después de hervirlos.

1.5.2. Reproducción y ciclo de vida.

El *Callinectes sapidus* es una especie dioica, en otras palabras, ambos sexos están separados y como explicamos en el apartado anterior tienen un dimorfismo sexual bastante marcado. Su estado de madurez es alcanzado en el segundo año de vida del organismo (Pérez, 2020), es decir, los cangrejos azules machos alcanzan la madurez después de 18 o 19 mudas post larvales, mientras que las hembras alcanzan la madurez después de 18 a 20 mudas post larvales (Millikin y Williams, 1984).

En su hábitat natural, su época de apareamiento es entre los meses de mayo a octubre, presentando una mayor intensidad entre agosto y septiembre. Las hembras se aparean sólo una vez en su vida, justo en el momento en el que pasa de ser inmadura a madura, a diferencia de los machos, los cuales pueden aparearse varias veces. Las hembras que están preparadas para la última muda liberan una feromona con el objetivo de atraer al macho, el cual se coloca detrás de ella y sosteniéndola con sus pinzas y patas ambulatorias, la transporta durante varios días debajo de él hasta que la hembra muda. Con el nuevo caparazón aun blando se unen por la parte ventral y empieza la cópula que dura entre 5 y 12 horas. Después, los machos se quedan junto a la hembra hasta que el caparazón se endurece de nuevo (Esteso, 2019). Más tarde, la hembra almacena el esperma en el receptáculo seminal (espermatóforo) y permanece viable en ella durante un año, ya que la finalidad del esperma almacenado es fecundar los óvulos, los cuales maduran progresivamente hasta dos meses después del apareamiento, y el resto del esperma se utilizará para las siguientes fecundaciones futuras. Estas fecundaciones generarán huevos, los cuales estarán retenidos en el abdomen de la hembra durante semanas hasta que eclosionan. Dependiendo del estado de la madurez de los huevos tendrá tres tipos de coloración (Figura 7.) y estos colores nos dirán en qué periodo están, dicho de otra manera, al principio son anaranjados, pero al cabo de dos semanas son amarillos y a partir de ese periodo se irán oscureciendo hasta obtener un color negro, al llegar a este color significa que la siguiente fase es la eclosión. Todo esto es debido a que el embrión absorbe la yema gradualmente a la vez que desarrolla el pigmento negro de los ojos (Van Engel, 1958). El desove se realiza en zonas de elevada salinidad, entre 23-33 psu y a temperaturas de entre 19-29 °C, porque son las condiciones necesarias para que los huevos puedan eclosionar (Navarro, 2021).

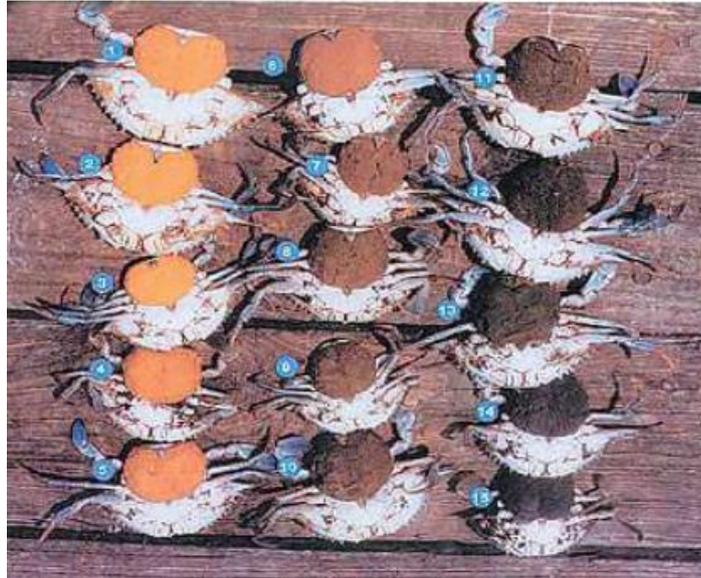


Figura 7. Estados de madurez de huevos en *Callinectes sapidus*. Fuente: <http://www.virginiaplaces.org>.

El ciclo de vida de *Callinectes sapidus* se divide en cinco fases (Figura 8.). La primera fase es un huevo y como se dijo en el anterior apartado, las hembras sueltan sus huevos en aguas marinas con una salinidad de entre 23-33 psu. La segunda fase es el primer estado larval o zoea, que es la fase en que se encuentran en la superficie del agua formando parte del zooplancton durante treinta días (Campos y Fagoth, 2018). Su primer estado larval o zoea tiene siete mudas y le permite aumentar su tamaño en un 50%. Aproximadamente tienen un milímetro de largo y su dieta consiste en consumir pequeños vegetales y protistas, los cuales son desplazados por la fuerza de las corrientes marinas. La tercera fase es el segundo estado larval o megalopa y su periodo de transformación a esta segunda fase va desde los siete a los veinte días y con la ayuda de las corrientes marinas se distribuirán hacia aguas protegidas, los cuales son las zonas costeras de carácter estuarino, por ejemplo, las desembocaduras de ríos, donde se desarrollará la cuarta fase que es la juvenil, en esta cuarta fase tienen hábitos bentónicos y hacen una migración río arriba, donde mudarán unas 18 o 20 veces hasta alcanzar la última y quinta fase, que es la fase adulta. Los cangrejos adultos tienen un año o un año y medio de vida, y se encuentran aguas arriba de los ríos y en lagunas costeras, tanto de agua dulce como salobre. En estos hábitats las hembras ovígeras, que se refieren aquellas hembras que están incubando los huevos entre los pleópodos o apéndices abdominales, vuelven a migrar hacia la desembocadura tras la época de apareamiento. La primera talla de maduración oscilará entre 7-8 cm o alcanzar los 12 cm, dependiendo de la zona donde se encuentre (Esteso, 2019). Por último, el tiempo que dura el ciclo de vida es de aproximadamente de tres años.

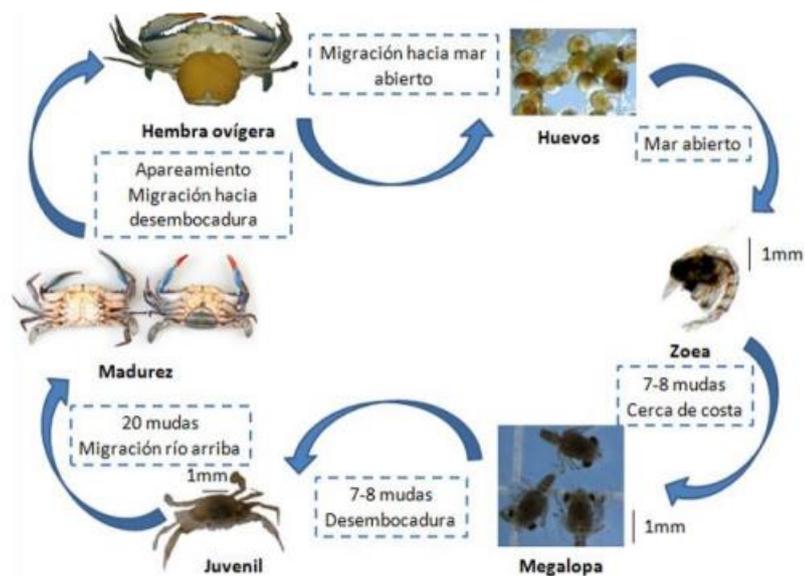


Figura 8. Ciclo de vida de *Callinectes sapidus* indicando donde y cuando se desarrolla cada fase y su tamaño aproximado. Fuente: Imagen creada por Isabel Esteso Perona.

1.5.3. Alimentación y Hábitat

En su hábitat natural, habita en una gran variedad de hábitats de aguas superficiales, desde agua dulce hasta aguas más saladas, debido a su condición de eurihalino. Pero su entorno más común son los estuarios y zonas costeras de poca profundidad, porque el terreno, vegetación, salinidad y temperatura son óptimas para su desarrollo y crecimiento (Olivert, 2018).

Su dieta consiste en moluscos, artrópodos, peces, poliquetos, algas, sedimentos, detritos, carroña e incluso pueden practicar el canibalismo hacia los juveniles (Belgrad y Griffin, 2016). Esta depredación ayuda a controlar la estructura de las comunidades que habitan en la parte bentónica y a la vez son las presas de diferentes depredadores como son los pulpos, el jaquetón de Milberto (*Carcharhinus plumbeus*) y diferentes especies de peces, tanto de agua salada como de agua dulce, como es el caso de la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), la anguila americana (*Anguilla rostrata*), la lubina rayada (*Morone saxatilis*) y la perca atruchada (*Micropterus salmoides*) (Millikin y Williams, 1984). Estos depredadores mantienen de forma controlada las poblaciones de cangrejos azules.

1.5.4. Especie invasora

Una especie invasora es aquel organismo que se desarrolla fuera de su área de distribución natural y que provoca alteraciones negativas en la riqueza y diversidad de los ecosistemas que no son suyos, y *Callinectes sapidus* es una especie que tiene las características de una especie invasora, ya que se introdujo en la costa Atlántica de Francia en 1900 a través de

las aguas de lastre de los barcos (Nehring, 2011) y en los siguientes años se reportaron especímenes de *C. sapidus* en el Mar Mediterráneo y en aquellos mares que son cercanos al Mar Mediterráneo como es el Mar Negro (Öztürk et al., 2020). Los primeros registros del cangrejo azul en el Mar Mediterráneo fueron en 1949 y 1950 en el Mar Adriático. No obstante, se supone que la introducción de la especie fue temprana en la década de los años treinta, como es el caso del registro de esta especie en el norte del Mar Egeo en 1935 y que lo mencionan en un artículo científico (Pipitone et al., 2020). Aunque otro artículo científico cita que el cangrejo azul se registró por primera vez en el Mediterráneo en aguas egipcias en la década de 1940 (Türelí et al., 2016). Esto nos indican que los primeros registros del cangrejo azul en el Mar Mediterráneo fueron en la parte oriental y no en la occidental. A partir de entonces se empezó a expandirse por todo el Mar Mediterráneo, porque tiene una alta capacidad de dispersión, tiene un alto poder reproductor y una fuerte capacidad en adaptarse a distintos grados de salinidad y a amplitudes de temperatura que van desde los 3°C hasta los 35°C. Otra influencia en su expansión por las costas mediterráneas es el cambio climático. A temperaturas menores a 3 °C el cangrejo azul no se establece en hábitats con temperaturas demasiado bajas. Pero el cambio climático está provocando un aumento de temperaturas por el Mar Mediterráneo y los modelos climáticos predicen que la cuenca mediterránea será una de las regiones más afectadas por la actual tendencia al calentamiento y por un aumento de los fenómenos extremos (Lejeusne et al., 2010). Este aumento de temperatura genera que las especies invasoras se adapten mucho mejor y en consecuencia se adapta mejor a las condiciones de los hábitats que han sido invadidos y en el caso del *C. sapidus* tendrá unas condiciones óptimas para su reproducción y su crecimiento.

La primera cita en las costas mediterráneas españolas fue una hembra adulta capturada a principios del mes de noviembre en el Delta del Ebro (Castejón y Guerao, 2013) y en la Comunidad Valenciana, su primera localización fue el 1 de octubre de 2014 en l'Albufera, se trata de ejemplares capturados por pescadores de la Comunidad de Pescadores de El Palmar al comienzo de la temporada de pesca. Desde entonces se han recibido avisos de distintas fuentes sobre la presencia y captura de ejemplares a lo largo de todo el litoral de la Comunidad Valenciana, indicando que esta especie invasora está teniendo una fuerte expansión en el litoral valenciano y apareciendo en las Salinas de Santa Pola, Desembocadura del *riu Millars*, Prat de Cabanes-Torreblanca, Marjal de Peñíscola, Marjal de Nules, Marjal de Pego-Oliva, Marjal de Almenara, Marjal de la Safor, en la desembocadura del río Turia, donde se capturo la primera hembra ovígera, la playa de la Mata (Torrevieja), Guardamar del Segura, El Hondo, etc. (<https://parquesnaturales.gva.es/>).

Además, en Murcia, en el Mar Menor, esta especie es especialmente abundante en las Encañizadas y cerca del puerto de Tomas Maestre (<https://canalmarmenor.carm.es/>).

El *Callinectes sapidus* está afectando negativamente a nuestros ecosistemas, ya que tienen la capacidad de reducir la densidad y diversidad de invertebrados y vertebrados autóctonos, como es el caso del bivalvo de agua dulce *Anodonta anatina* (Figura 9.), cuyo número de población de ejemplares está disminuyendo notablemente, porque el cangrejo azul posee receptores químicos en las antenas y son capaces de detectar a este bivalvo nativo a través del agua y a varios centímetros de distancia (Olivert, 2018).



Figura 9. Imagen de la *Anodonta anatina*. Fuente: Wikipedia.

Otro problema, es que el *Callinectes sapidus* contiene una rica comunidad de macro y microparásitos; como por ejemplo los dos parásitos protozoarios, *Toxoplasma gondii* y *Cyclospora cayetanensis*, que se encuentran en los órganos, las branquias y en la hemolinfa (Marangi et al., 2022); y algunos de ellos con una alta patogenicidad (Olivert, 2018). Mientras que la pesca artesanal está sufriendo un efecto negativo debido a que los cangrejos quedan atrapados en las redes de trasmallos y con sus pinzas las rompen. También se alimentan de los peces que han sido atrapados y estos efectos generan un impacto negativo para el sector pesquero y su economía (Esteso, 2019).

Esta especie de crustáceo se considera una de las 100 especies invasoras más dañinas del Mediterráneo (Streftaris y Zenetos, 2006), pero hay un gran vacío de información y de momento no es posible afirmar su carácter invasor en la mayoría de las áreas del Mediterráneo (Mancinelli et al., 2013).

1.5.5. Alternativas para mitigar su población y aprovechamiento del *Callinectes sapidus*

El *Callinectes sapidus* por su gran capacidad de expansión y de crecimiento es de difícil eliminación. Por lo tanto, la mejor opción es desarrollar un método de control poblacional, en otras palabras, el sector pesquero podrá hacer una sobrepesca sin límites en el volumen de capturas o en las tallas, como una forma de reducir el tamaño de los cangrejos y al tener cada vez una talla cada vez menor, el número de ejemplares se reducirá. Todas estas capturas tienen fines gastronómicos, ya que a nivel regional se está incluyendo el cangrejo azul en nuestros platos. Pero también se podrían utilizar sus caparazones e incluso sus patas grandes en la extracción y caracterización de quitina y quitosano en sus diferentes aplicaciones, como la síntesis de andamios de criogel con el fin de ser utilizados en la aplicación de ingeniería de tejidos (Demir et al., 2016); o la obtención de películas delgadas y recubrimientos para cubrir alimentos frescos o procesados, es decir, utilizar su quitosano para el revestimiento de materiales envasados (Duran et al., 2017). También puede ser útil por su actividad antimicrobiana y antifúngica y por tanto este quitosano puede ser útil contra microorganismos patógenos de humanos y peces (Kaya et al., 2016). Siguiendo las posibilidades del quitosano *Callinectes sapidus* como nueva ruta de extracción de quitosano para ser utilizados como floculantes en solutos de soja (Lee et al., 2018).

