

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Síntesis de Biocompositos de Quitosano/Ácido Pirrol 2-Carboxílico y su Efecto en la Morfometría, Germinación y Organelos Subcelulares de Especies de *Aspergillus*

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

Carlos Ignacio Muñoz Espinoza

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2016

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Carlos Ignacio Muñoz Espinoza** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Químico en Alimentos**

Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Presidente

Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo

Secretario

Mstra. Lucía Castellón Campana

Vocal

Dra. Maritza Lizeth Alvarez Ainza

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero dedicar ésta tesis para todas esas personas que estuvieron conmigo durante y después de éste acontecimiento; mi familia, amigos y compañeros de trabajo que involucraron estar dentro del proyecto, sobre todo Gracias a Dios por haberme permitido primordialmente salud, sabiduría y entendimiento para ejecutar dicho tema.

Agradeciendo mis padres en primera por ser el pilar que me dio como sostén el llevar a cabo desde que tengo uso de razón la educación que para mí se parte en dos, la que se da en escuela y la que se aprende en el hogar, un ejemplo a seguir para las dos personas que me dieron la vida a muy temprana edad; Juan Carlos y Soledad los amo con todo mi corazón, ya que sin duda nunca dejaron que me descarrilara por el largo camino que hasta ahora he llegado, jamás serán suficientes las gracias que les doy a ellos por siempre mantenerse firmes, sin olvidar a mi hermano me encuentro agradecido por haberme apoyado en cualquier momento o los favores que me brindó a cualquier hora del día.

Totalmente agradecido con mi novia Fernanda ya que ella ha sido parte de mi motivación a seguir adelante en cualquier aspecto, recibiendo su apoyo desde lo sencillo a lo más complejo, como olvidar las veladas en las que fue responsable de poder seguir dando mi 100% académica y personalmente, siendo una de las personas más importantes que tanto aprecio y amo, muchas gracias por estar involucrada en mis proyectos de vida que han finalizado, aquellos que están por concluir y sobre todo esos que en un futuro se realizarán.

Sin duda a los Maestros y Doctores del cuerpo académico de licenciatura y partícipes de la tesis profesional, sobre todo a mis maestros de la especialidad de la Academia de Tecnología de Alimentos, al Dr. Ocaño, a la Maestra Coyito, Maestro Cesar por siempre darnos su mejor palabra y consejo tanto académica y personalmente sin olvidar el lazo que se formó, Dra. Maribel Plascencia por estar ahí siempre para cualquier duda que se me presentaba, estoy completamente agradecido por haberme brindado todos los conocimientos que fueran como base para poder concluir con éxito mi licenciatura.

CONTENIDO

APROBACIÓN	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	8
OBJETIVOS	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
RESUMEN	11
HIPÓTESIS	12
INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	15
Generalidades de los Hongos	15
Estructura de los Hongos	16
Reproducción de los Hongos.....	18
Gemación.....	19
Reproducción Sexual.....	19
Métodos de Control de Hongos.....	20
Control Químico	20
Ácidos Orgánicos.....	20
Control Biológico.....	21
Quitosano	21
Fuentes de Obtención.....	22
Estructura Química.....	23
Actividad Antimicrobiana	23
Bicompositos de Quitosano	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Reactivación de Cepas.....	26
Cultivo Monospórico.....	26
Preparación de la Suspensión de Esporas	27

Preparación de la Solución de Quitosano	27
Preparación de la Solución de PCA	27
Preparación de las Nanopartículas.....	27
Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	28
Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR)	28
Ensayos Microbiológicos.....	29
Viabilidad de las Esporas por Ensayo con XTT.	29
Germinación de Esporas.....	29
Análisis Morfométrico.....	29
Viabilidad Celular por Tinción con Azul de Tripán.	30
Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores.....	30
Ioduro de propidio (PI):	31
Blanco de Calcoflúor:.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Tamaño y Potencial Z de las Partículas	32
Análisis de FT-IR	33
Viabilidad Mediante Prueba con XTT.....	34
Germinación de Esporas.....	36
Análisis Morfométrico.....	38
Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores	40
<i>Aspergillus niger</i>	40
<i>Aspergillus parasiticus</i>	42
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tamaño y potencial zeta de las partículas de quitosano y del biocomposito quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico.....	30
2. Tabla 2. Efecto de las partículas de quitosano, del biocomposito de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico y del ácido pirrol-2-carboxílico sobre la viabilidad de las esporas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>A. parasiticus</i> , determinada mediante la técnica de XTT.....	32
3. Morfometría de esporas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>A. parasiticus</i> desarrollados en presencia de las partículas de quitosano y de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de hongos del género <i>Aspergillus</i>	16
2. Cabezas conidiales del género <i>Aspergillus</i> : a) uniseriada, b) biseriada.....	17
3. Tipos de esporas asexuales.....	18
4. Espectros obtenidos por Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier para: A) nanopartículas de quitosano/PCA, B) PCA y C) nanopartículas de quitosano.....	32
5. Viabilidad de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>A. niger</i> desarrollados en presencia de partículas de quitosano (CS) y del biocomposito quitosano/PCA (CSPCA), determinada mediante técnica de XTT.....	34
6. Viabilidad de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>A. niger</i> desarrollados en presencia de PCA (en solución), determinada mediante técnica de XTT.....	35
7. Porcentaje de esporas de <i>Aspergillus niger</i> germinadas en presencia de partículas de quitosano (CS) y del biocomposito quitosano/PCA (CSPCA).....	36
8. Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en medio con partículas del complejo quitosano/PCA (CSPCA), a las 24 horas, observadas en fluorescencia. Medio de cultivo con: a) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo claro; b) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; c) CSPCA, Ioduro de propidio, campo claro; d) CSPCA, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.....	37
9. Porcentaje de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> germinadas en presencia de partículas de quitosano (CS) y del biocomposito quitosano/PCA (CSPCA).....	38
10. Esporas germinadas y no germinadas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en medio de cultivo adicionado con: a) control; b) partículas de quitosano; c) partículas del composito de quitosano/PCA. Observaciones realizadas a 40x.....	39
11. Esporas e hifas de <i>Aspergillus niger</i> desarrolladas en medio control, a las 24 horas, observadas en microscopio de fluorescencia. Tinción con: A) solución azul de tripán; B) Blanco de Calcoflúor, campo claro; C) Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; D) Ioduro de propidio, campo claro; E) Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.....	40
12. Esporas Esporas e hifas de <i>Aspergillus niger</i> desarrolladas en medio adicionado con	

	partículas de quitosano (CS) y con partículas del complejo quitosano/PCA (CSPCA), a las 24 horas, observadas en fluorescencia. Medio de cultivo con: A) CS, Blanco de Calcoflúor, campo claro; B) CS, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; C) CS, Ioduro de propidio, campo claro; D) CS, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia; E) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo claro; F) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; G) CSPCA, Ioduro de propidio, campo claro; H) CSPCA, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.....	43
13.	Esporas e hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en medio control, a las 24 horas, observadas en microscopio de fluorescencia. Tinción con: a) Blanco de Calcoflúor, campo claro; b) Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; c) Ioduro de propidio, campo claro; d) Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.....	43
14.	Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en medio con partículas del complejo quitosano/PCA (CSPCA), a las 24 horas, observadas en fluorescencia. Medio de cultivo con: a) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo claro; b) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; c) CSPCA, Ioduro de propidio, campo claro; d) CSPCA, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.....	44

OBJETIVOS

Objetivo General

Sintetizar y evaluar la actividad antifúngica de biocompositos de quitosano y ácido pirrol-2-carboxílico sobre el crecimiento de especies de *Aspergillus*.

Objetivos Específicos

1. Obtener biocompositos de quitosano y ácido 2-pirrolcarboxílico mediante nanoprecipitación.
2. Caracterizar los biocompositos obtenidos mediante el potencial Z, análisis de FT-IR, tamaño y dispersión.
3. Evaluar el efecto *in vitro* de los biocompositos sobre la viabilidad, la morfometría y la germinación de esporas de los hongos *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*.
4. Evaluar el efecto de los biocompositos sobre los organelos subcelulares de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*, mediante análisis de fluorescencia.

RESUMEN

Los microorganismos han sido benéficos y/o dañinos para la humanidad tanto en la industria farmacéutica y alimentaria como en los procesos biotecnológicos, campos en los cuales se involucran diferentes grupos de microorganismos. En el área de los alimentos, el género *Aspergillus* es uno de los principales agentes patógenos y deteriorativos que afectan la vida de anaquel y la calidad de una gran variedad de alimentos y productos poscosecha, ya que algunas especies son micotóxicas y ocasionan enfermedades en humanos y animales. Recientemente, la búsqueda de métodos alternos de conservación que sean “amigables con el ambiente” es un tema de interés para el control de microorganismos en alimentos. El quitosano, un polímero natural con propiedades antimicrobianas, es capaz de inhibir el crecimiento de algunos hongos y bacterias, por lo que se le ha estudiado en varias formas: soluciones, fibras, nanopartículas, entre otras; estas últimas han resultado ser más efectivas comparado con el quitosano en solución. En este proyecto se sintetizaron biocompositos de ácido 2-pirrol-carboxílico (PCA) funcionalizados con quitosano y se evaluó su efecto sobre el crecimiento *in vitro* de dos especies de *Aspergillus* de importancia agrícola. Se realizaron bioensayos para conocer el efecto sobre la morfometría, germinación y viabilidad de esporas de *A. parasiticus* y *A. niger*. Además, se determinó el tamaño y potencial Z de los biocompositos, y se evaluó el grado de acoplamiento mediante análisis de FT-IR. A fin de conocer el efecto a nivel subcelular, se realizaron tinciones con marcadores fluorescentes específicos. Se encontró que los biocompositos de PCA funcionalizados con quitosano afectan fuertemente la germinación y viabilidad de esporas de ambas especies de hongos, por lo que constituyen un potencial tratamiento viable para aplicaciones en agricultura, especialmente para alimentos secos como granos y semillas.

HIPÓTESIS

Los bionanocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico inhiben el crecimiento *in vitro* de esporas de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*, además de ocasionar daños en la integridad de la membrana celular.

INTRODUCCIÓN

El quitosano ha sido investigado como un material antimicrobiano contra una amplia gama de organismos como algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, *in vivo* e *in vitro*, utilizándolo en diferentes formas como: soluciones, películas y materiales compuestos tales como micro y nanopartículas (Argüelles et al., 1990). Los recientes estudios sugieren que la actividad del quitosano es bacteriostática o fungistático más que biocida, aunque el mecanismo exacto aún no se conoce del todo (Peniche y Argüelles, 1993).

Para explicar la actividad antimicrobiana se han propuesto diferentes mecanismos por los que el quitosano puede actuar sobre los microorganismos e inhibir su crecimiento y desarrollo. El principal mecanismo se basa en la interacción de cargas, el cual se relaciona con la pérdida de la integridad de la membrana; este mecanismo se asocia con la permeabilidad de la membrana citoplasmática, mediante la interacción de los grupos amino ($-NH_2$) del biopolímero con componentes fosfolipídicos cargados negativamente en las membranas microbianas, con lo que se altera el intercambio con el medio ambiente, además de la formación de quelatos con los metales de transición y la inhibición de algunas enzimas (Freitez, 2008).

Varios autores han reportado que la actividad fungicida del quitosano se asocia a su carácter catiónico; la interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Martínez et al., 2010).

