

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

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Síntesis, caracterización parcial y evaluación de la actividad biológica de biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico para el control *in vivo* e *in vitro* de *Aspergillus niger*

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

Q.A. Alma Carolina Gálvez Iriqui

Hermosillo, Sonora

Enero de 2017

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

Síntesis, caracterización parcial y evaluación de la actividad biológica de biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico para el control *in vivo* e *in vitro* de *Aspergillus niger*

Autora

Q. A. Alma Carolina Gálvez Iriqui

Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Directora de la tesis

Dr. Mario Onofre Cortez Rocha

Miembro del comité de tesis

Dr. Armando Burgos Hernández

Miembro del comité de tesis

Dra. Montserrat Calderón Santoyo

Miembro del comité de tesis

Hermosillo, Sonora

Enero de 2017

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias 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

Autora

Q.A. Alma Carolina Gálvez Iriqui

Coordinador del Programa

Dr. Enrique Márquez Ríos

Hermosillo, Sonora

Enero de 2017

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la Universidad de Sonora y a sus maestros por brindarme las herramientas necesarias para poder seguir mis estudios de posgrado.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por permitirme realizar las actividades experimentales necesarias para la presente investigación. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A. C.) de la ciudad de Guaymas y Hermosillo por su colaboración para la caracterización fisicoquímica realizada. A la Dra. Montserrat Calderón Santoyo investigadora titular del Laboratorio de Microbiología de la unidad de investigación en alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic (ITT) por abrirme sus puertas y apoyarme con sus conocimientos para la realización del trabajo experimental *in vivo*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Investigación (CoNACYT) por brindar su confianza en esta investigación y apoyarme hasta el final de mis estudios de maestría.

A la Dra. Maribel Plascencia Jatomea por su valiosa colaboración en la dirección de la presente tesis, por su dedicación, paciencia y principalmente por permitirme ser parte de este proyecto.

Por último, a los miembros del comité por su dedicación y compromiso con la presente investigación. A mi familia y amigos por sus innumerables muestras de apoyo.

DEDICATORIA

For future research students:

Every single day we made decisions.

They can be unimportant or not... It's up to you.

But they can write the course of our history.

Caroline Gálvez

RESUMEN

Actualmente, la biotecnología se ha abierto paso en el diseño de sistemas micro y nanoestructurados con aplicación en el control de plagas y enfermedades en agricultura, en cuya formulación se han tratado de utilizar compuestos bioactivos con bajo impacto ambiental y baja toxicidad, como el quitosano y compuestos de origen microbiano. El objetivo de este trabajo fue sintetizar, caracterizar parcialmente y evaluar la actividad biológica de biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) para el control *in vivo* e *in vitro* de *Aspergillus niger*. Para la síntesis se utilizó el método de nanoprecipitación, agregando Tween 80 para aumentar la estabilidad a la agregación/aglomeración. La caracterización fisicoquímica consistió en análisis de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), dispersión dinámica de la luz (DLS) y espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR). Para la caracterización biológica se evaluó la toxicidad aguda con *Artemia salina* y la mutagenicidad mediante prueba de Ames utilizando *Salmonella typhimurium* (TA100 y TA98). Para determinar la actividad antifúngica *in vitro* se llevaron a cabo ensayos de viabilidad por XTT, cinéticas de germinación de esporas y crecimiento radial, morfometría y microscopía de fluorescencia utilizando biomarcadores; las pruebas *in vivo* se realizaron en tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma') y los tratamientos se aplicaron mediante aspersion. Los biocompositos QT-PCA presentaron un tamaño promedio y potencial Z de 502 ± 72 nm y $+54.7 \pm 15.0$ mV, respectivamente. El análisis ESEM mostró biocompositos bien distribuidos con tamaño <1 μ m. Los materiales sintetizados no inducen mutaciones en las cepas de *S. typhimurium*, además, tienen la capacidad de reducir la viabilidad de esporas en un 58 %, inhibir en un 12.5 % la germinación, incrementar el diámetro promedio de esporas e hifas y provocar estrés oxidativo, daño a la membrana y daño a la pared celular principalmente en etapas tempranas en el desarrollo de *A. niger*. En los ensayos *in vivo* se observó una inhibición del crecimiento del hongo en tomate hasta el quinto día de almacenamiento. Por lo anterior, estos materiales son candidatos prometedores para el control de hongos, principalmente en la industria de conservación de alimentos y en la industria agrícola.