En este trabajo final de máster quiero averiguar si puede ser utilizado como antifúngico, con la finalidad de eliminar y mitigar a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Raza Tropical 4) (FocTR4), que es un hongo que parasita a las plataneras. Este patógeno infecta las raíces de la platanera, coloniza y ocluye los vasos de la xilema causando una decoloración marrón-rojiza del rizoma y del pseudotallo, y una vez que el hongo se ha introducido en la planta comienza a producir conidios provocando que el patógeno se disperse por la planta colonizando nuevos tejidos, obstruyendo el sistema vascular, disminuyendo el flujo de agua y los nutrientes que necesita la planta, y estos resultados hacen que la planta se marchite y muera. Todo este proceso hace que el cultivo de plátanos y bananos sean susceptibles a esta cepa de *Fusarium* (López, 2019).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Obtener quitosano a partir de la especie de cangrejo invasor (*Callinectes sapidus*) procedente de machos maduros y hembras maduras.
- Caracterizar fisicoquímicamente la quitina y el quitosano obtenidos a partir de muestras de *Callinectes sapidus*, mediante FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometry).
- Determinar si el quitosano procedente del cangrejo azul tiene las características similares al quitosano comercial.
- Comprobar que el quitosano obtenido de machos y hembras de cangrejo azul pueda ser utilizado en la inhibición de la germinación del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área de muestreo y método de captura de cangrejo azul

Los cangrejos azules fueron capturados en el Puerto de Altea, Puerto de Guardamar, Salinas de Santa Pola y El Hondo en la provincia de Alicante y en Murcia en el Mar Menor. Tanto el Hondo como las Salinas de Santa Pola son parques naturales localizados en la zona sur de la provincia de Alicante. Ambos parques presentan continuidad geográfica e hidrológica, formados por diversas lagunas y una compleja red de canales que comunican toda el área de estudio con el río Vinalopó y con el río Segura que desemboca en Guardamar, donde el agua circula en cantidad y calidad variable.

El método de captura utilizado fue una trampa tipo nasa (Figura 10.) hecha con material de alambre con abertura superior y las siguientes dimensiones: 50 x 50 x20 cm. En cada área se caló una nasa durante 24 horas utilizando como cebo normalmente carpa (*Cyprinus carpio*).



Figura 10. Imagen de las nasas utilizadas en el estudio hechas de malla metálica con abertura superior y con lastre para evitar que sea arrastrada por la corriente. Fuente: foto enviada por la tutora María del Carmen Barbera Cebrián y esta foto fue fotografiada por Isa Estesó (25/06/2018).

Los ejemplares capturados fueron trasladados al laboratorio del Centro de Investigación Marina de Santa Pola (CIMAR), donde se almacenaron congelados y debidamente etiquetados. Recordar que el CIMAR es un centro que está ubicado a los pies del arrecife coralino fósil de Santa Pola y fue construido mediante un convenio entre el Ayuntamiento de Santa Pola y la Universidad de Alicante. Los cangrejos quedan almacenados siguiendo un proceso donde se les asignan un código identificativo y quedan registrados en un estadillo con la fecha de la captura, la localidad donde fueron capturados, el número de ejemplares, su sexo (macho y hembra), su madurez (maduro e inmaduro), su peso (g), la longitud del caparazón (CL (cm)), la anchura del caparazón (CW (cm)), la anchura máxima del abdomen de las hembras (AW (cm)), el peso del estómago (SW (mg)), el peso de la hepatopáncreas (HpW (mg)) y el peso de las gónadas (GW (mg)) de los cangrejos maduros (Figuras 11 y 12).



Figuras 11 y 12. En estas imágenes se observan los estómagos que están llenos de restos de alimentos que han consumido los dos cangrejos azules, las hepatopáncreas y las gónadas: hembra (Izquierda) y macho (Derecha).

3.2. Preparación de las muestras del cangrejo para la obtención de biopolímeros

El siguiente punto del proceso de preparación del cangrejo para la obtención de biopolímeros es el hervido en una olla con agua destilada durante trece minutos (Figura 13.), es decir, se hierve el agua destilada y cuando empieza a burbujear se tiran los cangrejos, al pasar los trece minutos se apaga el hornillo. Durante estos minutos la pigmentación azul que desprende la alfa-crustacianina de los cangrejos desaparece y el color que domina el exoesqueleto es el color anaranjado de la astaxantina. Al sacarlos de la olla se comienza a separar sus exoesqueletos (caparazones y patas grandes) de la carne y de sus órganos. Posteriormente, los cangrejos maduros que han sido medidos y apuntados, se guardaron en una bolsa de plástico con el nombre de la localidad, la fecha en que fueron capturados, el número de ejemplares y su sexo, para ser trasladados al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada de la Universidad de Alicante.



Figura 13. Tres cangrejos azules, machos y maduros siendo hervidos.

Aunque la mayoría de las muestras recogidas vinieron preparadas desde el CIMAR, todo el proceso antes descrito se realizó en muchas ocasiones en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada de la Universidad de Alicante, comprobando la dificultad que supone la preparación de muestras biológicas y el esfuerzo y el tiempo que hay que dedicar a este tipo de procedimientos, tan importantes para el éxito de los estudios de investigación.

En el laboratorio se eliminó el tejido muscular y los restos de órganos. También se eliminó las pinzas de las patas grandes y se cortó en pequeños trozos el exoesqueleto para poder lavarlos varias veces con agua destilada y secarlos en la estufa a 40°C. Al obtener la muestra ya seca se midió su peso.

Posteriormente fueron triturados en una batidora (Figura 14.) hasta convertirlo en polvo, al obtener el polvo se puso en unos tamices (Figura 15.) que iban desde el mayor hasta el menor, es decir, cuatro tamices con diferente luz (mm) que va desde el mayor hasta el menor, (Luz: 0,100 mm, 0,050 mm, 0,025 mm y 0,010 mm), donde estuvieron entre diez y veinte minutos siendo movidos de forma manual, porque lo que queremos es que los distintos tamaños de granos se encuentren en los cuatro tamices. Al finalizar el proceso, la muestra que se encontraba repartida en los cuatro tamices fue puesta en cuatro Placas Petri y pesadas. Al obtener sus pesos, sumamos su peso total, porque lo que queremos es que el peso de la muestra sea de 30 gramos, si es más de 30 gramos una parte de la muestra se almacenara en la nevera de Biología Molecular, donde se trabajara en la extracción de quitina y de quitosano.



Figuras 14 y 15. Imagen de la batidora (Figura 14.), donde fueron triturados los restos de exoesqueletos de los cangrejos azules (*Callinectes sapidus*) e imagen de los tamices (Figura 15.) junto con las muestras siendo tamizadas.

3.3. Extracción de quitina

Al obtener un peso de 30 gramos se multiplicó por 10 o por 50 con la finalidad de obtener un volumen adecuado a la cantidad de la muestra y para poder extraer con éxito la quitina se hizo tres procesos que son la desmineralización, la desproteización y la decoloración. En el proceso de desmineralización, se multiplicó por diez para obtener el volumen (mL) de HCl 2M. Con este volumen se añadió el polvo del exoesqueleto de los cangrejos azules y se removió durante seis horas a temperatura ambiente, después se lavó varias veces en agua destilada combinándolo con la decantación y la centrifugación hasta conseguir que su pH sea neutro y tenga el mismo pH que el agua destilada del Laboratorio de Fitopatología. Seguidamente se secan en la estufa durante 24 horas o menos a 60°C y ya secas se medirá su peso.

Con la muestra ya desmineralizada se pasó al proceso de desproteización, donde se multiplicó la muestra por cincuenta para obtener el volumen (mL) de NaOH 2 M. Se removió durante diecinueve horas a temperatura ambiente, luego se hizo el mismo proceso del lavado del apartado anterior y una vez obtenida la muestra con un pH neutro, se secó en la estufa durante 12 horas a 60°C.

Después de pesar la muestra desproteinizada se pasó al proceso de decoloración (Figura 16.), donde multiplicamos la muestra por cincuenta para obtener el volumen de lejía al 2% (25 mL de agua destilada y de lejía). El procedimiento de remover se finalizará cuando la muestra este completamente blanca y haremos el mismo proceso de lavado con la finalidad de que su pH sea neutro. Por último, se secó en la estufa a 50°C durante 48 horas, aunque la mayoría de las veces las muestras estuvieron menos horas y en las últimas replicas fueron secadas en la campana. Finalmente obtuvimos quitina (Figuras 17 y 18.) y antes de hacer la extracción de quitosano se pesó.

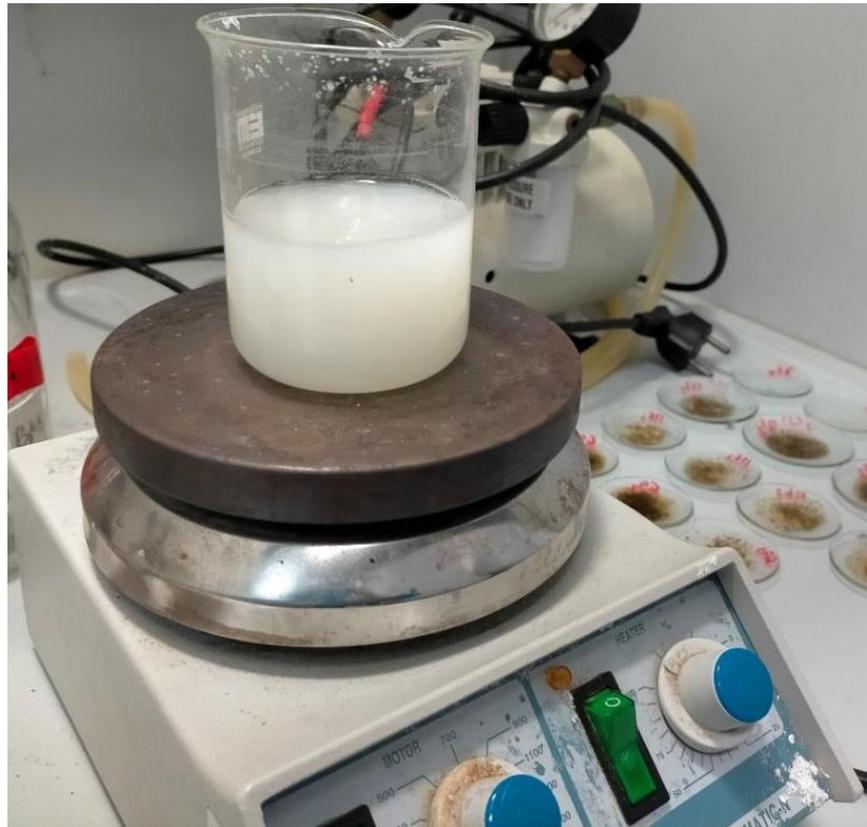
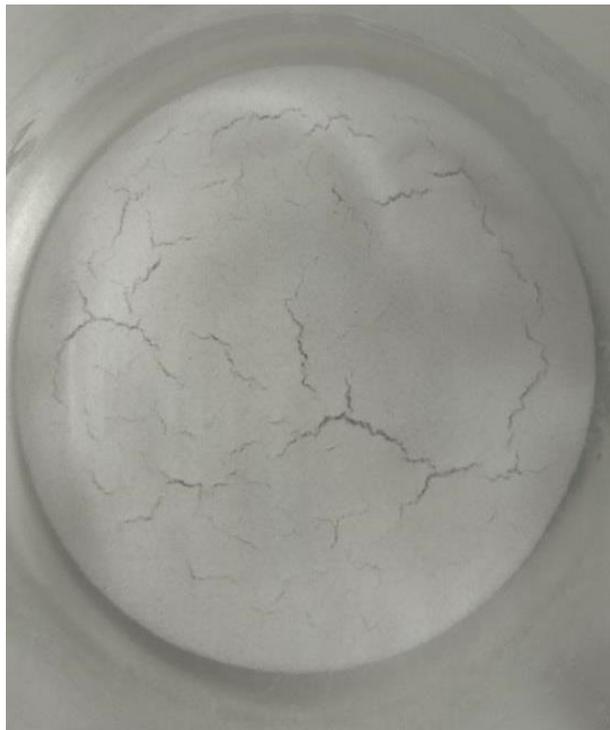


Figura 16. Una muestra siendo decolorada mediante el uso de lejía al 2%



Figuras 17 y 18. Imágenes de la quitina de las hembras maduras de la tercera réplica.

3.4. Extracción de quitosano

Para la extracción de quitosano, se utilizó el proceso de desacetilación, se utilizó NaOH del 50%, siempre se multiplicó por cincuenta la quitina para tener un volumen adecuado al tamaño de la muestra. Se removió a una temperatura de 100°C durante 2 horas (Figura 19.), en las primeras réplicas el vaso de la muestra estaba en otro vaso precipitado que estaba lleno de

aceite de girasol para que se calentara más deprisa, pero en las últimas réplicas no se utilizó el aceite de girasol, ya que se observó que daba el mismo resultado, y que la única diferencia es que con el aceite de girasol aumentaba la temperatura de una forma rápida. Más tarde, se apaga y se espera a que la temperatura del termómetro marque 30°C y se añade agua destilada que se removerá durante cinco minutos, luego se dejará unos cinco minutos para que se decante, si no se decanta se hará la centrifugación hasta llegar a un pH neutro. Luego se pondrá en la estufa a 50°C durante 48 horas, pero la mayoría de las veces estaba menos tiempo y en las últimas réplicas se ponían a secar en la campana. Por último, se pesó el quitosano (Figura 20.).



Figuras 19 y 20. En la imagen de la derecha (Figura 19) se está haciendo el último proceso experimental: la desacetilación. En la otra imagen (Figura 20) se observa el quitosano seco y pesado de la última réplica de machos maduros.

3.5. Caracterización de la quitina y del quitosano

Se recogió pequeñas muestras de quitina y de quitosano de las ocho réplicas de *Callinectes sapidus* y se guardaron en tubos eppendorfs, donde fueron llevados a Servicios Técnicos de Investigación con la finalidad de obtener la caracterización de las muestras mediante el FTIR (Infrarrojo Transformado de Fourier). Mientras que el quitosano comercial (T8) del laboratorio, que es un producto perteneciente a la empresa Louis Schoppenhauer GmbH & Co.KG y cuya sede se encuentra en Bremerhaven, Alemania, no hizo falta hacer la caracterización, ya que sus resultados se encuentran en el laboratorio de fitopatología.

3.6. Solubilizar el quitosano obtenido

De los ocho quitosanos obtenidos se elegirá dos quitosanos, uno de cangrejos machos maduros (cuarta réplica) y uno de cangrejos hembras maduras (segunda réplica) para convertirlos en quitosano líquido. Antes de este cambio, se transformó a líquido el quitosano comercial (T8). Para ello se leyó el protocolo que se encuentra en el laboratorio y que consta de siete pasos.