A nivel industrial, el quitosano tiene un gran potencial de aplicación en diversos campos, destacándose su uso en la cosmetología (lociones, aditivos para el cabello, cremas faciales y para el cuerpo (Lang y Clausen, 1989). Se emplea como agente conservador en productos alimenticios aprovechando sus características antimicrobianas y también como antioxidante (Shahidi et al., 2002). En biotecnología ha tenido diferentes usos entre los que figura la inmovilización de células y enzimas (Sandford, 1989), en farmacología y medicina (fibra dietética, medicamentos) (Liu et al., 2001), y en la agricultura se ha empleado como modificador de suelos y fungicida, entre otros (Hoagland, 1996;). Un uso muy importante en postcosecha ha sido su aplicación en forma de películas recubriendo los frutos, con el objetivo de encontrar una forma de preservarlos y contribuir a extender su vida útil.

Las nanopartículas representan un grupo emergente de materiales híbridos que se forman por la combinación de polímeros naturales y sólidos orgánicos, ya que exhiben una mejora estructural y propiedades funcionales de gran interés para diferentes aplicaciones. Las propiedades inherentes del quitosano, tales como su compatibilidad, funcionalidad y biodegradabilidad, abren nuevas perspectivas asociadas con el desarrollo de nanocompuestos con aplicaciones especiales en la agricultura y el desarrollo de materiales ecológicos (de Azeredo, 2009).

Los bionanocompositos basados en quitosano abren una oportunidad para el uso de nuevos materiales funcionales con base a su alto rendimiento, que pueden sustituir a los materiales plásticos tradicionales utilizados para envasado, elaborados a partir de petróleo (Rhim et al., 2013).

Así, el desarrollo de polímeros de base biológica como el quitosano y el uso de tecnologías innovadoras puede reducir la dependencia de los combustibles fósiles. Sin embargo, las nuevas propiedades físicoquímicas de estos nanomateriales hacen hincapié en la necesidad de evaluar adecuadamente los efectos potenciales y los riesgos para la salud humana, específicamente acerca de la posible citotoxicidad. A pesar de que la evidencia señala que estos materiales pueden tener un efecto adverso sobre la salud humana, la relación causa/efecto aún no se comprende plenamente (Foldbjerg et al., 2011; Luque-Alcaraz et al, 2016).

ANTECEDENTES

Generalidades de los Hongos

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos con nutrición heterótrofa, que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas (Prescott et al., 1999). Inicialmente, los hongos fueron clasificados dentro del reino *Plantae* ya que fueron considerados organismos inmóviles presentando estructuras que se asientan firmemente en el sustrato sobre el que crecían (Lazo, 2013).

Son organismos pertenecientes al reino Funji, que se divide en cuatro *Phyla* denominados *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*, encontrándose en los tres primeros los hongos patógenos humanos (Carillo, 2003). Poseen una pared celular de quitina y glucanos, carecen de celulosa y causan enfermedades al hombre, animales y vegetales; otros son saprófitos, que se desarrollan sobre materia orgánica en descomposición.

Entre las características que definen a esta clase de microorganismo destacan:

- Inmóviles por defecto de su pared celular e incapaces de llevar el proceso de fotosíntesis debido a la carencia de cloroplastos y clorofila; éstos encuentran la energía en la oxidación de compuestos orgánicos.
- Se diferencian por su estructura misceliana, ya que está compuestos de filamentos, hifas y ramificaciones que dan como estructura al micelio o talo (Scriban et al., 1989).

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación (Abarca, 2000). Son mayoritariamente ubicuas, aislándose de diferentes sustratos, aunque con mayor frecuencia de climas cálidos. Algunas especies tienen interés por su importancia industrial, otras por ser agentes de biodeterioro o producir micotoxinas, o por ser patógenas para los animales y los vegetales.

Las colonias de las especies de este género se desarrollan en general de forma rápida y se presentan diversas tonalidades: blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas,

marrón-negruczas o verdosas. Están formadas por densas agrupaciones de conidióforos sobre los que se encuentran las células conidiógenas, que son las que originarán las esporas asexuales o conidios.

Estructura de los Hongos

El cuerpo o estructura vegetativa de un hongo se denomina talo. Su complejidad es variable y va desde las levaduras unicelulares y los mohos multicelulares, hasta las setas (Lazo, 2003) (Figura 1).

La diferencia entre levadura y moho consiste en que la levadura es un hongo con un único núcleo que se reproduce de forma asexual por gemación y división transversal o bien por reproducción sexual, a través de la formación de esporas (Carillo, 2003). En cambio, un moho u hongo filamentoso se desarrolla produciendo filamentos a modo de hilos con ramificaciones de células llamadas hifas, que en conjunto forman un micelio. En algunos géneros, el protoplasma fluye a lo largo de las hifas, sin tabiques transversales; estas hifas se conocen como cenocíticas. Hifas de otros hongos contienen tabiques llamados septos, con un poro único o múltiples poros que permiten el flujo del citoplasma (Figura 1) (Prescott et al., 1999)

El conidióforo característico de *Aspergillus* posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. La vesícula, las métulas (si están presentes), las fiálides y los conidios constituyen la cabeza conidial. Cuando las cabezas conidiales solo presentan fiálides se denominan uniseriadas (Figura 2).

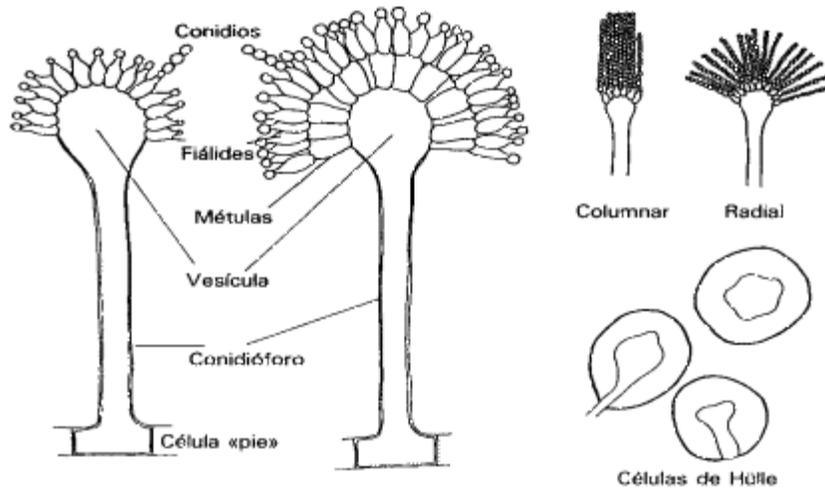


Figura 1. Estructura de hongos del género *Aspergillus*.

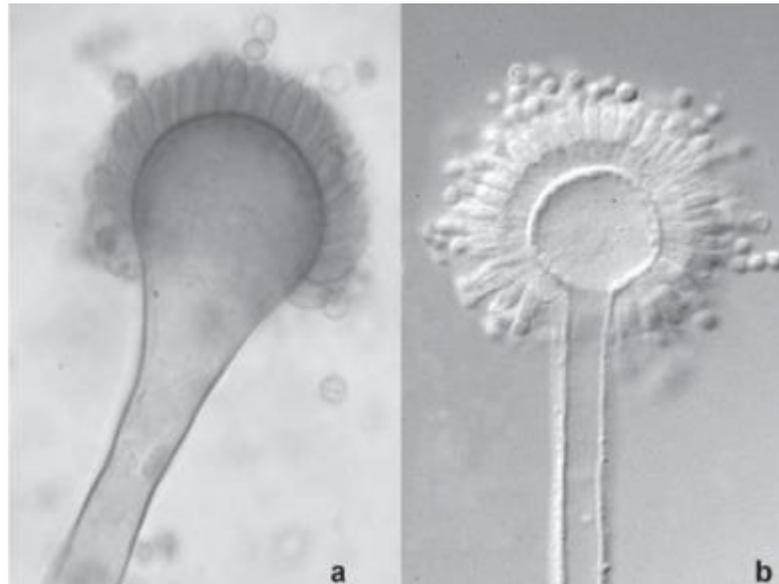


Figura 2. Cabezas conidiales del género *Aspergillus*: a) uniseriada, b) biseriada.

Fuente: Soriano, 2015.

Reproducción de los Hongos

Los hongos pueden reproducirse por procesos asexuales y sexuales.

Reproducción Asexual

Implica la división de los núcleos y formación de nuevos hongos sin participación de gametos y sin fusión nuclear. Se conocen 3 mecanismos de reproducción asexual:

- Esporulación seguida de germinación de las esporas.
- Gemación.
- Fragmentación de hifas.

Esporas Asexuales

No presentan latencia, es decir, pueden germinar cuando dispongan de la humedad aún en ausencia de nutrientes. Existen varios tipos de esporas asexuales (Figura 3):

- Clamidosporas: esporas esféricas u ovoides de pared gruesa que se forman dentro de las hifas somáticas. Son más resistentes al calor y a la desecación que las otras esporas asexuales.
- Conidiosporas: Son esporas delgadas que se encuentran en grupos o solas sobre hifas especializadas llamadas conidióforos. Algunos autores llaman conidiosporas a todas las esporas asexuales.
- Esporangiosporas: Son esporas que se forman dentro de una estructura en forma de saco denominada esporangio. La hifa que porta el esporangio se denomina esporangióforo.
- Blastosporas: Son esporas que se forman por gemación.

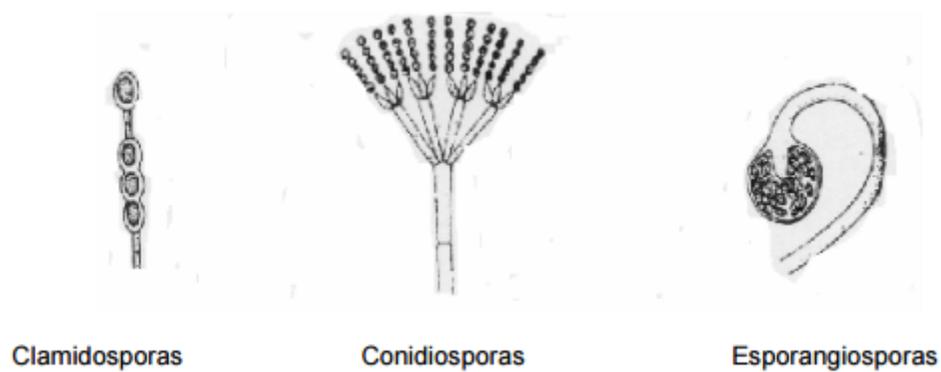


Figura 3. Tipos de esporas asexuales.

Fuente: Pedrique y De Castro, 2008.

Gemación

Es el proceso de reproducción asexual que prevalece en las levaduras, aunque algunas especies se dividen por fisión o por fragmentación de hifas, ya que los fragmentos de las hifas de algunos hongos son capaces también de dar nuevas colonias.

Reproducción Sexual

Los hongos que tienen reproducción sexual lo hacen a través de los siguientes procesos:

1. Un núcleo haploide de una célula donante (macho) penetra el citoplasma de una célula receptora (hembra).
2. Se fusionan los núcleos para formar un núcleo cigótico diploide.
3. Por meiosis el núcleo diploide origina cuatro núcleos haploides, algunos de los cuales pueden ser recombinantes genéticos.

Del proceso de reproducción sexual resultan las esporas sexuales, las cuales son usualmente más resistentes al calor que las esporas asexuales, aunque sin llegar a tener la extremada resistencia al calor que presentan las endosporas bacterianas; además presentan latencia, es

decir, germinan sólo cuando son activadas ya sea por un calentamiento mínimo o en presencia de sustancias químicas (Davis et al., 1990)

Métodos de Control de Hongos

Control Químico

Las plagas se encuentran entre las principales causas de pérdidas en la agricultura; por lo tanto, los insecticidas son una herramienta importante de control. Sin embargo, los efectos colaterales tales como la contaminación ambiental, el envenenamiento humano, la reducción en el número de enemigos naturales y la resistencia a los insecticidas y/o fungicidas, entre otros, hace necesaria la búsqueda de otros métodos de control. Las formulaciones que contienen pesticidas se preparan de suspensiones coloidales o polvos en nanoescala, que presentan ventajas tales como aumento de la estabilidad del compuesto orgánico activo (UV, térmica, hidrólisis, etc.), decantación foliar, reducción en la lixiviación foliar, acción sistémica, sinergismo y especificidad. En consecuencia, es necesario reducir la cantidad de pesticidas, el número de aplicaciones y el impacto ambiental, además de la exposición humana a los plaguicidas. Las nanoformulaciones se han empleado no sólo para los pesticidas sintéticos, sino también en productos alternativos naturales (extractos de hierbas) y microorganismos entomopatógenos para el control de plagas de insectos (Perlatti et al., 2013).

