

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

**Síntesis, Caracterización y Evaluación Antifúngica de
Nanopartículas de Quitosano con Aceites Esenciales**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Rocío Elizabeth Villegas Rascón

Hermosillo, Sonora

enero de 2019

Universidad de Sonora

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

Título de la tesis

Síntesis, Caracterización y Evaluación Antifúngica de Nanopartículas de Quitosano con Aceites Esenciales

Autor

Q.B.C. Rocío Elizabeth Villegas Rascón

Dr. Mario Onofre Cortez Rocha

Director de la tesis

Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Miembro del Comité de tesis

Dra. Ema Carina Rosas Burgos

Miembro del Comité de tesis

Dra. Yolanda Leticia López Franco

Miembro del Comité de tesis

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Q.B.C. Rocío Elizabeth Villegas Rascón

Autor

Dr. Francisco Rodríguez Félix
Coordinador del Programa de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque antes que todo es quien hace posible cada experiencia de la vida.

Al DIPA, por confiar en mí para formar parte de este posgrado y permitirme crecer académicamente.

A los docentes y compañeros del Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas, por apoyarme tanto, en lo académico y lo moral y estar siempre a la disposición de ayudar.

A CONACyT por aprobar y financiar el proyecto No. 219786 del cual se deriva la presente tesis.

Al Dr. Mario Cortez, por tantas enseñanzas y por creer en mí una vez más.

A mis excelentes sinodales; a la Dra. Maribel Plascencia, la Dra. Ema Carina Rosas y la Dra. Yolanda Leticia López, por todos sus consejos y apoyo a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Ana Luque y a Ana Karenth, por ayudarme tanto de principio a fin e “iluminarme” entre tanta duda en el laboratorio.

A mi familia, mis amigos y todos aquellos que han estado conmigo en este camino y me han apoyado tanto ¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

A mis padres Fátima y Chente, porque sin ellos no sería lo que ahora soy. Por todo el apoyo, todos los sacrificios y todo el amor brindado.

A mis hermanos, Valentín, Magda y Dulce y mis sobrinos Leo, Gera y Valentina, por ser parte de esta gran familia y estar al pendiente de mis logros.

A Edgar, por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas y ser un gran soporte en mi vida. Por todo el amor y el cariño que me brindas.

A mi tía Toñita, quien siempre me impulsó a llegar más lejos y sé que desde el cielo lo sigue haciendo.

A mis amigos, que siempre han estado conmigo compartiendo grandes momentos, a Brisa, Samara y Ana Gaby, por todas esas salidas “pa’ desestresarnos” (pues ustedes saben bien lo difícil que puede ser este camino).

A Jacque y Fenech, por ser las mejores ‘roomies’ que pude haber tenido.

A todos mis compañeros de la maestría, por hacer más amena mi estancia en el posgrado.

A Coty por tanto apoyo a mí y a mis compañeros.

Para ustedes va este trabajo, muchas gracias por todo.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue sintetizar, caracterizar y evaluar las propiedades antifúngicas y antimicotoxigénicas de nanopartículas (NP's) de quitosano con aceites esenciales de tomillo (*Thymus capitatus*), canela (*Cinnamomun zeylanicum*) y Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) en *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides*.

Los aceites esenciales (AE's) fueron caracterizados químicamente por cromatografía de gases con detector de masas (GC/MS). Cada AE fue evaluado a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 ppm mediante cinéticas de crecimiento radial en ambos hongos con el fin de determinar sus concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀). Posteriormente, por gelificación ionotrópica se sintetizaron nanopartículas de quitosano con la CI₅₀ determinada para cada AE y se caracterizaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Asimismo, se evaluaron sus propiedades antifúngicas en el crecimiento radial, germinación y morfometría de esporas, así como en la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales.

Se encontró que los componentes mayoritarios en los AE's fueron carvacrol (46.2 %) en el aceite esencial de tomillo (AET), eugenol (70 %) en el aceite esencial de canela (AEC) y 3,3,3,-trimetil-1,3,5-Cicloheptatrieno (22.9 %) en el aceite esencial de eucalipto (AEE). Por otro lado, las CI₅₀ de los AE's para *A. parasiticus* fueron: 178.3, 118 y 817.9 ppm de AET, AEC y AEE, respectivamente y en *F. verticillioides*: 187.3,

65.6 y 964.4 ppm de AET, AEC y AEE, respectivamente. Debido a que la CI_{50} de AEE fue considerablemente alta para ambos hongos en comparación a las de AET y AEC, se continuó trabajando sólo estos.

Con respecto a las nanopartículas, se obtuvieron diámetros promedio de 29.3 ± 0.9 y 19.7 ± 0.9 nm para las de quitosano con AEC (QT-AEC) y las de quitosano con AET (QT-AET), además presentaron un valor del potencial zeta de $+22.9 \pm 0.3$ y $+22.7 \pm 0.8$ mV, respectivamente. Por otra parte, las nanopartículas control de quitosano (sin AE) presentaron un diámetro promedio de 478.9 ± 30.3 nm y potencial zeta de $+24.3 \pm 3.6$ mV. Se observó que la incorporación de AE's en la matriz de quitosano afecta la morfología de la partícula, haciéndola más irregular y con tendencia a la aglomeración. Asimismo, el análisis de FT-IR evidenció la presencia de los AE's en las matrices de quitosano.

En la evaluación antifúngica se encontró que las nanopartículas de QT-AEC y de QT-AET presentaron efecto inhibitorio del crecimiento radial y la germinación, así como en la morfometría de las esporas durante las primeras horas de incubación, posteriormente se observó que ambos hongos se adaptaron y crecieron con normalidad. Asimismo, se observó mayor susceptibilidad de los hongos a las nanopartículas en la etapa de la germinación de esporas que en el crecimiento radial. No se encontró efecto antimicotoxigénico en la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales con la adición de las nanopartículas de QT-AEC y de QT-AET. Sin embargo, no se ha reportado con anterioridad la evaluación antimicotoxigénica de nanopartículas de quitosano con AEC y AET en grano de maíz.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
RESUMEN.....	iv
CONTENIDO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Los Hongos en los Alimentos.....	3
Género <i>Aspergillus</i>	4
<i>Aspergillus parasiticus</i> y las aflatoxinas.....	5
Género <i>Fusarium</i>	7
<i>Fusarium verticillioides</i> y las fumonisinas.....	8
Métodos Generales de Control de Hongos.....	11
Métodos de Control Alternativos.....	12
Aceites esenciales.....	13
Aceite esencial de canela (<i>Cinnamomun zeylanicum</i>).....	14
Aceite esencial de eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>).....	15
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus capitatus</i>).....	16
Encapsulación de Aceites Esenciales.....	17
Quitosano como agente encapsulante y antimicrobiano.....	18
Gelificación ionotrópica.....	19
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Particulares.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Materia Prima.....	24
Microorganismos y Condiciones de Crecimiento.....	24
Extracción del Aceite Esencial de Eucalipto (<i>E. camaldulensis</i>).....	24
Caracterización Química de los Aceites Esenciales.....	25
Determinación de Concentraciones Inhibitorias 50 (CI ₅₀) de los AE's....	25
Síntesis de las nanopartículas de quitosano con los AE's (QT-AE's).....	26
Caracterización Fisicoquímica de las nanopartículas de QT-AE's.....	27
Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	27
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	28

Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)....	28
Capacidad de Carga y Eficiencia de Encapsulación.....	28
Evaluación Antifúngica de las nanopartículas de QTAE's.....	29
Crecimiento Radial.....	29
Germinación y Morfometría de Esporas.....	29
Conteo de Septos en Hifas.....	30
Evaluación Antimicotoxigénica.....	31
Producción de Fumonisinias (FB's) y Aflatoxinas (AF's) totales.....	31
Análisis Estadístico.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
Extracción del Aceite Esencial de Eucalipto y Caracterización Química de los Aceites Esenciales.....	32
Determinación de Concentraciones Inhibitorias 50 (CI ₅₀) de los AE's....	34
Caracterización Físicoquímica de las nanopartículas de QT-AE's.....	39
Potencial zeta, Tamaño y Morfología.....	39
Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)....	42
Evaluación Antifúngica de las nanopartículas de QT-AE's.....	43
Crecimiento Radial.....	43
Germinación y Morfometría de Esporas.....	48
Conteo de septos en hifas.....	51
Evaluación Antimicotoxigénica.....	52
Producción y Cuantificación de Fumonisinias (FB's) y Aflatoxinas (AF's) Totales.....	52
CONCLUSIONES.....	54
RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Colonias de <i>Aspergillus parasiticus</i> en agar Czapek con extracto de levadura (CYA), agar extracto de malta (MEA) y agar extracto de levadura (YES).....	6
2	Estructura química de las aflatoxinas.....	7
3	Conidios de <i>F. verticillioides</i>	9
4	Estructura química de las principales fumonisinas.....	11
5	Estructura química de los principales compuestos mayoritarios del aceite esencial de canela	15
6	Estructura química de la quitina y el quitosano	18
7	Ilustración esquemática de la estructura química del quitosano entrecruzado iónicamente con el TPP en una nanopartícula cargada con carvacrol	21
8	Aceite esencial de eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>) extraído por hidrodestilación	32
9	Micrografías de TEM de las nanopartículas de QT-TPP y QT-AE's	41
10	Espectros de infrarrojo de las nanopartículas de QT-TPP y de QT-AE's	43
11	Cinética de crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> en presencia de las nanopartículas de QT-AE's	45
12	Cinética de crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en presencia de las nanopartículas de QT-AE's	46
13	Septos en hifas de <i>A. parasiticus</i> en presencia de las nanopartículas de QT-AE's.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Compuestos mayoritarios de los AE's obtenidos mediante GC/MS.....	34
2	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en presencia de los aceites esenciales (AE's).....	36
3	Porcentaje de inhibición de <i>A. parasiticus</i> en presencia de los aceites esenciales (AE's).....	37
4	Parámetros cinéticos del crecimiento radial de ambos hongos en presencia de los aceites esenciales estimados mediante el modelo de Gompertz.....	38
5	Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) de los aceites esenciales para cada hongo a las 48 h de incubación.....	39
6	Potencial zeta, tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas.....	41
7	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> y <i>F. verticillioides</i> por las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales (QT-AE's) en su CI ₅₀	47
8	Parámetros cinéticos del crecimiento radial de ambos hongos en presencia de las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales (QT-AE's) estimados mediante el modelo de Gompertz.....	48
9	Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de ambos hongos a distinto tiempo de incubación con las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales (QT-AE's).....	50
10	Diámetro promedio (µm) de esporas de <i>A. parasiticus</i> a distinto tiempo de incubación con las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales.....	50
11	Ancho y longitud promedio (µm) de esporas de <i>F. verticillioides</i> a distinto tiempo de incubación con los tratamientos.....	51
12	Concentración de fumonisinas (FB's) y aflatoxinas (AF's) totales en maíz quebrado después de 16 días de incubación.....	53

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, géneros que a su vez contaminan frecuentemente productos alimenticios y alimentos balanceados (piensos) (Hove y col., 2016; Chen y col., 2016; Stark, 2009). Estas sustancias representan un serio peligro para la salud humana y animal, debido a los potenciales efectos tóxicos que pueden desarrollar, como son carcinogenicidad, mutagenicidad, neurotoxicidad, efectos inmunosupresores y estrogénicos (Chen y col., 2016).

Las actuales estrategias para la desintoxicación de alimentos, piensos y forrajes contaminados con micotoxinas incluyen métodos químicos, biológicos y físicos, siendo los químicos los más utilizados (Zhao y col., 2015). Sin embargo, existe una serie de problemas por el uso de estos productos químicos, ya que los hongos han desarrollado resistencia a ellos. Con el fin de superar este problema, los agricultores aplican cada vez mayores concentraciones de estos productos químicos, aumentando así el riesgo de altos niveles de residuos en los alimentos (Bajpai y col., 2008). La preocupación pública sobre la contaminación de alimentos por residuos de fungicidas ha crecido considerablemente en los últimos años. Por lo anterior, ha sido necesario la búsqueda de alternativas seguras y biodegradables que sean efectivas y económicamente viables para el control de estos fitopatógenos (da Cruz-Cabral y col., 2013).

Las propiedades antimicrobianas de las plantas han sido reconocidas desde la antigüedad, por lo que se emplean tanto para la conservación de los alimentos como en la medicina. La mayoría de estas propiedades se deben a la presencia de aceites esenciales (AE's), los cuales por sus efectos antifúngicos y antibacterianos son capaces de controlar microorganismos relacionados con el deterioro de los alimentos (Russo y col., 2012). Diversos autores han evaluado las propiedades antimicrobianas de los AE's de plantas pertenecientes a los géneros *Thymus*, *Cinnamomum* y *Eucalyptus*, encontrando buenos resultados en la inhibición del crecimiento fúngico y bacteriano (Barrera-Necha y col., 2009; Unlu y col., 2010; Džamić y col., 2015; Chaves y col., 2018). Sin embargo, la adición directa de AE a una determinada matriz puede

presentar varias desventajas, tales como la pérdida de compuestos volátiles y su bioactividad debido a la presencia de la luz ultravioleta y oxígeno. Una manera de evitar estas desventajas es la generación de una cobertura polimérica alrededor del aceite esencial a través de micro o nanoencapsulación (Benavides y col., 2016).

El quitosano es un biopolímero ampliamente utilizado para la elaboración de micro y nanopartículas. Esto por su biodegradabilidad, capacidad de adsorción, biocompatibilidad, efecto potenciador de la permeabilidad, capacidad de formación de película, y muchas otras además de ser considerado seguro y rentable. En particular, el quitosano posee un amplio espectro de inhibición frente a especies bacterianas y fúngicas, siendo esta una de sus características más atractivas (Cota-Arriola y col., 2013; O'Callaghan y Kerry, 2016). Por lo anterior, y dada la necesidad de nuevas estrategias de combate en plagas fúngicas sin provocar daño al medio ambiente y a la salud pública, surge la inquietud de elaborar y evaluar nanopartículas de quitosano con aceites esenciales, como una alternativa al uso de fungicidas químicos sintéticos en el control de este tipo de plagas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los Hongos en los Alimentos

Los hongos son microorganismos ubicuos capaces de deteriorar alimentos frescos, almacenados o procesados (Huang y col., 2009). Los hongos pueden generar cambios en apariencia, textura, olor y/o gusto en los alimentos debido a su capacidad para sintetizar una amplia variedad de enzimas hidrolíticas (Cortez-Rocha y col., 2012; da Cruz-Cabral y col., 2013). Asimismo, reducen el valor nutricional de los alimentos debido a la degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos, también favorecen el aumento en el contenido de humedad y la temperatura. Los cereales son excelentes sustratos para los hongos, ya que les proporcionan condiciones óptimas para su desarrollo. Los principales géneros que atacan este tipo de alimentos son *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* (Cortez-Rocha y col., 2012; da Cruz-Cabral y col., 2013). Estos hongos están asociados a diversas enfermedades de los cultivos, y pueden conducir no sólo a importantes pérdidas en la producción, sino también dar lugar a la generación y acumulación de micotoxinas (Degola y col., 2015).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de bajo peso molecular, que pueden producirse antes y después de la cosecha de productos agrícolas y cuyos niveles pueden aumentar durante su manipulación y almacenamiento poscosecha (Bennet y Klich, 2003; da Cruz-Cabral y col., 2013). Las micotoxinas pueden presentarse de manera natural en la cadena alimenticia, ya sea por consumo directo (al comer plantas, frutos y granos contaminados) o indirectamente a través de la ingestión de animales que han sido expuestos a ellas, como pollos, cerdos y vacas, entre otros (Geary y col., 2016; Hove y col., 2016).

Se ha demostrado que una amplia gama de productos agrícolas, incluidos los cereales, frutos secos, frutas, especias y vinos, pueden estar contaminados con estos metabolitos (Geary y col., 2016). En el caso de los cereales, ha sido reportado que aproximadamente el 25 % de las cosechas en el mundo, están contaminados con micotoxinas (Windels, 2000).

Actualmente se conocen más de 400 micotoxinas, siendo las aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos, ocratoxina A, zearalenona y las producidas por *Alternaria* sp., las más frecuentemente aisladas (Bennett y Klich, 2003). Estas son capaces de causar efectos cancerígenos, teratogénicos, nefrotóxicos y hepatotóxicos en humanos y animales que las consumen (Zhao y col., 2015). Dichos efectos han llevado a la Unión Europea y muchos otros países, a presentar propuestas para establecer niveles máximos en productos alimenticios destinados al consumo humano o animal, como ha sido el caso de los cereales y sus productos derivados (Oueslati y col., 2012). En México, la Norma Oficial Mexicana 188 (NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias) sobre las aflatoxinas, micotoxinas producidas por especies del género *Aspergillus*, establece que los cereales para consumo humano no deben exceder de 20 µg/kg de aflatoxinas totales, mientras que de 21 hasta 300 µg/kg son permitidos en aquellos destinados al consumo animal (Secretaría de Salud, 2002).

Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* está ampliamente distribuido en el mundo, siendo frecuentemente aislado en diferentes hábitats por su capacidad para colonizar una variedad de sustratos. Los hongos que pertenecen a este género son conocidos como saprofitos asexuales, producen conidios redondos negros o cafés, con fiálides arregladas en una cabeza globular radiada desde una vesícula o conidiófora esférica (Cortez-Rocha y col., 2012). Las especies de *Aspergillus* son más dominantes entre los hongos que deterioran los alimentos. Se les encuentra sobre todo en granos de cereales como el trigo, maíz, sorgo, arroz, cebada y mijo, y pueden producir metabolitos secundarios tóxicos llamados aflatoxinas (El-Aziz y col., 2012).

Las esporas que producen las especies del género *Aspergillus* se dispersan por el aire y están generalmente asociadas tanto a materiales orgánicos como al suelo. Además, se pueden adaptar a distintas condiciones ambientales y ser cultivadas en un amplio intervalo de temperatura (10-50 °C), pH (2-11), salinidad (0-34%), actividad de agua

(0.6-1), así como bajo condiciones ya sean oligotróficas o ricas en nutrientes (Meyer y col., 2011).