1) Se pesa la cantidad de quitosano (T8) que se quiere disolver, en este caso fue 1,005 gramos, y se apunta el peso exacto para poder calcular la concentración final de T8. Con el peso ya obtenido se llenó un vaso precipitado con un volumen de 1000 mL de HCl 0,25 M (1 gramo son 1000 mL de HCl 0,25 M), importante hacerlo poco a poco, cuando la muestra este ya disuelta, la muestra ya es líquida, se hará el siguiente proceso.

2) Una vez que se haya disuelto el quitosano comercial (T8) se ajusta el pH de la solución a 5,60/5,61 añadiendo poco a poco NaOH, 1M.

3) Se hidratan las membranas de celulosa 1 minuto a máxima potencia en el microondas en un vaso de precipitado con agua destilada. Se recortan según necesidad. Se sacan las membranas, se enjuagan con agua destilada y se pasan a un vaso distinto con agua nueva. Se mete en el microondas a máxima potencia otro minuto. Se vuelven a enjuagar con agua destilada esta vez por dentro.

4) Se hace un nudo en un extremo, se rellenan con el T8 a T10 mg/L y se hace un nudo en el extremo que queda suelto. Es importante dejar un espacio vacío antes de hacer el segundo nudo (1/2 o 1/3).

5) Se ponen las membranas en un vaso de 5L. Se cubren con agua destilada y se agitan con una mosca en frío (nevera) durante 2 días. Cada 24 horas se cambia el agua destilada del vaso de 5L.

6) A los 2 días, se sacan las membranas y se corta el extremo superior, se vierte el contenido en una probeta para medir el volumen total y obtener la concentración del quitosano comercial (T8).

a. Volumen total del quitosano comercial (T8) = 0,158 L.

b. $[T8] = 1,005 \text{ g} / 0,158 \text{ L} = 6,36 \text{ g/L}$ que es la concentración del quitosano comercial (T8).

7) Se autoclava 20 minutos a 120°C y se guarda en frío por un mes (Figura 21.), después de un mes está caducado.

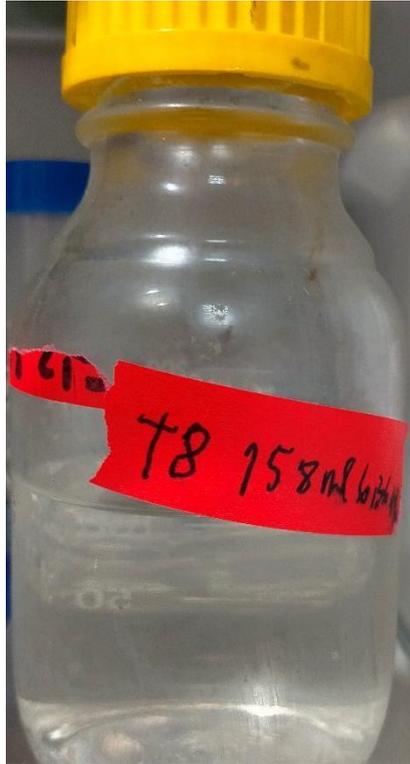


Figura 21. Bote del quitosano líquido comercial (T8) guardado en la nevera.

Se hizo lo mismo con los quitosanos de los cangrejos azules machos y hembras maduras. En su preparación a quitosano líquido se pesaron a 0,1 gramos (0,104 g de machos maduros y 0,105 g de hembras maduras), más tarde se puso 10 mL de HCl 0,25 M y poco a poco se pone el polvo del quitosano. Cuando el quitosano ya está disuelto se añade NaOH 1 M hasta obtener un pH de 5,60-5,61. Los siguientes cuatro pasos no se hicieron por falta de tiempo y al obtener este pH se vertieron los contenidos en una probeta para medir sus volúmenes totales y obtener las concentraciones tanto del quitosano de cangrejos azules machos maduros como de cangrejos azules hembras maduras.

Volumen total del quitosano de cangrejos azules machos maduros = 0,1349 L

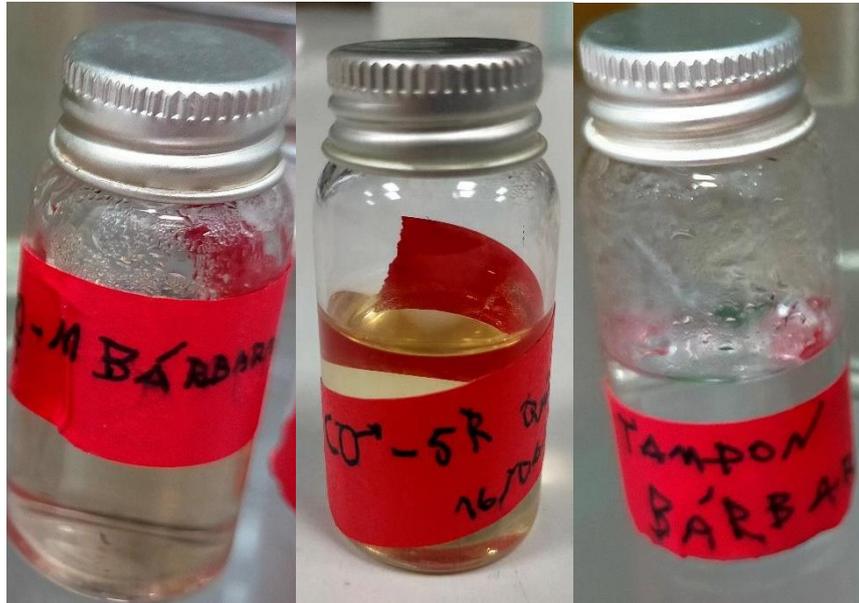
Machos maduros = $0,104 \text{ g} / 0,1349 \text{ L} = 0,771 \text{ g/L}$ que es la concentración de los machos maduros.

Volumen total del quitosano de cangrejos azules hembras maduras = 0,137 L

Hembras maduras = $0,105 \text{ g} / 0,137 \text{ L} = 0,766 \text{ g/L}$ que es la concentración del quitosano de las hembras maduras.

Por último, se preparó el tampón y el agua destilada. El tampón se preparó con los mismos pasos que los quitosanos de los cangrejos azules, pero sin el quitosano (10 mL HCl 0,25 M y añadir NaOH 1 M hasta obtener un pH de 5,60-5,61). Después se llenó en un bote el agua

destilada y las cuatro disoluciones ya nombradas fueron esterilizadas. Al obtener las cuatro disoluciones esterilizadas (Figuras 22, 23 y 24.), el tampón y los quitosanos líquidos de los cangrejos azules fueron guardados en frío junto con el quitosano líquido comercial, mientras que el agua destilada fue puesta en una estantería donde se encuentran varios botes de agua destilada esterilizadas para diferentes usos.



Figuras 22, 23 y 24. Bote de quitosano líquido de los cangrejos azules hembras maduras (Izquierda), bote de quitosano líquido de los cangrejos azules machos maduros (Centro) y bote de tampón líquido (Derecha).

3.7. Preparación de placas de PDA

Para que las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4) crecieran, se necesitaba preparar placas Petri con PDA (*Potato Dextrose Agar*), que es un medio muy utilizado para el crecimiento de hongos y levaduras.

Para preparar PDA, se disolvió 19,5 gramos de polvo de este medio en agua destilada de 500 ml y se esterilizó para rellenar las placas con líquido de PDA (Figura 25.). Al tener placas con PDA se puso cuatro papeles que contenían este hongo y posteriormente fueron guardados en una estufa rota a temperatura ambiente, donde se guardan diferentes hongos para diferentes experimentos, con la finalidad de que crezcan los hongos de FocTR4 para preparar la extracción de sus conidios.

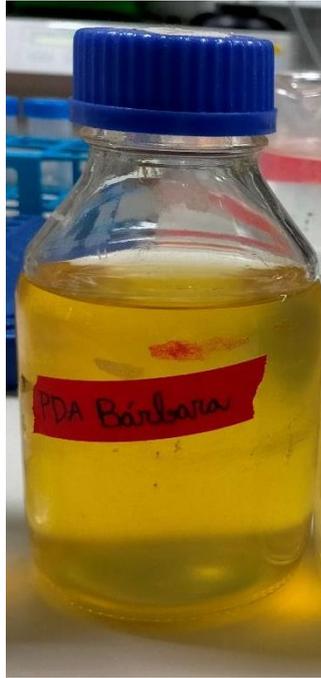


Figura 25. Bote de PDA (*Potato Dextrose Agar*) estéril y listo para la preparación de placas Petri con este medio.

3.8. Protocolo de extracción de conidios de FocTR4 en placa y su preparación en placas húmedas

Para la extracción de conidios de FocTR4, se necesitan tener el hongo previamente inoculado en placas entre 5 y 10 días, es decir, que *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 cubra toda la placa (Figura 26.), y se añade sobre ella 1,5/2 ml de agua destilada. Se frota la placa con un asa de siembra estéril para extraer todas las esporas y que se queden en el agua, se recoge el líquido de la placa con la pipeta y se filtra por papel Miracloth (Merck Millipore, Calbiochem), sobre un eppendorf nuevo, sobre el que caerán los conidios. Después de filtrar la solución se toman 10 μ l del falcón y se ponen en una cámara Neubauer.



Figura 26. El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4), cubre completamente la placa Petri, indicando que este hongo está listo para la extracción de sus conidios.

Al tener esta muestra en la cámara de Neubauer, se contaron los conidios de FocTR4 que se encontraban en cinco cuadrados que estaban dentro de un cuadro grande central, de forma diagonal mediante el microscopio. A continuación, se sumaron el número de conidios de cada cuadrado para obtener la suma total y se dividieron entre cinco.

1º Cuadrado	2º Cuadrado	3º Cuadrado	4º Cuadrado	5º Cuadrado	Suma total	Suma total/5
86 conidios	73 conidios	104 conidios	96 conidios	88 conidios	447 conidios	89

Tabla 1. La suma de cada cuadrado, la suma total y la media.

Seguidamente este resultado se multiplica por 10^6 y se dividió entre cuatro para obtener la concentración inicial de conidios/ml.

$$89 \times 10^6 / 4 = 2,225 \times 10^7 \text{ con/ml (concentración inicial)}$$

Al obtener la concentración inicial, se calculará el volumen inicial mediante el cálculo de dilución química:

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$$

$$(2,225 \times 10^7 \text{ con/mL}) \times V_{\text{inicial}} = 10^6 \times (0,2 \text{ mL}) \Rightarrow V_{\text{inicial}} = 8,99 \times 10^{-3} \text{ mL} = 9 \mu\text{L}$$

Con la concentración y el volumen inicial obtenidos, se harán unos cálculos con el propósito de obtener cinco muestras donde estarán las disoluciones del apartado anterior y los conidios junto con agua destilada en cinco tubos eppendorfs para la preparación del experimento.

En otras palabras, para obtener un volumen adecuado de agua destilada y de conidios es necesario restar al volumen final de agua destilada, el volumen inicial de conidios. El volumen final elegido de agua destilada fué de 0,2 mL y en unidades 200 μ L, ya que se pensó que 0,2 mL era el volumen más eficiente para los tubos eppendorfs. Al restarlo obtuvimos 0,191 mL que equivale a 191 μ L de agua destilada.

En el caso del quitosano comercial y el procedente de los cangrejos azules macho y hembra se procedió del mismo modo, pero se utilizó el cálculo de dilución química para obtener el volumen inicial de los quitosanos. En la fórmula de la dilución química la concentración inicial es la calculada en el proceso de obtención de quitosano líquido (g/L). La concentración final resultante es de 0,1 mg/mL que fue la concentración de quitosano elegida y que permitió observar cómo influye el quitosano en la germinación de los conidios de este hongo fitopatógeno. El resultado del cálculo que se obtuvo para el quitosano comercial fue 3,2 μ L y de 26 μ L tanto para machos como para hembras maduras. Más tarde, se procede a obtener el volumen de agua destilada, para ello al volumen final de agua destilada se le resta la suma total de volumen inicial de conidios y el volumen inicial de los quitosanos. Mientras que para el tampón se consideró que su volumen inicial fuera el mismo que el del quitosano comercial. Los cálculos se encuentran en el apartado del Anexo.

Finalmente se preparan treinta placas Petri, quince para las 24 horas y quince para las 48 horas, y por dentro se disponen de círculos de papel de filtro esterilizado y dos portaobjetos, también esterilizados en forma de cruz sobre el papel de filtro. Se humedece el papel con 2 ml de agua destilada esterilizada y sobre el portaobjetos superior, junto con tres cubreobjetos hidrófobos, se disponen 3 gotas de suspensión de conidios, cada gota tendrá una concentración de 10 μ L.

En resumen, tendremos treinta placas Petri (Figuras 27 y 28.), dentro de las treinta placas quince placas serán para las 24 horas y quince serán para las 48 horas. Dentro de las placas se pondrán tres gotas con concentración de 10 μ L, es decir, tres gotas de control (agua destilada) para tres placas Petri, tres gotas de tampón para tres placas Petri, tres gotas de quitosano comercial (T8) para tres placas Petri, tres gotas de quitosano de machos maduros para tres placas Petri y tres gotas de quitosano de hembras maduras para tres placas Petri. Al finalizarlo, se esperarán las 24 horas y las 48 horas para que los conidios de FocTR4 germinen y observar en el microscopio (20X) cuantos conidios germinados y no germinados se encuentran en cada gota, la cual se dividirá en tres áreas para obtener la media de cada una, y observar cómo estas disoluciones influyen en su número.

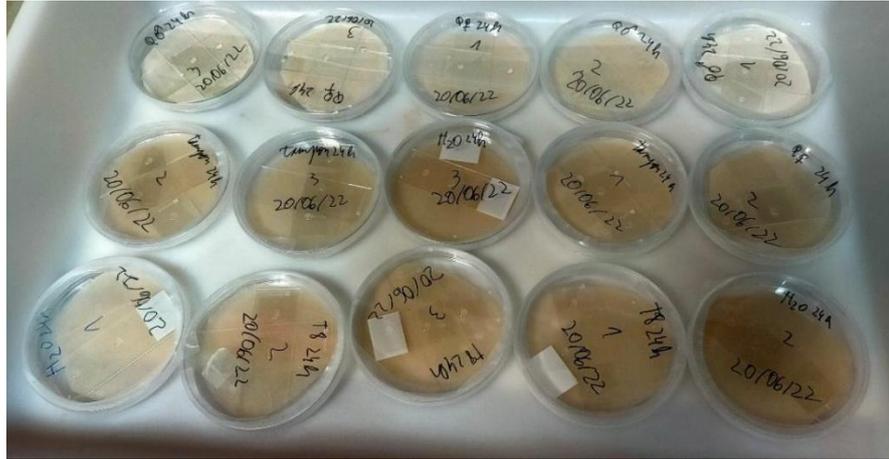


Figura 27. Quince placas para las 24 horas: 3 placas para el Control (Agua destilada), 3 placas para el Tampón, 3 placas para el Quitosano Comercial (T8), 3 placas para el Quitosano Cangrejos Machos y 3 placas para el Quitosano Cangrejos Hembras, y cada placa tiene tres gotas de cada disolución.