Ácidos Orgánicos

Desde la antigüedad se ha recurrido al uso de ácidos orgánicos como preservantes en la alimentación animal y humana (Rodríguez, 2000). Los acidificantes pueden tener una influencia positiva en la producción alimentaria, ya que pueden limitar la proliferación de bacterias, hongos y otros organismos patógenos o nocivos. Sin embargo, es inevitable prever las complejas interacciones que pueden darse entre ácidos orgánicos y los componentes del alimento, así como la influencia de éstos en la microflora saprófita (Harris, 2004)

Control Biológico

A pesar de que más de 1000 toneladas métricas de quitina son producidas anualmente en los ambientes acuáticos, no existe una sustancial acumulación de quitina en los sedimentos marinos (Keyhani y Roseman, 1999). Esto se debe a los procesos de bioconversión que naturalmente son dirigidos por los microorganismos marinos (Hirono et al., 1998) los cuales pueden convertir la quitina en compuestos orgánicos que después pueden ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno (Robbins et al., 1988).

El control biológico o el uso de microorganismos o sus secreciones para prevenir el crecimiento de patógenos y plagas en plantas ofrece una alternativa atractiva o suplemento para el control de enfermedades en plantas. Por tanto, las prácticas de control biológico han llegado a ser un importante acercamiento para impulsar la agricultura sustentable (Wang et al., 2002).

La aplicación de quitina en suelos incrementa la población de organismos quitinolíticos como actinomicetos, hongos y bacterias. Este incremento ha mostrado estar correlacionado con la reducción de hongos fitopatógenos y nemátodos, lo que trae como consecuencia una reducción en la infectividad y el daño al cultivo (Wang et al., 2002).

Con respecto al biocontrol de hongos filamentosos, algunos autores han reportado que diferentes microorganismos no rizosféricos pueden ser considerados como buenos candidatos para el control biológico en maíz almacenado, el cual se afecta principalmente por especies toxigénicas de *Aspergillus* y *Fusarium*. Sin embargo, aún se requiere mejorar la eficacia de los agentes de control biológico para su uso exitoso. Algunos estudios involucran el cambio en el estado de nutrientes y la escasez de agua, los cuales pueden afectar a la acumulación intracelular de solutos compatibles; asimismo se está estudiando el efecto de combinaciones de estas bacterias para mejorar múltiples mecanismos de acción para su aplicación en granos almacenados (Necsi et al., 2005).

Quitosano

La quitina parcial o totalmente desacetilada se conoce como quitosano, un polímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina y en menor cantidad, de N-acetil glucosamina. Este compuesto natural, biodegradable y no tóxico tiene un amplio potencial industrial en la

cosmetología, alimentos, biotecnología, agricultura, entre otros. La actividad antifúngica del quitosano se ha comprobado en diferentes especies de hongos, encontrando que afecta fundamentalmente el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas. Recientemente, se ha comenzado a evaluar el efecto de la inducción de resistencia vegetal producido por este biopolímero natural como respuesta a la infección por microorganismos durante el almacenamiento de las frutas y hortalizas, obteniéndose resultados alentadores relacionados con la reducción de la maceración celular y la producción de hidrolasas antifúngicas que actúan directamente sobre la pared celular del patógeno (Hernández Bautista-Baños, 2005). Adicionalmente, se ha observado que el quitosano induce la formación de barreras estructurales de defensa que limitan el avance del patógeno.

Fuentes de Obtención

La quitina es el segundo polímero natural más abundante en la biósfera después de la celulosa (Sandford, 1989). Se encuentra presente en la cutícula de los crustáceos, exoesqueleto de artrópodos y en las paredes celulares de algunos hongos. Está muy asociada con sales inorgánicas, proteínas, pigmentos y lípidos, por lo que el proceso convencional de extracción por métodos químicos incluye una desproteínización con álcalis, seguido de una desmineralización con ácidos diluidos; por último se eliminan los lípidos presentes mediante el empleo de solventes orgánicos, aunque este último paso se considera opcional (Matsumoto et al., 1996).

La quitina se puede desacetilar mediante un tratamiento con álcalis concentrados a alta temperatura y el producto desacetilado se conoce como quitosano, un biopolímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) con uniones β (1-4). El quitosano se comporta como un polielectrolito lineal a pH ácido, posee una alta densidad de cargas positivas cuando se encuentra en medio ácido, tiene la capacidad de quelar iones metálicos (Fe, Cu, Zn y otros metales pesados) y de adherirse fácilmente e interactuar con superficies cargadas negativamente (Argüelles et al., 1990). La alta densidad de cargas positivas le confieren propiedades biológicas y fisiológicas únicas (Sandford, 1989).

Estructura Química

Tanto la quitina como el quitosano son copolímeros lineales de residuos de N-glucosamina (D-GlcN) y N-Acetil glucosamina (D-GlcNAc) distribuidos al azar y unidos mediante un enlace β -1,4, que producen una estructura rígida no ramificada. Hasta ahora no existe una nomenclatura oficial para diferenciar a la quitina del quitosano; algunos autores establecen la diferencia en función del porcentaje de grupos acetilados en la molécula (grado de acetilación DA), de esta forma el quitosano se define como un copolímero de unidades de repetición D-GlcN y D-GlcNAc, soluble en soluciones acuosas ligeramente ácidas, mientras que la quitina sólo es soluble en soluciones de dimetilacetamida (DMAc) o N-metil pirolidona (NMP) conteniendo del 5 al 7% de cloruro de litio (Domard, 1989).

Actividad Antimicrobiana

La actividad fungicida del quitosano se ha estudiado tanto "*in vitro*" (Okole y Schulz, 1997) como "*in vivo*" (Ghaouth et al., 1992). Se ha reportado que el biopolímero inhibe el desarrollo de numerosas especies de hongos, siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares. Estos últimos en general son menos sensibles a la aplicación de dosis razonables del biopolímero por dos razones: (a) la presencia natural de quitosano en las paredes celulares no genera efectos adversos para el microorganismo y (b) las interacciones electrostáticas del quitosano añadido (exógeno), cargado positivamente, deberían verse menos favorecidas con paredes celulares que poseen quitosano endógeno que cuando éstas poseen material con cargas negativas (Ayala et al, 2014).

Diversos estudios han dejado claros los principales requerimientos que deben satisfacerse para lograr una mayor efectividad fungicida del biopolímero. Uno de los más importantes se relaciona con la existencia de una alta correlación entre la concentración de quitosano y la inhibición fúngica de acuerdo a la especie de microorganismo; por ello, para una buena efectividad se deberá encontrar la dosis adecuada en cada situación. Existen evidencias que demuestran que la sensibilidad de los hongos patógenos hacia el quitosano puede cambiar en los diferentes estadios de su desarrollo (Plascencia-Jatomea et al., 2003). También se ha encontrado una relación directa entre la actividad fungicida y el peso molecular del quitosano (Sánchez et al., 2007).

Biocompositos de Quitosano

Conocido por sus propiedades biológicas y versatilidad, el quitosano claramente tiene un mayor potencial de desarrollo a futuro en diferentes campos de la ciencia y recientemente en la alimentación y la agricultura.

Los nanomateriales a base de quitosano tienen propiedades físicas y químicas superiores tales como alta área superficial, porosidad, resistencia a la tracción, conductividad y fotoluminiscencia, así como el aumento de las propiedades mecánicas en comparación con quitosano puro (Shukla et al., 2013; Hernández-Téllez et al., 2016).

En la actualidad, un gran número de estudios se han centrado en el desarrollo de encapsulados antimicrobianos o plaguicidas, específicamente el establecimiento de la dosis requerida para controlar el crecimiento microbiano; sin embargo, este método de control no resuelve completamente los problemas asociados con el uso indiscriminado de productos químicos sintéticos. Por esta razón, es necesario continuar con la búsqueda de alternativas viables naturales como el quitosano, capaz de formar matrices de liberación controlada para uso agrícola, que además pueden contener principios activos con actividad antimicrobiana (Cota-Arriola et al., 2013).

Debido a que la industria farmacéutica es la principal área de aplicación de matrices a base de quitosano para la liberación controlada de fármacos, la mayoría de los procesos para obtener nanopartículas se han adaptado a esta zona (Il'ina et al., 2008). Actualmente, los materiales basados en quitosano han sido diseñados para biomedicina, en donde se ha demostrado una alta actividad antibacteriana que se puede utilizar para controlar infecciones potenciales. Estos materiales se basan principalmente en el uso de nanopartículas de quitosano con la incorporación de iones metálicos para aumentar su potencial antibacteriano (Sanpo et al., 2009). El estudio de matrices de liberación controlada a base de quitosano se ha centrado en las ciencias farmacéuticas y biomédicas; por lo tanto, es importante aplicar esta tecnología a otras áreas de investigación como la alimentación y la agricultura, que no han sido explorados.

Con relación al desarrollo de materiales nanoestructurados elaborados a base de quitosano con compuestos bioactivos, se ha reportado que las nanopartículas de quitosano cargadas con iones metálicos (como plata, cobre, zinc, manganeso y hierro) exhiben una fuerte actividad inhibitoria sobre diferentes especies de bacterias como *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Asimismo, la adición de compuestos como nisina y eritromisina incrementan el potencial

antibacteriano de las nanopartículas del biopolímero. No obstante, son pocos los estudios en hongos filamentosos (Sotelo-Boyas et al., 2015).

Las nanopartículas representan un grupo emergente de materiales híbridos que están formados por una combinación de polímeros naturales y sólidos inorgánicos y muestran una mejora en cuanto a su estructura y propiedades funcionales, las cuales son de gran interés para diferentes aplicaciones. Las propiedades inherentes de biopolímeros como el quitosano ofrece una ventaja de interés en el desarrollo de bionanocompositos con aplicaciones especiales en agricultura o bien en el desarrollo de materiales ecológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivación de Cepas

Se utilizaron cepas de *Aspergillus niger* (NRRL-3) y *A. parasiticus* (ATCC 16992), seleccionadas con base a su elevada ocurrencia en alimentos, campo agrícola, almacenes y superficies. Para su propagación, las cepas fueron inoculadas en matraces con agar papa dextrosa, PDA (Bioxon, USA), incubando a 28°C durante 5 días.

Una vez desarrolladas, las esporas fueron resuspendidas en solución Tween-80 al 0.1% (v/v) mediante agitación magnética durante 5 minutos (Plascencia, 2004). Posteriormente, de cada cepa se preparó un cultivo monospórico en el mismo medio, a fin de asegurar la pureza de los cultivos.