CONTENIDO

APROBACIÓN	i
DERECHOS DE AUTOR	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Pérdidas de Cultivos por Plagas y Enfermedades	3
Importancia de la Contaminación por Hongos Fitopatógenos en Alimentos	4
Principales especies relacionadas con pérdidas pre y poscosecha	5
<i>Aspergillus spp</i>	5
Fisiología.....	5
<i>Aspergillus niger</i>	7
Métodos para el Control de Hongos	10
Métodos químicos de control	10
Extractos de plantas y aceites esenciales.....	10
Metabolitos secundarios de origen microbiano.....	11
Biopolímeros: Quitina y quitosano	14
Mecanismos de acción del quitosano.....	16
Biocompositos de Quitosano como Acarreadores de Compuestos Bioactivos	17
Materiales nano-estructurados a partir de polímeros	17
Biocompositos o materiales de origen biológico multicompuestos	17
Métodos de síntesis	18
Propiedades fisicoquímicas	20
Propiedades biológicas	26
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33

OBJETIVOS	34
General	34
Específicos	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Materiales	35
Síntesis de Biocompositos Quitosano-Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)	36
Elaboración de soluciones de quitosano	36
Nanoprecipitación.....	37
Caracterización Parcial de Biocompositos de Quitosano-Ácido Pirrol-2-Carboxílico (QT-PCA)	39
Microscopía electrónica de barrido ambiental	39
Dispersión dinámica de luz.....	39
Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier	39
Evaluación de la Toxicidad Aguda y Mutagenicidad de Biocompositos de Quitosano-Ácido Pirrol-2-Carboxílico (QT-PCA)	40
Toxicidad Aguda a <i>Artemia salina</i>	40
Mutagenicidad en <i>Salmonella</i> / Técnica de Ames	41
Evaluación de la Actividad Antifúngica <i>in-vitro</i> de Biocompositos de Quitosano-Ácido Pirrol-2-Carboxílico (QT-PCA)	42
Propagación de la cepa <i>Aspergillus niger</i> (NRRL-3).....	42
Suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i> (NRRL-3)	43
Viabilidad de esporas de <i>Aspergillus niger</i> por el método de XTT	43
Estimación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀)	44
Germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	44
Parámetros morfométricos.....	45
Microscopía de fluorescencia para el análisis de componentes celulares	46
Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i>	48
Evaluación de la Actividad Antifúngica <i>in vivo</i> de los Biocompositos de Quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) en <i>Solanum lycopersicum</i> 'Roma'	49
Propagación de la cepa <i>Aspergillus niger</i> (NRRL-3).....	49
Suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	50
Determinación de la concentración de esporas a utilizar y verificación de la patogenicidad sobre diferentes modelos de estudio.....	50
Aplicación de los tratamientos por el método de aspersión	51
Análisis Estadístico	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
Síntesis de Biocompositos de Quitosano- Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) por Nanoprecipitación.....	54
Nanoprecipitación.....	54