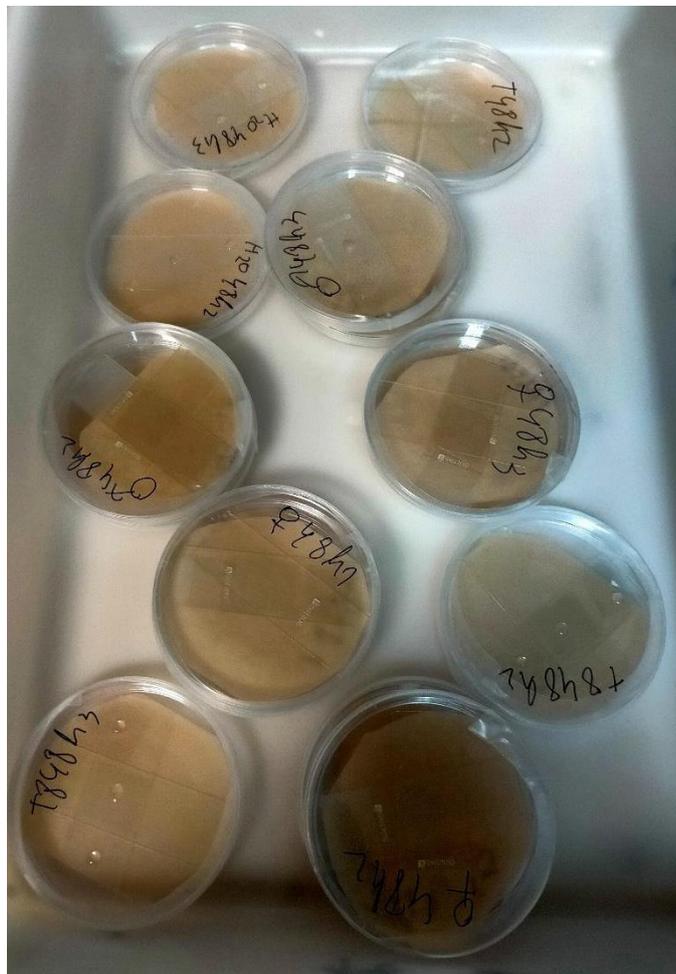


Figura 28. Quince placas para las 48 horas: 3 placas para el Control (Agua destilada), 3 placas para el Tampón, 3 placas para el Quitosano Comercial (T8), 3 placas para el Quitosano Cangrejos Machos y 3 placas para el Quitosano Cangrejos Hembras, y cada placa tiene tres gotas de cada disolución.

3.9. Análisis estadístico

Al obtener los resultados de los no germinados y germinados del experimento durante las 24 horas y 48 horas, se hizo la suma total y la media de cada cubre que se observó tres veces, en otras palabras, el primer cubre perteneciente a la primera placa de agua destilada (control) se contó en tres áreas distintas de la gota que está sobre el primer cubre y así sucesivamente. Más tarde, se calculó el porcentaje de germinación (Anexo: 9.2. Tabla):

Germinación (%): $\left(\frac{\text{Media de Germinados}}{\text{Media de Germinados} + \text{Media de No Germinados}}\right) \times 100$

Finalmente, los datos obtenidos del porcentaje de germinación de conidios durante las 24 horas y las 48 horas de este experimento fueron evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA), para determinar las diferencias que hay entre las cinco disoluciones y cómo influye en la germinación de conidios de este hongo patógeno.

4. RESULTADOS

4.1. Pesos triturados y tamizados de los exoesqueletos de los cangrejos azules (*Callinectes sapidus*)

Estos datos (Tabla 2.) nos indican que el tamaño de los granos del exoesqueleto del *Callinectes sapidus* es heterogéneo y diferente (Figura 29.), y que el tamaño de los granos más dominantes se encuentra en el tamiz con luz 0,100 mm. Cuando se obtuvo el peso total, se utilizó el de 30 gramos, exceptuando la primera réplica, puesto que antes no se habló de un peso determinado y como se dijo en el apartado de la obtención de biopolímeros, aquellos pesos que superaban los 30 gramos, una parte de la muestra se almacenará en la nevera de Biología Molecular para futuras extracciones.

A pesar de tener datos de la segunda y tercera réplica del proceso experimental para la obtención de quitina y de quitosano, fueron descartados del experimento debido a unas incidencias que hubo y que se explicará en el apartado de Incidencias. Por lo tanto, la cuarta réplica se convirtió en la segunda réplica y el polvo guardado en la nevera fue utilizado para la tercera y cuarta réplica.

Sexo y madurez	Replicas	0,100 mm	0,050 mm	0,025 mm	0,010 mm	Peso total
Machos maduros	1	24,831 g	8,893 g	0,868 g	0,016 g	34,608 g
Machos maduros	2	28,883 g	10,977g	2,805 g	0,364 g	43,029 g

Machos maduros	3	25,183 g	9,171g	3,454 g	0,012 g	38,172 g
Machos maduros	4	39,994 g	10,810 g	5,872 g	0,538 g	57,214 g
Hembras maduras	1	21,305 g	8,537 g	1,917 g	0,055 g	31,814 g
Hembras maduras	2	14,755 g	4,812 g	2,766 g	1,105 g	23,438 g
Hembras maduras	3	43,489 g	12,244 g	6,669 g	0,467 g	62,869 g
Hembras maduras	4	43,489 g	12,244 g	6,669 g	0,467 g	62,869 g

Tabla 2. Representación de los diferentes pesos de los exoesqueletos triturados del *Callinectes sapidus*, tanto de machos como de hembras maduras, en las distintas mallas y luz (mm) de los cuatro tamices y el peso total de cada réplica. N.º de caparazones sacrificados en los machos maduros: 1 réplica (N.º 9, 10 y 11), 2 réplica (N.º 15, 16 y 17), 3 réplica (N.º 31, 32, 33 y 34) y 4 réplica (N.º 42, 43, 44, 45 y 46). N.º de caparazones sacrificados en las hembras maduras: 1 réplica (N.º 12, 13, 14 y 20), 2 réplica (N.º 56, 60 y 61), 3 réplica (N.º 64, 65, 66, 67 y 68) y 4 réplica (N.º 64, 65, 66, 67 y 68).



Figura 29. En esta imagen se observa que el tamaño de los granos del exoesqueleto del *Callinectes sapidus* es heterogéneo y de diferente tamaño, es decir, tiene granos gruesos y finos.

4.2. Resultados de los procesos experimentales para la obtención de quitina y quitosano del *Callinectes sapidus*

En la (Tabla 3.), se observa que en cada proceso disminuye el peso del resultado obtenido, debido a que en cada proceso experimental se pierde una cantidad de la muestra, a pesar del esfuerzo que se realiza para no perderla.

Sexo y madurez	Replicas	N ° de caparazones sacrificados	Peso no triturado (g)	Peso triturado y tamizado (g)	Ds (g)	Dp (g)	Dc (g)	Da (g)
Machos maduros	1	3 cangrejos sacrificados y sus números son 9, 10 y 11.	37,83	34,61	3,49	2,51	1,94	0,81
Machos maduros	2	5 cangrejos sacrificados y sus números son 42, 43, 44, 45 y 46.	59,42	30,02	3,89	3,07	2,33	0,09
Machos maduros	3	El polvo que no ha sido utilizado se utilizará en esta réplica.	El polvo que no ha sido utilizado se utilizará en esta réplica.	30,02	3,67	3,03	2,49	0,60
Machos maduros	4	El polvo que no ha sido utilizado se utilizará en esta réplica.	El polvo que no ha sido utilizado se utilizará en esta réplica.	30,45	4,48	3,38	2,35	0,4
Hembras maduras	1	4 cangrejos sacrificados y sus números son 12, 13, 14 y 20.	39,044	30,04	4,13	3,46	2,72	0,88
Hembras maduras	2	3 cangrejos sacrificados y sus números son 56, 60 y 61.	30,351	23,44	3,45	2,75	2,29	0,37
Hembras maduras	3	5 cangrejos sacrificados y sus números son 64, 65, 66, 67 y 68.	66,597	30,09	3,91	3,07	2,38	0,56
Hembras maduras	4	5 cangrejos sacrificados y sus números son 64, 65, 66, 67 y 68.	66,597	30,03	3,79	2,82	2,17	0,01

Tabla 3. Representación de los diferentes pesos en los distintos procesos experimentales para la obtención de quitina (columna Dc g) y de quitosano (columna Da g).

4.3. Rendimiento de quitina y de quitosano

Los pesos de quitina y de quitosano (Tabla 3.) fueron calculados para conseguir los resultados de rendimiento de quitina y de quitosano (Tabla 4.):

$$\text{Rendimiento de quitina (\%)} = [\text{Quitina (g)}/\text{Peso no triturado (g)}] \times 100$$

Rendimiento de quitosano (%) = [Quitosano (g)/Peso no triturado (g)]x 100

En la (Tabla 4.) se observa que los resultados del rendimiento de quitosano son menores que el rendimiento de quitina, debido a la pérdida de muestra. Se observa que la tercera y la cuarta réplica, tienen sus rendimientos de quitina y de quitosano vacíos, puesto que el material utilizado era polvo de los exoesqueletos que estaban guardados en la nevera de Biología Molecular.

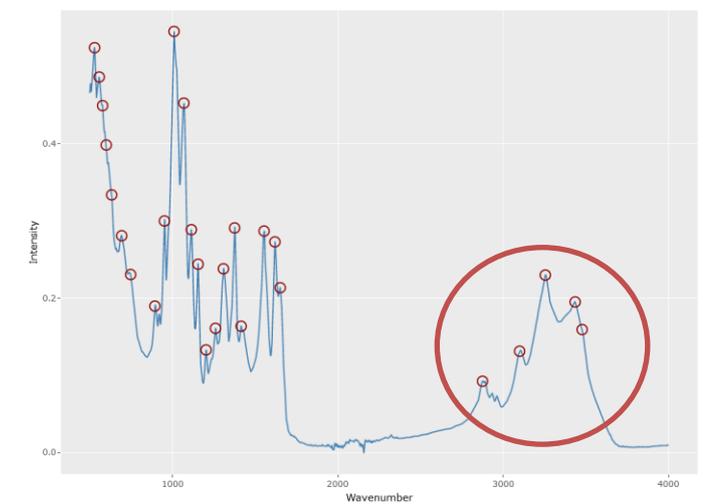
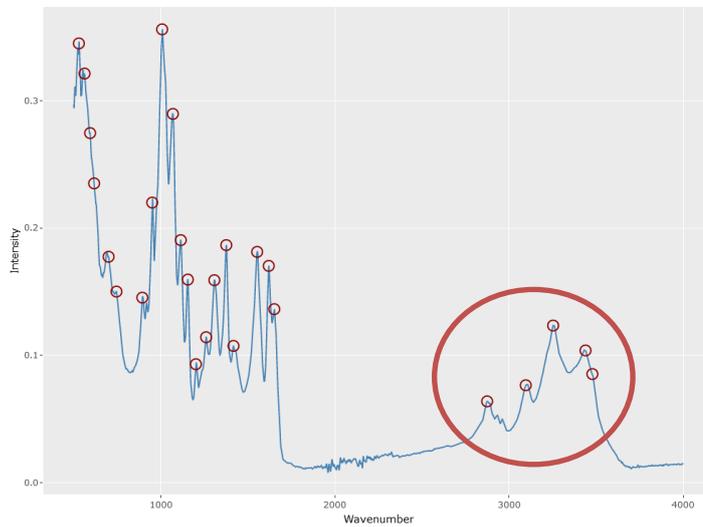
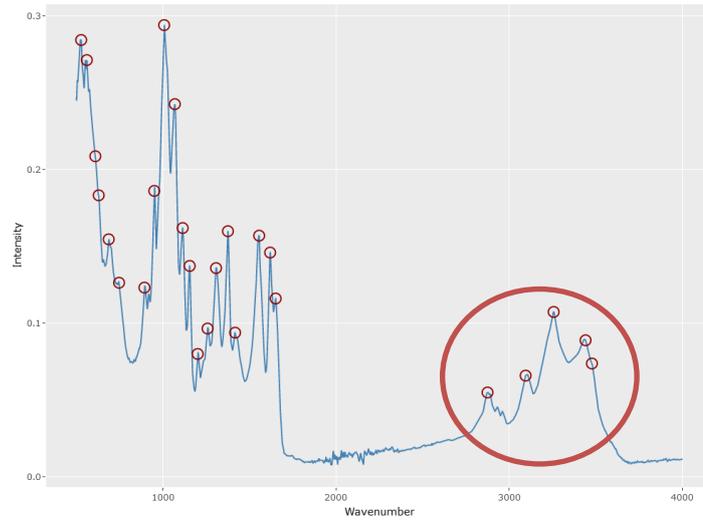
Se calcularon los rendimientos medios de quitosano, tanto de machos como de hembras maduras. En los machos maduros se calculó los rendimientos de la primera y segunda réplica, porque las otras dos están vacías. Se observa que las desviaciones estándar nos indican que los datos se extienden sobre 1,409 % y un 0,932 %, pero que son cercanos a las medias 1,145 % y 1,075 %.