Existen alrededor de 250 especies del género *Aspergillus* conocidas. Entre ellas se encuentran especies industrialmente explotadas como son *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus terreus* y otras que son patógenas para animales y/o plantas, como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*. Debido a su extraordinaria versatilidad metabólica, las especies de este género se utilizan en la biotecnología para la producción de una variedad de productos como ácidos orgánicos, productos farmacéuticos, proteínas y enzimas (Meyer y col., 2011). Cerca de 50 nuevas especies de *Aspergillus* fueron descritas a partir del año 2000, basándose en características morfológicas y moleculares, siendo muchas de ellas imposibles de diferenciar morfológicamente. Numerosas especies de *Aspergillus* se encuentran descritas en bases de datos como el Mycobank.org o el Index Fungorum. Las principales especies productoras de aflatoxinas son *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, aunque se conocen otras (Arrúa-Alvarenga y col., 2012).

Aspergillus parasiticus y las aflatoxinas

Además de *A. flavus*, *A. parasiticus* (Figura 1) es una de las especies más importantes y representativas del género *Aspergillus* sección *Flavi*. Este se presenta de forma natural y es responsable de la producción de aflatoxinas en una amplia variedad de alimentos. Las aflatoxinas (AF's) son metabolitos secundarios altamente tóxicos que generalmente se encuentran en alimentos como cereales (cacahuates, maíz, arroz, trigo), así como frutas, huevos y leche. Existen alrededor de 18 diferentes formas de aflatoxinas, de las cuales destacan las B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. *A. parasiticus* tiene la capacidad de producir las primeras cuatro. Las AFM₁ y AFM₂ son formas hidroxiladas de la AFB₁ y AFB₂, respectivamente, mismas que pueden ser aisladas de la leche u orina de animales (Sultana y col., 2015; Luo y col., 2018; Gacem y El Hadj-Khelil, 2016; Shuaib y col., 2010).

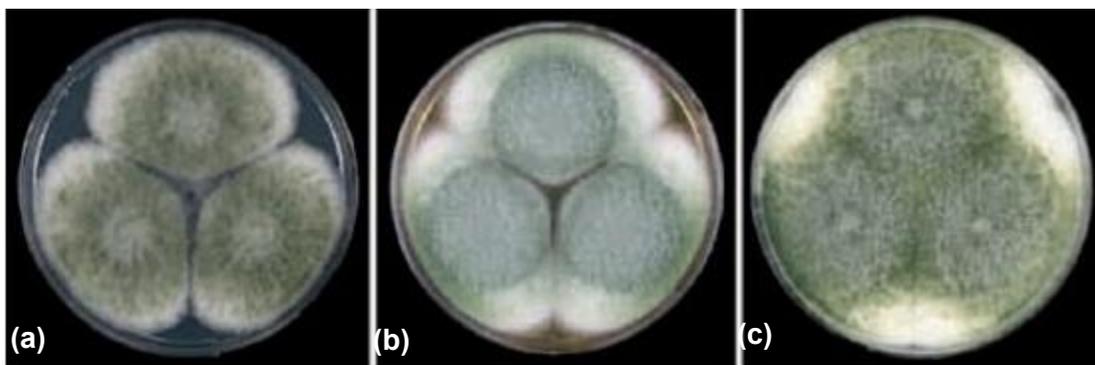


Figura 1. Colonias de *Aspergillus parasiticus* en: (a) agar Czapek con extracto de levadura (CYA); (b) agar extracto de malta (MEA) y (c) agar extracto de levadura (YES). Fuente: Varga y col. (2011).

Químicamente las aflatoxinas son difuranocumarinas, compuestos policíclicos en el que el núcleo de cumarina está unido por un lado al grupo difurano y por otro a un anillo pentenona en el caso de las aflatoxinas de la serie B, o un anillo lactona de seis miembros de la serie G (Figura 2). Estas toxinas son muy estables en una amplia gama de temperatura, siendo así persistentes en alimentos contaminados durante el procesado, cocción y esterilización. Las aflatoxinas se han clasificado por parte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2002), como carcinógenos para humanos y en estudios *in vitro* se ha demostrado que son causantes de cáncer en el hígado. Debido a los trastornos metabólicos en los seres humanos, estas micotoxinas han sido también clasificadas como mutagénicas, carcinogénicas e inmunosupresoras (Sultana y col., 2015).

La producción de aflatoxinas es favorecida por factores que se presentan tanto en el campo como en el almacén. En el campo, la producción de estas se incrementa con el estrés hídrico, las altas temperaturas y daños en las plantas hospedantes producidos por el ataque de insectos, daños físicos, restos de cultivos previos, entre otras. En el almacén, las condiciones de alta temperatura y humedad del grano, así como la aireación e inóculo primario proveniente del campo son también determinantes en el incremento de la síntesis de estas (Padrón y col., 2013).

Entre los diferentes tipos de aflatoxinas, la B₁ (AFB₁) es considerada como el agente carcinógeno de origen natural más potente, además de ser la forma más prevalente (Arita y col., 2014). La AFB₁ es conocida por sus efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e inmunosupresores, los cuales ejerce en diversos órganos como el hígado, pulmones, tracto gastrointestinal, riñón, corazón, sistema nervioso y diferentes glándulas endocrinas. Es importante destacar que la AFB₁ sólo produce sus efectos biológicos después de su activación metabólica en el organismo, por acción de la monooxigenasa dependiente del citocromo P-450. Esta forma reactiva es denominada AFB₁-8, 9-epóxido (AFBO) e interactúa con macromoléculas celulares, particularmente con el ADN, para ejercer sus efectos genotóxicos y carcinogénicos (Trebak y col., 2015).

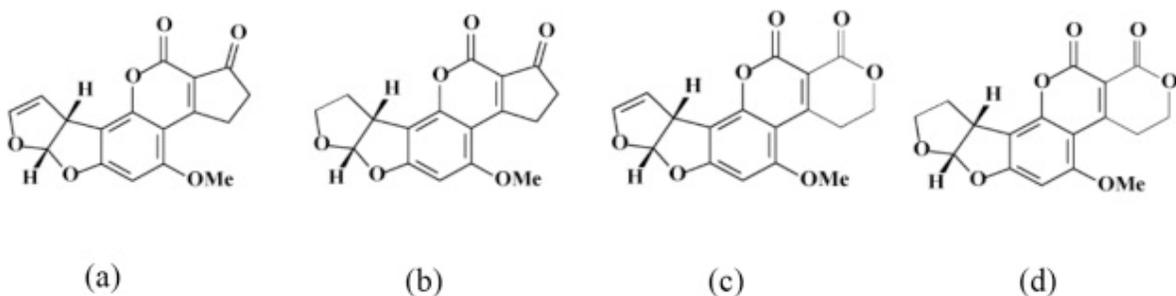


Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas; (a) AFB₁, (b) AFB₂, (c) AFG₁, (d) AFG₂. Fuente: Tao y col. (2018).

Género *Fusarium*

El género *Fusarium* está clasificado en la subdivisión Deuteromicotina, clase *Hyphomycetes*, orden *Hyphates*. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y en sustratos orgánicos (Cortez-Rocha y col., 2012; Ahrazem y col., 2000). Dentro de este género, las especies de mayor interés en el maíz son *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg y *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking), pertenecientes a la sección *Liseola*. Estas especies destacan a nivel mundial por los daños que ocasionan en una diversidad de plantas, como son el

marchitamiento del sistema vascular, la pudrición de raíces en pre y posemergencia, su alta capacidad para descomponer material celulósico y pudrición de cereales durante el almacenamiento, entre otras (Cortez-Rocha y col., 2012).

Este género se caracteriza por poseer macro y microconidios como estructuras de propagación. Los macroconidios pueden producirse en esporodoquios en el micelio aéreo, mientras que los microconidios sólo se producen en el micelio aéreo. Dependiendo de la especie, los macro y microconidios que crecen en el micelio aéreo pueden diferenciarse a partir de las células conidiógenas monofialdicas o polifialdicas, mientras que los macroconidios que crecen en esporodoquios se producen a partir de monofialides (Nelson y col., 1983).

Fusarium verticillioides y las fumonisinas

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (sinónimo: *F. moniliforme*, teleomorfo: *Gibberella moniliformis*; sinónimo *Giberella fujikuroi* población de apareamiento A), es un hongo filamentoso patógeno del maíz que ataca al tallo, granos y plántulas (Nelson y col., 1983, Li y col., 2006; Ridenour y Bluhm, 2014). Este hongo ocasiona pudrición del tallo, que es una de las enfermedades más importantes y dañinas en la planta de maíz, caracterizada por la decoloración y desgaste del tejido de médula, causando muerte prematura y el alojamiento reduce drásticamente los rendimientos (Ridenour y Bluhm, 2014).

El ciclo de infección en maíz por *F. verticillioides* (Figura 3) es bastante complejo. Esta especie invade los tejidos de la planta por debajo del pericarpio en la región del pedúnculo, pudiendo sobrevivir en el pedicelo, en el endospermo y en el embrión de la semilla, afectando el desarrollo normal del grano (Bullerman, 1996).

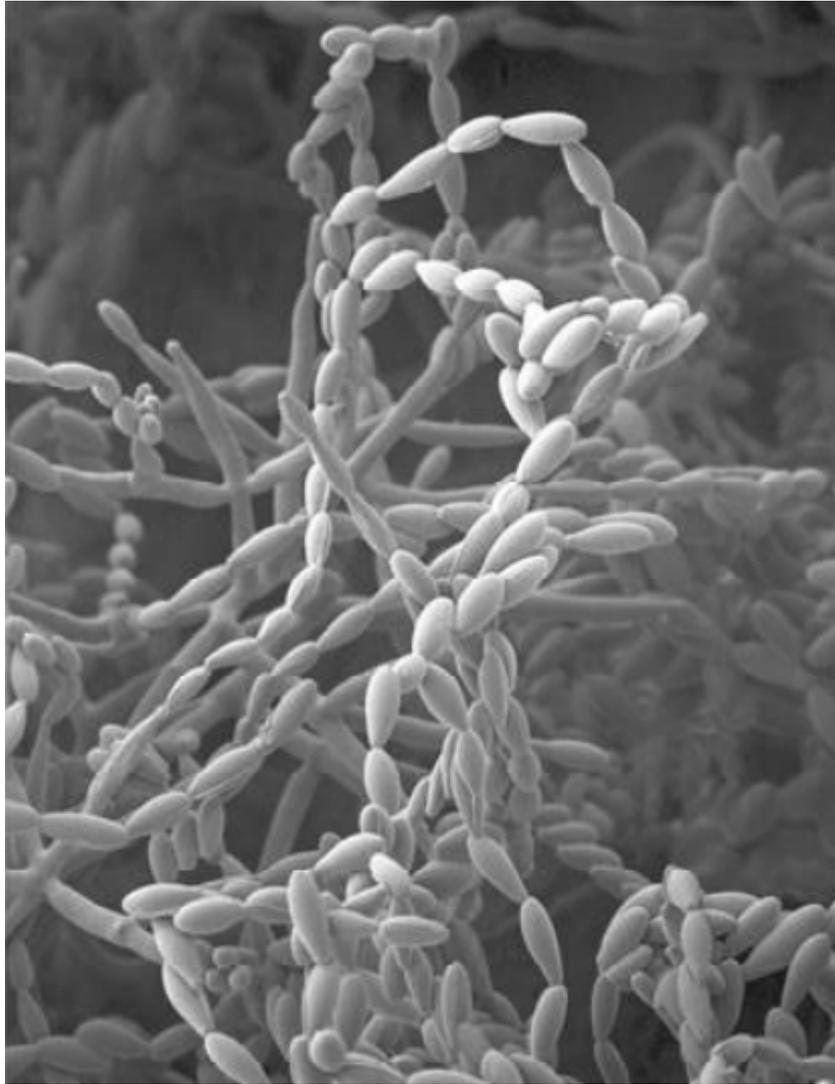


Figura 3. Conidios de *F. verticillioides*. Fuente: Duncan (2010).

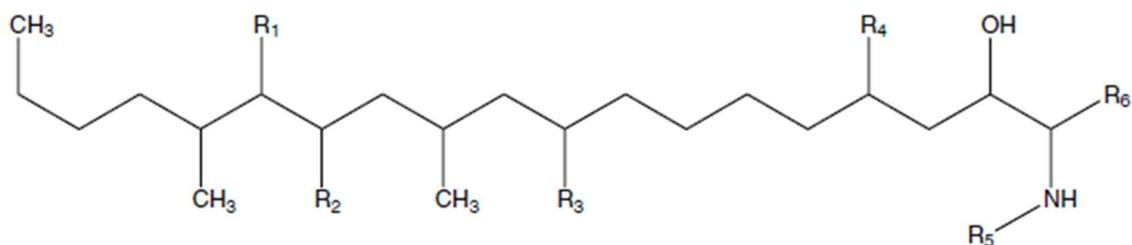
F. verticillioides es una especie que produce fumonisinas, un grupo de metabolitos secundarios derivados de policétidos. Está vinculado a diversas micotoxicosis agudas y crónicas en humanos y en animales, tales como la leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, cáncer en ratas y presumiblemente en el esófago de seres humanos (Ridenour y Bluhm, 2014; Shim y Woloshuk, 2001).

Se han aislado y caracterizado 28 tipos de fumonisinas, las cuales se han dividido en cuatro grupos: fumonisinas A, B, C y P. Los análogos de la serie B son los más

abundantes y se subdividen en fumonisina B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), B₃ (FB₃) y B₄ (FB₄). La FB₁ se encuentra con mayor abundancia en los alimentos y es también la más tóxica. Es responsable del 70 - 80% de la contaminación de los alimentos, mientras que la FB₂ y FB₃ son responsables de 15 – 25 % y 3 – 8 %, respectivamente (Rheeder y col., 2002). Las fumonisinas B₂, B₃ y B₄ son menos prevalentes y difieren estructuralmente de la FB₁ en el número y ubicación de los grupos hidroxilo en la cadena principal de hidrocarburos de la molécula (Figura 4) (Voss y col., 2007).

La FB₁ tiene la estructura 2S-amino-12S, 16R-dimetil-3S, 5R, 10R, 14S, 15R-pentahidroxieicosano con los grupos hidroxilo en C-14 y C-15 esterificados por un grupo carboxilo terminal de ácido propano-1,2,3-tricarboxílico, también conocido como ácido tricarbálico (TCA). El grupo amino libre parece desempeñar un papel específico en la actividad biológica de la FB₁. Las FC₁, FC₂, FC₃ y FC₄ carecen del grupo metilo terminal C-1, que es característico en los otros tipos de fumonisinas (Soriano y Dragacci, 2004).

El inicio y la progresión de enfermedades asociadas a fumonisinas está estrechamente correlacionada con la interrupción del metabolismo de los esfingolípidos. La FB₁ inhibe la ceramida sintasa (esfinganina N-aciltransferasa), enzima responsable de la acilación de esfinganina en la vía biosintética *de novo* de los esfingolípidos. En las células expuestas a la FB₁, la esfinganina se acumula rápidamente y se produce una disminución de las ceramidas, concomitante con el aumento de la fragmentación de ADN, disminución de la viabilidad, pérdida de la regulación de diferenciación y morfología apoptótica (Shim y Woloshuk, 2001).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
FB₁	TCA	TCA	OH	OH	H	CH ₃
FB₂	TCA	TCA	H	OH	H	CH ₃
FB₃	TCA	TCA	OH	H	H	CH ₃
FB₄	TCA	TCA	H	H	H	CH ₃
FC₁	TCA	TCA	OH	OH	H	H
FC₂	TCA	TCA	H	OH	H	H
FC₃	TCA	TCA	OH	H	H	H
FC₄	TCA	TCA	H	H	H	H
AP₁	OH	OH	OH	OH	H	CH ₃

Ácido Tricarbalílico (TCA)

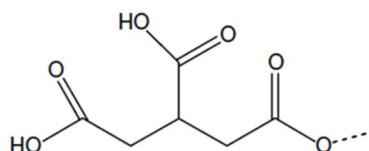


Figura 4. Estructura química de las principales fumonisinas (FB: fumonisinas grupo B; FC: fumonisinas grupo C; AP: Aminopentol, forma hidrolizada de la FB₁). Fuente: Soriano y Dragacci (2004).

Métodos Generales de Control Fúngico

La contaminación por micotoxinas en cereales y forrajes ha generado preocupación a nivel mundial, debido a que éstas disminuyen la calidad, el valor nutricional y económico de los productos agrícolas y, aún más importante, el riesgo potencial que representan para la salud el consumo de productos contaminados con ellas (Zhao y col., 2015; Khalili y col., 2015).

Los fungicidas sintéticos son el principal medio para el control de la contaminación por hongos en cultivos (Mohammadi y col., 2015), así como para reducir la producción de sus micotoxinas (Zhao y col., 2015). Sin embargo, su aplicación continua o repetida presenta inconvenientes significativos como elevados costos por aplicaciones

constantes, riesgos sanitarios de manipulación y contaminación de los cultivos por sus residuos, lo cual amenaza la salud humana (Mohammadi y col., 2015). A pesar de los considerables esfuerzos que se llevan a cabo en el campo, es imposible evitar la contaminación por micotoxinas en los productos agrícolas. Por lo tanto, es necesario desarrollar técnicas que resulten prácticas y eficaces para inhibir el crecimiento fúngico y su potencial producción de micotoxinas (Zhao y col., 2015).

Métodos de Control Alternativos

La conciencia pública y la creciente demanda de productos agrícolas libres de plaguicidas, ha llevado a la búsqueda de estrategias para el control de hongos que involucren compuestos menos tóxicos, amigables con el medio ambiente, y que protejan a los alimentos (Soliman y col., 2013). Los productos naturales son una importante fuente de compuestos activos capaces de retrasar o inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y/o la producción de sus toxinas (Pietro y col., 2013). Estos agentes bioactivos pueden obtenerse de diferentes fuentes que incluyen plantas, animales y microorganismos, de los cuales, las primeras están ganando terreno para el manejo/control de fitopatógenos (Ribes y col., 2017; Pietro y col., 2013).