Cultivo Monospórico

El cultivo monospórico se caracteriza por provenir de una sola célula o spora, lo cual permite obtener cultivos puros. Para ello, primeramente, se preparó un inóculo a partir de las placas con el hongo *Aspergillus parasiticus* desarrollado en el punto anterior (reactivación). Se tomó la placa con la colonia más aislada desarrollada en el medio de cultivo, a la cual se adicionó un volumen de solución Tween 80, un surfactante hidrofílico que favorece la dispersión de las esporas o propágulos fúngicos. Las esporas fueron resuspendidas mediante agitación y el inóculo preparado fue utilizado para preparar diluciones seriadas con diferente concentración de esporas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}); cada dilución fue depositada sobre una placa con medio PDA e incubada a 28°C. Enseguida, con ayuda de una espátula estéril se tomaron las colonias desarrolladas en los medios con las últimas diluciones (10^{-4} y 10^{-5}), en las cuales se observó una mayor dispersión de colonias, sin contaminación evidente. Las colonias cortadas fueron depositadas en placas con medio PDA estéril e incubadas nuevamente a 28°C, a fin de obtener un cultivo monospórico.

Preparación de la Suspensión de Esporas

Se prepararon 30 mL de agar PDA, se esterilizó el medio y se dejó reposar hasta solidificar. Se inoculó con el cultivo monospórico de *Aspergillus parasiticus* y posteriormente se incubó de 4 a 5 días a 28°C. Se resuspendieron las esporas agregando al matraz una solución de Tween 80 al 0.05% (v/v) previamente estéril y se agitó durante 5 minutos. Ya resuspendidas las esporas se determinó la concentración por la técnica de conteo de células en la cámara de Neubauer.

Preparación de la Solución de Quitosano

Se utilizó quitosano comercial de medio peso molecular (Sigma, USA); a partir de este se preparó una solución madre homogénea de volumen final de 100 mL, con la siguiente formulación: 0.5% (p/v) de quitosano, 1% (v/v) ácido acético, aforando a 100 mL con agua miliQ. La mezcla se dejó en reposo durante 24-36 horas para dar una mayor homogeneidad. A partir de la solución madre se procedió a la elaboración del biocomposito con el compuesto bioactivo en solución.

Preparación de la Solución de PCA

La solución de PCA se elaboró disolviendo 62.6 mg de PCA en 15 mL de solución de quitosano, homogenizando perfectamente hasta la disolución completa del PCA, a temperatura ambiente. Este compuesto es lábil a la luz, por lo que se almacenó en un recipiente ámbar.

Preparación de las Nanopartículas

Se utilizó una proporción quitosano: ácido pirrol-2-carboxílico de 4:1 y se ajustaron las concentraciones de ambos compuestos. Para elaborar las partículas se utilizó una bomba

peristáltica a fin de mantener constante la velocidad y el flujo para la precipitación de las nanopartículas. Una vez que se obtuvieron se retiró el exceso de solvente mediante un rotaevaporador (Luque-Alcaraz et al., 2016). Se realizaron tres tratamientos: partículas de quitosano, partículas de quitosano/PCA y solución de PCA (sólo), para comparar los resultados de la efectividad contra cada cepa empleada del género *Aspergillus*.

Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

El análisis de dispersión dinámica de luz permite obtener los datos del tamaño de partícula, el potencial zeta y el grado de polidispersidad de las partículas obtenidas de quitosano y de quitosano-PCA. Para su análisis, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Biopolímeros del CIAD, A.C. Hermosillo, en donde se utilizó un equipo Mobius (Wyatt Technologies, USA), a temperatura controlada. El sistema utiliza un láser simple Mobius, modo longitudinal de 45 mW operado a 532 nm y un ángulo Θ de 163.5°. Para el análisis de los datos experimentales se utilizó el programa Dynamics versión 7.3.1.15 (Wyatt Technology Corporation, USA).

Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR)

El análisis de FT-IR permite determinar el grado de acoplamiento mediante interacciones entre el quitosano y el PCA. El análisis de las muestras se realizó en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la UNISON, utilizando un equipo de espectrofotometría de infrarrojo FT-IR (Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX), en un rango espectral de 4000 a 400 cm^{-1} .

Ensayos Microbiológicos

Viabilidad de las Esporas por Ensayo con XTT.

Esta técnica permitió evaluar el efecto de los biocompositos elaborados sobre la viabilidad de las esporas de los hongos *Aspergillus parasiticus* y *A. niger*. Se utilizaron diferentes concentraciones las cuales permitieron estimar la concentración que inhibe el 50% de la viabilidad de las esporas de cada hongo. Estas concentraciones fueron utilizadas en los ensayos siguientes. La determinación se llevó a cabo mediante la técnica de XTT, siguiendo la metodología descrita por Luque-Alcaraz et al. (2016).

Germinación de Esporas.

La evaluación de la germinación de esporas consistió en visualizar un número determinado de esporas (germinadas y sin germinar) que se desarrollaron durante el lapso de incubación, lo cual varía en función de los componentes del medio. El ensayo se realizó en microplacas de 12 pozos, utilizando las concentraciones estimadas en el ensayo de viabilidad. De cada tratamiento se capturaron imágenes a diferentes tiempos (0, 3, 6, 12, 15 y 18 horas), en un microscopio Olympus CX311 equipado con cámara Infinity 1 (Media Cybernetics, USA). De cada pozo se contó como mínimo un total de 200 esporas (germinadas y no germinadas) y se calculó el porcentaje de esporas germinadas (Martínez-Camacho et al., 2010; Luque-Alcaraz et al., 2016).

Análisis Morfométrico.

Las imágenes capturadas en el apartado anterior (germinación de esporas) fueron procesadas utilizando el programa para análisis de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, USA). Se midió el diámetro de las esporas e hifas y la longitud de las hifas terminales desarrolladas en los diferentes tratamientos. Se tomaron al menos 40-60 mediciones por tratamiento (Plascencia-Jatomea et al., 2003).

Viabilidad Celular por Tinción con Azul de Tripán.

Esta determinación se realizó mediante la técnica de tinción con solución azul de tripán. Este colorante, también conocido como azul diamina, azul niágara o azul vital, es un derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas (Ehrlich, 1904). Este colorante es uno de los varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de capacitación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. El azul tripán no es necesario para realizar conteos simples de células pero si es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras.

En general el procedimiento utilizado consistió en realizar una suspensión de esporas y mezclarla con una solución al 0.4% de azul tripan, antes de ser observada bajo el microscopio haciendo uso de la cámara de Neubauer. A pesar de que el protocolo original muestra el uso de una mezcla isovolumétrica de azul de tripán y suspensión celular, también se puede hacer uso de otros tipos de diluciones (especialmente para suspensiones celulares concentradas), siempre y cuando se considere el factor de dilución correspondiente en los cálculos finales.

Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores

Se utilizó un microscopio invertido (Leica DMi8, USA) equipado con filtros de fluorescencia (filtro DAPI excitación 350/50 y emisión 460/50, filtro FITC excitación 480/40 y emisión 527/30, filtro RHOD excitación 546/10 y emisión 585/40), cámara enfriada DFC 450C (Leica) y software overlay de fluorescencia (LAS AF versión 3.1.0, Leica Microsystem, USA). Se tomaron imágenes de las cepas desarrolladas bajo las mismas condiciones utilizadas en las cinéticas microbianas de germinación de esporas. Las células se tiñeron con los marcadores de yoduro de propidio, azul de tripán y blanco de Calcoflúor.

Ioduro de propidio (PI):

Este colorante es capaz de penetrar en células dañadas e intercalarse con el material celular, emitiendo una coloración roja. El protocolo consistió en agregar en un portaobjetos 100 μ l del inóculo del hongo, 100 μ l de agua estéril y 2 μ l de la solución de PI.

Para este ensayo, en una microplaca, en cada pozo, previamente adicionado con medio líquido Czapek, se colocaron por triplicado 700 μ L del medio de cultivo líquido (Czapek), 300 μ L de las nanoparticulas y el inóculo a una concentración de 1×10^6 esporas/mL, incubando a 28°C durante 24 h. Posteriormente, a cada pozo se añadió una solución de PI 3 μ M y nuevamente se incubaron a la misma temperatura durante 3 h. Después de la incubación, se analizaron las células en el microscopio de fluorescencia (Leica DMI8, USA) (Riccardi & Nicoletti, 2006).

Blanco de Calcoflúor:

Es un colorante fluorocrómico no específico, que se une a la quitina y glucanos de la pared de los hongos, emitiendo una fluorescencia que puede ser observada en el microscopio de fluorescencia. Ha sido recomendado para el estudio de las muestras poco parasitadas. De los diversos fluorocromos usados, el Blankophor tiene la ventaja de disolverse con facilidad en el KOH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tamaño y Potencial Z de las Partículas

Mediante la técnica de nanoprecipitación se lograron obtener partículas de quitosano (NP-CS) y de biocompositos de quitosano/PCA (NP-CSPCA), con un potencial zeta de +49.1 y +63.8, respectivamente (Tabla 1).

Se encontró que los biocompositos del complejo quitosano/PCA presentaron un tamaño mayor con respecto a las partículas de quitosano, lo cual se puede deber a la complejidad de la red tridimensional que se forma cuando el ambos compuestos se mezclan en presencia del ácido orgánico. El incremento en el tamaño de las partículas coincidió con el potencial zeta de las mismas, encontrando un mayor potencial en las partículas del biocomposito.

Tabla 1. Tamaño y potencial zeta de las partículas de quitosano y del biocomposito quitosano/PCA.

Tratamiento	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Z (mV)
NP-CS	415.3	+ 49.1 ± 13.1
NP-CSPCA	2001.5	+ 63.8 ± 5.4

En un estudio reciente, Luque-Alcaraz et al. (2016) encontraron un menor potencial zeta en partículas de quitosano cargadas con aceite de esencial de pirul (*Schinus molle*), lo cual se puede atribuir a la composición de la partícula, específicamente a las interacciones intra e intermoleculares entre los componentes.

Análisis de FT-IR

En los espectros obtenidos (Figura 4) se aprecian las bandas características de un espectro de quitosano, mostrando la banda de flexión del grupo amino (NH_2) a 1600 cm^{-1} . Por su parte, en la Figura 4 (B) se observó una banda a 1750 cm^{-1} , la cual se relaciona con el grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ presente en las moléculas de ácidos carboxílicos. En la Figura 4 (A) se muestra el espectro de los bionanocompositos de quitosano/PCA, en donde puede apreciarse la desaparición de la señal del carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) al llevarse a cabo la reacción con los grupos amino del quitosano.

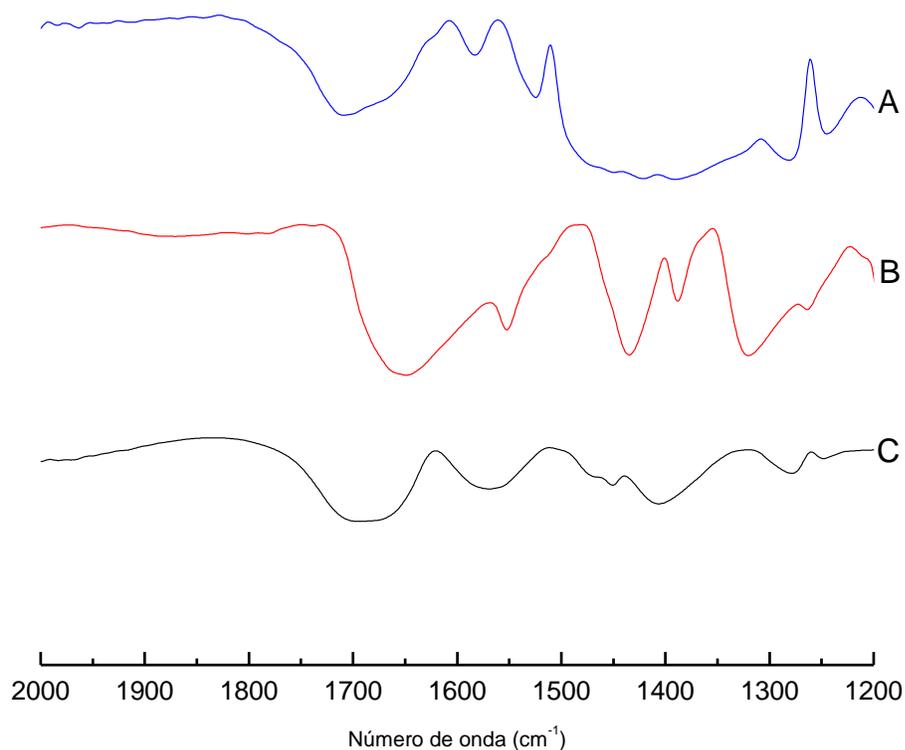


Figura 4. Espectros obtenidos por Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier para: A) nanopartículas de quitosano/PCA, B) PCA y C) nanopartículas de quitosano.