Sexo y madurez	Réplicas	Rendimiento de quitina (%)	Rendimiento de quitosano (%)	Rendimiento medio de quitosano (%)
Machos maduros	1	5,128	2,141	1.145±1,409
Machos maduros	2	3,923	0,148	
Machos maduros	3			
Machos maduros	4			
Hembras maduras	1	6,966	2,254	1,075±0,932
Hembras maduras	2	7,545	1,206	
Hembras maduras	3	3,574	0,833	
Hembras maduras	4	3,258	0,008	

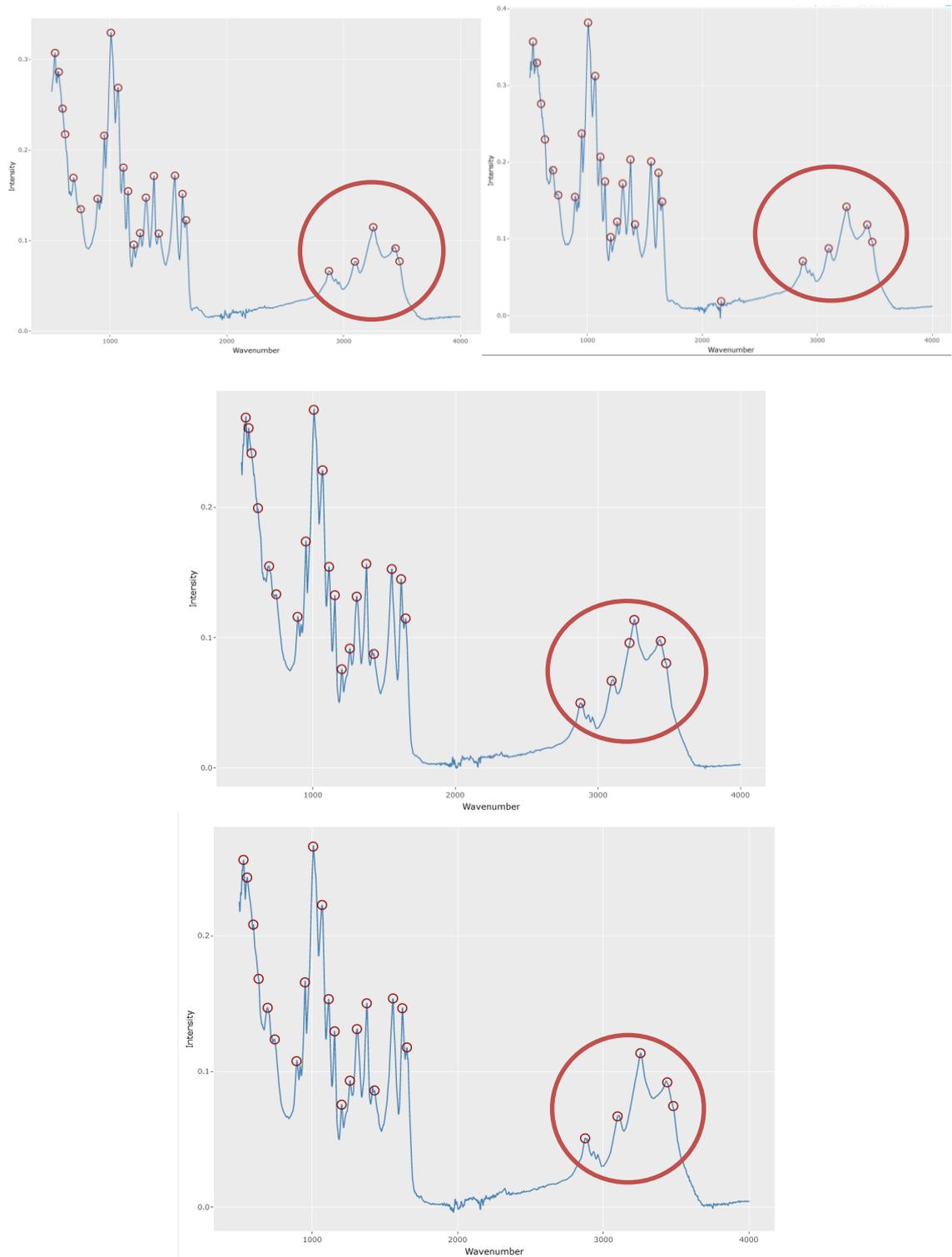
Tabla 4. Representación de los diferentes rendimientos de quitina (%) y de quitosano (%) del *Callinectes sapidus*, tanto de machos como de hembras maduras. Las filas de los machos maduros tercera y cuarta réplica de la columna del Rendimiento de quitina (%) y Rendimiento de quitosano están vacíos, porque no teníamos peso no triturado, ya que el material utilizado era polvo de los exoesqueletos que estaban guardados en la nevera de Biología Molecular. También se encuentran los rendimientos medios de quitosano (%).

4.4. Caracterización de la quitina y del quitosano

Llama la atención que los resultados de la caracterización de quitina del *Callinectes sapidus*, tanto de machos maduros como de hembras maduras sean iguales, tanto en intensidad (Intensity) como el número de onda (Wavenumber), indicando con ello que no hay diferencias en el sexo y que por tanto no es necesario hacer una separación entre ellos.

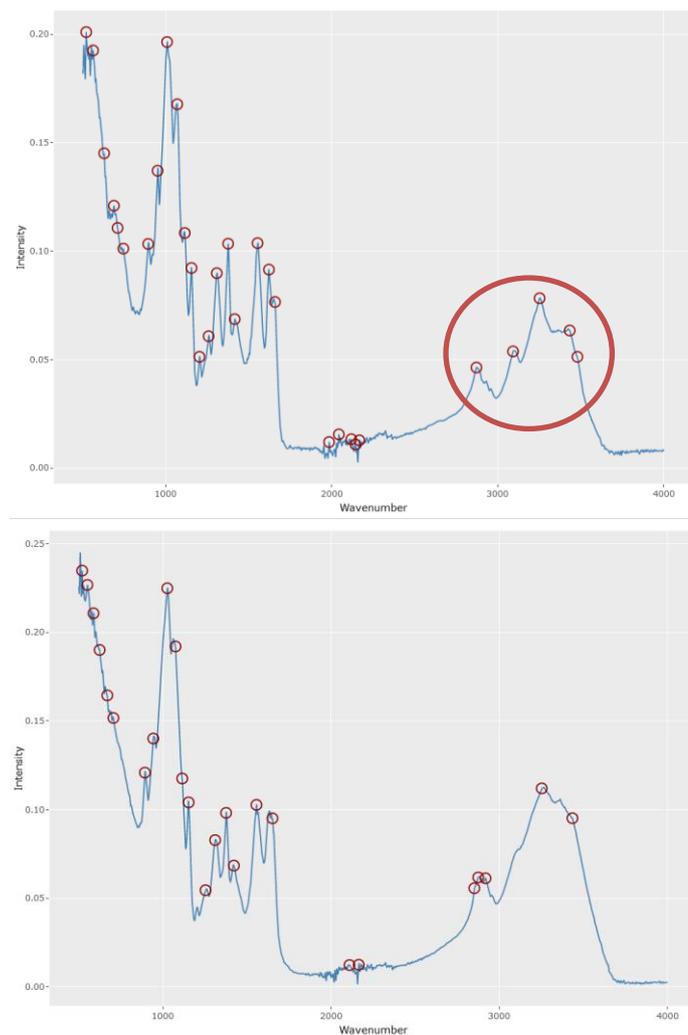


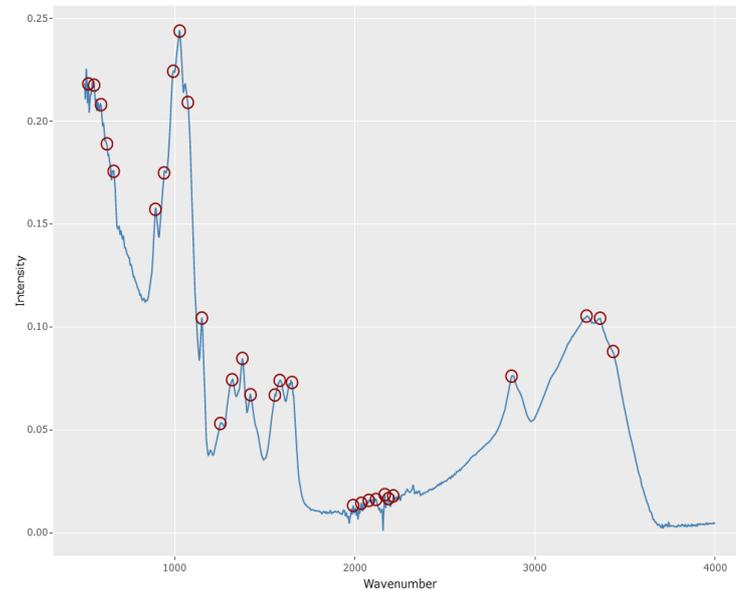
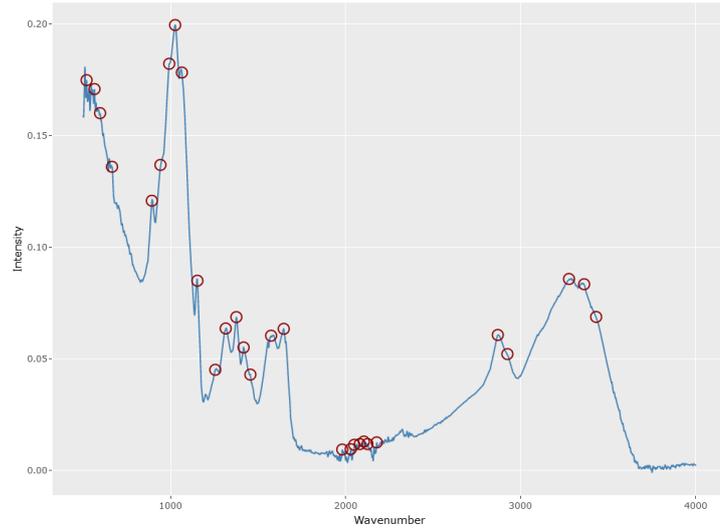
Figuras 30, 31 y 32. Caracterización de las quitinas de los machos maduros primera réplica (Figura 31.), de la segunda réplica (Figura 32.) y de la tercera réplica (Figura 33.). También se remarca con un círculo rojo las bandas desde 2871 hasta 3480 cm^{-1} , porque son muy parecidas a las bandas del quitosano de los machos maduros de la primera réplica.



Figuras 33, 34, 35 y 36. Caracterización de las quitinas de las hembras maduras primera réplica, de la segunda réplica (Figuras 34 y 35.), de la tercera réplica (Figura 36.) y de la cuarta réplica (Figura 37.). También se remarca con un círculo rojo las bandas desde 2871 hasta 3480 cm^{-1} , porque son muy parecidas a las bandas del quitosano de los machos maduros de la primera réplica.

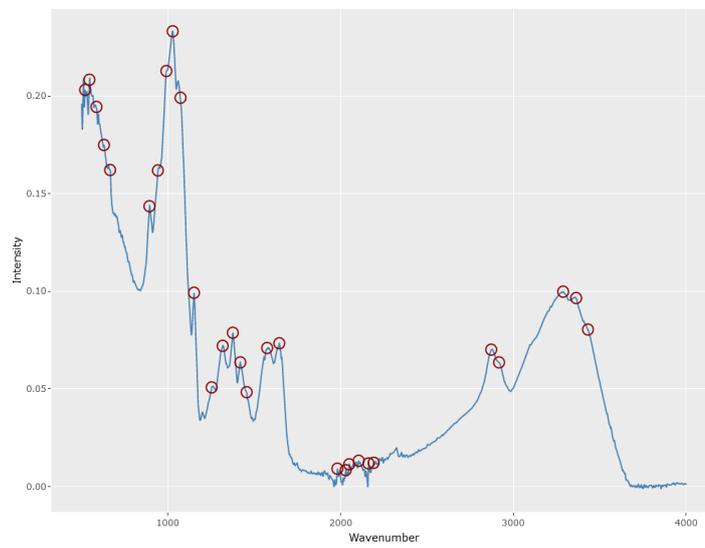
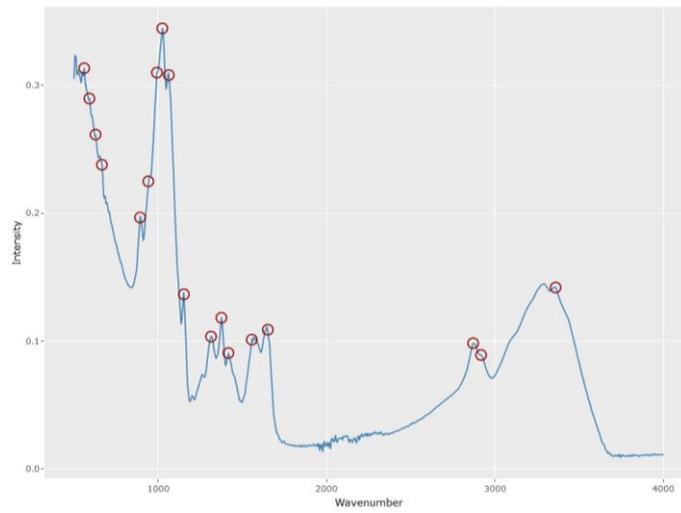
Las bandas de la segunda, tercera y cuarta réplica de la caracterización de los quitosanos de las machos maduros están entre $3435\text{-}3253\text{ cm}^{-1}$ y que podría asignarse a los grupos (N-H), (O-H) y (NH₂). Pero la primera réplica sus bandas están entre $3480\text{-}3252\text{ cm}^{-1}$ y es debido a que el proceso de desacetilación no fue eficiente, ya que al transformar su quitosano a líquido se decantaba cuando se suponía que tenía que estar disuelto, indicando que el quitosano no era puro, es decir, entre el polvo había quitina y una forma de observarlo en la imagen es desde 2871 hasta 3480 cm^{-1} , donde se observa (representado con un círculo rojo) que es muy parecida a las quitinas que hemos nombrado anteriormente. Mientras que las bandas entre $2851\text{-}2925\text{ cm}^{-1}$ indica la presencia del grupo metilo en el anillo de piranosa y del grupo metilo en el grupo metileno. Los picos más altos de las imágenes del espectro final de la segunda, tercera y cuarta réplica se encuentran entre $1025\text{-}1027\text{ cm}^{-1}$ y muestran el estiramiento de C-O (Demir D., et al., 2016). En cambio, el pico más alto de la primera réplica se encuentra en 1007 cm^{-1} y es debido a lo que se ha dicho anteriormente.

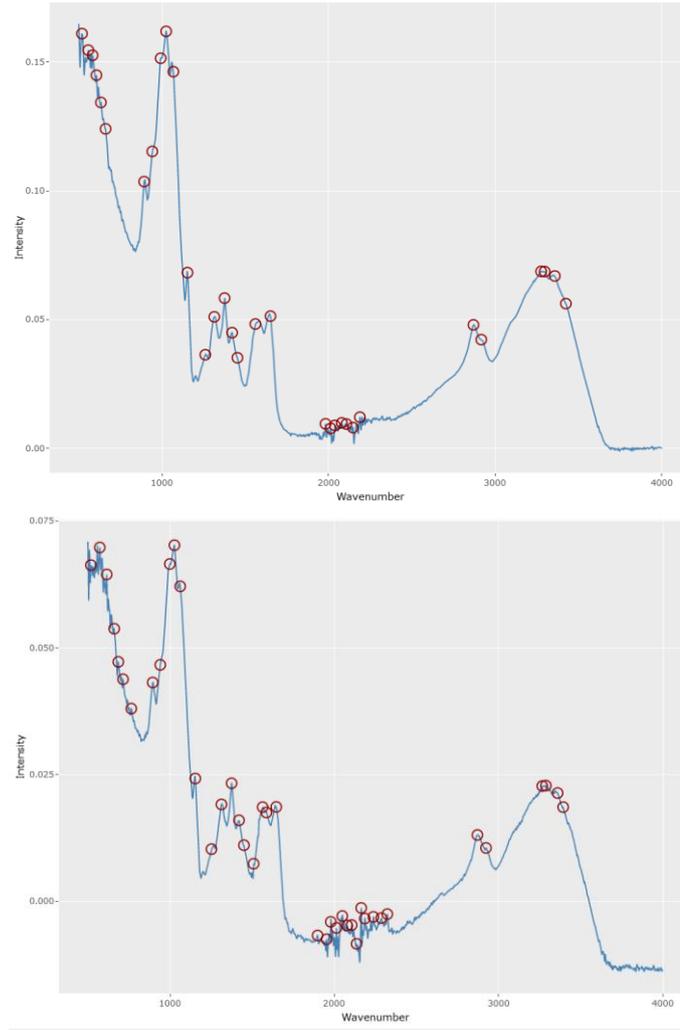




Figuras 37, 38, 39 y 40. Caracterización de los quitosanos de las machos maduros primera réplica (Figura 37.), el cual está remarcado en un círculo rojo las bandas desde 2871 hasta 3480 cm^{-1} , porque son muy parecidas a las bandas de quitina que hemos nombrado anteriormente; de la segunda réplica (Figura 38.), de la tercera réplica (Figura 39.) y de la cuarta réplica (Figura 40.).