Los metabolitos producidos por las plantas son una alternativa prometedora en la conservación de los alimentos contra los hongos, debido a que éstas producen una amplia variedad de compuestos como parte de su desarrollo o en respuesta al estrés o por el ataque de patógenos (da Cruz-Cabral y col., 2013).

La literatura ha demostrado que la actividad biológica de los extractos de plantas, aceites esenciales y de sus componentes individuales, está relacionada con la inhibición del crecimiento de diversas especies de hongos fitopatógenos (Pietro y col., 2013). Además, cualidades como su biodegradabilidad, su baja toxicidad en mamíferos y plantas, así como su bajo efecto ambiental han generado un creciente interés en su estudio. Así mismo, muchos de los compuestos vegetales son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, en inglés) por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA, por sus

siglas en inglés) (da Cruz-Cabral y col., 2013; Soliman y col., 2013). Un ejemplo de estos compuestos son los aceites esenciales.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son compuestos naturales lipófilos, volátiles y complejos, caracterizados por un fuerte aroma y producidos por las plantas como metabolitos secundarios (Soliman y col., 2013; Russo y col., 2012). Su composición está influida por factores intrínsecos como la especie, variedad, ecotipo y factores ecológicos como el origen geográfico de la planta, las condiciones climáticas durante su crecimiento, el tipo de suelo, los factores bióticos y tecnológicos, las técnicas de cultivo, tipos de procesos de recolección, condiciones de almacenamiento de la materia prima, así como la tecnología para su procesamiento. Además, entre las plantas de la misma especie, pero de distinto origen, pueden expresar diferente composición química (Russo y col., 2012).

Se ha encontrado que muchos aceites esenciales como el de tomillo, orégano, clavo y canela son eficientes antifúngicos, no sólo por contacto directo sino también en la fase de vapor (Frankova y col., 2016). Los AE's se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones tales como productos alimenticios, cosméticos, productos de limpieza, plaguicidas y fragancias. Asimismo, los AE's han logrado una extensa aplicación en la aromaterapia. Esto se basa en los hallazgos de que sus componentes poseen propiedades curativas y pueden actuar como medicamentos alternativos (Bousbia y col., 2009).

La aplicación de AE's en la etapa de pre o poscosecha de productos vegetales, es considerado como un tratamiento alternativo al uso de fungicidas sintéticos para prevenir la pudrición durante la poscosecha de frutas y otros cultivos, extendiendo así la vida de anaquel y conservando la calidad general del producto (Mohammadi y col., 2015).

Aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). La canela es una especia obtenida de la corteza interior seca de los árboles pertenecientes al género *Cinnamomum*. Este género comprende alrededor de 250 especies, de las cuales 20 se encuentran en la India. Los aceites esenciales más importantes de la canela son los extraídos de la corteza y las hojas de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum cassia* (aceite de cassia) y *Cinnamomum camphora*. Sin embargo, otras especies de *Cinnamomum* se destilan a menor escala y los aceites se usan localmente o se exportan a mercados regionales (Javaprakasha y Rao, 2011; Tulini y col., 2016).

C. zeylanicum (sinónimo *C. verum* J. S. Presl) es un árbol tropical de hoja perenne que crece de forma silvestre en Sri Lanka, Madagascar, India e Indochina. La hoja y la corteza se utilizan como especias y en la producción de aceites esenciales. Las hojas tienen un sabor y olor picante cuando se aplastan. Diversos estudios han demostrado que los extractos y aceites esenciales de *C. zeylanicum* poseen componentes con importante actividad biológica como anti-inflamatoria, antimicrobiana, insecticida, acaricida, antitrosinasa, antioxidante, antimutagénica, antitumoral y cardioprotectora (Jayaprakasha y col., 2007; Unlu y col., 2010; Javaprakasha y Rao, 2011; Tulini y col., 2016).

Los principales compuestos aislados e identificados en *C. zeylanicum* pertenecen a dos clases químicas: polifenoles y fenoles volátiles. Entre los polifenoles, la canela contiene principalmente ácidos vanílicos, cafeicos, gálicos, protocatéquicos, *p*-cumáricos y ferúlicos. Con respecto a los componentes volátiles, la composición química de los aceites esenciales de canela depende de la parte de la planta de la que se extraen. En el aceite esencial extraído de la corteza, el cinamaldehído es la sustancia mayormente encontrada, con un contenido que varía de 62 a 90 %, dependiendo del tipo de extracción. Los otros compuestos volátiles (Figura 5) menores son hidrocarburos y compuestos oxigenados, como cariofileno, benzoato de bencilo, linalool, acetato de eugenilo y acetato de cinamilo. En el aceite esencial de hoja de canela, el componente principal es el eugenol, que alcanza una concentración de más del 80%. En el aceite esencial obtenido de los frutos y flores de canela, el acetato de (*E*)-cinamino y el cariofileno son los componentes principales (Nabavi y col., 2015).

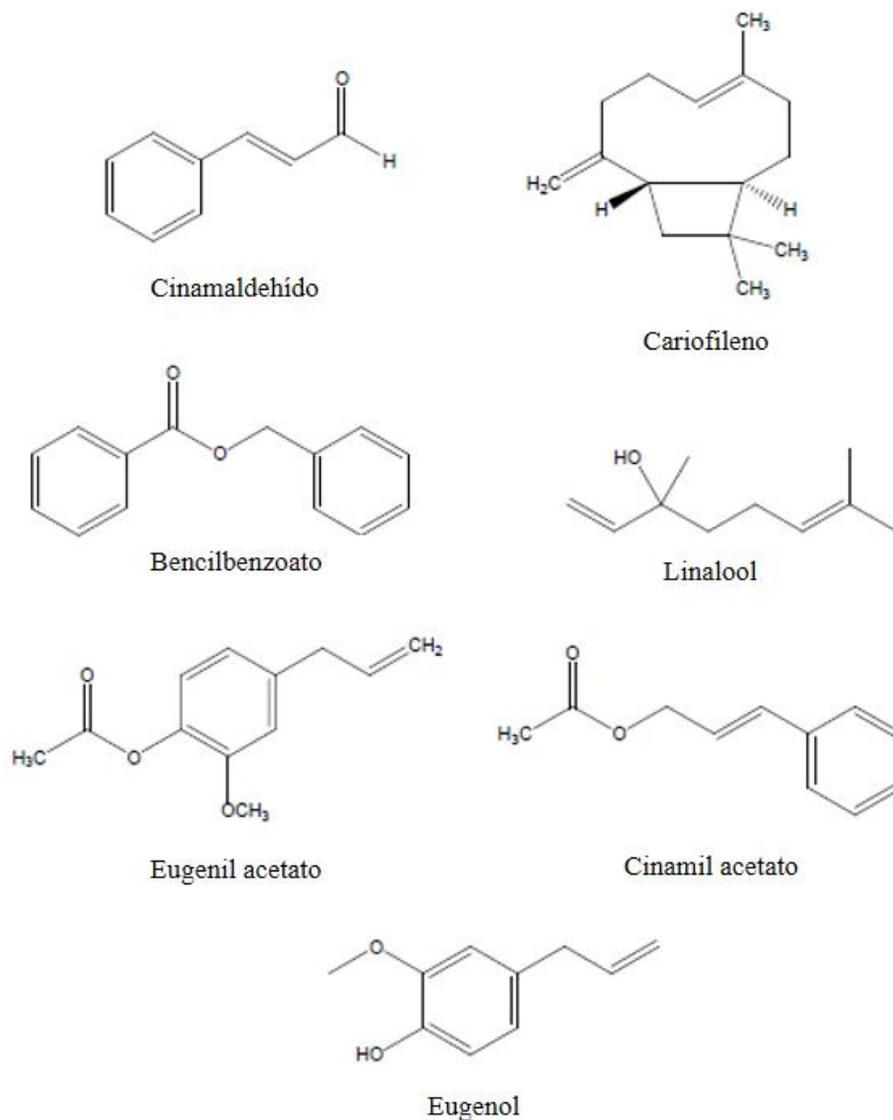


Figura 5. Estructura química de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de canela. Fuente: Nabavi y col. (2015).

Aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*). El género *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) procede de Australia y cuenta con casi 900 especies, algunas nativas del sudeste de Asia, aunque está naturalizado en la mayoría de los continentes. Debido a su rápido crecimiento, el eucalipto es un importante cultivo forestal utilizado en la industria del papel y celulosa. Su madera se utiliza para la construcción y elaboración

de combustible, mientras que su goma se emplea para el tratamiento de diarrea y como un astringente en odontología (Ghaffar y col., 2015; Mulyaningsih y col., 2010).

E. camaldulensis se encuentra entre las especies más importantes del género. Sus hojas se utilizan en la medicina tradicional como antiséptico y para el tratamiento de la tos y los resfriados, dolores de garganta, diarrea, disentería y otras infecciones. La composición fitoquímica del aceite esencial de *E. camaldulensis* se ha evaluado en estudios previos en los que 1,8 cineol es el componente principal con porcentajes de composición que van del 26.1 al 69.46%. Sin embargo, diferentes estudios señalaron al *p*-cimeno y el α -pineno como los constituyentes principales. También se ha evaluado una amplia gama de actividades biológicas, como las actividades antimicrobianas, larvicidas, citotóxicas, antioxidantes, antidiabéticas y antiinflamatorias (Chaves y col., 2018).

Aceite esencial de tomillo (*Thymus capitatus*). El género *Thymus* (*Lamiaceae*) pertenece a un grupo taxonómicamente complejo de plantas aromáticas que está ampliamente distribuido en la Península Ibérica. Es tradicionalmente utilizado con fines medicinales debido a sus propiedades antisépticas, antiespasmódicas y antitusivas. Los aceites esenciales de las especies de *Thymus* muestran un polimorfismo químico generalizado. La mayoría de ellas presenta una gran cantidad de monoterpenos fenólicos, los cuales poseen actividad contra virus, bacterias y hongos (Pina-Vaz y col., 2004).

Existen numerosos estudios sobre la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus capitatus* recolectados en diferentes localidades. En todos los estudios, las especies presentan un alto contenido de timol y de su isómero carvacrol, seguido de sus precursores biosintéticos, *c*-terpineno y *p*-cimeno como los otros compuestos principales. Estudios indican un fuerte potencial bioactivo del aceite esencial de *T. capitatus* y se le atribuye principalmente a su alto contenido de compuestos fenólicos como el timol y carvacrol, mismos que presentan

actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, citotóxica, herbicida así como propiedades insecticidas (Džamić y col., 2015).

Encapsulación de aceites esenciales

Aunque los AE's han demostrado ser buenos agentes antimicrobianos, su empleo para conservar la calidad de los cultivos y disminuir la pudrición pre y poscosecha causada por hongos, es a menudo limitada debido a que sus compuestos volátiles pueden degradarse fácilmente por acción del calor, la luz, la presión y el oxígeno. Por lo tanto, la liberación controlada o sostenida de los AE's es crucial para obtener el máximo beneficio de su empleo como agentes antimicrobianos (Mohammadi y col., 2015).

La nanoencapsulación representa una alternativa eficiente para aumentar la estabilidad física de compuestos bioactivos lábiles como los aceites esenciales, protegiéndolos de interacciones perjudiciales con factores ambientales (O'Callaghan y Kerry, 2016). Además, las nanocápsulas o nanopartículas funcionan como un transportador para administrar compuestos activos en los órganos diana y concomitantemente para controlar la liberación de dichos compuestos (Keawchaon y Yoksan, 2011).

Para la elaboración de nanopartículas se han utilizado diferentes tipos de matrices poliméricas, incluidos polisacáridos como la hidroxipropilmetilcelulosa, la goma arábica y el quitosano, entre otros (Keawchaon y Yoksan, 2011). De los anteriores, el quitosano ha atraído gran atención en la encapsulación de compuestos bioactivos debido a que es un biopolímero considerado GRAS. Además, el quitosano tiene ventajosas propiedades biológicas como biodegradabilidad, biocompatibilidad y su no toxicidad, así como capacidad para formar películas, membranas, geles, micro y nanopartículas (Mohammadi y col., 2015).

Quitosano como agente encapsulante y antimicrobiano. El quitosano (QT) (Figura 6), es un biopolímero versátil obtenido de la N-desacetilación parcial de la quitina. En

condiciones ácidas presenta un carácter policationico por protonación de los grupos aminos de su estructura, lo cual le confiere propiedades biodegradables, biocompatibles, y antimicrobianas. Es muy conocido su potencial antimicrobiano frente a bacterias, virus y hongos y se le considera como una alternativa a la utilización de productos químicos para el control de enfermedades en plantas (Souza y col., 2014; Cota-Arriola y col., 2013).

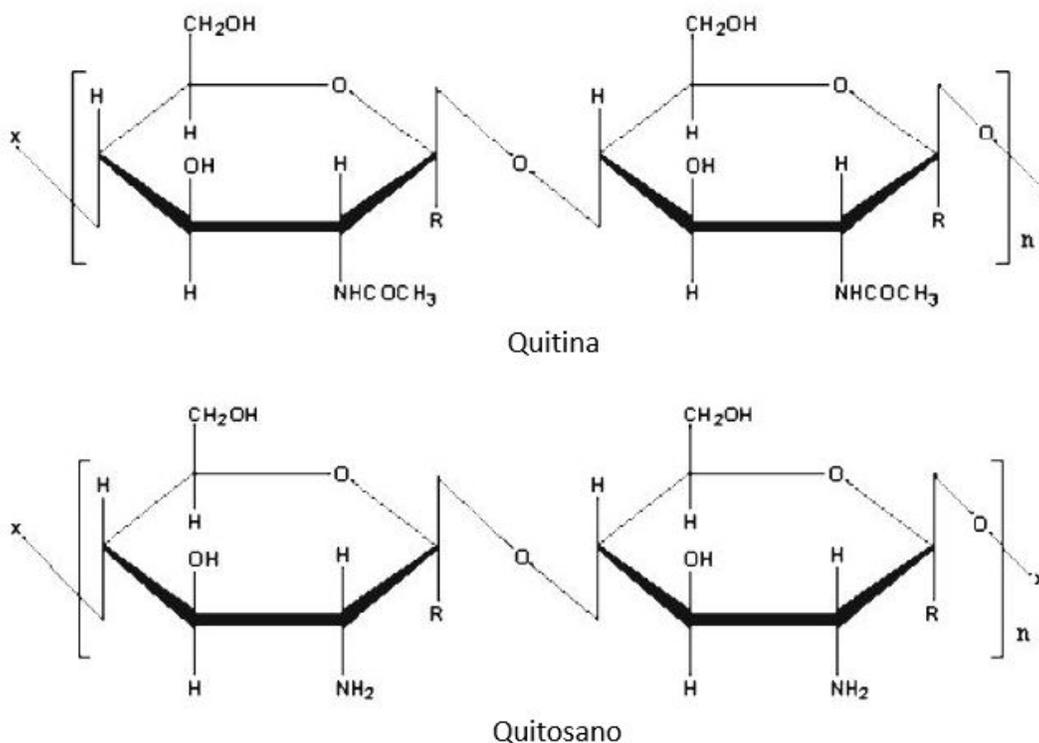


Figura 6. Estructura química de la quitina y el quitosano. Fuente. Xing y col. (2015).

Hasta ahora han sido propuestos tres mecanismos para explicar las propiedades antimicrobianas del quitosano. En el primero, se dice que en condiciones ácidas ocurre una protonación de los grupos aminos en la cadena polimérica del quitosano, por lo que las cargas positivas interactúan con las cargas negativas de los residuos de macromoléculas (lipopolisacáridos y proteínas) presentes en la membrana de las células microbianas, interfiriendo así con el intercambio de nutrientes entre el exterior

y el interior de la célula. Estas cargas pueden competir con el calcio (Ca^{++}) por los sitios electronegativos en la membrana, lo que compromete su integridad y causa la liberación del material intracelular, que resulta en la muerte celular (Raafat y col., 2008; Du y col., 2009; Martínez-Camacho y col., 2010; Qing y col., 2015; Ying y col., 2015). El segundo mecanismo propone que el quitosano actúa como un agente quelante de metales traza esenciales para la célula (Martínez-Camacho y col., 2010). Por otra parte, el tercer mecanismo establece que el quitosano de bajo peso molecular, es capaz de entrar en el núcleo de la célula interactuando con el ADN, interfiriendo con la síntesis del ARN mensajero, que a su vez afecta la síntesis de proteínas e inhibe la actividad de varias enzimas (Martínez-Camacho y col., 2010; Cota-Arriola y col., 2013).

Dadas las múltiples propiedades y versatilidad del quitosano, a través de la nanotecnología se ha empleado en una variedad de técnicas para la elaboración de nanopartículas. Entre algunos de los métodos que destacan son el entrecruzamiento en emulsión, secado por aspersion, método de micelar inverso, polimerización de plantilla, complejo de polielectrolito, precipitación y gelificación ionotrópica (Thandapani y col., 2017).

Gelificación ionotrópica. Entre los procedimientos desarrollados para elaborar nanopartículas de quitosano y otros compuestos bioactivos, la gelificación iónica o ionotrópica ha atraído considerable atención debido a que este proceso es controlable, no tóxico y libre de solventes orgánicos. La técnica se basa en la interacción iónica entre los grupos amino primarios cargados positivamente del quitosano y los grupos cargados negativamente de un polianión, tal como el tripolifosfato de sodio (Fan y col., 2012). El tripolifosfato de sodio o trifosfato de sodio (TPP), es un compuesto inorgánico con la fórmula $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. Este es el agente de entrecruzamiento de iones más ampliamente utilizado, debido a sus propiedades no tóxicas y a su rápida capacidad de gelificación, además de ser considerado un compuesto GRAS por la FDA (Thandapani y col., 2017; Moeini y col., 2018; Paulraj y col., 2017). El TPP puede formar geles por medio de la interacción iónica entre grupos amino cargados

positivamente del quitosano y sus contraiones cargados negativamente, OH^- , $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ y/o $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ (Figura 7). El entrecruzamiento físico del quitosano con el TPP es un método valioso para la obtención de micro-nanopartículas con tamaño controlado y eficaz en la encapsulación de biomoléculas. Además, la reticulación o entrecruzamiento físico reversible por interacción electrostática, en lugar de la reticulación química, evita la toxicidad de los reactivos y otros efectos indeseables (Moeini y col., 2018).