Es factible suponer que al ocurrir la reacción, la disminución de la frecuencia de vibración de las bandas características del quitosano se asocia a la formación de un grupo imino detectado entre 1640-1690 cm^{-1} .

Viabilidad Mediante Prueba con XTT

Para evaluar el efecto de los biocompositos de quitosano/PCA se utilizaron medios de cultivo adicionados con diferentes concentraciones; asimismo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de las partículas de CS y del PCA (en solución). Los resultados experimentales fueron utilizados para estimar las concentraciones que inhiben o afectan la viabilidad del 50% de las esporas de cada especie de hongo, las cuales fueron utilizadas en los ensayos biológicos posteriores.

Al analizar los resultados se observó que en general *Aspergillus niger* presentó una mayor sensibilidad a ambos tipos de partículas, mostrando una menor viabilidad a concentraciones de 200-1200 $\mu\text{g/ml}$. Por su parte, para *A. parasiticus* se observó que la viabilidad se redujo moderadamente al incrementarse la concentración de las partículas, encontrando una menor viabilidad a la mayor concentración utilizada (Figura 5). Los resultados obtenidos mostraron que en general los dos tipos de partículas son efectivas para inhibir el 50% de la viabilidad de los hongos con respecto al PCA, el cual requiere ser utilizado en una mayor cantidad (Figura 6, Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de las partículas de quitosano, del biocomposito de quitosano/PCA y del PCA sobre la viabilidad de las esporas de *Aspergillus niger* y *A. parasiticus*, determinada mediante la técnica de XTT.

Tratamiento	<i>Aspergillus parasiticus</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Aspergillus niger</i> ($\mu\text{g/ml}$)
CS	3,854.4 \pm 311.9	834.4 \pm 164.2
CSPCA	1,249.3 \pm 116.3	1,246.5 \pm 313.7
PCA	6,914.3 \pm 201.3	15,269.2 \pm 841.2

Valores promedio \pm desviación estándar de cuatro réplicas.

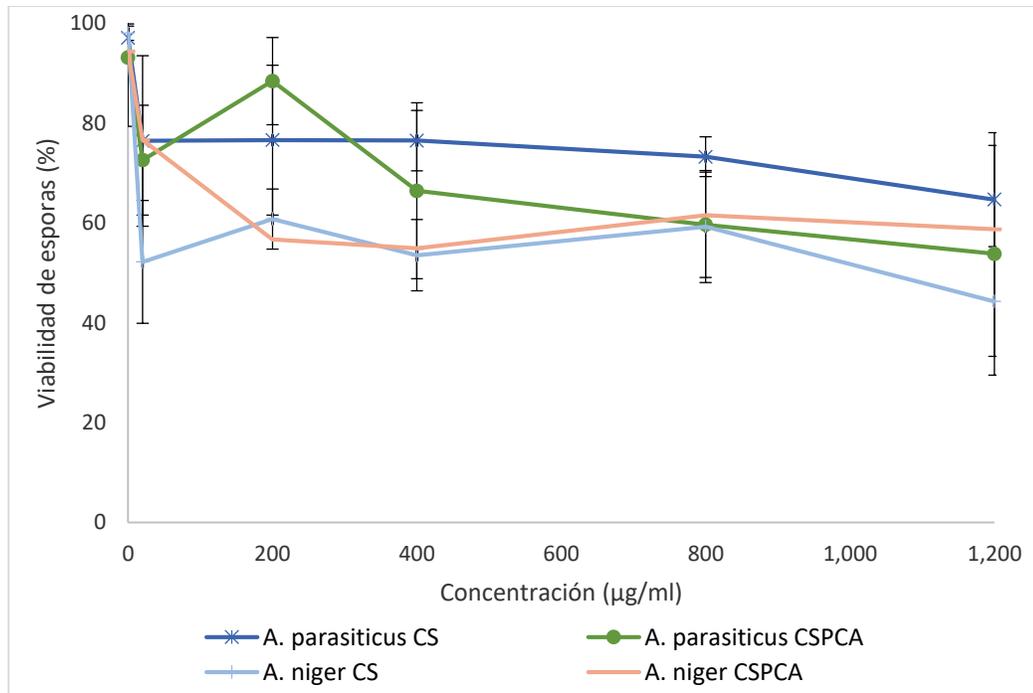


Figura 5. Viabilidad de esporas de *Aspergillus parasiticus* y *A. niger* desarrollados en presencia de partículas de quitosano (CS) y del biocomposito quitosano/PCL (CSPCA), determinada mediante técnica de XTT.

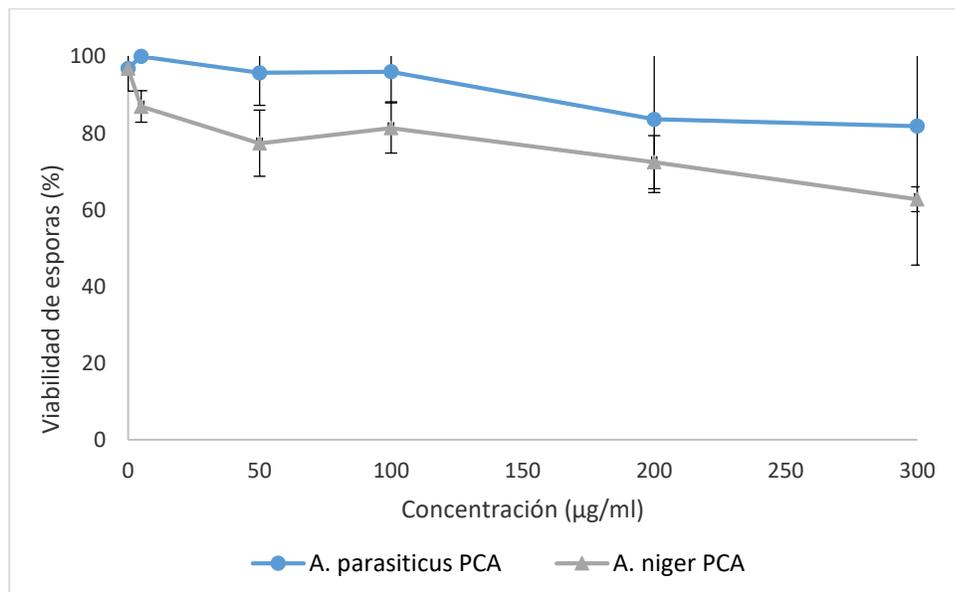


Figura 6. Viabilidad de esporas de *Aspergillus parasiticus* y *A. niger* desarrollados en presencia de PCL (en solución), determinada mediante técnica de XTT.

Se encontró que *Aspergillus parasiticus* resultó ser más sensible a las partículas del biocomposito quitosano/PCA, mientras que *A. niger* fue mas sensible a las partículas de quitosano. Se observó que para inhibir el 50% de la viabilidad de ambas especies de hongos se requiere una similar concentración de partículas del biocomposito de quitosano/PCA, lo cual se puede relacionar con las similitudes de la composición de las paredes celulares de ambos *Aspergillus*.

Germinación de Esporas

Con base a los resultados obtenidos en los análisis de viabilidad, se procedió a evaluar el efecto de las partículas de CS y CSPCA sobre la germinación de esporas de ambas especies de hongos, utilizando las concentraciones inhibitorias estimadas en el apartado anterior (Tabla 2). La determinación se llevó a cabo utilizando microplacas de 12 pozos y medio de cultivo líquido Czapek, contando un total de 200 esporas (germinadas y no germinadas) por pozo, cada 4 horas hasta llegar a las 20 horas.

Tanto las partículas de quitosano como del biocomposito de quitosano/PCA afectaron fuertemente la germinación de esporas de las dos especies de hongos, encontrando 0% de esporas germinadas a las 20 horas (Figuras 7, 8, 9 y 10).

A las 12 horas, *Aspergillus niger* presentó mas del 70% de esporas germinadas en el medio control (Figura 7), lo cual indica que la cepa tiene una actividad metabólica. Esta característica le permite proliferar rápidamente e invadir cualquier sustrato y/o nutriente. Aunque no se observaron esporas germinadas en los tratamientos adicionados con las partículas de CS y CSPCA, se encontró un mayor número de esporas polarizadas las cuales mostraron alteraciones sobre la superficie, caracterizadas por zonas rugosas, oscurecimiento en el interior de la célula y una pared celular ligeramente adelgazada (Figura 8). Esto se puede atribuir a la interacción entre los grupos aminos residuales del quitosano presentes en la superficie de las partículas, con los compuestos de carga opuesta presentes en la membrana del hongo.

Por otro lado, *A. parasiticus* presentó alrededor de 30% de esporas germinadas a las 20 horas, mostrando una germinación con tendencia ascendente, aunque a una velocidad menor (Figura 9).

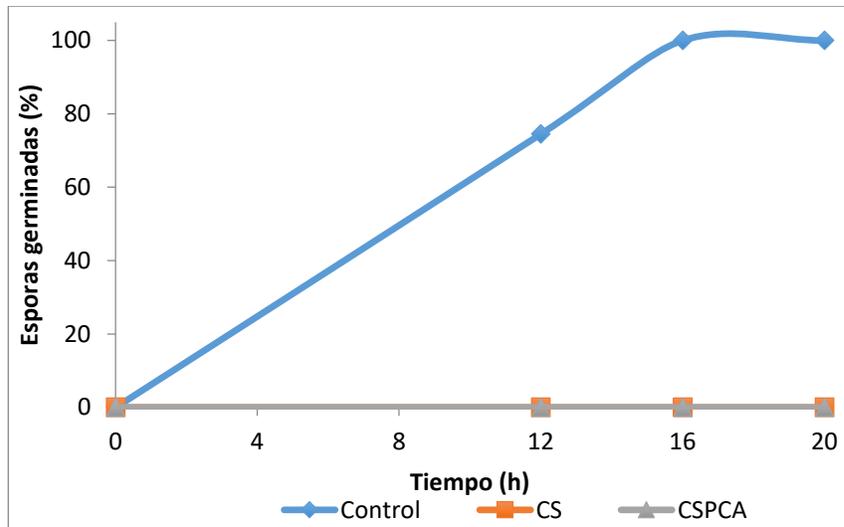


Figura 7. Porcentaje de esporas de *Aspergillus niger* germinadas en presencia de partículas de quitosano (CS) y del biocomposito quitosano/PCL (CSPCA).