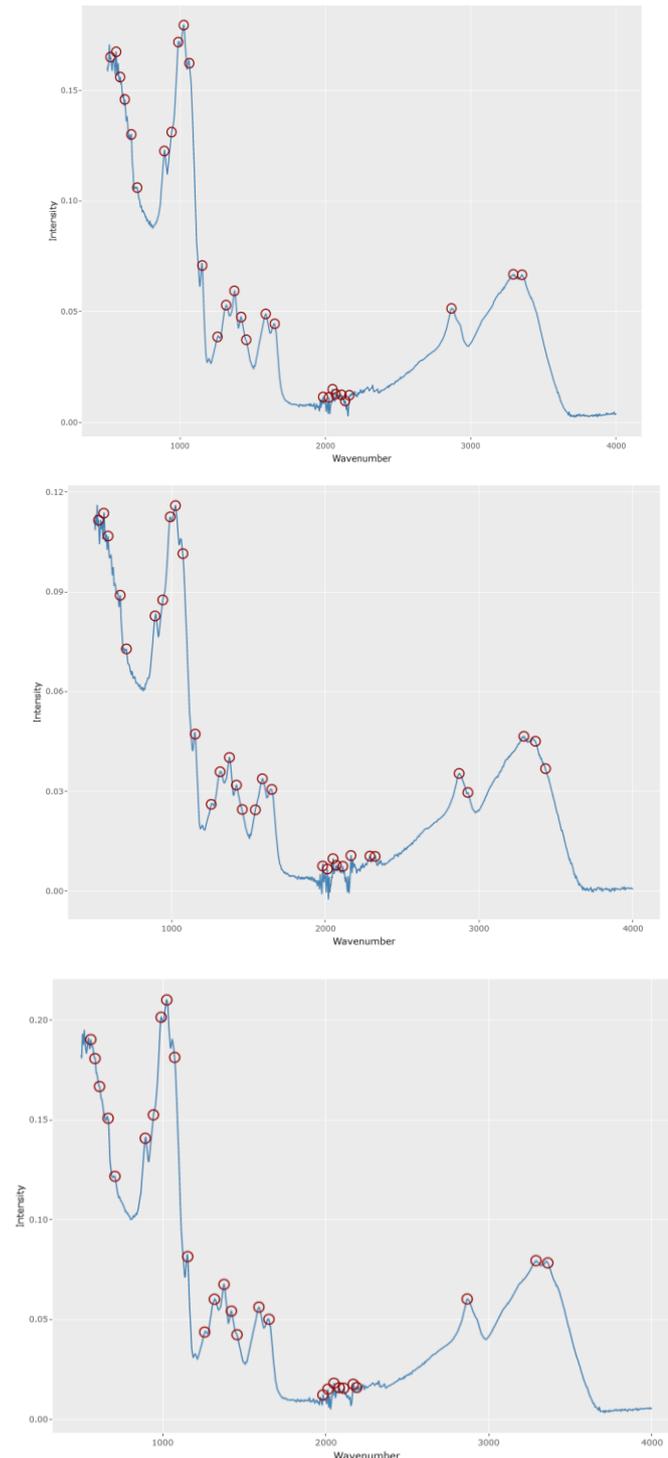
Las bandas entre 3435-3260 cm^{-1} de la caracterización de los quitosanos de las hembras maduras podría asignarse a los grupos (N-H), (O-H) y (NH₂), mientras que las bandas entre 2870-2924 cm^{-1} indica la presencia del grupo metilo en el anillo de piranosa y del grupo metilo en el grupo metileno. Los picos más altos de las imágenes del espectro final se encuentran entre 1024-1027 cm^{-1} muestran el estiramiento de C-O (Demir D., et al., 2016).





Figuras 41, 42, 43 y 44. Caracterización de los quitosanos de las hembras maduras primera réplica (Figura 41.), de la segunda réplica (Figura 42.), de la tercera réplica (Figura 43.) y de la cuarta réplica (Figura 44.).

Las bandas entre $3435\text{-}3285\text{ cm}^{-1}$ de la caracterización del quitosano comercial (T8) del laboratorio podría asignarse a los grupos (N-H), (O-H) y (NH₂), mientras que las bandas entre $2867\text{-}2926\text{ cm}^{-1}$ indica la presencia del grupo metilo en el anillo de piranosa y del grupo metilo en el grupo metileno. Los picos más altos de las imágenes del espectro final se encuentran entre $1024\text{-}1025\text{ cm}^{-1}$ muestran el estiramiento de C-O (Demir D., et al., 2016).



Figuras 45, 46 y 47. Caracterización del quitosano comercial (T8) del laboratorio. Estas tres imágenes representan la similitud de resultados, pero con algunas pequeñas diferencias.

Todo ello nos indica que el quitosano con origen tanto del *Callinectes sapidus* como el comercial son muy similares, lo mismo ocurre con los machos y hembras del cangrejo azul. Estos resultados parecidos pueden ser debido a que la quitina y el quitosano de los crustáceos tienen forma α , porque la forma α , la banda de la amida I se divide en dos bandas aproximadamente

1650 y 1620 cm^{-1} (Mohan K., et al., 2020), y en los resultados se encuentran entre 1621-1658 cm^{-1} .

4.5. Resultados de la germinación de los conidios en las cinco disoluciones

En la Tabla 5., se observa que hay diferencias significativas entre las cinco disoluciones, ya que su p-valor ($\text{Pr}(>F)$) es menor de 0,05. Mientras que las horas y disoluciones entre horas no hay diferencias significativas, puesto que su p-valor es mayor de 0,05.

##	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
datos\$Disoluciones	4	17034	4258	143,422	<2e-16
datos\$Horas	1	36	36	1,216	0,273
datos\$Disoluciones:datos\$Horas	4	228	57	1,916	0,116
Residuals	80	2375	30		

Tabla 5. Resultados del ANOVA.

En la Figura 49., nos señala que el agua destilada (Control) y el Tampón tienen diferencias entre las diferentes disoluciones, pero las disoluciones del quitosano comercial, quitosano cangrejo macho y quitosano cangrejo hembra no tienen diferencias entre las tres.

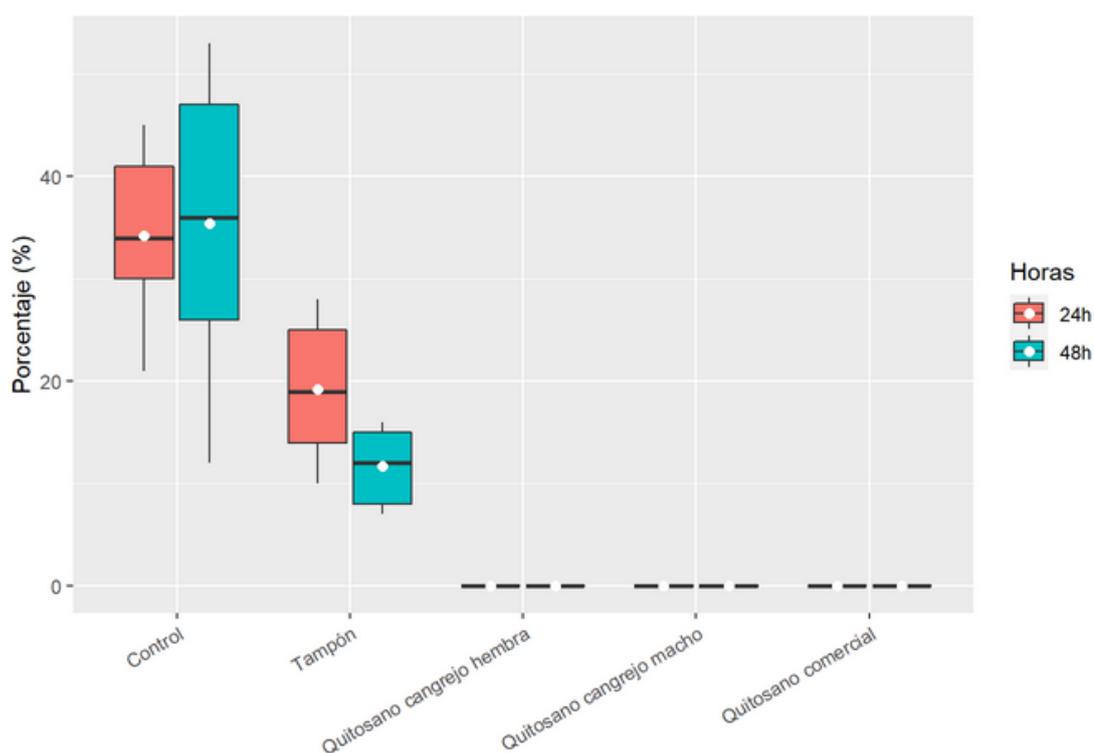


Figura 48. Boxplot donde se representa las diferencias entre el Control (agua destilada) y el Tampón, con las demás disoluciones y entre ellas mismas. Mientras que las disoluciones del quitosano comercial, quitosano cangrejo macho y quitosano cangrejo hembra no tienen diferencias entre las tres, debido a que el número de germinados es cero.

5. DISCUSIÓN

Los resultados nos señalan que el quitosano del *Callinectes sapidus* puede ser utilizado con éxito para la extracción de quitina y la obtención de quitosano. Por otro lado, al proceder a su utilización como antifúngico para la eliminación y mitigación del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4), parece que tiene la misma efectividad que el quitosano comercial contra la germinación de conidios de esta cepa que afecta negativamente a los cultivos de plátanos y bananos.

El estudio también observa que se puede utilizar machos o hembras maduros y por tanto el sexo no parece ser significativo en la obtención de resultados. Por ello no es necesario separarlos para la obtención de quitina y quitosano.

El quitosano con origen en este crustáceo invasor podría ser empleado con los mismos resultados que el de otras especies de crustáceos en el ámbito de la agricultura (Riseh et al., 2022) por su actividad antimicrobiana contra los hongos patógenos (Chowdary et al., 2022) y contra las bacterias (Donsi et al., 2015). Podría ser aprovechado como nutriente para aquellos hongos que parasitan nematodos (Fraile, 2020), los cuales afectan negativamente a los cultivos, e incluso ser utilizado en diferentes aplicaciones industriales y biomédicas (Crini et al., 2022) como ocurre con los quitosanos que se encuentran en el mercado.

Elaborar un protocolo de experimentación basado en la documentación referida a este tema (Demir et al., 2016), (Kaya et al., 2016), (Lee et al., 2018) y (Sarbon et al., 2015) es una de las claves de este trabajo y por supuesto contrastar algunas actuaciones específicas realizadas en el laboratorio en relación al cangrejo azul. En los puntos anteriores explique la metodología utilizada tanto para la preparación de la muestra en la extracción de quitina y quitosano, como de la extracción de los conidios.

Pero los resultados serán más significativos si se realiza un mayor número de experimentos (Mohan et al., 2022) en relación al quitosano que se encuentra en los exoesqueletos del cangrejo azul, y de ese modo medir su eficiencia y efectividad para la eliminación o el aumento del crecimiento de otros microorganismos.

Este trabajo puede ayudar a futuros experimentos, centrados en la obtención de quitina y quitosano del *Callinectes sapidus*, aunque sería necesario preparar más réplicas y usar diferentes concentraciones de quitosano para desarrollar un experimento más complejo (Coral et al., 2018). Podríamos conocer la concentración más eficiente no solo en el control de la germinación de conidios sino en el crecimiento de otros microorganismos patógenos e investigar otros usos (Kaya et al., 2016).

Debemos procurar que los exoesqueletos no sean desechados a la basura y sean reutilizados para que tengan un valor e impulsar la reducción de los residuos que afectan de forma negativa al medio ambiente y a la salud humana, cumpliendo con el modelo de economía circular (Marsh et al., 2022), pero para cumplirlo se necesita que los ciudadanos intervengan, es decir, en vez de desechar los restos de crustáceos a la basura sean tirados en un contenedor para ser reutilizados.

Otra vía para reconducir la población de esta especie invasora, sería la sobrepesca y el aumento de su consumo, de esa forma ayudaría a disminuir el número de individuos de esta población y al disminuirlos estimularía a que las poblaciones nativas crezcan y repueblen aquellas áreas que han desaparecido debido a la depredación del *Callinectes sapidus*.

6. CONCLUSIÓN

Este trabajo nace con el fin de cumplir los objetivos marcados: obtener quitosano del *Callinectes sapidus* caracterizando de forma física la quitina y el quitosano, a través del análisis FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometry), a la vez se comparan los resultados de los procedimientos de extracción con machos y hembras para concluir que el sexo no es una diferencia significativa. También se consiguió con el procedimiento utilizado la similitud de resultados con el quitosano de origen comercial. Es importante el proceso de control y eliminación del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4 (FocTR4) que hemos realizado en este trabajo fin de máster.

El proceso elegido puede mejorar en su protocolización y habiendo obtenido resultados similares con aquellos de los artículos científicos, es necesario profundizar y ampliar estos estudios para que los resultados sean concluyentes.

La quitina y el quitosano del *Callinectes sapidus*, tanto de machos como de hembras maduras no presentan diferencias entre sí. Además, el quitosano obtenido de *Callinectes sapidus* y el quitosano comercial tienen la misma eficacia como agentes antifúngicos contra el *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 4. No obstante, se necesitan más réplicas y diferentes concentraciones de quitosano para que el experimento sea más complejo y profundo.

La economía circular siempre será beneficiaria de actuaciones que reduzcan el número de especies invasoras con actuaciones científicas que consigan resultados de eficiencia comercial y a la vez mejoren la salud del ecosistema cuando es imposible erradicar de forma total una especie invasora.

CONCLUSION

This thesis was written with the aim of fulfilling the following objectives: to obtain chitosan from *Callinectes sapidus* by physically characterising the chitin and chitosan, through FTIR analysis (Fourier Transform Infrared Spectrometry); and to compare the results of the extraction procedures with males and females, which confirmed that sex is not a significant difference. Similar results have been achieved with chitosan of commercial origin following the same procedure. The process of control and elimination of the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* sp. f. cubense tropical race 4 (FocTR4) that has been carried out in this Master's thesis is important.