Caracterización Parcial Fisicoquímica de Biocompositos de QT-PCA.....	55
Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)	55
Tamaño hidrodinámico, potencial Z e índice de polidispersión	57
Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR).....	59
Evaluación de Toxicidad Aguda y Mutagenicidad de Biocompositos de Quitosano-Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)	62
Toxicidad aguda mediante el ensayo de <i>Artemia salina</i>	62
Mutagenicidad en cepas de <i>Salmonella</i> / Técnica de Ames	66
Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Biocompositos de Quitosano–Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)	69
Viabilidad de esporas de <i>Aspergillus niger</i> por el método de XTT y determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀).....	69
Estimación de la concentración media inhibitoria (CI ₅₀)	73
Germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano	74
Parámetros morfométricos de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de biocompositos de QT-PCA	77
Microscopía de fluorescencia para el análisis de componentes celulares	84
Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de biocompositos de QT-PCA	92
Evaluación <i>in-vivo</i> de los Biocompositos de Quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) en <i>Solanum lycopersicum</i> 'Roma'	95
Verificación de la patogenicidad sobre diferentes modelos de estudio	95
Efecto de biocompositos QT-PCA y partículas de QT sobre crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> 'Roma').....	100
CONCLUSIONES	107
RECOMENDACIONES.....	109
REFERENCIAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfología de diversas especies de <i>Aspergillus spp</i>	7
Figura 2	Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en agar papa dextrosa a 25 °C.....	8
Figura 3	Etapas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> : a) Germinación de espora y crecimiento polarizado del túbulo germinal para formación de hifa; b) Hifa desarrollada; c) Ramificación de hifas para formación de micelio.....	9
Figura 4	Estructura química del ácido pirrol-2-carboxílico.....	13
Figura 5	Estructura química de la quitina (parte de una cadena polimérica).....	14
Figura 6	Obtención a partir de la quitina por el método de desacetilación del quitosano y su estructura química (parte de una cadena polimérica; grupos aminos en el C2).....	15
Figura 7	Micrografía obtenida con ESEM de partículas de quitosano entrecruzadas con genipina donde se pueden observar partículas agregadas con superficie áspera (a) 350×; (b) 750×; (c) 2000×; (d) 5000×.....	22
Figura 8	a) Partículas de PLGA con distribución de tamaños uniforme monodispersa; b) Partículas de quitosano/PLGA 0.3% (p/v) distribución moderadamente polidispersa.....	24
Figura 9	Solución de quitosano completamente diluida en solución de ácido acético al 1% (v/v).....	36
Figura 10	Bomba peristáltica utilizada en la síntesis de biocompositos (QT-PCA) y partículas de quitosano con y sin adición de Tween 80 como agente surfactante.....	38
Figura 11	Matraz para eclosión de <i>Artemia salina</i> durante 24 h a 25 °C en agua salina bajo aireación y luz artificial.....	41
Figura 12	Microscopio invertido equipado con filtros de fluorescencia (Leica DMi8) y cámara enfriada DFC 450C (Leica).....	48
Figura 13	Cámara de crecimiento con monitoreo de humedad relativa y temperatura (Novatech, CA-550).....	51
Figura 14	Suspensión biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico obtenidas por el método de nanoprecipitación.....	54
Figura 15	Imágenes de ESEM de: A) nanopartículas de quitosano; A) biocomposito de QT-PCA. Ambas partículas se encuentran suspendidas en medio líquido Czapek inoculado con esporas de <i>Aspergillus niger</i> , después de 12 h de incubación a 28 ± 2 °C.....	56
Figura 16	Imágenes de ESEM de esporas de <i>Aspergillus niger</i> después de 12 h de incubación a 28 ± 2 °C, mostrando zonas polarizadas que indican el inicio de un crecimiento normal.....	56
Figura 17	Imágenes de ESEM de esporas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio adicionado con partículas de quitosano donde se observan cambios en su estructura, después de 12 h de incubación a 28 ± 2 °C.....	56

Figura 18	Dispersión de tamaños de partícula de: a) biocompositos quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico; b) partículas de quitosano. Ambas partículas sintetizadas sin Tween 80.....	57
Figura 19	Dispersión de tamaños de partícula de: a) partículas de quitosano; b) biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico. Ambas partículas sintetizadas adicionado Tween 80 al 0.05% (v/v) como agente surfactante.....	58
Figura 20	Espectros de infrarrojo de: a) ácido pirrol-2-carboxílico; b) partículas de quitosano/Tween 80; c) biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80, correspondiente a la región de 1900 a 1000 cm^{-1}	60
Figura 21	Reacción de amidación entre quitosano y un ácido carboxílico.....	61
Figura 22	Superficie de respuesta del porcentaje de supervivencia de <i>Artemia salina</i> expuesta a pH final monitoreado para cada concentración de partículas de quitosano y de biocompositos de QT-PCA.....	63
Figura 23	Porcentaje de supervivencia de <i>Artemias</i> expuestas a: a) biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico; b) partículas de quitosano; c) solución de ácido pirrol-2-carboxílico.....	64
Figura 24	Superficie de respuesta del porcentaje de supervivencia de <i>Artemia salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de partículas de quitosano y de biocompositos de QT-PCA. El pH final ajustado arriba de 4.....	65
Figura 25	Efecto mutágeno de biocompositos de QT-PCA y partículas de QT sobre cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100.....	68
Figura 26	Viabilidad de esporas de <i>A. niger</i> por el método de XTT. a) Partículas de quitosano y biocompositos de quitosano con ácido pirrol-2-carboxílico; b) Biocompositos y partículas quitosano adicionadas con Tween 80.....	70
Figura 27	Esporas e hifas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio con partículas de quitosano y quitosano-PCA, a 40x. a) Control, mostrando un crecimiento normal b) <i>A. niger</i> expuesto a biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico; c) Control Tween, mostrando un crecimiento normal del hongo; d) <i>A. niger</i> expuesto a biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80.....	72
Figura 28	Esporas e hifas de <i>Aspergillus niger</i> inoculado en medio con PCA, a 40x. a) Control, mostrando un crecimiento normal b) Esporas germinadas y no germinadas del hongo creciendo en presencia de ácido pirrol-2-carboxílico 100 $\mu\text{g/mL}$	73
Figura 29	Cinética de germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> expuestas a biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano adicionadas con Tween 80 al 0.05 % v/v durante la síntesis.....	75