La incorporación de aceites esenciales en nanopartículas de quitosano y TPP por gelificación ionotrópica ha sido reportada con anterioridad por diversos autores. En el 2015, Mohammadi y col. encapsularon AE de *Cinnamomum zeylanicum* en nanopartículas de quitosano y evaluaron su efecto antifúngico *in vivo* en pepinos contaminados por *Phytophthora drechsleri*, obteniendo mejor desempeño en la preservación de los pepinos durante su almacenamiento con el AE encapsulado que por sí sólo. Feyzioglu y Tornuk (2016) elaboraron nanopartículas de quitosano con aceite esencial de *Satureja hortensis* y evaluaron sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas en *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, encontrando fuerte actividad antibacteriana y antioxidante dependiendo de la concentración.

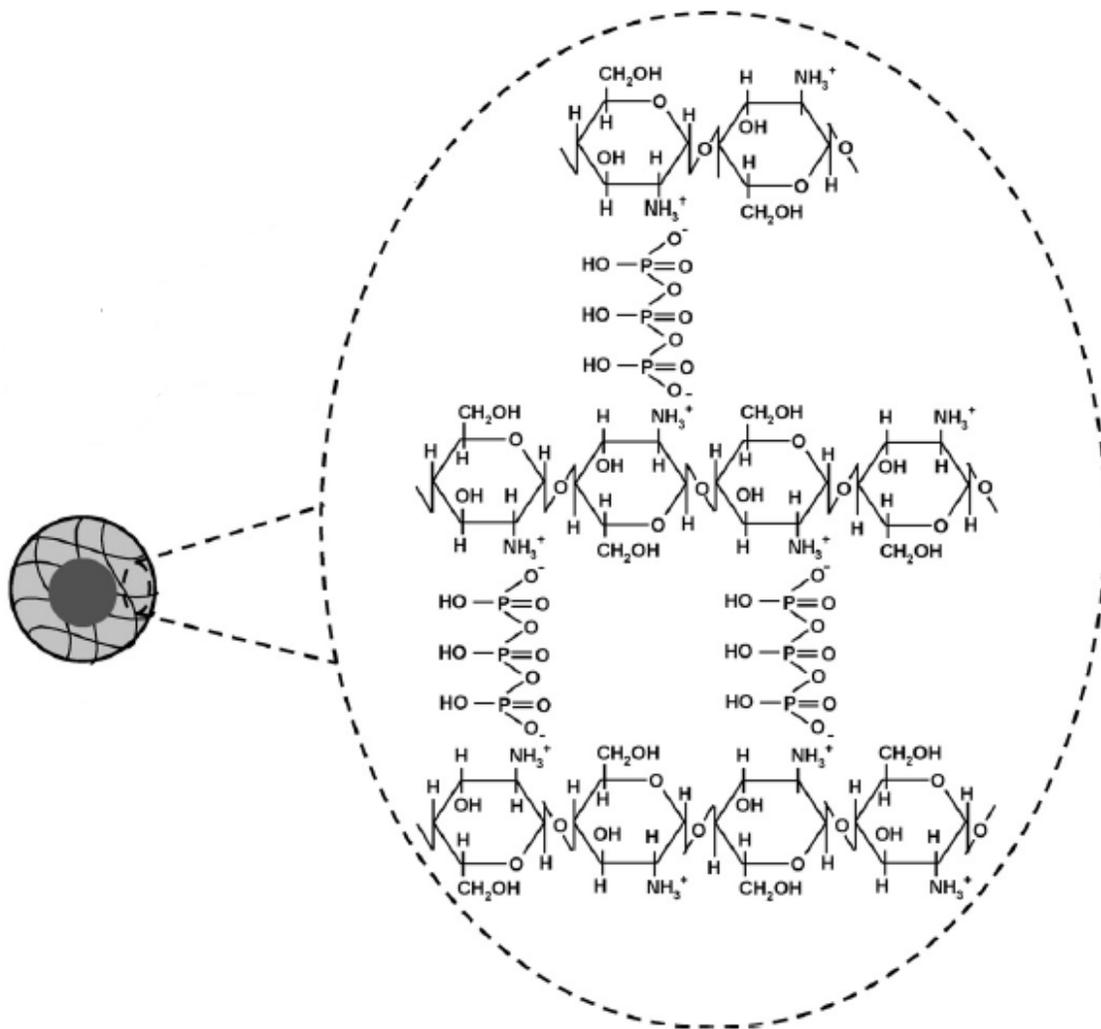


Figura 7. Ilustración esquemática de la estructura química del quitosano entrecruzado iónicamente con el TPP en una nanopartícula cargada con carvacrol. Fuente: Thandapani y col. (2017).

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales de tomillo, eucalipto y canela inhiben el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas por *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus parasiticus*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de quitosano con aceites esenciales y evaluar su efecto en el desarrollo de *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus parasiticus*, así como en la producción de sus micotoxinas.

Objetivos Particulares

1. Extraer aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) y determinar sus componentes mayoritarios, así como los de los aceites de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) y tomillo (*Thymus capitatus*).
2. Determinar concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) de cada aceite esencial en *A. parasiticus* y *F. verticillioides*.
3. Elaborar y caracterizar nanopartículas de quitosano con cada uno de los aceites esenciales en sus CI₅₀.
4. Evaluar el efecto de las nanopartículas con cada uno de los aceites esenciales en sus CI₅₀ en ensayos de crecimiento radial, germinación y morfometría de esporas, número de septos en hifas y en la producción de aflatoxinas y fumonisinas totales por *A. parasiticus* y *F. verticillioides*, respectivamente, en maíz sano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizó quitosano (QT) comercial de mediano peso molecular (153 kDa) y grado de desacetilación de 78% (448877), tripolifosfato de sodio (TPP) (238503) y aceites esenciales (AE's) de canela (AEC) (*Cinnamomum zeylanicum*, w-22921-0) y tomillo (AET) (*Thymus capitatus*, w-28281-2) de Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA). El aceite esencial de eucalipto (AEE) (*Eucalyptus camaldulensis*) fue obtenido por hidrodestilación a partir de las hojas de la planta, las cuales fueron recolectadas durante el mes de marzo del 2017 en Hermosillo, Sonora (29°04'49.5"N 110°57'55.7"W). El Tween 80 utilizado se adquirió de Faga Lab (catálogo # 2378) (Mocorito, Sinaloa, Mex).

Microorganismos y Condiciones de Crecimiento

Se utilizaron cepas de *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) y *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme* ATCC 52539) del Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora. Cada cepa se inoculó en matraces con agar papa dextrosa (PDA) (DIFCO, USA) y se incubaron durante siete días bajo las siguientes condiciones: periodo de 12 h luz/12 h sombra a 25 ± 2 °C para *F. verticillioides* y de 27 ± 2 °C en oscuridad para *A. parasiticus* (Cota-Arriola y col., 2013; López-Meneses y col., 2015; Luque-Alcaraz y col., 2017).

Extracción del Aceite Esencial de Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*)

Las hojas recolectadas se lavaron con agua corriente y se secaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 7 días. Posteriormente se cortaron con tijeras en trozos finos y se guardaron en bolsas de papel. Para la extracción del AE se tomó una muestra de

100 g, se colocaron en un matraz bola de tres entradas con 300 mL de agua destilada y se montó en un equipo de extracción por hidrodestilación. El proceso de destilación se realizó por 4 h (Said y col., 2016). El AE extraído se recuperó y se almacenó a 4 °C. El rendimiento de extracción se calculó como la relación entre el peso del AE con respecto al peso de las hojas mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de aceite (\%)} = \frac{\text{Peso del AE}}{\text{Peso de hojas secas}} \times 100$$

Caracterización Química de los Aceites Esenciales

La composición química de los AE's se determinó de acuerdo con el método descrito por Said y col. (2016). Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases GC-7890B (Agilent Technologies, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 240 (GC/MS) con un sistema de ionización eléctrico de 70 eV. La columna capilar utilizada fue una DB-5 (50 m x 0.25 mm) (J&C Scientific, Agilent Technologies, EE. UU.) acondicionada a 60 °C y mantenida así por 10 min. La temperatura se incrementó a 20 °C/min hasta los 180 °C, se dejó por 2 min y finalmente se aumentó a 4 °C/min hasta alcanzar los 250 °C permaneciendo así por 4.5 min. Se utilizó helio como gas acarreador en un flujo de 2 mL/min. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 220 y 280 °C, respectivamente. Los constituyentes de cada AE fueron identificados mediante la comparación de índices de retención lineales con base a una mezcla de n-alcános, tiempos de retención de espectros obtenidos con la base de datos NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, EE. UU.).

Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de los AE

Para determinar las CI₅₀ de cada AE, se realizó un ensayo de crecimiento radial para cada hongo, de acuerdo con la técnica descrita por López-Meneses y col. (2015). Se utilizaron cuatro concentraciones de cada AE: 125, 250, 500 y 1000 ppm. Para la incorporación de los AE al medio de cultivo, se preparó una emulsión en Tween 80 (1%) y se agregó a ésta el AE en las concentraciones mencionadas. Esta emulsión se

mezcló con el medio Czapek, se agitó en un vortex hasta su homogenización y se vació en placas Petri de 25 mL. Se elaboraron tres controles: Czapek (agar Czapek puro), Tween (agar Czapek + Tween 80 [1 %]) y Terravax [medio Czapek + fungicida comercial Terravax® (Captan 20 % + Carboxin 20 %) 2.5 g/L], como control positivo de inhibición. Finalmente, en el centro de cada placa se perforaron pocillos de 6 mm de diámetro en donde se colocó un inóculo de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL de cada hongo (Cota-Arriola y col., 2013).

El crecimiento radial de las colonias se evaluó mediante la técnica descrita por Plascencia-Jatomea y col. (2003). El crecimiento de las colonias en cada tratamiento se midió diariamente y se comparó con el crecimiento en los controles. El porcentaje de inhibición radial se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición radial (\%)} = \left[1 - \left(\frac{X_i}{X_c} \right) \right] \times 100$$

Donde X_c es el radio promedio de la colonia en el medio control, y X_i es el radio de la colonia en medio con cada tratamiento.

Una vez obtenido el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, se utilizó la función de supervivencia Probit del programa estadístico NCSS versión 12 (NCSS, LLC, Utah, USA) para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los AE's para cada hongo.

Síntesis de las Nanopartículas de Quitosano-Aceite Esencial (QT-AE)

La síntesis de las nanopartículas de QT-AE se realizó mediante dos pasos: preparación de una emulsión aceite en agua y gelificación ionotrópica (Keawchaon y Yoksan, 2011; Hosseini y col. 2013). El primer paso consistió en elaborar una solución de quitosano al 0.2% (p/v) en ácido acético al 1 % (v/v), la cual se dejó en agitación magnética a 50°C durante dos días consecutivos hasta su disolución. Después se filtró a través de papel filtro con tamaño de poro de 1.6 μm . Al filtrado se le ajustó el pH a

4.6 con NaOH al 0.1 N y ácido acético 0.1 % (v/v). Se tomaron 20 mL de la solución filtrada de QT y se le añadió Tween 80 (0,225 g) como surfactante y se agitó magnéticamente a 50° C durante 2 h. Posteriormente, se agregaron 0.02 g de cada AE a la mezcla de QT y Tween 80 (una mezcla por cada AE). Cada mezcla se dejó en agitación magnética por una hora a temperatura ambiente para lograr una emulsión Quitosano-Tween 80-Aceite Esencial (QT-Tw80-AE).

En el segundo paso se preparó una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) al 0.02% (p/v), la cual se dejó gotear (3 mL) a través de una bomba peristáltica Bio-Rad Econo Pump (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) a una velocidad de flujo de 0.30 mL/min sobre la mezcla de QT-Tw80-AE (3 mL) en agitación magnética constante. Una vez que se depositaron los 3 mL de TPP en la mezcla QT-Tw80-AE, se dejó en agitación magnética por 15 min teniendo como resultado la formación de las nanopartículas QT-AE's. (Feyzioglu y Tornuk, 2016). Posteriormente, se hizo un lavado mediante diálisis para eliminar el material remanente del proceso de síntesis. Primero se dieron dos lavados con metanol al 10% (v/v) (un lavado cada 12 h en agitación magnética constante) seguido de dos lavados más utilizando una membrana de 12 KDa (Sigma-Aldrich) en los que se empleó sólo agua deionizada.

Caracterización Físicoquímica de las Nanopartículas QTAE's

Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Se determinó el potencial zeta y el diámetro promedio de las nanopartículas QTAE's, así como el índice de polidispersidad mediante dispersión de luz dinámica (DLS), de acuerdo con la técnica reportada por Kiilll y col. (2017). Para ello, la solución con las nanopartículas se diluyó en agua MilliQ en relación 1:100 (v/v) y se sonicó durante 5 min para evitar su agregación. La solución ya sonicada se depositó en una celda capilar electromagnética y se depositó en el equipo Möbius (Wyatt Technology Corporation, EE. UU.) con el fin de obtener los parámetros deseados. Cada determinación se realizó por triplicado.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La morfología de las nanopartículas de QTAE se observó en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL con voltaje de operación de 200 kV y filamento de emisión de campo (JEM 2010F JEOL, EE. UU.), tal como lo describió Hernández-Téllez y col. (2017). Para ello se dejó secar una gota de cada muestra a temperatura ambiente en una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono de malla 400 (FCF400-Cu). Posteriormente, a cada muestra se le agregó 10 μL de ácido fosfotúngstico al 2% y se dejó actuar durante 5 min, retirando el exceso. Por último, las muestras se colocaron en una cámara de vacío por 18 h y se realizaron observaciones en el campo de 200 nm.

Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

La interacción entre los grupos funcionales del quitosano con cada aceite esencial se analizó mediante espectros de FT-IR en un equipo Perkin-Elmer FT-IR Spectrum GX (Waltham, MA, EE. UU.) con un promedio de dieciséis exploraciones en un intervalo espectral de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (Souza y col., 2014; Wu y col., 2017; Luque-Alcaraz y col., 2016).

Capacidad de Carga y Eficiencia de Encapsulación

El contenido de cada AE cargado en las nanopartículas de quitosano se determinó mediante espectrofotometría UV-vis (Keawchaoon y Yoksan, 2011; Hosseini y col., 2013). Para ello, se colocaron 10 mg de nanopartículas QT-AE's en ácido clorhídrico 2 M (5 mL) y se calentaron a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Después se dejó enfriar, se añadieron 2 mL de etanol y se centrifugó a 9000 rpm durante 5 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Se recogió el sobrenadante y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 300 nm en un espectrofotómetro UV-vis (BioMate 3S, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) para determinar el contenido de AE. La cantidad de AE se calculó mediante una curva de calibración de cada AE libre en etanol ($R^2 = 0.999$). Cada muestra se midió por triplicado. La eficacia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC) de cada AE fueron calculadas a partir de las siguientes ecuaciones:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad total de AE cargado}}{\text{Cantidad inicial de AE}} \times 100$$

$$LC (\%) = \frac{\text{Cantidad total del AE cargado}}{\text{Peso de los nanopartículas QT – AE liofilizados}} \times 100$$

Evaluación Antifúngica de las Nanopartículas de QT-AE's

Crecimiento Radial

El análisis del crecimiento radial de *Aspergillus* y *Fusarium* en presencia de las nanopartículas de QT-AE's se llevó a cabo mediante el método de deposición puntual, previamente descrito para la determinación de la CI₅₀. Para ello, se prepararon placas Petri con capacidad de 25 mL con agar Czapek con cada tipo de nanopartícula en la CI₅₀ determinada para cada AE. Asimismo, se prepararon los controles: placas con medio Czapek puro (control Czapek), placas con Czapek + solución de quitosano al 0.2 % (7:3) (control QT) y placas con medio Czapek y solución de TPP al 0.02 % (control TPP). Se hizo un pocillo de 6 mm en el centro de cada placa y se depositó en él una suspensión de 1x10⁵ esporas/mL de cada hongo en placas separadas. Seguidamente, todos los tratamientos y controles se incubaron a las condiciones previamente mencionadas para cada microorganismo. Se midió el crecimiento radial de la colonia cada 24 h hasta que esta cubrió el 100 % de la superficie en la placa control Czapek.

Germinación y Morfometría de Esporas

La evaluación del efecto de las nanopartículas de QT-AE en la germinación de esporas de cada hongo, se realizó siguiendo el método descrito por Cota-Arriola y col. (2013) con modificaciones. Para ello, se utilizaron microplacas de 12 pozos (Costar, Corning Inc, EE. UU.) adicionando 1 mL de medio Czapek líquido (pH= 5.6) con las nanopartículas (en la CI₅₀ de cada AE) en cada pozo, así como los controles utilizados en el ensayo de crecimiento radial. Cada tratamiento se inoculó con una suspensión

de 1×10^6 esporas/mL de cada hongo y se incubaron a las condiciones mencionadas para cada especie de hongo. Cada seis horas se tomó al azar una muestra de cada tratamiento y control, se colocó en un cubreobjetos y en un microscopio óptico se contaron 100 esporas al azar, determinando el número de germinadas y no germinadas. Se calculó el porcentaje de inhibición de germinación de esporas con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de germinación(\%)} = \left(\frac{\%S_c - \%S_t}{\%S_c} \right) \times 100$$

En donde $\%S_c$ es el porcentaje de esporas germinadas en el control y $\%S_t$ el porcentaje de esporas germinadas en cada tratamiento.

Posteriormente se midió el diámetro promedio de las esporas y su morfometría mediante observaciones realizadas en un microscopio óptico con el objetivo 40x (Olympus CX31, Japón) conectado a una cámara Infinity 1 (Media Cybernetics Inc, EE. UU.). El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics Inc., EE. UU.).