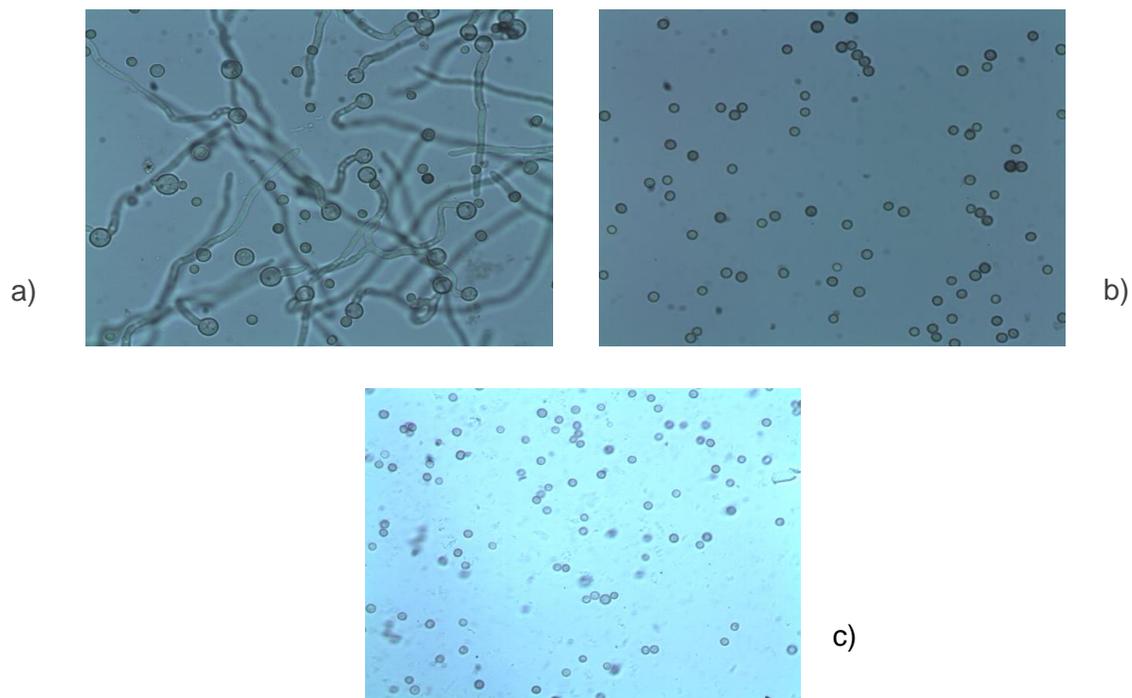


Figura 8. Esporas germinadas y no germinadas de *Aspergillus niger* desarrolladas en medio de cultivo adicionado con: a) control; b) partículas de quitosano; c) partículas del compuesto de quitosano/PCL. Observaciones realizadas a 40X.

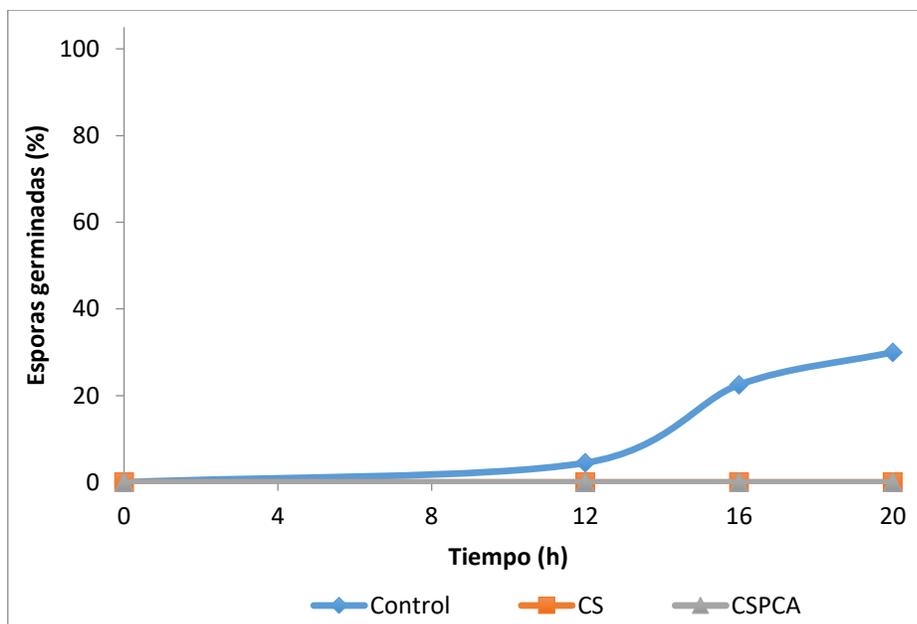


Figura 9. Porcentaje de esporas de *Aspergillus parasiticus* germinadas en presencia de partículas de quitosano (CS) y del biocomposito quitosano/PKA (CSPCA).

Al igual que la especie anterior, *Aspergillus parasiticus* presentó un comportamiento similar cuando se desarrolló in vitro en presencia de las partículas del biocomposito de quitosano/PKA. No obstante, se encontró que las esporas mostraron un tamaño más reducido y la mayoría estaba aún sin polarizar comparado con el control (Figura 10), lo cual indica que el tratamiento aplicado ejerce un mayor grado de estrés, impidiendo la germinación del hongo a las 20 horas (Figura 9).

Análisis Morfométrico

Para evaluar el efecto de las partículas sobre la morfometría se midió el diámetro promedio de las esporas y de las hifas desarrolladas a las 12 horas de incubación. Este tiempo fue seleccionado con base a los resultados de germinación de los hongos en el medio control, ya que a ese tiempo se contabilizaron esporas germinadas con desarrollo de hifas. De cada

tratamiento se tomaron mínimo 60 mediciones, de las cuales se reportó el promedio \pm error estándar.

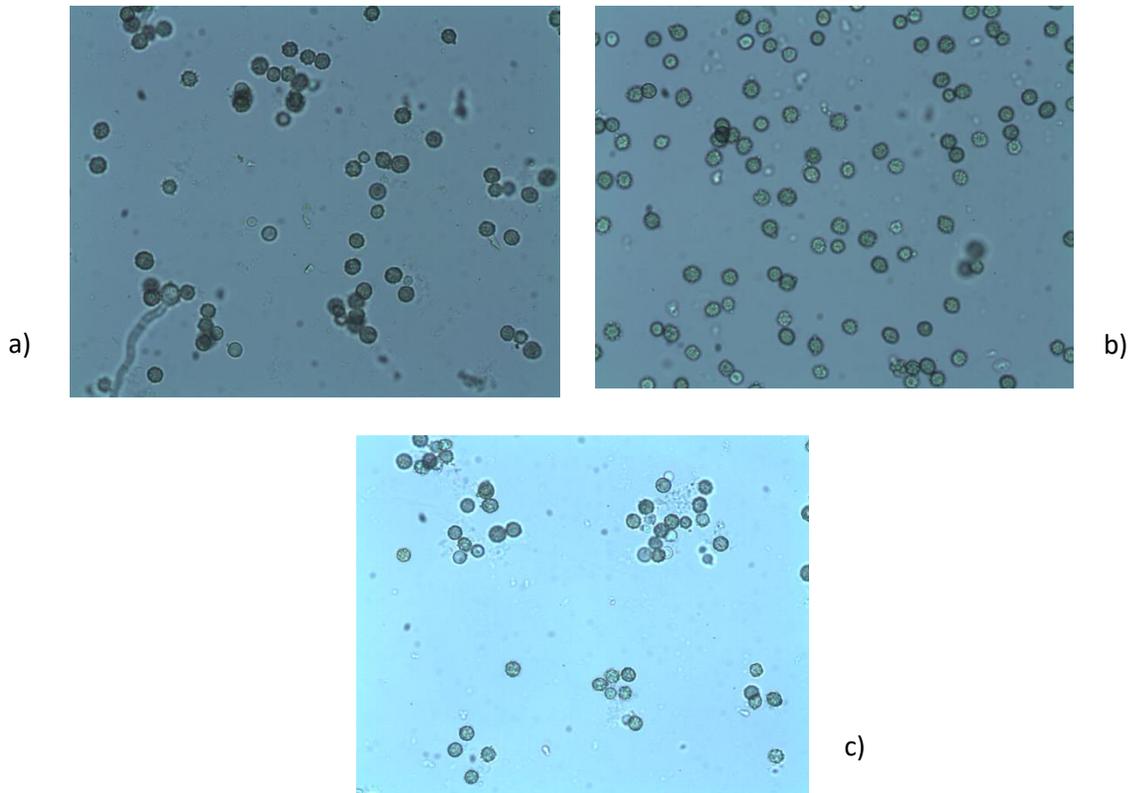


Figura 10. Esporas germinadas y no germinadas de *Aspergillus parasiticus* desarrolladas en medio de cultivo adicionado con: a) control; b) partículas de quitosano; c) partículas del compuesto de quitosano/PCL. Observaciones realizadas a 40x.

Tanto las partículas de quitosano como las partículas del biocompuesto afectaron la morfometría de las esporas, observando una reducción en el diámetro de las esporas con respecto al control (Tabla 3). Se encontró que las esporas inoculadas en el medio adicionado con el biocompuesto de CSPCA presentaron un menor diámetro promedio con respecto a los demás tratamientos, concluyendo que este tratamiento es más efectivo comparado con las partículas de quitosano y con el ácido orgánico (control).

Tabla 3. Morfometría de esporas de *Aspergillus niger* y *A. parasiticus* desarrollados en presencia de las partículas de quitosano y de quitosano/PCA.

Tratamiento	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Control	14.970 ± 0.209b	16.659 ± 0.455b
CS	13.865 ± 0.235a	13.494 ± 0.304 ^a
CSPCA	14.111 ± 0.256a	12.757 ± 0.350 ^a

Valor promedio de al menos 60 mediciones ± error estándar.

Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores

Mediante análisis de fluorescencia se observó el efecto de las partículas sobre los organelos subcelulares de los hongos, específicamente sobre la integridad de la membrana celular, los glucanos de la pared y sobre la actina. El ioduro de propidio permitió la tinción del núcleo celular de las esporas cuando la membrana de estas se encontraba parcialmente o totalmente dañada, o incluso muertas. Esta técnica se comparó con la tinción utilizando azul de tripán, debido a que esta permite diferenciar entre las células vivas y células no viables o muertas, las cuales se tiñen en su interior con el colorante.

Por último, la tinción con Blanco de Calcoflúor permitió evidenciar los glucanos presentes en las paredes de los hongos, lo cual se puede relacionar con afectaciones en la síntesis de glucanasas, producción de glucanos e incluso en la integridad de la membrana.

Aspergillus niger

Al inocular esta especie de hongo en el medio control se observó que las esporas se encontraban germinadas, con evidente formación de hifas (Figura 11). Con respecto a la tinción con Blanco de Calcoflúor, se encontró que este permitió evidenciar el contorno de las hifas,

observando zonas apicales con una mayor intensidad de la fluorescencia, lo cual se pueden relacionar con la presencia de vesículas de enzimas con actividad de glucanasas.

Al estar en un medio no estresante, el crecimiento de las esporas ocurrió de manera normal, encontrando una escasa cantidad de esporas dañadas (teñidas de rojo) al realizar la tinción con ioduro de propidio.