Figura 30	Esporas germinadas y no germinadas, a 40x, de <i>Aspergillus niger</i> a las 12 h de incubación en medio adicionado con (a) partículas de quitosano, (b) biocompositos de QT-PCA/Tween 80 (c), ácido pirrol-2-carboxílico (c), y (d) control.).....	77
Figura 31	Cinética del efecto de partículas de quitosano y biocompositos de QT-PCA sobre el diámetro de esporas de <i>Aspergillus niger</i> durante 24 horas de incubación a 28 ± 2 °C.....	79
Figura 32	Cinética del efecto de partículas de quitosano y biocompositos de QT-PCA sobre el diámetro de hifas de <i>Aspergillus niger</i> durante 24 horas de incubación a 28 ± 2 °C.....	81
Figura 33	Cambios morfológicos en esporas germinadas de <i>Aspergillus niger</i> tras 12 h de exposición con: A) partículas de quitosano, B) biocompositos QT-PCA, C) ácido pirrol-2-carboxílico y D) control (pH 4.5-5).....	82
Figura 34	Imágenes de esporas control de <i>Aspergillus niger</i> durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C captadas a 40x. A, A2) Esporas en campo claro; B1, B2) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables y muertas; C) Tinción con Blanco de Calcoflúor; D) Tinción con yoduro de propidio.....	85
Figura 35	Imágenes de esporas de <i>Aspergillus niger</i> expuestas a ácido pirrol-2-carboxílico durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. A) Esporas en campo claro; B1, B2, B3) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables.....	86
Figura 36	Imágenes de esporas de <i>Aspergillus niger</i> expuestas a partículas de quitosano/Tween 80 durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. A1, A2, A3) Esporas en campo claro; B) Tinción con Blanco de Calcoflúor; C) Tinción con yoduro de propidio; D1, D2) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables; F) Tinción estrés oxidativo con 2,7-DCFH2-DA.....	89
Figura 37	Imágenes de esporas de <i>Aspergillus niger</i> expuestas a biocompositos de QT-PCA/Tween 80 durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. A1, A2) Esporas en campo claro; B) Tinción con Blanco de Calcoflúor; C) Tinción con yoduro de propidio; D1, D2) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables; F) Tinción estrés oxidativo con 2,7-DCFH2-DA; G) Tinción con yoduro de propidio.....	91
Figura 38	Cinética de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> expuesto a) biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (CI ₅₀ : 380 µg/mL y 450 µg/mL); b) partículas de quitosano (CI ₅₀ : 450 µg/mL y 590 µg/mL); c) ácido pirrol-2-carboxílico (PCA: 2mg/mL) y c) control con agua miliQ.....	93
Figura 39	Evolución del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en diferentes modelos de estudio; primera columna segundo día de inoculación, segunda columna cuarto día y tercer día sexto día de inoculación. En el caso del fruto de cebolla el tiempo de almacenamiento fue de 4 semanas.....	97