Conteo de Septos en Hifas

El conteo de septos en las hifas de cada hongo se realizó por microscopía de fluorescencia, tal como lo describe Cota-Arriola y col. (2011). Se utilizaron microplacas de 12 pozos y a cada pozo se le agregó 1 mL de medio líquido Czapek con cada uno de los tratamientos y controles en las CI_{50} de cada AE previamente estimadas. Cada pozo se inoculó con 1×10^6 esporas/mL y las microplacas se incubaron por 12 h. A partir de estos inóculos se preparó un frotis en fresco de cada tratamiento, al cual se le agregó de 1 - 2 gotas del colorante blanco de calcoflúor a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Se tomaron imágenes de las esporas adheridas, fijadas y teñidas, utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica DM2500, EE. UU.), con un filtro azul-violeta a una longitud de onda de emisión y excitación de 330-380 y > 420 nm, respectivamente. Cada experimento se realizó por triplicado.

Evaluación Antimicotoxigénica

Producción de Fumonisinias (FB's) y Aflatoxinas (AF's) totales

La producción de fumonisinas y aflatoxinas totales se llevó a cabo como lo describen López-Meneses y col. (2015). Se colocaron muestras de 50 g de grano de maíz sano quebrado en matraces de 125 mL, se le ajustó la humedad a 40% en el caso de *Fusarium* y 25% para *Aspergillus* y se esterilizaron dos días consecutivos en autoclave por 15 min a 121 °C. El maíz esterilizado se trató por separado con 10 mL de las nanopartículas en la CI_{50} de cada AE y se prepararon los siguientes controles: control maíz (maíz + 10 mL de agua sin inóculo ni tratamiento), control agua (maíz + 10 mL de agua destilada estéril + la suspensión de esporas), control QT (maíz + 10 mL solución de QT al 0.2%), control TPP (maíz + 10 mL de solución de TPP al 0.02%), control AEC (maíz + 10 mL de emulsión de AEC en su CI_{50}) y control AET (maíz + 10 mL de emulsión de AET en su CI_{50}). Cada matraz se inoculó con 1×10^5 esporas/mL de cada hongo y se incubó durante 16 días a las condiciones previamente descritas para cada hongo. Se hicieron tres repeticiones para cada tratamiento. Para la extracción y cuantificación de las micotoxinas, se utilizaron columnas de inmunoafinidad de los kits Fumonitest y Aflatest para fumonisinas y aflatoxinas, respectivamente, ambos de VICAM (Waters Corporation, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante para cuantificación en fluorómetro.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como el valor medio \pm la desviación estándar de tres repeticiones. Los valores fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia significativa entre los tratamientos se determinó con la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el programa estadístico JMP versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Extracción del Aceite Esencial de Eucalipto y Caracterización Química de Todos los Aceites

El aceite esencial de eucalipto (AEE) presentó una coloración amarilla (Figura 8), el olor característico de esta planta y un rendimiento de 0.8 ± 0.1 en base seca. Autores como Mubarak y col. (2015) y Elaissi y col. (2010), reportan rendimientos de extracción en *E. camaldulensis* por hidrodestilación de 1.4 %, y 1.3 %, respectivamente, los cuales son superiores al nuestro. Pese a que se trata de la misma especie de planta, la variabilidad del rendimiento de aceite esencial se puede asignar a diversos factores, por ejemplo: el suelo, la edad de las plantas, el clima y el tiempo de cosecha (Mubarak y col., 2015).



Figura 8. Aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) extraído por hidrodestilación.

Los aceites esenciales contienen gran cantidad de componentes bioquímicos que incluyen terpenos, alcoholes, ésteres, cumarinas, cetonas, aldehídos y fenoles, entre otros (Mubarak y col., 2015). Para este estudio se determinó la composición química del AEE, mientras que la composición de los aceites de canela y tomillo ya se había determinado en un estudio previo (Villegas-Rascón y col., 2018). Los resultados de la caracterización química de los AE's (Tabla 1) muestran que en *T. capitatus* el compuesto mayoritario fue el carvacrol (46.2 %), en *C. zeylanicum* el eugenol (70 %) y en *E. camaldulensis* el 3,3,3,-trimetil-1,3,5-Cicloheptatrieno (22.9 %). Otros autores reportan diferentes compuestos como mayoritarios para los aceites esenciales utilizados en este estudio, así como en diferente proporción. En el aceite esencial de *C. zeylanicum* uno de los principales compuestos reportados es el cinamaldehído (Simsek y col., 2013; Nabavi y col., 2015), mientras que en el aceite esencial de *E. caladulensis* han sido reportados el γ -Terpineno y el 1,8-Cineol entre otros (Mubarak y col., 2015; Ghaffar y col., 2015). Esta variabilidad de compuestos mayoritarios en los aceites esenciales, incluso dentro de la misma especie, se debe a diversos factores que afectan el desarrollo y procesamiento de la planta. El origen geográfico, las condiciones climáticas, el suelo, los factores bióticos y tecnológicos, las técnicas de cultivo, los tipos de procesos de recolección, las condiciones de almacenamiento de la materia prima, así como las tecnologías de su procesamiento son algunos ejemplos de dichos factores (Russo y col., 2012).

De los compuestos mayoritarios encontrados en los aceites esenciales analizados en este estudio, se ha descrito una amplia gama de actividad biológica del eugenol y el carvacrol. El eugenol es ampliamente utilizado en la industria cosmética y farmacéutica, principalmente en perfumes, enjuagues bucales y como analgésico dental. Asimismo, ha sido estudiado por sus propiedades antimicrobianas en la industria alimentaria (Campaniello y col., 2010; Woranuch y Yoksan, 2013). Diversos autores han demostrado que el eugenol es capaz de presentar actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antihelmíntica, antiinflamatoria, antioxidante, analgésica, anticancerígena y antimutagénica, entre otras (Kamatou y col., 2012). Por otro lado, varios estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito propiedades del carvacrol,

incluyendo actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiséptica, antiespasmódica, antiinflamatoria, expectorante, antitusiva, inmunomoduladora y quimiopreventiva, así como agente modificador de la fermentación microbiana y reducción de la emisión de metano (Alagawany y col., 2015).

Tabla 1. Compuestos mayoritarios (%) de los AE's obtenidos mediante GC/MS.

<i>Thymus capitatus</i> ¹		<i>Cinnamomun zeylanicum</i> ¹		<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	
Compuesto	(%)	Compuesto	(%)	Compuesto	(%)
Carvacrol	46.2	Eugenol	70.0	3,3,3-trimetil-1,3,5-Cicloheptatrieno	22.9
Timol	13.6	Cariofileno	4.5	Eucaliptol	14.1
o-Cimeno	12.0	Benzilbenzoato	2.8	3-Careno	12.0
β-Pineno	6.4	o-Eugenol	2.2	Espatulenol	11.3
Otros	20.8	Otros	17.6	Otros	31.1

¹Fuente: Villegas-Rascón y col. (2018).

Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de los Aceites Esenciales

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* producida por los AE's. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto entre los AE's como en las concentraciones aplicadas. El aceite esencial de canela (AEC) es el que ocasionó el mayor y más prolongado efecto inhibitorio (100 % de inhibición a 500 y 1000 ppm en las primeras 96 h de incubación), seguido del aceite esencial de tomillo (AET) (78 % de inhibición a 500 ppm a las 96 h). Resultados similares se encontraron en *A. parasiticus* (Tabla 3), en donde AEC inhibió totalmente su crecimiento micelial a 1000 ppm hasta las 144 h de incubación, seguido nuevamente de AET (82.6 % de inhibición). Este comportamiento que presentan ambos hongos expuestos a los AE's puede apreciarse mejor cuando se analizan otros parámetros cinéticos de crecimiento como los que se muestran en la Tabla 4. Estos resultados sugieren que tanto *F. verticillioides* como *A. parasiticus* son más susceptibles a AEC, seguido de AET. Los datos indican que AET limita y ralentiza

considerablemente el crecimiento específico máximo (A) de ambos hongos desde 500 ppm, produciendo también un aumento en la fase lag (λ) de estos microorganismos.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Barrera-Necha y col. (2009), quienes evaluaron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* usando el aceite esencial de canela, que a una concentración de 300 ppm inhibió completamente su crecimiento. El aceite esencial de eucalipto (AEE) fue el que presentó la inhibición más débil en ambos hongos (menos del 32 %). Cabe destacar que el 3,3,3-trimetil-1,3,5-Cicloheptatrieno (compuesto mayoritario del AEE) hasta la fecha no ha sido investigado como potencial antifúngico.

Se ha reportado que la actividad biológica de los AE's depende del tipo de compuesto mayoritario que estos poseen (Fandohan y col., 2004; Barrera-Necha y col., 2009; Campaniello y col., 2010; Woranuch y Yoksan; 2013). En el aceite esencial de canela se detectó al eugenol como su componente mayoritario, el cual es un compuesto fenólico al que se le atribuyen diversas propiedades, destacando su actividad antimicrobiana. Dicha actividad recae en la capacidad del eugenol para interactuar con la membrana citoplasmática y alterarla, así como al flujo de electrones y el transporte activo en la célula fúngica (Abbaszadeh y col., 2014). Por otra parte, Pillai y Ramaswamy (2012) evaluaron el efecto del eugenol en el desarrollo de *A. parasiticus*, encontrando que a concentración de 150 ppm se inhibió totalmente el crecimiento radial de este hongo. Juglal y col. (2002) evaluaron el efecto de diversos AE's en el crecimiento de *A. parasiticus* y *F. moniliforme*, así como en la producción de sus toxinas. Encontraron que el AE de clavo, cuyo compuesto mayoritario es eugenol, fue el AE que mejor inhibió tanto el crecimiento de ambos hongos, como la producción de sus toxinas. A concentración de 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, el AE de clavo inhibió completamente la producción de la aflatoxina B₁ y B₂, mientras que a 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, la fumonisina B₁ fue reducida en un 78 %.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* en presencia de aceites esenciales (AE).

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	96
Ccz	0 ^d	0 ^g	0 ^g	0 ⁱ
Canela				
125	100.0 ± 0.0 ^a	77.8 ± 0.0 ^{bc}	73.8 ± 1.2 ^c	68.2 ± 0.0 ^{de}
250	100.0 ± 0.0 ^a	79.6 ± 3.2 ^{bc}	74.7 ± 2.5 ^c	71.2 ± 1.3 ^d
500	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a
1000	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a
Tomillo				
125	76.7 ± 2.9 ^b	27.8 ± 5.6 ^{ef}	25.2 ± 3.9 ^e	14.4 ± 2.6 ^g
250	100.0 ± 0.0 ^a	72.2 ± 0.0 ^c	69.7 ± 0.9 ^c	65.2 ± 1.3 ^e
500	100.0 ± 0.0 ^a	83.3 ± 0.0 ^b	81.8 ± 0.6 ^b	78.0 ± 1.3 ^c
1000	100.0 ± 0.0 ^a	96.3 ± 3.2 ^a	97.0 ± 0.1 ^a	95.5 ± 0.0 ^b
Eucalipto				
125	45.0 ± 18.0 ^c	20.4 ± 3.2 ^f	17.1 ± 4.2 ^f	3.0 ± 1.3 ⁱ
250	53.3 ± 5.8 ^c	25.9 ± 3.2 ^{ef}	19.1 ± 4.0 ^{ef}	8.3 ± 1.3 ^h
500	61.7 ± 12.6 ^{bc}	31.5 ± 3.2 ^e	21.2 ± 2.4 ^{ef}	14.4 ± 1.3 ^g
1000	100.0 ± 0.0 ^a	55.6 ± 5.6 ^d	42.4 ± 1.7 ^d	31.8 ± 2.3 ^f

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores dentro de una misma columna. Ccz: control Czapek.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *A. parasiticus* en presencia de los aceites esenciales (AE).

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
C _{Cz}	0 ^d	0 ^g	0 ⁱ	0 ⁱ	0 ^h	0 ^k
Canela						
125	100.0 ± 0.0 ^a	56.0 ± 7.4 ^{cd}	43.9 ± 2.6 ^{ef}	43.0 ± 1.9 ^e	34.4 ± 1.2 ^e	26.5 ± 1.3 ^{gh}
250	100.0 ± 0.0 ^a	74.3 ± 4.7 ^b	66.7 ± 2.6 ^c	64.5 ± 0.0 ^c	63.2 ± 1.2 ^{cd}	56.8 ± 2.3 ^e
500	100.0 ± 0.0 ^a	94.8 ± 4.5 ^a	86.4 ± 4.5 ^b	82.8 ± 1.9 ^b	80.8 ± 2.2 ^b	76.5 ± 1.3 ^c
1,000	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a
Tomillo						
125	45.0 ± 18.0 ^{bc}	41.0 ± 2.3 ^{ef}	36.4 ± 4.5 ^f	37.6 ± 1.9 ^f	39.2 ± 1.2 ^e	29.5 ± 2.3 ^g
250	100.0 ± 0.0 ^a	59.0 ± 2.3 ^c	56.1 ± 2.6 ^d	57.0 ± 1.9 ^d	57.6 ± 0.8 ^d	50.0 ± 0.0 ^f
500	100.0 ± 0.0 ^a	76.6 ± 9.1 ^d	71.2 ± 2.6 ^c	68.8 ± 1.9 ^c	65.6 ± 3.0 ^c	61.4 ± 2.3 ^d
1,000	100.0 ± 0.0 ^a	97.2 ± 4.8 ^a	87.9 ± 2.6 ^b	81.7 ± 1.9 ^b	83.2 ± 4.4 ^b	82.6 ± 2.6 ^b
Eucalipto						
125	30.0 ± 8.7 ^c	30.7 ± 6.7 ^f	16.7 ± 2.6 ^h	19.4 ± 3.2 ^h	16.8 ± 0.2 ^g	6.8 ± 2.3 ⁱ
250	45.0 ± 18.0 ^{bc}	33.3 ± 2.5 ^f	21.2 ± 5.2 ^{gh}	21.5 ± 1.9 ^{gh}	18.4 ± 1.1 ^{fg}	8.3 ± 1.3 ^j
500	68.3 ± 16.1 ^b	43.4 ± 6.0 ^{def}	25.8 ± 2.6 ^g	25.8 ± 0.0 ^g	24.0 ± 2.1 ^f	13.6 ± 0.0 ⁱ
1,000	100.0 ± 0.0 ^a	53.7 ± 3.6 ^{cde}	50.0 ± 0.0 ^{de}	38.7 ± 3.2 ^{ef}	36.0 ± 3.7 ^e	25.0 ± 0.0 ^h

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa (p<0.05) entre los valores dentro de una misma columna. C_{Cz}: control Czapek.

Tabla 4. Parámetros cinéticos del crecimiento radial de ambos hongos en presencia de los aceites esenciales estimados mediante el modelo de Gompertz.

<i>F. verticillioides</i>				
Tratamiento (ppm)	A	v_m	λ	R ²
Ccz	27.65 ± 0.74	0.34 ± 0.01	21.65 ± 0.71	0.9994
Canela				
125	10.51 ± 1.35	0.12 ± 0.01	33.84 ± 1.74	0.9965
250	8.42 ± 0.96	0.11 ± 0.01	33.06 ± 2.17	0.9949
500	-	-	-	-
1000	-	-	-	-
Tomillo				
125	26.37 ± 2.95	0.30 ± 0.02	28.71 ± 1.91	0.9958
250	10.29 ± 1.11	0.13 ± 0.01	30.93 ± 2.02	0.9955
500	7.20 ± 1.20	0.08 ± 0.00	32.33 ± 2.32	0.9938
1000	26.93 ± 2.48	0.16 ± 0.00	36.55 ± 1.62	0.9978
Eucalipto				
125	34.60 ± 3.76	0.32 ± 0.01	28.47 ± 1.40	0.9979
250	29.73 ± 2.03	0.31 ± 0.01	28.46 ± 1.04	0.9987
500	25.16 ± 1.02	0.31 ± 0.01	28.80 ± 0.81	0.9992
1000	21.31 ± 2.06	0.26 ± 0.01	34.68 ± 1.48	0.9974
<i>A. parasiticus</i>				
Ccz	27.03 ± 1.03	0.21 ± 0.01	19.86 ± 2.06	0.9968
Canela				
125	22.87 ± 2.16	0.16 ± 0.01	37.28 ± 2.34	0.9953
250	12.86 ± 1.15	0.09 ± 0.00	35.83 ± 2.41	0.9951
500	7.24 ± 1.22	0.06 ± 0.00	49.64 ± 3.78	0.9874
1000	-	-	-	-
Tomillo				
125	21.72 ± 1.62	0.14 ± 0.00	22.85 ± 1.99	0.9968
250	14.14 ± 1.39	0.10 ± 0.01	28.31 ± 3.16	0.9922
500	11.64 ± 1.39	0.09 ± 0.00	37.21 ± 3.21	0.9914
1000	3.96 ± 0.32	0.07 ± 0.01	52.20 ± 6.01	0.9697
Eucalipto				
125	28.53 ± 1.80	0.19 ± 0.00	25.98 ± 1.73	0.9975
250	28.08 ± 1.62	0.19 ± 0.00	28.18 ± 1.56	0.9979
500	24.92 ± 1.25	0.18 ± 0.00	30.89 ± 1.56	0.9980
1000	23.66 ± 1.86	0.17 ± 0.00	38.50 ± 1.84	0.9971

Los valores representan la media de tres repeticiones ± el error estándar. Intervalos de confianza del 95%. Ccz: control Czapek (sin aceite esencial). A: es el crecimiento máximo alcanzado durante la fase estacionaria. v_m : velocidad de crecimiento específico máximo (1/0.5 días). λ : fase lag (0.5 días). R²: coeficiente de determinación.

Por otro lado, el análisis de supervivencia arrojó una CI_{50} considerablemente alta para el aceite esencial de eucalipto en comparación con los de canela y tomillo (Tabla 5). Lo anterior se traduce en una menor eficiencia de actividad antifúngica contra *A. parasiticus* y *F. verticillioides*. Esto podría ser una razón por la cual su compuesto mayoritario, el 3,3,3,-trimetil-1,3,5-Cicloheptatrieno, no ha sido reportado con potencial antifúngico. En base a esto, se continuó trabajando sólo con los aceites esenciales de canela y tomillo para la elaboración de las nanopartículas.