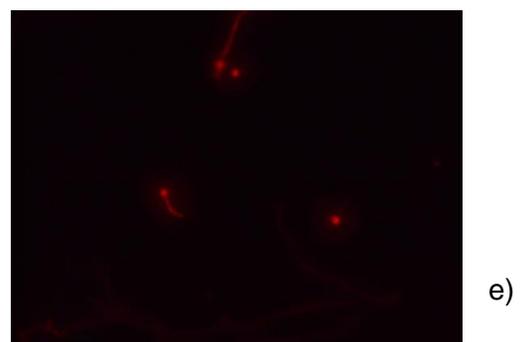
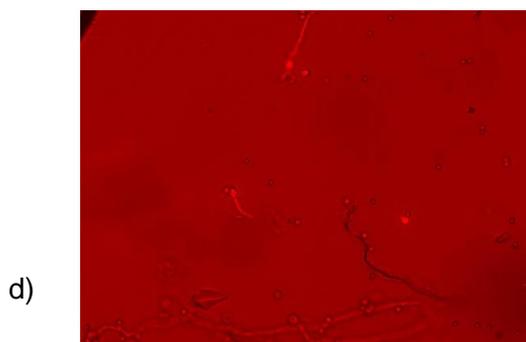
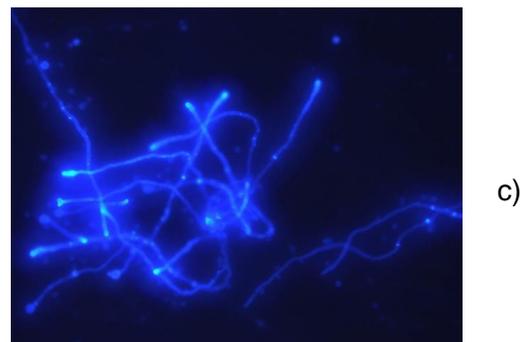
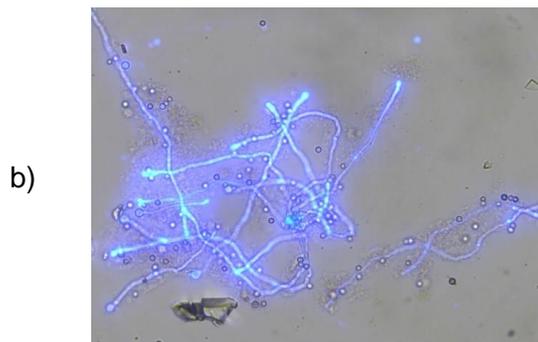
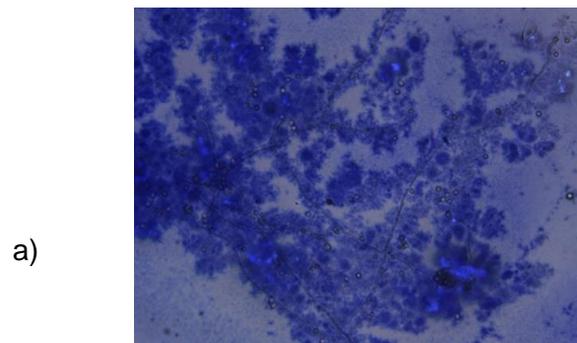


Figura 11. Esporas e hifas de *Aspergillus niger* desarrolladas en medio control, a las 24 horas, observadas en microscopio de fluorescencia. Tinción con: A) solución azul de tripán; B) Blanco de Calcoflúor, campo claro; C) Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; D) Ioduro de propidio, campo claro; E) Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.

En contraste, en los medios de cultivo adicionados con las nanopartículas de quitosano y del complejo quitosano/PCA se encontró que la mayoría de las esporas estaban aún sin germinar (Figura 12). Aunque en el tratamiento con las nanopartículas del biopolímero (CS) se observaron algunas esporas con formación de hifas, las estructuras fúngicas desarrolladas se tiñeron con el ioduro de propidio, indicando daños en la integridad de la membrana. La tinción con blanco de Calcoflúor no muestra resultados concluyentes, lo cual se puede deber a la capacidad del quitosano para retener el colorante debido a su similitud estructural con la quitina y los glucanos.

En el tratamiento con el complejo quitosano/PCA se encontraron esporas sin germinar, con evidentes daños en la integridad de la membrana (debido a la retención del ioduro de propidio) y una notoria formación de complejos entre el Blanco de Calcoflúor con los polímeros (quitina y glucanos) de la pared. Esto indica una posible desorganización en la actividad enzimática en la pared celular.

Aspergillus parasiticus

Esta especie presenta un crecimiento más lento comparado con *Aspergillus niger*, lo cual se puede relacionar con su metabolismo. *A. niger* es capaz de crecer asimilando una gran variedad de sustratos como fuentes de carbono e hidrógeno, mientras que *A. parasiticus* posee un metabolismo más complejo asociado a la producción de metabolitos secundarios como las aflatoxinas.

En este estudio se encontró que las esporas de *A. parasiticus* desarrolladas en medio control se encontraban germinadas en un 30%, a las 20 h, con presencia de septos en las hifas. Al teñir el hongo con la solución Blanco de Calcoflúor se evidenció una fuerte coloración se los

glucanos, indicando una elevada actividad enzimática que se puede relacionar con el crecimiento del microorganismo bajo condiciones óptimas (Figura 13).

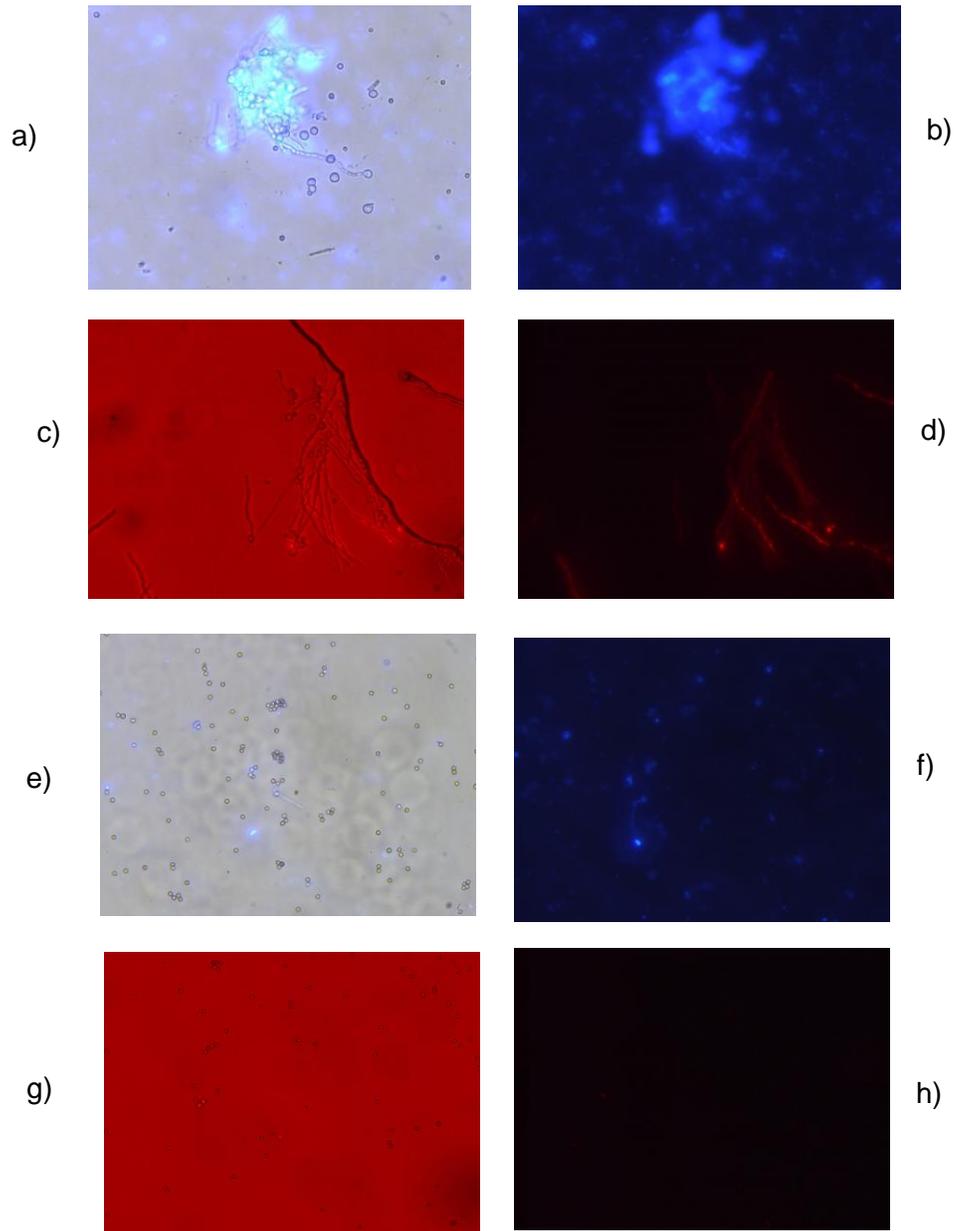


Figura 12. Esporas e hifas de *Aspergillus niger* desarrolladas en medio adicionado con partículas de quitosano (CS) y con partículas del complejo quitosano/PKA (CSPCA), a las 24 horas, observadas en fluorescencia. Medio de cultivo con: A) CS, Blanco de Calcofluor, campo

claro; B) CS, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; C) CS, Ioduro de propidio, campo claro; D) CS, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia; E) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo claro; F) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; G) CSPCA, Ioduro de propidio, campo claro; H) CSPCA, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.

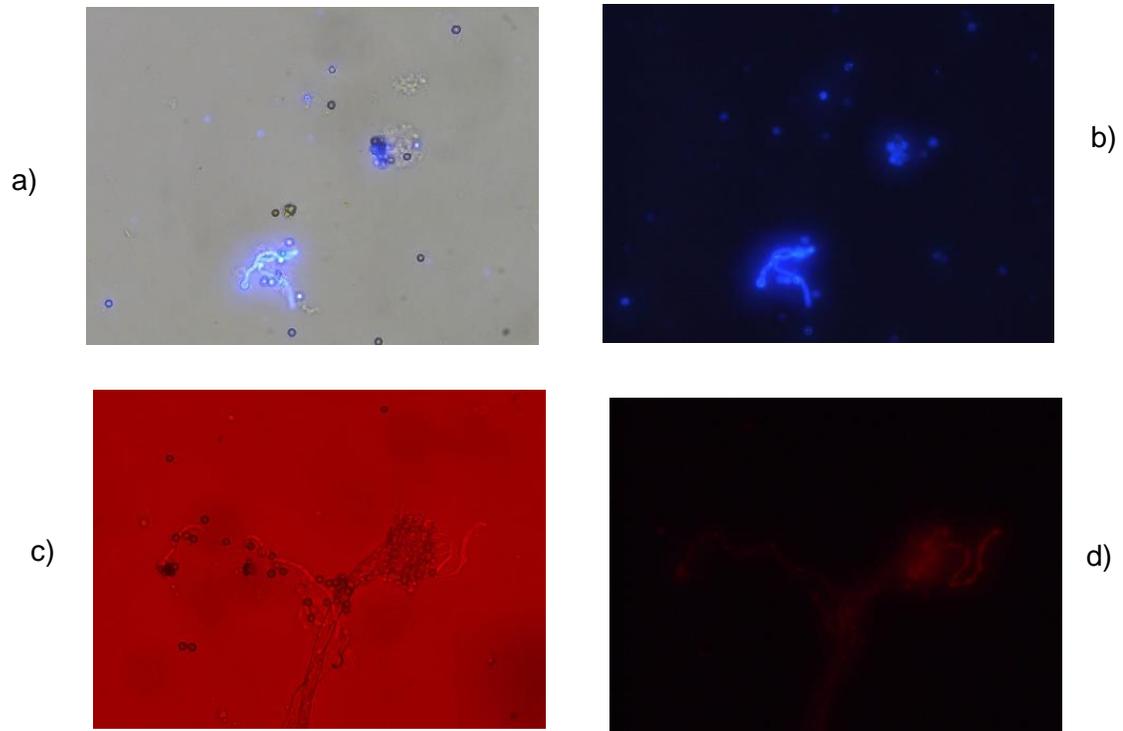


Figura 13. Esporas e hifas de *Aspergillus parasiticus* desarrolladas en medio control, a las 24 horas, observadas en microscopio de fluorescencia. Tinción con: a) Blanco de Calcoflúor, campo claro; b) Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; c) Ioduro de propidio, campo claro; d) Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.

De igual forma, la tinción con ioduro de propidio permitió evidenciar que el hongo no se encontraba bajo condiciones de estrés, al no observar la penetración de este colorante hacia el interior de las estructuras del hongo, con la consecuente intercalación con el DNA y tinción de los núcleos (Figura 13).