The findings of this thesis were consistent with existing research, however further replications of this study is required to establish more conclusive results. In addition, the protocolisation of the experimental procedure can be improved.

Chitin and chitosan from *Callinectes sapidus*, both in males and mature females, do not differ from each other. Furthermore, chitosan obtained from *Callinectes sapidus* and commercial chitosan have the same efficiency as antifungal agents against *Fusarium oxysporum* sp. f. cubense tropical race 4 (FocTR4). However, further investigation using different concentrations of chitosan is needed to improve the validity of these findings.

The circular economy will always benefit from scientific actions that reduce the number of invasive species, while improving ecosystem health and achieving commercially efficient outcomes, when complete eradication of an invasive species is not possible.

7. INCIDENCIAS

Este TFM ha tenido muchos cambios a lo largo de las semanas. En un principio se planteó realizar tres réplicas de machos y hembras, tanto maduros como inmaduros. Pero al final se ha concluido con cuatro réplicas de machos y hembras maduras, debido a que el proceso de decantar y centrifugar para obtener un pH neutro ha sido largo e incluso la obtención de este pH se obtuvo a la semana siguiente. Antes de utilizar la centrifugación y la decantación, se utilizaba papel de filtro y un embudo para separar los sólidos de lo líquido, pero fue descartado, ya que el papel de filtro se descomponía con la lejía al 2%. La segunda y la tercera réplica de los machos maduros fue descartada, porque en el momento del lavado de la segunda réplica, una manipulación accidental hizo caer la muestra perdiendo gran parte de quitina y provocando un peso de quitosano muy pobre. Por otro lado, el quitosano de la tercera réplica se quemó cuando se encontraba en la estufa, lo que causó que se decidiera utilizar la campana para el proceso de secado. Al no lograr la cantidad suficiente era más sensible a la temperatura de la estufa y por ese motivo se decidió secarla en la campana. Otro problema importante ha sido no contar con el tiempo suficiente, porque el procedimiento para la obtención de biopolímeros y su posterior utilización en el desarrollo de su actividad antimicrobiana es un proceso largo que requiere un tiempo suficiente para generar más réplicas y resultados más amplios.

8. BIBLIOGRAFÍA

8.1. Publicaciones:

Ahmed Ahmed Saad Ali, Hassan Ali Mostafa A. y Nour Mohammed Hamdi. Utilization of Chitosan Extracted from Shrimp Shell Waste in Wastewater Treatment as Low Cost Biosorbent. Egypt. J. Chem. Vol. 64, No. 2 pp. 981-988 (2021).

Amalraj Augustine, Jude Shintu y Gopi Sreeraj. Chapter 1 – Polymer blends, composites and nanocomposites from chitin and chitosan; manufacturing, characterization and applications. Handbook of Chitin and Chitosan. Volume 2: Composites and Nanocomposites from Chitin and Chitosan, Manufacturing and Characterisations 2020, Pages 1-46.

Bakshi Prasanna S., Selvakumar D., Kadirvelu K. y Kumar N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on Recent modifications and applications. International Journal of Biological Macromolecules 150 (2020) 1072-1083.

Balde Akshad, Kim Se-Kwon y Abdul Nazeer Rasool. Crab (*Charybdis natator*) exoskeleton derived chitosan nanoparticles for the in vivo delivery of poorly water-soluble drug: Ibuprofen. International Journal of Biological Macromolecules 212 (2022) 283-293.

Bautista Baños S., Hernández Lauzardo A. N., Velázquez del Valle M. G., Hernández López M., Ait Barka E., Bosquez Molina E. y Wilson C. L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection. Volume 25, Issue 2, February 2006, Pages 108-118.

Belgrad B. A. y Griffen B. D. (2016). The influence of diet composition on fitness of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Plos one, 11(1), e0145481.

Campos Williams L. N. y Fagoth W. R. (2018). Diagnóstico de las etapas de desarrollo de la Jaiba Azul *Callinectes sapidus* y Jaiba Roja *Callinectes bocourti* en la laguna de Bluefields como base para el establecimiento de veda (Doctoral dissertation, Bluefields Indian & Caribbean University).

CASTEJÓN D. y GUERAO G. (2013). A new record of the American Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda: Brachyura: Portunidae), de *Mediterranean coast of the Iberian Peninsula Bioinvasions* Rec.2, 141-143.

Chowdary Vallabhaneni Tilak, Baba SK Roshan, Divya Jagana y Varma P. Kishore. Chapter 10 – Role of chitosan in ecofriendly management of plant diseases for sustainable agriculture. New

and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Sustainable Agriculture: Revisiting Green Chemicals. 2022, Pages 219-244.

Coral David, Madroñero David y Ramírez Gina (2018). Estandarización del proceso de obtención de quitosano a partir del caparazón de *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*. Universidad Mariana, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería de Procesos, Séptimo Semestre.

Crini Grégorio. Chapter Seven – Chitin and chitosan: Production, properties, and applications. Chitin and Chitosan. Discoveries and Applications for Sustainability. 2022, Pages 149-207.

Demir Didem, Öfkeli Fatma, Ceylan Seda y Karagülle Nimet Bölgen. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Blue Crab and Synthesis of Chitosan Cryogel Scaffolds. Mersin University, Engineering Faculty, Chemical Engineering Department, 33343, Mersin, Turkey. Adana Science and Technology University, Bioengineering Department, Adana, Turkey. Demir et al., JOTCSA. 2016; 3 (3): 131-144.

Donsì Francesco, Marchese Enrico, Maresca Paola, Pataro Gianpiero, Dang Vu Khanh, Salmieri Stephane, Lacroix Monique y Ferrari Giovanna. Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. Postharvest Biology and Technology 106 (2015) 21-32.

Duran Baron Ricardo, Lúquez Pérez Latife, Mejía Salcedo Jesús, Pérez Córdoba Luis y do Amaral Sobral Paulo José. Production and characterization of films based on blends of chitosan from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste and pectin from Orange (*Citrus sinensis Osbeck*) peel. International Journal of Biological Macromolecules 98 (2017) 676-683.

Escudero N., Ferreira S. R., Lopez-Moya F., Naranjo-Ortiz M. A., Marin-Ortiz A. I., Thornton C. R., y Lopez-Llorca L. V. (2016). Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal biology*, 120(4), 572-585.

Esteso Perona, I. (2019). Estudio de la biología y pesca del cangrejo azul americano *Callinectes sapidus* Rathbun 1896 (Brachyura: Portunidae), en el Sureste de la Península Ibérica. Máster Internacional en Gestión Pesquera Sostenible (7ª edición: 2017-2019).

Fraile Gómez Teresa. Caracterización molecular y celular del efecto del quitosano sobre el desarrollo de cepas de origen mundial de los hongos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* y *Akanthomyces lecanii*. Universitat D'Alacant. Facultad de Ciencias, Grado en Ciencias del Mar, Trabajo Fin de Grado, Curso Académico [2020-2021].

Gao Yanyun y Wu Yuling. Recent advances of chitosan-based nanoparticles for biomedical and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 203 (2022) 379-388.

Ghosh Manasi, Sadhukhan Souray y Kishor Dey Krishna. Elucidating the internal structure and dynamics of α -chitin by 2DPASS—MAS-NMR and spin-lattice relaxation measurements. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 97 (2019) 7-16.

Hamed Imen, Özogul Fatih y Regenstein Joe M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* 48 (2016) 40-50.

Hisham F., Maziati Akmal M. H., Ahmad F. B. y Ahmad Kartini. Facile extraction of chitin and chitosan from Shrimp shell. *Materials Today: Proceeding* 42 (2021) 2369-2373.

Huang Liang, Bi Shichao, Pang Jianhui, Sun Mengjie, Feng Chao y Chen Xiguang. Preparation and characterization of chitosan from crab shell (*Portunus trituberculatus*) by NaOH/urea solution freeze-thaw pretreatment procedure. *International Journal of Biological Macromolecules* 147 (2020) 931-936.

Jabeur Fadoua, Mechri Sondes, Mensi Fethi, Gharbi Ines, Ben Naser Yosri, Kriaa Mouna, Bejaoui Nejla, Bachouche Samir, Badis Abdelmalek, Annane Rachid, Djellali Mostapha, Sadok Saloua y Jaouadi Bassem. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysate from the invasive Pacific blue crab, *Portunus segnis* (Forsk., 1775) having potential biological activities. *Environmental Science and Pollution Research* (2021).

Karen Munhuweyi, Cheryl L. Lennox, Julia C. Meitz-Hopkins, Oluwafemi J. Caleb, Gunnar O. Sigge y Umezuruike Linus Opara. Investigating the effects of crab shell chitosan on fungal mycelial growth and postharvest quality attributes of pomegranate whole fruit and arils. *Scientia Horticulturae* 220 (2017) 78-89.

Kashyap Prem Lal, Xiang Xu y Heiden Patricia. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 77, June 2015, Pages 36-51.

Kaya Murat, Dudakli Fatma, Asan-Ozusaglam Meltem, Cakmak Yazuz Selim, Baran Talat, Mentis Ayfer y Erdogan Sevil. Porous and nanofiber α -chitosan obtained from blue crab (*Callinectes*

sapidus) tested for antimicrobial and antioxidant activities. LWT – Food Science and Technology 65 (2016) 1109-1117.

Kumar G. P., Desai S., Moerschbacher B. M. y Eddine-El Gueddari N. Seed treatment with chitosan synergizes plants growth promoting ability of *Pseudomonas aeruginosa*-P17 in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). bioRxiv 2019, 10, 601328.

Lee Yongjae, Kim Hyun-Wook y Kim Yuan H. Brad. New route of chitosan extraction from blue crabs and shrimp shells as flocculants on soybean solutes. Food Sci Biotechnol (2018) 27(2): 461-466.

Lejeusne C., et al. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. Trends in Ecology & Evolution Volume 25, Issue 4, April 2010, Pages 250-260.

López Núñez Raquel (2019). Efecto del quitosano sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Raza tropical 4) (FocTR4), agente causal del mal de Panamá de *Musa acuminata*. Programa formativo en biomedicina y tecnologías para la vida. Máster Universitario en Biotecnología para la salud y la sostenibilidad. Trabajo fin de Máster. Curso Académico [2019-2020]. Universidad de Alicante.

Mancinelli G., Carrozo L., Marini G., Pagliara P. y Pinna M. (2013). The co-occurrence of *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Brachyura: Portunidae) and the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. (Dinoflagellata: Syndinidae) in two transitional water ecosystems of the Apulia coastline (South-Italy). *Transitional Water Bulletin*, 7, 32-42.

Marangi M., et al. Occurrence of the protozoan parasites *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in the invasive Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* from the Lesina Lagoon (SE Italy). *Marine Pollution Bulletin*. Volume 176, March 2022, 113428.

Mármol Zulay, Páez Gisela, Rincón Marisela, Araujo Karelen, Aiello Cateryna, Chandler Cintia y Gutiérrez Edixon (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería.

Marsh Alastair T. M., Velenturf Anne P. M. y Bernal Susan A. Circular Economy strategies for concrete: implementation and integration. *Journal of Cleaner Production*. Volume 362, 15 August 2022, 132486.

Millikin M. R. y Williams A. B. (1984). Synopsis of Biological Data on the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. FAO Fisheries Synopsis No. 138. NOAA Technical Report NMFS 1.

Mittal Hemant, Ray Suprakas Sinha, Kaith Balbir Singh, Bhatia Jaspreet Kaur, Sukriti, Sharma Jitender y Alhassan Saeed M. Recent progress in the Structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields. *European Polymer Journal* 109 (2018) 402-434.

Mocholi Soriano, V. (2020). Abundancia y uso del hábitat del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) en la Albufera de Valencia. Universitat Politècnica de Valencia. Escola Politècnica Superior de Gandia. Máster en Eval. Amb. Ecosistemes Marins i Costers.

Mohan Kannan, Ganesan Abirami Ramu, Ezhilarasi P. N., Kondamareddy Kiran Kumar, Rajan Durairaj Karthick, Sathishkumar Palanivel, Rajarajeswaran Jayakumar y Conterno Lorenza. Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers* 287 (2022) 119349.

Mohan Kannan, Ganesan Abirami Ramu, Muralisankar Thirunavukkarasu, Jayakumar Rajarajeswaran, Sathishkumar Palanivel, Uthayakumar Venkatachalam, Chandirasekar Ramachandran y Revathi Nagarajan. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in Food Science & Technology* 105 (2020) 17-42.

Muriithi Kiirika Leonard, Stahl Frank y Wydra Kerstin. Phenotypic and molecular characterization of resistance induction by single and combined application of chitosan and silicon in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 81 (2013) 1-12.

Navarro García Paula (2021). Diferentes estadios de desarrollo de *Callinectes sapidus* en las golas de la Albufera de Valencia. Universitat Politècnica de Valencia. Escola Politècnica Superior de Gandía. Grado en Ciencias Ambientales.

Nehring, S. (2011). Invasion history and success of the American blue Crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 in European and adjacent waters. In: Galil, B. S., Clark, P. F. & Carlton, J. T. (Eds.), *In the wrong Place -Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*. *Invading Nature – Springer Series in Invasion Ecology* 6, 607-624, 2011.

Pakizeh Majid, Moradi Ali y Ghassemi Toktam. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from Shrimp shells. *European Polymer Journal* 159 (2021) 110709.

Palmeira Chaves de Souza Maurício, Miguel Sábio Rafael, de Cassia Ribeiro Tais, Martins dos Santos Aline, Bagliotti Meneguín Andréia y Chorilli Marlus. Highlighting the impact of chitosan on the development of gastroretentive drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules* 159 (2020) 804-822.

Pérez Jiménez, P. (2020-2021). Contenido de metales pesados en poblaciones de *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1986) en diferentes hábitats del SE Ibérico. Facultad de Ciencias Grado en Ciencias del Mar Trabajo Fin de Grado Curso Académico [2020-2021].

Pipitone Carlo, Zenone Arturo, Badalamenti Fabio y D'Anna Giovanni. First record of the blue crab *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae), a non-indigenous species in the central/southern Tyrrhenian Sea. ACTA ADRIAT., 61 (1): 101-106, 2020.

Quiroga Ariza Leidy Juliette (2019). Evaluación de biopolímeros (Quitina y Quitosano) extraídos a partir del caparazón de cangrejo *Procambarus clarkii* – Girard 1852 (Crustacea: Cambaridae), Paipa-Boyacá. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Ambiental. Tunja-Boyacá.

Olivert Angel, J. (2018). Situación y problemática de la introducción del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) en la Comunidad Valenciana. Universitat Politècnica de Valencia. Escola Politècnica Superior de Gandia. Grau en Ciències Ambientals.