Tabla 5. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) en ppm de los aceites esenciales para cada hongo a las 48 h de incubación.

Aceite Esencial	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. verticillioides</i>
Tomillo	178.3	187.3
Canela	118.0	65.6
Eucalipto	817.9	964.4

Datos obtenidos mediante la función probit del programa estadístico NCSS.

Caracterización Físicoquímica de las Nanopartículas de QT-AE

Potencial Zeta, tamaño y morfología

En la Tabla 6 se presentan los resultados del potencial zeta y el diámetro promedio de las nanopartículas (NP's) así como el índice de polidispersidad obtenidos mediante DLS. Las partículas control de QT-TPP (sin aceite incorporado) presentaron un diámetro promedio de 478.9 nm, el cual fue significativamente distinto ($p < 0.05$) al de las partículas con aceite esencial incorporado (29.3 nm y 19.7 nm para QT-AEC y QT-AET, respectivamente). Diversos autores han trabajado en el desarrollo de nanopartículas de quitosano con aceites esenciales obteniendo diferentes tamaños de partícula. Hosseini y col. (2013) elaboraron nanopartículas de quitosano con aceite esencial de orégano, obteniendo un diámetro promedio de 282 nm para las nanopartículas de sólo quitosano y de 310 a 402 nm para las nanopartículas de quitosano con el aceite esencial incorporado. Sotelo-Boyás y col. (2017) elaboraron

nanopartículas y nanocápsulas de quitosano con aceite esencial de lima con un tamaño promedio de 6.1 nm. Son diversos factores los que afectan el tamaño de las nanopartículas de quitosano, como el peso molecular, grado de desacetilación y concentración del quitosano, el pH, la fuerza iónica del medio en suspensión, así como el método utilizado (Jonassen y col., 2012; Mohammadi y col., 2015; Hernández-Téllez y col., 2017; Sotelo-Boyás y col., 2017). Por otro lado, no se encontró diferencia significativa entre el potencial zeta de QT-TPP y de QT-AE's. Asimismo, ambas nanopartículas presentaron cargas positivas, lo cual es indicativo de su estabilidad física debido a que la repulsión electrostática entre partículas permanece (Luque-Alcaráz y col., 2016). La morfología de las nanopartículas fue analizada mediante TEM y sus micrografías se muestran en la Figura 9. Las nanopartículas QT-TPP (a) presentaron forma esférica y fueron observados dos tamaños principales ($\phi = 16-23$ nm y $54-84$ nm). Con la incorporación de los AE's, pudo observarse cambios en la forma y dispersión de las partículas, probablemente debido al ordenamiento de los compuestos fenólicos presentes en los AE y la matriz de QT-TPP. Las nanopartículas de QT-AEC y de QT-AET presentaron irregularidad en la morfología y una tendencia a la agregación. Los cambios morfológicos fueron más marcados con QT-AET, donde se observaron partículas con tendencia a formas oblongas y poco uniformes, con mayor contraste de tamaños (no se muestran los datos).

Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

Con la finalidad de evidenciar la cantidad de AE's cargados dentro de las nanopartículas de quitosano, se realizó un análisis de eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC). Los cálculos realizados indican que no hubo AE en cantidades suficientes dentro de las nanopartículas. Sin embargo, el análisis de FT-IR mostró picos atribuidos a los AE's en las nanopartículas de QT-AEC y QT-AET, con diferencia de intensidad. Estos resultados sugieren que el AE podría haberse quedado en la superficie de las partículas interactuando con los grupos amino del quitosano. Además, durante la diálisis al estar en la superficie, el AE puede ser removido con mayor facilidad.

Ha sido reportada una variación de los valores de EE y LC de distintos compuestos bioactivos utilizando gelificación ionotrópica como método de síntesis. Hosseini y col. (2013) evaluaron la encapsulación del aceite esencial de orégano en NP's de QT con diferentes proporciones del AE y obtuvieron valores de 5.45 – 24.72% y de 1.32 – 2.12 % de EE y LC, respectivamente. Asimismo, Mohammadi y col. (2015) analizaron la EE y LC de NP's de QT con aceite esencial de canela, también en diferentes proporciones del AE. Los autores obtuvieron valores de 1.99 – 16.91 % y 3.18 – 3.78 % de EE y LC, respectivamente. En ambos estudios se observó una disminución en la EE a mayor proporción del AE, lo cual es atribuido a una saturación del aceite en las NP's de QT, como pudo haber ocurrido en el presente estudio.

Tabla 6. Potencial zeta, tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas.

Tratamiento	Potencial Z (mV)	Diámetro (nm)	PDI
QT-TPP	+24.3 ± 3.6 ^a	478.9 ± 30.3 ^a	0.3 ± 0.0 ^a
QT-AEC	+22.9 ± 0.3 ^a	29.3 ± 0.9 ^b	0.3 ± 0.1 ^a
QT-AET	+22.7 ± 0.8 ^a	19.7 ± 0.9 ^b	0.2 ± 0.1 ^a

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos dentro de la misma columna. QT-TPP: nanopartículas de quitosano y TPP sin aceite esencial. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

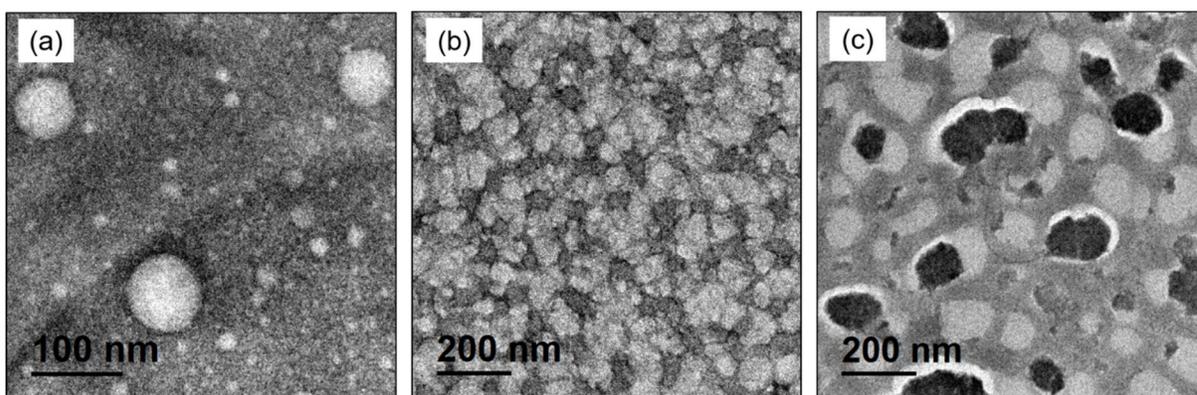


Figura 9. Micrografías de TEM a 200 kV de (a) QT-TPP (control); (b) QT-AEC; (c) QT-AET. QT-TPP: nanopartículas de quitosano y TPP sin aceite esencial. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La composición química de las nanopartículas fue dilucidada mediante espectroscopía de infrarrojo (Figura 10). En las nanopartículas de sólo quitosano (QT-TPP) se exhibieron bandas intensas a 1569 (amida II), 1410 (flexión C-H), 1040 (flexión C-O-C), 651 (flexión N-H fuera de plano) y 617 cm^{-1} (anillo piranososa) y con menor intensidad en la región de 2987 y 2925 (estiramiento C-H), las cuales son características del quitosano (Keawchaoon y Yoksan, 2011; Woranuch y Yoksan, 2013; Thandapani y col., 2017; Hu y col., 2018). En las nanopartículas de QT-AEC se encontró un aumento en la intensidad de las bandas en las regiones 2920 y 2857 cm^{-1} (estiramiento de C-H) lo cual probablemente sea debido a la presencia del AEC (Hosseini y col., 2013) y el Tween 80 (Gupta y col., 2017). Asimismo, se observaron bandas a 3394 (O-H), 1735 (estiramiento C=O), 1572 (amida II), 1410 (flexión C-H), 1092 (flexión C-O-C) y a 648 cm^{-1} (flexión N-H fuera de plano) (Keawchaoon y Yoksan, 2011; Woranuch y Yoksan, 2013). Las nanopartículas de QT-AET exhibieron bandas muy similares a las de QT-AET pero con picos más intensos a 2925 y 2862 cm^{-1} . Tanto las de QT-AEC como las de QT-AET mostraron bandas más anchas e intensas entre 3394 y 3432 cm^{-1} que las de QT-TPP. Esto probablemente debido a un incremento de grupos OH, los cuales están presentes en los compuestos fenólicos de ambos aceites esenciales.

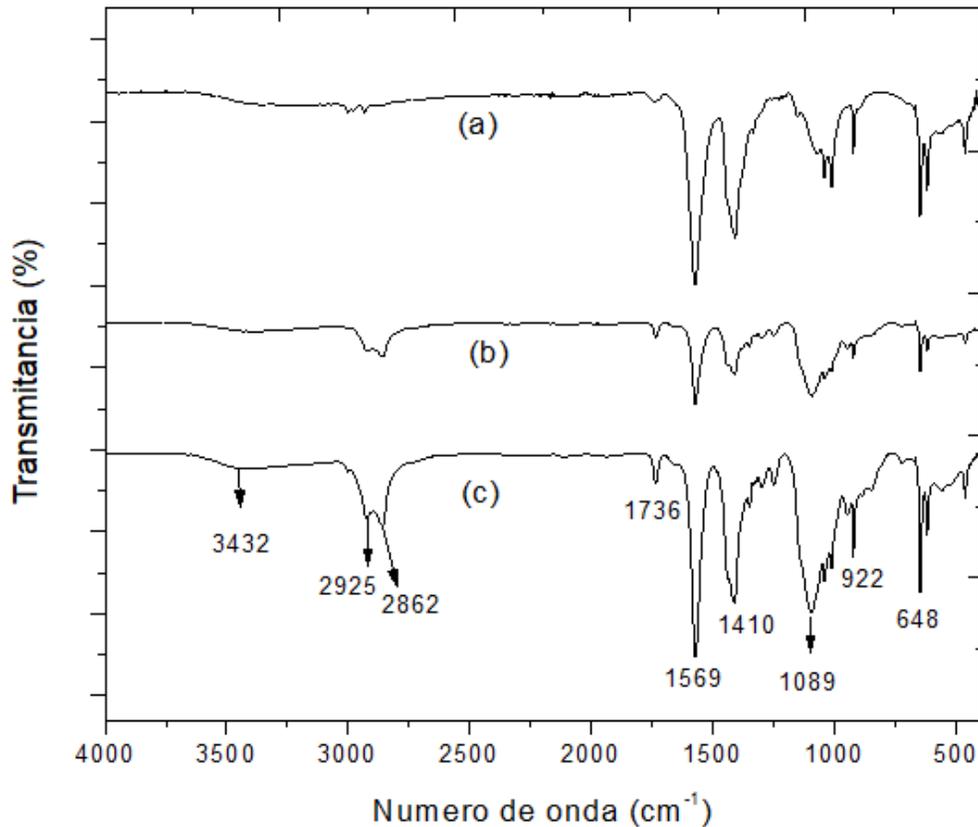


Figura 10. Espectros IR de (a) QT-TPP (control); (b) QT-AEC; (c) QT-AET. QT-TPP: nanopartículas de quitosano y TPP sin aceite esencial. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Evaluación Antifúngica de las Nanopartículas

Crecimiento radial

Las figuras 11 y 12 presentan las cinéticas de crecimiento radial de *A. parasiticus* y *F. verticillioides*, respectivamente. Las mediciones del radio de la colonia en cada hongo se realizaron hasta que la colonia de ellos cubrió el 100 % de la superficie de la placa del control Czapek (96 y 168 h para *F. verticillioides* y *A. parasiticus*,

respectivamente). En estas gráficas se observó que el crecimiento micelial de ambos hongos en presencia de las nanopartículas de QT-AE's, es similar al del control Czapek, en donde los hongos crecen con normalidad. Sin embargo, se encontró que el porcentaje de inhibición de las NP's de QT-AEC fue significativamente distinto ($p < 0.05$) a las NP's de QT-AET y el control Czapek en las primeras 24 h de incubación (Tabla 7). A las 48 h de incubación, la inhibición del crecimiento en ambos hongos es menor del 15 % y posterior a este tiempo, no hubo diferencia significativa entre las NP's y el control Czapek.

De todos los tratamientos, fue el control con QT el que causó mayor efecto inhibitorio en el crecimiento radial de *A. parasiticus* en las primeras 72 h de incubación. Sin embargo, posterior a este tiempo, fue superado por el AET (43.2% a las 168 h de incubación). Esto indica que tanto *A. parasiticus* como *F. verticillioides*, se adaptan con mayor rapidez a la presencia de las NP's de QT-AE's que al quitosano y a los aceites esenciales por separado. Esto también se refleja en los otros parámetros cinéticos de crecimiento, los cuales se presentan en la Tabla 8. Se observó que el AET por sí solo, disminuyó considerablemente el crecimiento específico máximo alcanzado durante la fase estacionaria (A) de *A. parasiticus*, así como su velocidad de crecimiento (V_{max}). Por otro lado, el quitosano causó un incremento en la duración de la fase lag de este hongo. En presencia de las NP's de QT-AE's, el comportamiento del hongo es similar a la del control Czapek. Este mismo efecto del AET fue observado en el crecimiento de *F. verticillioides*.

Un efecto antagonista parece presentarse entre los AE's y el QT a causa de las posibles interacciones entre los grupos amino del quitosano (cargados positivamente) y los grupos hidroxilo presentes en los compuestos fenólicos de los AE's (cargados negativamente), ya que pueden formarse puentes de hidrógeno entre ellos. Al ser el NH_2^+ y el OH^- los grupos funcionales responsables de las propiedades antimicrobianas del QT y de los AE's, respectivamente, estas posibles interacciones resultarían en la disminución de dichos grupos funcionales disponibles en la superficie de las nanopartículas para interactuar con la célula fúngica y producir un efecto en ella (Sotelo-Boyás y col., 2017). Asimismo, ha sido reportado que el Tween 80 (surfactante

utilizado durante el proceso de síntesis de las nanopartículas) parece tener un efecto negativo en la actividad antimicrobiana de los AE's. Esto se le puede atribuir a la unión hidrofóbica entre el Tween 80 y los AE's, la cual causa una reducción de la cantidad de AE disponible para interactuar con los microorganismos (Ma y col., 2016).

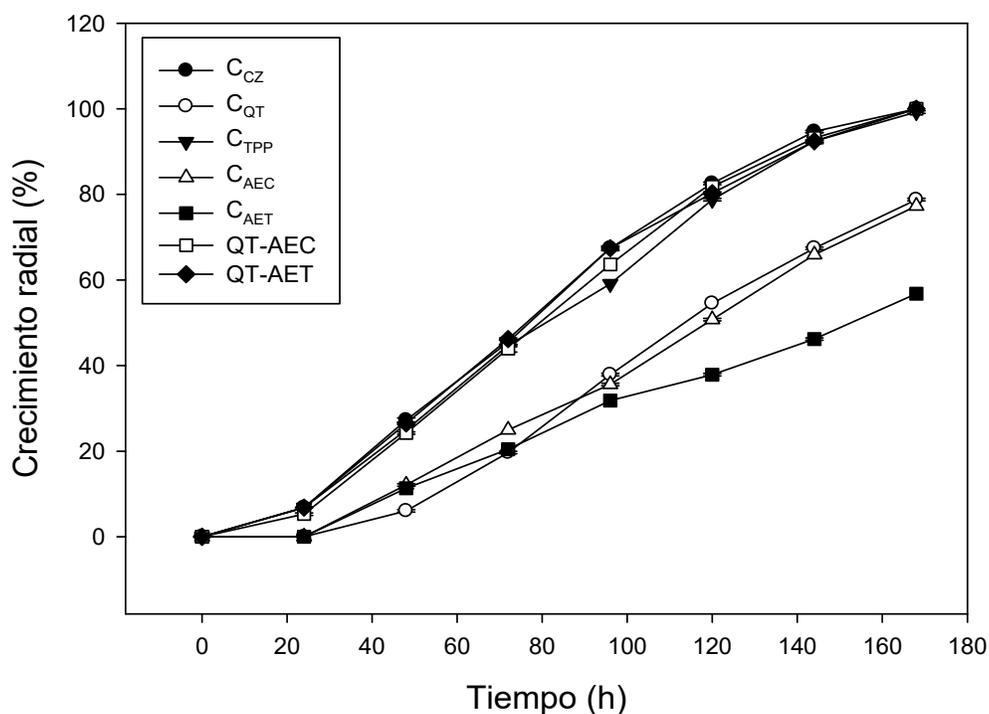


Figura 11. Cinética de crecimiento radial de *A. parasiticus* en presencia de las nanopartículas QT-AE's. C_{CZ}: control Czapek. C_{QT}: control quitosano. C_{TPP}: control tripolifosfato. C_{AEC}: control aceite esencial de canela. C_{AET}: control aceite esencial de tomillo. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

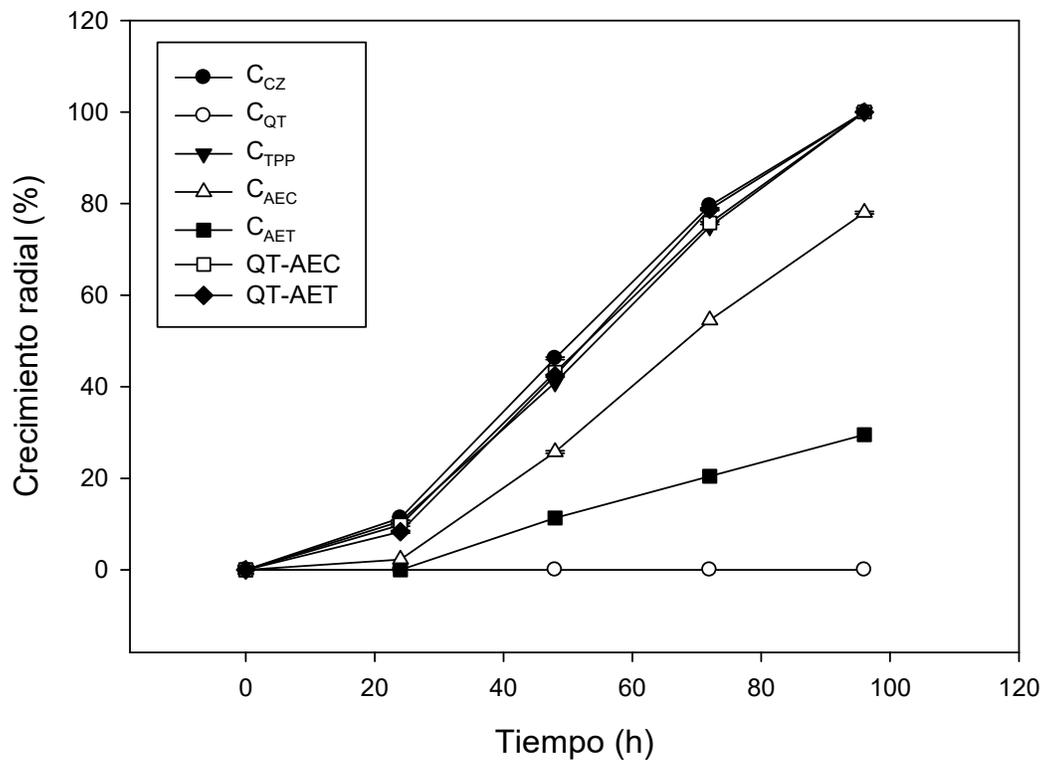


Figura 12. Cinética de crecimiento radial de *F. verticillioides* en presencia de las nanopartículas QT-AE's. C_{CZ}: control Czapek. C_{QT}: control quitosano. C_{TPP}: control tripolifosfato. C_{AEC}: control aceite esencial de canela. C_{AET}: control aceite esencial de tomillo. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *A. parasiticus* y *F. verticillioides* por las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales (QT-AE) en su CI₅₀.