Al igual que en el caso de *Aspergillus niger*, se encontró que el biocomposito de quitosano/PCA afectó fuertemente el crecimiento de *A. parasiticus*, observando una gran cantidad de esporas sin germinar. Sin embargo, no se encontraron afectaciones importantes relacionadas con daños en la integridad de la membrana ni formaciones de complejos entre el Blanco de Calcoflúor y los glucanos o quitina (Figura 14).

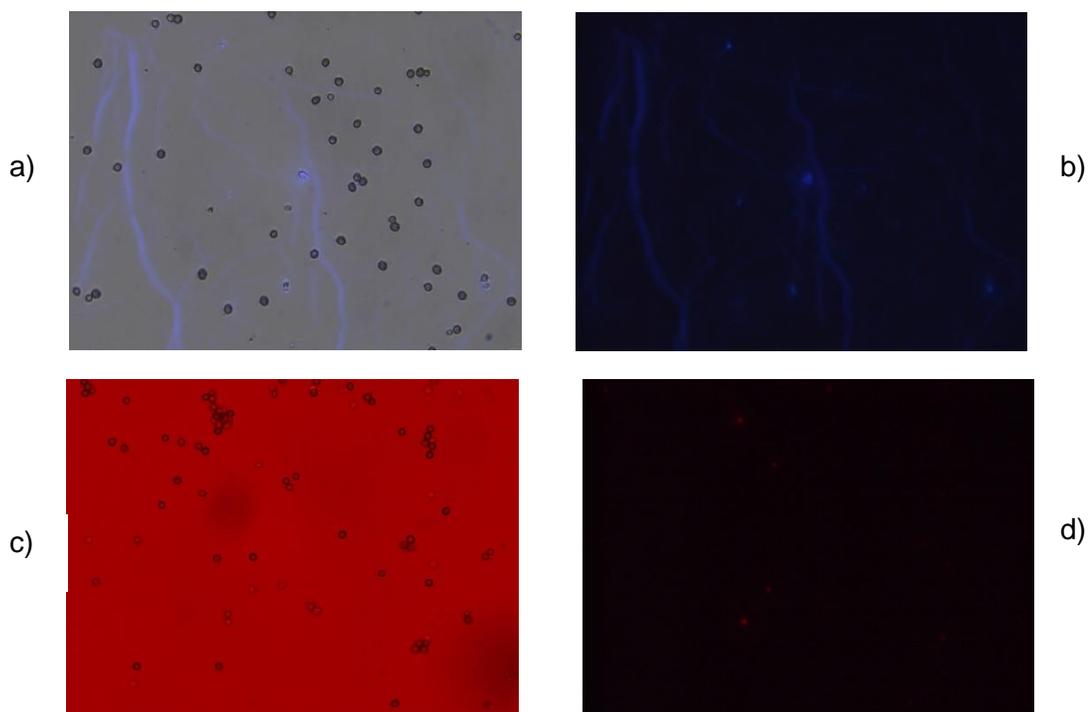


Figura 14. Esporas de *Aspergillus parasiticus* desarrolladas en medio con partículas del complejo quitosano/PCA (CSPCA), a las 24 horas, observadas en fluorescencia. Medio de cultivo con: a) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo claro; b) CSPCA, Blanco de Calcoflúor, campo con fluorescencia; c) CSPCA, Ioduro de propidio, campo claro; d) CSPCA, Ioduro de propidio, campo con fluorescencia.

Las esporas desarrolladas en medio con PCA como control no fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia debido a el bajo efecto antifúngico observado en los bioensayos con ambas especies de *Aspergillus*.

Los resultados obtenidos sugieren que el quitosano y el PCA tienen un efecto sinérgico, haciendo que el biocomposito sea capaz de inactivar al hongo e impedir su desarrollo, lo cual coincide con los resultados de viabilidad encontrados en el presente estudio.

CONCLUSIONES

Mediante la técnica de nanoprecipitación fue posible obtener biocompositos de quitosano y ácido pirrol-2-carboxílico, en una sola etapa, con tamaños de partícula alrededor de 2000 nm y un potencial zeta de + 63 mV.

De acuerdo al análisis de IR, existe un buen acoplamiento entre ambos componentes, lo cual se relaciona con la estabilidad del biocomposito.

Se logró evaluar la actividad biológica del biocomposito sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus niger* y *A. parasiticus*, encontrando un efecto importante en la inhibición de la germinación de esporas. Asimismo se encontró que el biocomposito afecta la integridad de la membrana, observando un efecto más evidente sobre *A. niger*, aunque más efectivo para inhibir el desarrollo de *A. parasiticus*.

En forma de biocompositos, el uso de quitosano constituye una alternativa natural para el control de microorganismos de importancia en alimentos. La combinación del PCA y el quitosano permite incrementar el efecto antimicrobiano inherente del biopolímero, formando partículas a escala micrométrica, con propiedades funcionales que pueden ser aprovechadas para aplicaciones en diversas áreas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda elaborar partículas utilizando quitosanos de diferentes características fisicoquímicas (peso molecular, grado de desacetilación, etc.), a fin de evaluar el efecto de estas propiedades sobre la actividad antimicrobiana del biocomposito.

Se recomienda estudiar el efecto antifúngico del biocomposito sobre otras especies de hongos filamentosos o bacterias de interés en alimentos. Asimismo, se recomienda evaluar el efecto *in vivo*, utilizando productos hortofrutícolas como modelos de estudio.

En investigaciones futuras es necesario estudiar más a fondo el efecto sobre los microorganismos, a fin de poder establecer un posible mecanismo de acción por el cual los biocompositos inhiben, o incluso promueven, el crecimiento microbiano.

El estudio del efecto de los biocompositos bajo diferentes factores externos e internos (temperatura, pH, concentración, etc.) permitiría establecer posibles protocolos para el control de hongos filamentosos del género *Aspergillus*.

Siendo *Aspergillus parasiticus* un hongo capaz de producir aflatoxinas, se recomienda estudiar el efecto de los biocompositos sobre la biosíntesis de estas toxinas y de otras micotoxinas producidas por especies fúngicas toxigénicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Argüelles-Monal, W., Gárciga, M. & Peniche-Covas, C. (1990). *Polymer Bulletin*, 23: 307. doi:10.1007/BF01032446
- Bautista S, Hernández A, Velázquez M, Bosquez E, Sánchez D. (2005). Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Rev. Iber. Tec. Postcosecha*, 23(2): 1-14
- Benhamou, N. (1992). Ultrastructural and Cytochemical Aspects of Chitosan of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, Agent of Tomato Crown and Root Rot. *Phytopathology*, 82: 1185-1193.
- Cota O, Cortez MO., Burgos A., Ezquerro JM, Plascencia M. (2013). Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1525–1536.
- Domard A. (1989). *chitin science*, 3, 24 encontrado en : [https://books.google.com.mx/books?id=iCm1SJBDZwkC&pg=PA209&lpg=PA209&dq=Domard+A.\(1989\).+chitin+science&source=bl&ots=0_qY7FFrEA&sig=xQKG9kDNYFTdGFQ64p46VO6Xohw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiGz9nAxrDPAhXGSyYKHVqtBc8Q6AEIIDAA](https://books.google.com.mx/books?id=iCm1SJBDZwkC&pg=PA209&lpg=PA209&dq=Domard+A.(1989).+chitin+science&source=bl&ots=0_qY7FFrEA&sig=xQKG9kDNYFTdGFQ64p46VO6Xohw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiGz9nAxrDPAhXGSyYKHVqtBc8Q6AEIIDAA)
- Foldbjerg R, Dang D, Autrup H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.* 85(1): 743–750.
- Ghaouth A. Arul J. (1992). *Polymer Degrad. Stab.* 39,21 encontrado en : https://www.researchgate.net/publication/281836441_EVALUACION_DE_LA_ACTIVIDAD_ANTI_FUNGICA_DEL_QUITOSANO_CONTRA_EL_HONGO_Mycosphaerella_Fijiensis_Morelet_QUE_PRODUCIÓ_LA_Sigatoka_negra_QUE_ATACA_EL_PLATANO
- Harris, DC. 2004. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ra edición. Ed Reverté S.A. Barcelona, España
- Hoagland, PD., and Parris, N. (1996). Chitosan/pectin laminated films. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 44:1915-1919.
- Il'ina AV., Varlamov VP., Yu AE., Orlov VN., Skryabin KG. (2008). Chitosan is a natural polymer for constructing nanoparticles. *Chemistry*, 421: 165-167.

Jeon, Y.; Kamil, J.; Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *J. Agr. Food Chem.* 50(18): 5167-5178.

Kendra DF and L. A. Hadwiger. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, 8(3): 276–281.

Luque-Alcaraz AG., Cortez-Rocha MO., Velázquez-Contreras CA., Acosta-Silva AL., Santacruz-Ortega HC, Burgos-Hernández A., Argüelles-Monal WM., Plascencia-Jatomea M. (2016). Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *Journal of Nanomaterials*, Article ID 6060137. (<http://dx.doi.org/10.1155/2016/6060137>)

Maresch G., Clausen T., Lang G. (1989). Hydroxypropylation of chitosan. In: *Chitin and Chitosan*. G. Anthonsen, T. and Sandford, P. Eds. New York: Elsevier Applied Science 389-396 pp.

Martínez-Camacho, AP., Cortez-Rocha MO., Ezquerra-Brauer, JM., Graciano-Verdugo, AZ., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, MM., Yépez-Gómez, MS., Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82: 305–315.

Nesci, AV., Bluma, RV., Etcheverry, MG. (2005). In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus section Flavi* and aflatoxin production. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 159-171.

Sanpo N, Ming S, Cheang P, Khor KA. Antibacterial property of cold sprayed chitosan Cu/Al coating, *J. Therm. Spray Technol.* 18 (2009) 600–608

Shirai, K., Guerrero, I. y Hall, GM. (1996). La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia* 47: 317.

Plascencia M, Martínez AP, Jaime HA, Velez JM, Q EA. (2012). *Nuevas tendencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos: Quitosano y control biológico como alternativas naturales para el control de hongos filamentosos en alimentos*. 1ª ed. Editorial Trillas. México

Pedrique, M., De Castro N. (2001). *Reproducción y Crecimiento Microbiano*. Cátedra de Microbiología (1) p.15.

Peniche C, Argüelles J. (1993). A kinetic study of thermal degradation of chitosan and mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degrad Stab.*, 39: 21-28

Perlatti B., de Souza PL., Fernandes da Silva MFG., Fernandez JB., Forim MR. (2013). Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals, in: S. Trdan (Ed.), *Insecticides – Development of Safer and More Effective Technologies*, InTech, Rijeka, Croatia

Rodríguez, P. (2000). Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. XVI Curso de Especialización FEDNA.

Roller S, Covill N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and Apple juice. *Inter. J. Food Microbio.* 47(1-2): 67-77

Sánchez D, Bautista B, Castillo O. (2007). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Anales de Biología*, 29: 23-32.

Soriano J. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Ed Diaz de Santos, Madrid. ISBN: 978-84-7978-808-7 p.36.

Sotelo ME, Bautista S., Aldana L., Solorza J., Jiménez A., Barrera L.L., Valverde G., Plascencia M. (2015). Nanotecnología en el control de microorganismos patógenos e insectos. En: *Nanopartículas: fundamentos y aplicaciones*. Editado por C. Lárez Velázquez, S. Koitech Khatib, F. López González. Comisión de Publicaciones del Depto. de Química, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ISBN 978-980-12-8382-9. Pp: 295-309.

Shukla SK, Mishra AK., Arotiba OA, Mamba BB. (2013). Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.* 59: 46–58.

Rhim W., Park HM. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications,. *Prog. Polym. Sci.* 38: 1629–1652.