Oyatogun G. M., Esan T. A., Akpan E. I., Adeosun S. O., Popoola A. P. I., Imasogie B. I., Soboyejo W. O., Afonja A. A., Ibitoye S. A., Abere V. D., Oyatogun A. O., Oluwasegun K. M., Akinwole I. E. y Akinluwade K. J. Chapter 11 – Chitin, chitosan, marine to market. Handbook of Chitin and Chitosan. Volume 1: Preparation and Properties 2020, Pages 335-376.

Öztürk Rafet Çağrı, Terzi Yahya, Feyzioğlu Ali Muzaffer, Şahin Ahmet y Aydin Mehmet (2020). Genetic characterization of the invasive Blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896), in the Black Sea. Regional Studies in Marine Science 39 (2020) 101412.

Quiroga Ariza Leidy Juliette. Evaluación de biopolímeros (Quitina y Quitosano) extraídos a partir del caparazón de cangrejo *Procambarus clarkii*

Reyes Pérez Juan José. Aplicación de quitosano incrementa la emergencia, crecimiento y rendimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de invernadero. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador. Biotecnia, ISSN 1665-1456, Vol. 22, N.º 3, 2020, págs. 156-163.

Riseh Roohallah Saberi, Tamanadar Elahe, Hajabdollahi Najmeh, Vatankhah Masoumeh, Thakur Vijay Kumar y Skorik A. Yury. Chitosan microencapsulation of rhizobacteria for biological control

of plant pests and diseases: Recent advances and applications. *Rhizosphere*. Volume 23, September 2022, 100565.

Sarbon N. M., Sandanamsamy S., Kamaruzaman S. F. S. y Ahmad F. Chitosan Extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: physicochemical and antioxidant properties. *J Food Sci Technol* (July 2015) 52(7): 4266-4275.

Sheth Yashvi, Dharaskar Swapnil, Khalid Mohammad y Sonawane Shiram. An environment friendly approach for heavy metal removal from industrial wastewater using chitosan based biosorbent: A review. *Sustainable Energy Technologies and Assesments* 43 (2021) 100951.

Streftaris N. y Zenetos A., 2006. Alien marine species in the Mediterranean – the 100 ‘WorstInvasives’ and their impact. *Medit Mar Sci* 7:87-118.

Türelı Canan, Miller Thomas J., Gündođdu and İrem Nur Yeşilyurt. Growth and Mortality of Blue Crab (*Callinectes sapidus*) in the North-Eastern Mediterranean Sea. © 2016 www.fisheriessciences.com.

Van Engel. WA (1958). The blue crab and its fishery in the Chesapeake Bay. Part I—Reproduction, early development, growth, and migration. *Commercial Fisheries Review*. 20: 6–17.

Wang Wenjie, Xue Changhu y Mao Xiangzhao. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *International Journal of Biological Macromolecules* 164 (2020) 4532-4546.

WECAFC/SAG/IX/2018/3. Review of the state of fisheries and fisheries resources in the WECAFC region. NINTH SESSION OF THE SCIENTIFIC ADVISORY GROUP (SAG) Bridgetown, Barbados, 19-20 November 2018. Western Central Atlantic Fishery Commision (WECAFC). FAO Fisheries and Aquaculture Department. FAO, 2018.

Zentz Frédéric, Bédouet Laurent, Almeida Maria José, Milet Christian, Lopez Evelyne y Giraud Michel. Characterization and Quantification of chitosan Extracted from Nacre of the Abalone *Haliotis tuberculata* and the Oyster *Pinctada máxima*. *Marine Biotechnology*. 3, 36-44, 2001.

Zhang Meng, Zhang Fengshi, Li Ci, An Heng, Wan Teng y Zhang Peixun (2022). Application of Chitosan and Its Derivative Polymers in Clinical Medicine and Agriculture. *Polymers* 2022, 14, 958.

8.2. Páginas web

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/90126>

<https://canalmarmenor.carm.es/inventario-ecologico/fauna/cangrejo-azul-jaibacallinectes-sapidus/>

<https://www.fisheries.noaa.gov/species/blue-crab>

<https://parquesnaturales.gva.es/documents/80302883/165126079/Informe+Callinectes+2016+10+def.pdf/db62c22f-f3f3-4395-86da-e9ca044bfda4;jsessionid=CC98CE8623E987BD5406659886C77521>

9. ANEXO

9.1. Imágenes estadísticas

```
##  
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test  
##  
## data:  modelg$residuals  
## D = 0.31111, p-value = 5.428e-08  
## alternative hypothesis: two-sided
```

Imagen. El p-valor es menor que 0,05, y como es menor de 0,05 rechazamos hipótesis nula, por tanto, no se cumple la normalidad. No obstante, si tenemos más de 30 datos y está balanceado, se asume normalidad.

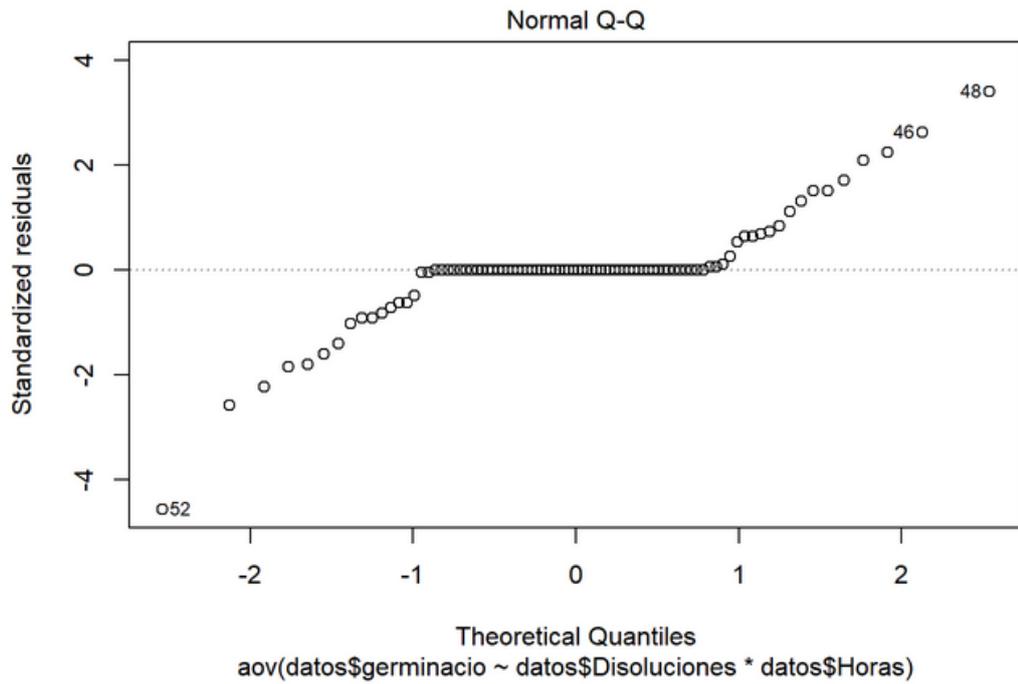


Imagen. Esta imagen nos indica que no se cumple la normalidad, porque si se cumpliera tendríamos una línea perpendicular.

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: germinacio by interaction(Disoluciones, Horas)
## Bartlett's K-squared = Inf, df = 9, p-value < 2.2e-16
```

Imagen. No se cumple la homogeneidad de varianzas, porque su p-valor es menor de 0,05 y por ese motivo bajamos a alfa 0,01, pero también nos da un p-valor menor de 0,01. Así que nuestras varianzas son heterogéneas.

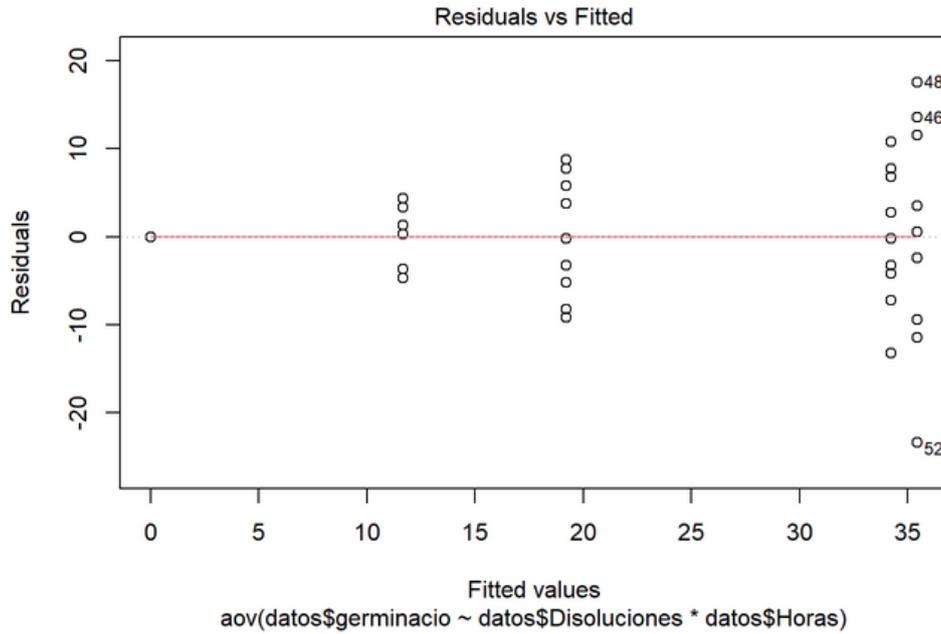


Imagen. En esta imagen nos indica que no hay homogeneidad de varianzas, porque los puntos no están repartidos igualmente sobre la línea de plot.

```
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
## factor levels have been ordered
##
## Fit: aov(formula = datos$germinacio ~ datos$Disoluciones * datos$Horas)

## `$datos$Disoluciones`

##                               p adj
## Quitosano_comercial-Quitosano_cangrejo_macho      1
## Quitosano_cangrejo_hembra-Quitosano_cangrejo_macho 1
## T-Quitosano_cangrejo_macho                        0
## Control-Quitosano_cangrejo_macho                  0
## Quitosano_cangrejo_hembra-Quitosano_comercial      1
## T-Quitosano_comercial                             0
## Control-Quitosano_comercial                       0
## T-Quitosano_cangrejo_hembra                       0
## Control-Quitosano_cangrejo_hembra                 0
## Control-T                                          0
```

Imagen. En esta imagen nos indican que hay diferencias significativas de las disoluciones quitosano comercial, quitosano cangrejo macho y quitosano cangrejo hembra hacia las disoluciones de agua destilada (Control) y el tampón, ya que sus p-valores son menores de 0,05. También hay diferencias significativas entre el agua destilada (Control) y el tampón.

9.2. Cálculos

Agua destilada + conidios

Volumen inicial de conidios = 9 μ L

Volumen de agua destilada = Volumen final de agua destilada – Volumen inicial de conidios = 0,2 ml – 9 $\times 10^{-3}$ mL = 0,191 mL = 191 μ L de agua destilada

Agua destilada + T8 + conidios

Volumen inicial de conidios = 9 μ L

$C_{inicial} \times V_{inicial} = C_{final} \times V_{final} \Rightarrow 6,36 \text{ (g/L)} \times V_{inicial} = 0,1 \text{ (mg/mL)} \times 0,2 \text{ (mL)} \Rightarrow V_{inicial} = (0,02/6,36) = 3,145 \times 10^{-3} \text{ mL} = 3,145 \mu\text{L} = 3,2 \mu\text{L}$ que es el volumen inicial de T8.

Volumen de agua destilada = Volumen final de agua destilada – la suma total del volumen inicial de conidios y el volumen inicial de T8 = 200 μ L – 12,145 μ L = 187,8 μ L = 188 μ L

Agua destilada + Quitosano machos + conidios

Volumen inicial de conidios = 9 μ L

$C_{inicial} \times V_{inicial} = C_{final} \times V_{final} \Rightarrow 0,771 \text{ (g/L)} \times V_{inicial} = 0,1 \text{ (mg/mL)} \times 0,2 \text{ (mL)} \Rightarrow V_{inicial} = (0,02/0,771) = 0,026 \text{ mL} = 26 \mu\text{L}$ que es el volumen inicial del quitosano de los machos maduros de los cangrejos azules.

Volumen de agua destilada = Volumen final de agua destilada – la suma total del volumen inicial de conidios y el volumen inicial de los machos = 200 μ L – 35 μ L = 165 μ L

Agua destilada + Quitosano hembras + conidios

Volumen inicial de conidios = 9 μ L

$C_{inicial} \times V_{inicial} = C_{final} \times V_{final} \Rightarrow 0,766 \text{ (g/L)} \times V_{inicial} = 0,1 \text{ (mg/mL)} \times 0,2 \text{ (mL)} \Rightarrow V_{inicial} = (0,02/0,766) = 0,026 \text{ mL} = 26 \mu\text{L}$ que es el volumen inicial del quitosano de las hembras maduras de los cangrejos azules.

Volumen de agua destilada = Volumen final de agua destilada – la suma total del volumen inicial de conidios y el volumen inicial de las hembras = 200 μ L – 35 μ L = 165 μ L

Agua destilada + tampón + conidios

Volumen inicial de conidios = 9 μ L

$V_{\text{inicial}} = 3,2 \mu\text{L}$ que es el volumen inicial del tampón.

Volumen de agua destilada = 188 μ L

9.3. Tabla

Disoluciones	Horas	Experimento	Germinación
Control	24 h	1	42,11009174
Control	24 h	1	31,54506438
Control	24 h	1	30,78703704
Control	24 h	1	27,3155416
Control	24 h	1	34,54
Control	24 h	1	21,39830508
Control	24 h	1	37,5
Control	24 h	1	45,71428571
Control	24 h	1	41,7794971
T	24 h	1	27,37094838
T	24 h	1	10,3515625
T	24 h	1	16,49350649
T	24 h	1	25,22522523
T	24 h	1	23,51851852
T	24 h	1	28,57142857
T	24 h	1	19,66
T	24 h	1	14,13043478
T	24 h	1	11,66666667
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_comercial	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0

Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	24 h	1	0
Control	48 h	1	49,52830189
Control	48 h	1	47,37442922
Control	48 h	1	53,73333333
Control	48 h	1	39,81042654
Control	48 h	1	26,67423383
Control	48 h	1	24,61220269
Control	48 h	1	12,93800539
Control	48 h	1	36,05
Control	48 h	1	33,7628866
T	48 h	1	12,2681883
T	48 h	1	15,90038314
T	48 h	1	16,11842105
T	48 h	1	12,09
T	48 h	1	15,75562701
T	48 h	1	7,296137339
T	48 h	1	7,849293564
T	48 h	1	13,2780083
T	48 h	1	8,256880734
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_comercial	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0

Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_macho	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	48 h	1	0
Quitosano_cangrejo_hembra	48 h	1	0

Tabla. En está tabla se encuentran las cinco disoluciones (Control (Agua destilada), Tampón (T), Quitosano comercial, Quitosano Cangrejo Macho y Quitosano Cangrejo Hembra), las horas (24 y 48 horas), el experimento que fue uno solo y el porcentaje de germinación.