Tratamiento (ppm)	Tiempo de incubación (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>A. parasiticus</i>							
C _{CZ}	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
C _{QT}	100.0 ± 0.0 ^a	77.7 ± 5.3 ^a	56.5 ± 4.8 ^a	43.8 ± 0.9 ^c	33.9 ± 1.0 ^b	28.8 ± 2.1 ^b	21.2 ± 1.3 ^b
C _{TPP}	0.0 ± 0.0 ^c	11.9 ± 5.0 ^c	3.3 ± 2.8 ^c	12.3 ± 1.7 ^d	4.6 ± 1.6 ^c	3.6 ± 1.7 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
C _{AEC}	100.0 ± 0.0 ^a	55.4 ± 5.8 ^b	44.9 ± 2.8 ^b	47.2 ± 0.9 ^b	38.5 ± 2.2 ^b	30.4 ± 1.0 ^b	22.7 ± 0.0 ^b
C _{AET}	100.0 ± 0.0 ^a	58.1 ± 3.5 ^b	54.9 ± 2.3 ^a	52.8 ± 0.9 ^a	54.1 ± 1.4 ^a	51.2 ± 1.2 ^a	43.2 ± 0.0 ^a
QT-AEC	33.3 ± 0.0 ^b	10.9 ± 3.9 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	5.6 ± 1.9 ^e	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
QT-AET	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^f	4.1 ± 1.9 ^c	3.6 ± 1.7 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
<i>F. verticillioides</i>							
C _{CZ}	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^d	-	-	-
C _{QT}	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	-	-	-
C _{TPP}	0.0 ± 0.0 ^c	11.4 ± 2.5 ^d	5.7 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	-	-	-
C _{AEC}	80.0 ± 0.0 ^a	44.2 ± 3.9 ^c	31.4 ± 0.0 ^c	22.0 ± 1.3 ^c	-	-	-
C _{AET}	100.0 ± 0.0 ^a	75.4 ± 0.7 ^b	74.3 ± 0.0 ^b	70.5 ± 0.0 ^b	-	-	-
QT-AEC	22.2 ± 19.2 ^{bc}	6.5 ± 2.6 ^{ad}	4.8 ± 1.6 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	-	-	-
QT-AET	0.0 ± 0.0 ^c	8.2 ± 2.8 ^{ad}	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^d	-	-	-

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores dentro de la misma columna para un mismo hongo. C_{CZ}: control Czapek. C_{QT}: control quitosano. C_{TPP}: control tripolifosfato. C_{AEC}: control aceite esencial de canela. C_{AET}: control aceite esencial de tomillo. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Tabla 8. Parámetros cinéticos del crecimiento radial de ambos hongos en presencia de las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales (QT-AE's), estimados mediante el modelo de Gompertz.

<i>A. parasiticus</i>				
Tratamiento	A	v_m	λ	R ²
C _{CZ}	24.34 ± 0.45	0.20 ± 0.01	21.57 ± 1.42	0.9985
C _{QT}	20.71 ± 0.49	0.17 ± 0.00	47.46 ± 1.06	0.9992
C _{TPP}	25.60 ± 0.72	0.18 ± 0.01	20.85 ± 1.70	0.9981
C _{AEC}	24.06 ± 1.72	0.14 ± 0.00	37.54 ± 2.04	0.9969
C _{AET}	15.27 ± 1.21	0.10 ± 0.01	28.60 ± 3.34	0.9925
QT-AEC	24.51 ± 0.68	0.20 ± 0.01	24.53 ± 1.99	0.9972
QT-AET	24.04 ± 0.42	0.20 ± 0.01	21.03 ± 1.36	0.9987
<i>F. verticillioides</i>				
C _{CZ}	25.52 ± 0.26	0.36 ± 0.00	19.65 ± 0.71	0.9998
C _{QT}	-	-	-	-
C _{TPP}	28.06 ± 0.39	0.33 ± 0.00	21.04 ± 0.03	0.9999
C _{AEC}	21.78 ± 0.86	0.29 ± 0.01	29.54 ± 0.93	0.9991
C _{AET}	7.75 ± 0.64	0.11 ± 0.01	28.10 ± 2.37	0.9945
QT-AEC	26.75 ± 0.64	0.34 ± 0.01	20.91 ± 0.71	0.9994
QT-AET	25.49 ± 0.40	0.37 ± 0.01	23.15 ± 0.57	0.9996

Los valores representan la media de tres repeticiones ± el error estándar. Intervalos de confianza del 95%. C_{CZ}: control Czapek (sin tratamiento). C_{QT}: control quitosano. C_{TPP}: control tripolifosfato. C_{AEC}: control aceite esencial de canela. C_{AET}: control aceite esencial de tomillo. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo. A: es el crecimiento máximo alcanzado durante la fase estacionaria. v_m : velocidad de crecimiento específico máximo (1/0.5 días). λ : fase lag (0.5 días). R²: coeficiente de determinación.

Germinación y morfometría de esporas

La germinación de esporas es la primera etapa de la colonización fúngica en los sustratos (Kocevski y col., 2013). En la Tabla 9 se presenta el porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *A. parasiticus* con las nanopartículas de QT-AE's y los controles, siendo el control Czapek (C_{CZ}) el medio de cultivo sin ningún tratamiento. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los tratamientos, siendo el control quitosano (C_{QT}) el de mayor y más prolongada inhibición (97 % a las 24 h de incubación). Dentro de las nanopartículas, las de QT-AET causaron el mayor efecto inhibitorio hasta las 12 h de incubación (24.5 %), después de este tiempo ya no se presentó inhibición. Sin embargo, las de QT-AEC continuaron inhibiendo hasta las 24

h (22.4 %). En *F. verticillioides*, sólo fue posible contar y medir las esporas hasta las 12 h de incubación. En este tiempo se encontró que las nanopartículas de QT-AET demostraron tener mayor efecto inhibitorio (63.5 %). Esto implica que las nanopartículas afectan de distinta manera a cada especie de hongo, así como de sus etapas de desarrollo. Este efecto fue más marcado en la germinación de esporas que en el crecimiento radial. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los diámetros promedio de las esporas de *A. parasiticus* en presencia de las NP's de QT-AE's (Tabla 10). En *F. verticillioides* sólo se encontró diferencia en el largo de las esporas en presencia de las NP's de QT-AEC en las primeras 6 h de incubación.

Los resultados obtenidos, tanto en el crecimiento radial como en la germinación de esporas de ambos hongos, sugieren que no se logró obtener un sinergismo entre los AE's y el QT con respecto a la actividad antifúngica de las NP's con la formulación utilizada en el presente estudio. Probablemente la mayor proporción de Tween 80 utilizado en la elaboración de las NP's (78.4 % de la composición total de las NP's) en comparación con la de los AE's (13.94 %) y el QT (6.97 %), haya tenido un papel crucial en la disminución de la actividad antimicrobiana del sistema (QT-AE). Aunado a ello, la posible interacción entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos en los AE's y los grupos amino del QT, como se mencionó anteriormente, esté afectando la bioactividad de estos materiales. Sin embargo, es importante recalcar que las nanopartículas de QT-AE's si afectaron el desarrollo de ambas especies de hongos en las primeras horas de crecimiento y germinación.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de ambos hongos a distintos tiempos de incubación con las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales (QT-AE).

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)			
	6	12	18	24
<i>A. parasiticus</i>				
C _{CZ}	0 ^c	0 ^d	0 ^d	0 ^e
C _{QT}	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	96.5 ± 1.8 ^a	97.0 ± 4.3 ^a
C _{TPP}	52.8 ± 8.6 ^b	1.5 ± 2.1 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	17.1 ± 4.7 ^{de}
C _{AEC}	100.0 ± 0.0 ^a	58.3 ± 1.7 ^b	18.9 ± 6.9 ^c	72.3 ± 19.0 ^{bc}
C _{AET}	89.6 ± 1.9 ^a	41.7 ± 1.7 ^{bc}	58.8 ± 1.0 ^b	87.1 ± 1.1 ^b
QT-AEC	44.7 ± 21.6 ^b	14.5 ± 8.4 ^d	18.8 ± 6.3 ^c	22.4 ± 1.6 ^d
QT-AET	97.1 ± 4.2 ^a	24.5 ± 14.4 ^{cd}	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^e
<i>F. verticillioides</i>				
C _{CZ}	0 ^a	0 ^c	-	-
QT-AEC	0 ^a	31.0 ± 3.4 ^b	-	-
QT-AET	0 ^a	63.5 ± 11.2 ^a	-	-

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos y los controles dentro de la misma columna para el mismo hongo. C_{CZ}: control Czapek (sin tratamiento). QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Tabla 10. Diámetro promedio (μm) de esporas de *A. parasiticus* a distintos tiempos de incubación con las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)			
	6	12	18	24
C _{CZ}	6.2 ± 0.0 ^a	6.8 ± 0.1 ^a	6.8 ± 0.0 ^{ab}	6.9 ± 0.1 ^{ab}
C _{QT}	5.4 ± 0.1 ^b	5.4 ± 0.9 ^b	5.4 ± 0.4 ^d	5.4 ± 1.4 ^c
C _{TPP}	5.9 ± 0.1 ^{ab}	7.7 ± 0.6 ^{ab}	6.5 ± 1.3 ^{bc}	6.0 ± 3.3 ^{abc}
C _{AEC}	6.0 ± 0.0 ^a	6.7 ± 1.0 ^a	7.0 ± 0.8 ^a	5.2 ± 0.5 ^{abc}
C _{AET}	6.0 ± 0.0 ^a	5.8 ± 2.1 ^a	6.2 ± 0.4 ^c	6.7 ± 0.8 ^{bc}
QT-AEC	5.9 ± 0.0 ^{ab}	6.9 ± 0.8 ^a	6.9 ± 0.7 ^{ab}	6.0 ± 0.7 ^a
QT-AET	6.0 ± 0.0 ^a	6.6 ± 1.5 ^a	7.0 ± 1.6 ^a	7.1 ± 1.3 ^a

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos y los controles dentro de la misma columna. C_{CZ}: control Czapek (sin tratamiento). C_{QT}: control quitosano. C_{TPP}: control tripolifosfato. C_{AEC}: control aceite esencial de canela. C_{AET}: control aceite esencial de tomillo. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Tabla 11. Ancho y longitud promedio (μm) de esporas de *F. verticillioides* a distintos tiempos de incubación con los tratamientos.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)			
	6		12	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
C _{CZ}	15.42 \pm 5.85 ^b	3.46 \pm 0.88 ^{ab}	19.68 \pm 6.37 ^a	4.12 \pm 0.79 ^a
QT-AEC	18.06 \pm 5.75 ^a	3.85 \pm 1.24 ^a	18.22 \pm 4.71 ^a	3.93 \pm 0.75 ^a
QT-AET	15.42 \pm 5.34 ^b	3.45 \pm 0.83 ^b	18.42 \pm 6.15 ^a	4.00 \pm 0.77 ^a

Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos y el control dentro de la misma columna. C_{CZ}: control Czapek. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Conteo de septos en hifas

Los resultados obtenidos del número de septos en hifas de *A. parasiticus* en presencia de las nanopartículas de QT-AE's se presentan en la Figura 13. Se observó que hubo presencia de hifas septadas y no septadas (cenocíticas) a las 12 h de incubación, tanto en el control como en los tratamientos. Se encontró mayor porcentaje de hifas no septadas en el control Czapek (C_{CZ}) y en el tratamiento con las nanopartículas de QT-AEC (31.5 y 33.3 %, respectivamente). En las nanopartículas de QT-AET, se presentó mayor número de hifas con dos septos (27.8 %). Se ha reportado que el quitosano por sí sólo es capaz de retrasar la formación de septos en hifas de *A. parasiticus* (Cota-Arriola y col., 2011). En el presente estudio, no se observó un efecto de las nanopartículas de QT-AE's en la formación de septos en las hifas de este hongo, probablemente por las posibles interacciones que hayan podido formarse entre los AE's, el quitosano y el Tween 80, como ya se ha reportado anteriormente. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que hayan reportado el efecto de nanopartículas de quitosano con aceites esenciales en la formación de septos en hifas de este hongo.

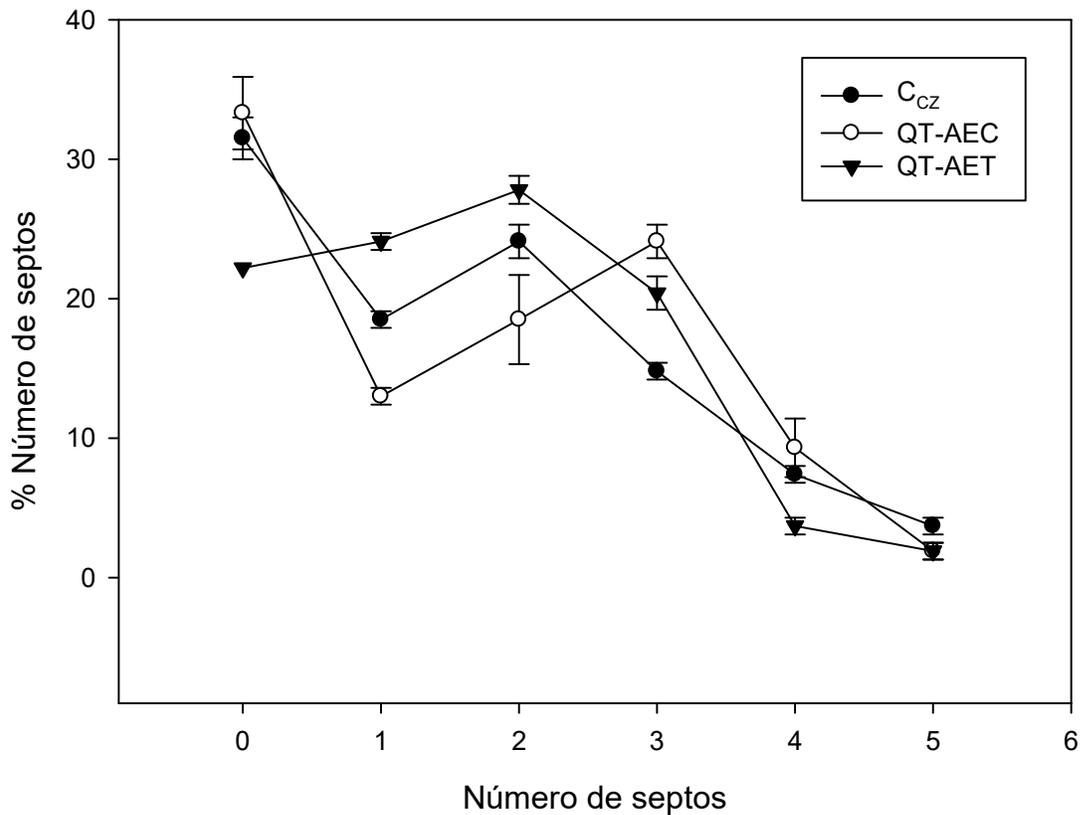


Figura 13. Número de septos en hifas de *A. parasiticus* en presencia de las nanopartículas QT-AE's. C_{CZ}: control Czapek. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

Producción de fumonisinas y aflatoxinas totales

En la tabla 12 se presentan los resultados de la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales en grano de maíz quebrado. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, sólo con respecto al control maíz (sin el hongo). Contrario a lo que se esperaba, las nanopartículas de QT-AE's no causaron efecto antimicotoxigénico. Pocos estudios se tienen hasta la fecha sobre la evaluación de bionanomateriales a base de quitosano con aceites esenciales en la producción de micotoxinas. López-Meneses y col. (2018) evaluaron nanopartículas de quitosano con

aceite esencial de *Schinus molle* a 62.5, 125, 250 y 500 ppm en la producción de aflatoxinas totales, reportando efecto inhibitorio a las mayores concentraciones. Por otro lado, Dwivedy y col. (2018), evaluaron el efecto del aceite esencial de *Illicium verum* nanoencapsulado en quitosano en la producción de aflatoxina B₁ (AFB₁) en pistachos por *A. flavus*. Los autores encontraron que éste logró suprimir la producción de la AFB₁ a 0.2 µL/mL que el AE sin encapsular. Cabe destacar que la concentración de quitosano que utilizaron fue mayor (1.5 %) a la que se reporta en el presente estudio (0.2 %). Estas variaciones en la formulación de nanomateriales impacta directamente en la actividad biológica que pueden presentar, debido a las posibles interacciones que pueden surgir entre los compuestos utilizados y la disponibilidad de los grupos funcionales responsables de su bioactividad.

Tabla 12. Concentración de fumonisinas (FB's) y aflatoxinas (AF's) totales en maíz quebrado después de 16 días de incubación.

Tratamiento	Concentración de FB's totales (ppm)	Concentración de AF's totales (ppb)
C _{MAÍZ}	0.7 ± 0.6 ^b	1.0 ± 1.7 ^b
C _{AGUA}	2.6 ± 0.5 ^{ab}	1566.7 ± 57.7 ^a
C _{QT}	5.5 ± 2.3 ^a	1233.3 ± 57.7 ^a
C _{TPP}	3.1 ± 2.7 ^{ab}	1433.3 ± 115.5 ^a
C _{AEC}	3.3 ± 0.7 ^{ab}	1200.0 ± 100.0 ^a
C _{AET}	1.4 ± 0.4 ^b	1333.3 ± 57.7 ^a
QT-AEC	3.6 ± 0.6 ^{ab}	1266.7 ± 152.8 ^a
QT-AET	3.9 ± 1.2 ^{ab}	1333.3 ± 351.2 ^a

Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras minúsculas representan diferencia significativa (p<0.05) entre los tratamientos y los controles dentro de la misma columna. C_{MAÍZ}: control maíz. C_{AGUA}: control agua. C_{QT}: control quitosano. C_{TPP}: control tripolifosfato. C_{AEC}: control aceite esencial de canela. C_{AET}: control aceite esencial de tomillo. QT-AEC: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de canela. QT-AET: nanopartículas de quitosano y TPP con aceite esencial de tomillo.

CONCLUSIONES

Las nanopartículas de quitosano con aceites esenciales sintetizadas por gelificación ionotrópica presentaron forma irregular y tendencia a la agregación, así como diámetros inferiores a 40 nm. En comparación, las nanopartículas de quitosano sin aceite esencial presentaron forma esférica y mayor dispersión entre ellas, así como diámetros mayores a los 90 nm. Esto indica la manera en el que el tipo de AE influye en el tamaño y morfología de las partículas.

Por otro lado, la evaluación antifúngica y antimicotoxigénica mostró que las nanopartículas de QT-AEC y de QT-AET no presentaron sinergismo entre el quitosano con los AE's. Sin embargo, tanto las nanopartículas de QT-AEC como de QT-AET, demostraron tener efecto inhibitorio en el crecimiento radial y en la germinación de esporas de *A. parasiticus* y *F. verticillioides* en las primeras horas de incubación, siendo ambos hongos más susceptibles a las nanopartículas en la fase de germinación de esporas. Cabe destacar que hasta la fecha no existen muchos estudios que evalúen el efecto de este tipo de nanomateriales en la germinación de esporas y la producción de toxinas de *A. parasiticus* y *F. verticillioides*.

Asimismo, se observó que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y el quitosano se vio afectada por la cantidad de Tween 80 utilizada en la formulación de las nanopartículas de QT-AE's. Es por ello que, es importante realizar varias pruebas en la formulación de nanomateriales con actividad biológica, ya que pequeñas diferencias en la concentración de un material pueden modificar la actividad de otro.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, es altamente recomendable probar diferentes formulaciones de un nanomaterial con actividad biológica. Es importante analizar la variación de la concentración de cada compuesto, así como la proporción en la que se encuentra con respecto a los otros, principalmente aquellos compuestos biológicamente activos. Lo anterior debido a que impactará directamente en la cantidad de grupos funcionales reactivos que son causantes de dicha actividad biológica. Además, realizar su caracterización fisicoquímica y en base a ello, seleccionar el que sea más estable para evaluarlo en ensayos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 24(2), e51-e56.
- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Barasoain, I., Bernabé, M., & Leal, J. A. (2000). An acidic water-soluble cell wall polysaccharide: a chemotaxonomic marker for *Fusarium* and *Gibberella*. *Mycological Research*, 104(5), 603-610.
- Alagawany, M., El-Hack, M. A., Farag, M. R., Tiwari, R., & Dhama, K. (2015). Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health-a review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2s), 73-84.
- Arita, C., Calado, T., Venâncio, A., Lima, N., & Rodrigues, P. (2014). Description of a strain from an atypical population of *Aspergillus parasiticus* that produces aflatoxins B only, and the impact of temperature on fungal growth and mycotoxin production. *European Journal of Plant Pathology*, 139(4), 655-661.
- Arrúa-Alvarenga, A. A., Moreno-Martínez, E., Quesada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Vázquez-Badillo, M. E., & Flores Olivas, A. (2012). *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(5), 1047-1052.
- Bajpai, V. K., Shukla, S., & Kang, S. C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology*, 99(18), 8903-8908.
- Barrera-Necha, L. L., Garduno-Pizana, C., & Garcia-Barrera, L. J. (2009). *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal*, 8(1), 17-21.

- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77-83.
- Bennett, J., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114(1), 355-362.
- Bullerman, L. B. (1996). Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In *Fumonisin in food* (pp. 27-38). Springer, Boston, MA.
- Campaniello, D., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1124-1128.
- Chaves, T. P., Pinheiro, R. E. E., Melo, E. S., Soares, M. J. D. S., Souza, J. S. N., de Andrade, T. B., de Lemos, T. L. G. & Coutinho, H. D. (2018). Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops and Products*, 112, 70-74.
- Chen, Y., Chen, Q., Han, M., Zhou, J., Gong, L., Niu, Y., Zhang, Y., He, L. & Zhang, L. (2016). Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. *Food Chemistry*, 213, 478-484.
- Cortez-Rocha, M. O., Parra-Vergara, N. V., & Sánchez-Mariñez, R. I. (2012). Hongos de importancia en granos y productos almacenados. En: *Nuevas tendencias en ciencia y tecnología de alimentos: Tópicos selectos*. Eds: Burgos-Hernández A, Cortez Rocha MO, Robles Sánchez M, Plascencia Jatomea M., y González Aguilar GA. Edit. Trillas, S.A. México, D. F. Pp 383, 386, 391 y 395.

- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., López-Franco, Y. L., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, 60(6), 937-944.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Lizardi-Mendoza, J., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R. M., & Plascencia-Jatomea, M. (2013). Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(4), 971-980.
- da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14.
- Džamić, A. M., Nikolić, B. J., Giweli, A. A., Mitić-Ćulafić, D. S., Soković, M. D., Ristić, M. S., Knežević-Vukčević, J. B. & Marin, P. D. (2015). Libyan *Thymus capitatus* essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 389-399.
- Degola, F., Morcia, C., Bisceglie, F., Mussi, F., Tumino, G., Ghizzoni, R., Pelosi, G., Terzi, V., Buschini, A., Restivo, F. M., & Lodi, T. (2015). *In vitro* evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 200: 104-111.
- Du, W. L., Niu, S. S., Xu, Y. L., Xu, Z. R., & Fan, C. L. (2009). Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 385-389.
- Duncan, K. E., & Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(1), 6-16.
- Dwivedy, A. K., Singh, V. K., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulated *Illicium verum* Hook. f. essential oil as an effective novel plant-based

- preservative against aflatoxin B1 production and free radical generation. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 102-113.
- El-Aziz, A. R. A., Al-Othman, M. R., Al-Sohaibani, S. A., Mahmoud, M. A., & Murugan, K. (2012). Prevention of aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus* through aqueous plant extracts in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*, 6(41), 6931-6935.
- Elaissi, A., Medini, H., Larbi Khouja, M., Simmonds, M., Lynene, F., Farhat, F., Chemli, R., & Harzallah-Skhiri, F. (2010). Variation in volatile leaf oils of eleven *Eucalyptus* species harvested from Korbous arboreta (Tunisia). *Chemistry & Biodiversity*, 7(7), 1841-1854
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Fandohan, P., Gbenou, J. D., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W. F., & Wingfield, M. J. (2004). Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6824-6829.
- Feyzioglu, G. C., & Tornuk, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 70, 104-110.
- Frankova, A., Smid, J., Bernardos, A., Finkousova, A., Marsik, P., Novotny, D., Legarová, V., Pulkrabek, J., & Kloucek, P. (2016). The antifungal activity of essential oils in combination with warm air flow against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Food Control*, 68, 62-68.
- Gacem, M. A., & El Hadj-Khelil, A. O. (2016). Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), 808-814.

- Geary, P. A., Chen, G., Kimanya, M. E., Shirima, C. P., Oplatowska-Stachowiak, M., Elliott, C. T., Michael, N. R., & Gong, Y. Y. (2016). Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. *Food Control*, *68*, 337-343.
- Ghaffar, A., Yameen, M., Kiran, S., Kamal, S., Jalal, F., Munir, B., Saleem, S., Rafiq, N., Ahmad, A., Saba, I., & Jabbar, A. (2015). Chemical composition and *in-vitro* evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils extracted from seven eucalyptus species. *Molecules*, *20*(11), 20487-20498.
- Gupta, S. A., Gaikwad, A. S., & Mahajan, A. M. (2017). Tween-80 based ultra low-k (ULK) mesoporous films. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, *28*(19), 14763-14768.
- Hernández-Téllez, C. N., Rodríguez-Córdova, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., & Plascencia-Jatomea, M. (2017). Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1, 3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech*, *7*(5), 279.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 50-56.
- Hove, M., de Boevre, M., Lachat, C., Jacxsens, L., Nyanga, L. K., & de Saeger, S. (2016). Occurrence and risk assessment of mycotoxins in subsistence farmed maize from Zimbabwe. *Food Control*, *69*, 36-44.
- Hu, J., Zhang, Y., Xiao, Z., & Wang, X. (2018). Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. *Industrial Crops and Products*, *122*, 85-92.
- Huang, Y., Chapman, B., Wilson, M., & Hocking, A. D. (2009). Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination

and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1), 179-185.

IARC-WHO, 2002. Chemical agents and related occupations. Volume 100 F. "A review of carcinogens". IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 225–248.

Jayaprakasha, G. K., Negi, P. S., Jena, B. S., & Rao, L. J. M. (2007). Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 330-336.

Jayaprakasha, G. K., & Rao, L. J. M. (2011). Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 547-562.

Jonassen, H., Kjøniksen, A. L., & Hiorth, M. (2012). Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 13(11), 3747-3756.

Juglal, S., Govinden, R., & Odhav, B. (2002). Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection*, 65(4), 683-687.

Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol - from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981.

Keawchaon, L., & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 163-171.

Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M. & Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 502-508.

Kiilll, C. P., da Silva Barud, H., Santagneli, S. H., Ribeiro, S. J. L., Silva, A. M., Tercjak, A., Gutierrez, J., Pironi, A. M. & Gremião, M. P. D. (2017). Synthesis and factorial

design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1695-1702.

Kocevski, D., Du, M., Kan, J., Jing, C., Lačanin, I., & Pavlović, H. (2013). Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. *Journal of Food Science*, 78(5), M731-M737.

Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R. H., Grayburn, W. S., & Calvo, A. M. (2006). FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1418-1432.

López-Meneses, A. K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Rosas-Burgos, E. C., Luque-Alcaraz, A. G., & Cortez-Rocha, M. O. (2015). Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. *Food Science and Technology*, 35(4), 664-671.

López-Meneses, A. K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Rodríguez-Félix, F., Mouriño-Pérez, R. R., & Cortez-Rocha, M. O. (2018). *Schinus molle* L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT-Food Science and Technology*, 96, 597-603.

Luo, Y., Liu, X., & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins- A review. *Food Control*, 89, 123-132.

Luque-Alcaraz, A. G., Cortez-Rocha, M. O., Velázquez-Contreras, C. A., Acosta-Silva, A. L., Santacruz-Ortega, H. D. C., Burgos-Hernández, A., Argüelles-Monal, W. M. & 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*, 2016(38). Article ID 6060137, 10 Pages.

- Ma, Q., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2016). Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 20-25.
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., Yépiz-Gómez, M. S. & Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315.
- Meyer, V., Wu, B., & Ram, A. F. (2011). *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters*, 33(3), 469-476.
- Moeini, A., Cimmino, A., Dal Poggetto, G., Di Biase, M., Evidente, A., Masi, M., Lavermicocca, P., Valerio, F., Leone, A., Santagata, G. & Malinconico, M. (2018). Effect of pH and TPP concentration on chemico-physical properties, release kinetics and antifungal activity of Chitosan-TPP-Ungeremine microbeads. *Carbohydrate Polymers*, 195, 631-641.
- Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S. M. (2015). Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 73-80.
- Mubarak, E. E., Ali, L. Z., Ahmed, I. F. A., & Ali, A. B. (2015). Essential oil compositions and cytotoxicity from various organs of *Eucalyptus camaldulensis*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17(2), 320-326.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061-1066.

- Nabavi, S., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., & Daglia, M. (2015). Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7(9), 7729-7748.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania. 203 p.
- O'Callaghan, K. A. & Kerry, J. P. (2016). Preparation of low-and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. *Food Control*, 69, 256-261.
- Oueslati, S., Romero-González, R., Lasram, S., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2012). Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2376-2381.
- Padrón, M., Yuef, H., Hernández Delgado, S., Reyes Méndez, C. A., & Vázquez Carrillo, G. (2013). El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126-146.
- Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S., Gandhi, M. R., Shajahan, A., Ganesan, P., Packiam, S. M., & Al-Dhabi, N. A. (2017). Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1813-1819.
- Pietro, J. A., Patiño, O. J., Plazas, E. A., Pabón, L. C., Ávila, M. C., Guzmán, J. D., Delgado, W. A., & Cuca, L. E. (2013). Natural products from plants as potential source agents for controlling *Fusarium*. Chapter 10. Fungicides-Showcases of

- Integrated Plant Disease Management from Around the World. Nita, M. (Ed). Croacia: Intech, 233-78.
- Pillai, P., & Ramaswamy, K. (2012). Effect of naturally occurring antimicrobials and chemical preservatives on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 228-233.
- Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73-78.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., & Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 582-586.
- Qing, W., Zuo, J. H., Qian, W., Yang, N. A., & Gao, L. P. (2015). Inhibitory effect of chitosan on growth of the fungal phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*, and sclerotinia rot of carrot. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(4), 691-697.
- Raafat, D., von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764-3773.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F., & Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101-2105.
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. (2017). Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Ridenour, J. B., & Bluhm, B. H. (2014). The HAP complex in *Fusarium verticillioides* is a key regulator of growth, morphogenesis, secondary metabolism, and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 69, 52-64.

- Russo, M., Serra, D., Suraci, F., & Postorino, S. (2012). Effectiveness of electronic nose systems to detect bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) essential oil quality and genuineness. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 137-151.
- Said, Z. B. O. S., Haddadi-Guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Remini, H., Adjaoud, A., Khaled, K. N. & Madani, K. (2016). Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*, 89, 167-175.
- Secretaría de Salud. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, 11.
- Shim, W. B., & Woloshuk, C. P. (2001). Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1607-1612.
- Shuaib, F. M., Ehiri, J., Abdullahi, A., Williams, J. H., & Jolly, P. E. (2010). Reproductive health effects of aflatoxins: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 29(3), 262-270.
- Simsek, U. G., Çiftçi, M., Doğan, G. & Özçelik, M. (2013). Antioxidant activity of cinnamon bark oil (*Cinnamomum zeylanicum* L.) in Japanese quails under thermo neutral and heat stressed conditions. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(5).
- Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., El-Din, M. M., & Massoud M. A. (2013). Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3: 48-55.
- Soriano, J. M., & Dragacci, S. (2004). Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International*, 37(10), 985-1000.

- Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 15-20.
- Souza, J. M., Caldas, A. L., Tohidi, S. D., Molina, J., Souto, A. P., Fangueiro, R., & Zille, A. (2014). Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(6), 691-698.
- Stark, A. A. 2009. Molecular mechanism of detection of aflatoxins and other mycotoxins. En: *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Rai, M. & Varma, A. (Ed). Springer Berlin Heidelberg. 21-37 p.
- Sultana, B., Naseer, R., & Nigam, P. (2015). Utilization of agro-wastes to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus parasiticus*: A biotreatment of three cereals for safe long-term storage. *Bioresource Technology*, 197, 443-450.
- Tao, F., Yao, H., Hruska, Z., Burger, W., Rajasekaran, K., & Bhatnagar, D. (2018). Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 65-81.
- Thandapani, G., Prasad, S., Sudha, P. N., & Sukumaran, A. (2017). Size optimization and *in vitro* biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1794-1806.
- Trebak, F., Alaoui, A., Alexandre, D., El Ouezzani, S., Anouar, Y., Chartrel, N., & Magoul, R. (2015). Impact of aflatoxin B1 on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior. *Neurotoxicology*, 49, 165-173.
- Tulini, F. L., Souza, V. B., Echalar-Barrientos, M. A., Thomazini, M., Pallone, E. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): Potential for increasing antioxidant content in functional foods for diabetic population. *Food Research International*, 85, 10-18.

- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3274-3280.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Studies in Mycology*, 69, 57-80.
- Villegas-Rascón, R. E., López-Meneses, A. K., Plascencia-Jatomea, M., Cota-Arriola, O., Moreno-Ibarra, G. M., Castellón-Campaña, L. G., Sánchez-Mariñez, R. I. & Cortez-Rocha, M. O. (2018). Control of mycotoxigenic fungi with microcapsules of essential oils encapsulated in chitosan. *Food Science and Technology*, 38(2), 335-340.
- Voss, K. A., Smith, G. W., & Haschek, W. M. (2007). Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), 299-325.
- Windels, C. E. (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90(1), 17-21.
- Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 578-585.
- Wu, T., Wu, C., Fu, S., Wang, L., Yuan, C., Chen, S., & Hu, Y. (2017). Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 155, 192-200.
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X., & Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 569-588.

Ying, L., Ren, X., & Liang, J. (2015). Antibacterial modification of cellulosic materials. *BioResources*, 10(1), 1964-1985.

Zhao, Z., Liu, N., Yang, L., Wang, J., Song, S., Nie, D., Wang, J., Yang, X., Hou, J., Wu, A. & Wu, A. (2015). Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. *Food Control*, 57, 362-369.