Figura 40	Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> sobre tomate saladette (<i>Solanum lycopersicum</i> 'Roma'): A) Inóculo de 10 ⁵ esporas/mL; B) Inóculo de 10 ⁶ esporas/mL.....	99
Figura 41	Conidióforo y conidios de <i>Aspergillus niger</i> desarrollados sobre tomate; A) Imagen captada a 10x y B) Imagen captada a 40x.....	99
Figura 42	Diámetro de la lesión producida por <i>Aspergillus niger</i> en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> 'Roma') durante 9 días de almacenamiento controlado.....	101
Figura 43	Porcentaje de reducción de la severidad provocada por el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> durante nueve días de almacenamiento controlado.....	102
Figura 44	Desarrollo de <i>Aspergillus niger</i> en tomate saladette (<i>Solanum lycopersicum</i> 'Roma') a los 3, 5, 7 y 9 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C con 80-95 % de humedad relativa.....	103
Figura 45	Porcentaje de reducción de heridas infectadas por <i>Aspergillus niger</i> en tomate durante 9 días de almacenamiento controlado.....	104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Valores aproximados del índice de polidispersión o dispersidad, según la técnica utilizada.....	24
Tabla 2	Concentración de los tratamientos evaluados por el método de viabilidad de esporas XTT.....	44
Tabla 3	Concentraciones inhibitorias medias de cada uno de los diferentes materiales, estimadas a partir de los datos experimentales <i>in-vitro</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> ...	52
Tabla 4	Tamaño hidrodinámico, índice de polidispersión y potencial Z para partículas de quitosano y biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico.....	57
Tabla 5	Resumen de señales características observadas en los espectros de FT-IR del biocomposito de QT-PCA/Tween 80, nanopartículas de quitosano/Tween 80 y ácido pirrol-2-carboxílico.....	60
Tabla 6	Valores de pH final para cada concentración de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico, partículas de quitosano y solución de ácido pirrol-2-carboxílico.....	63
Tabla 7	Valores de pH de las soluciones de agua de mar con diluyente, con y sin ajuste de pH.....	63
Tabla 8	Valores de pH final ajustado para cada concentración de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico, partículas de quitosano y solución de ácido pirrol-2-carboxílico (PCA).....	65
Tabla 9	Valores de pH de las soluciones de agua de mar con diluyente, con ajuste de pH y sin ajuste.....	65
Tabla 10	Efecto mutagénico de biocompositos de QT-PCA y partículas de QT sobre cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100.....	67
Tabla 11	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de materiales a base de quitosano.....	73
Tabla 12	Parámetros cinéticos de la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> expuestas a biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano adicionadas con Tween 80 al 0.05 % v/v durante la síntesis.....	73
Tabla 13	Efecto de biocompositos QT-PCA/Tween 80 y partículas de QT/ Tween 80 sobre la morfometría de esporas e hifas de <i>Aspergillus niger</i> durante la germinación en medio Czapek líquido, a 28 ± 2 °C.....	78

Tabla 14	Parámetros cinéticos de crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de biocompositos de quitosano (QT-PCA), partículas de quitosano (QT) y ácido pirrol-2-carboxílico (PCA).....	95
Tabla 15	Diámetro de lesión provocado por el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en tomate saladette expuestos a tratamientos de biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80 y partículas de quitosano/Tween 80 durante 9 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C y 85-90 % de H.R.....	101

INTRODUCCIÓN

La contaminación de cultivos provocada por el desarrollo de hongos se ha vuelto un problema importante a nivel mundial, ya que estos generan grandes pérdidas económicas por la baja calidad de los productos cosechados y por la contaminación con sustancias que ponen en riesgo la salud de los consumidores. A pesar de que los países invierten gran cantidad de dinero en el control de plagas y enfermedades, las pérdidas de cultivos en pre-cosecha y poscosecha en los países en vías de desarrollo provocados por plagas van de 40-50 % (Flood, 2010; FAO, 2013; Gustavsson *et al.*, 2011). Investigaciones recientes sugieren que debido a las condiciones climáticas actuales como el aumento en la temperatura global, el desarrollo de plagas de hongos e insectos en diferentes cultivos se verá favorecido. Aunado a esto, factores externos como la globalización, el crecimiento demográfico y la circulación del comercio contribuyen a su propagación alrededor del mundo, por lo que un efecto combinado de estos factores representa una seria amenaza para la seguridad alimentaria en pocos años (Bebber *et al.*, 2014).

Desde hace unos años, la sociedad científica se ha dado la tarea de desarrollar e investigar métodos naturales para el control de plagas que tengan un mínimo impacto en el medio ambiente. Sustancias como los extractos de plantas, aceites esenciales, metabolitos secundarios de origen microbiano e inclusive biopolímeros como el quitosano, han demostrado capacidad para controlar el crecimiento de una variedad de microorganismos como los hongos, específicamente del género *Aspergillus spp.* Sin embargo, cada uno de ellos presenta algunas limitantes relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas, tamaño, toxicidad y tiempo de biodegradación (Pawar y Thaker, 2006; Martínez-Camacho *et al.*, 2013; Surapuram *et al.*, 2014).

Es aquí donde la Nanotecnología ha jugado un papel importante, ya que ha podido resolver estas limitantes con el desarrollo de estrategias para obtener materiales con propiedades físicas y químicas mejoradas, tal es el caso de los biocompositos. Actualmente, el uso de biopolímeros como acarreadores de compuestos bioactivos tales como el quitosano, ha tenido gran auge en la industria agrícola como sistemas de liberación prolongada de fertilizantes y fungicidas. Además, también en la industria biomédica y farmacéutica para el control y diagnóstico de enfermedades

como cáncer, infecciones micóticas o bacterianas entre otras, en donde se han reportado excelentes resultados (Cota-Arriola *et al.*, 2013; Aloui *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015).

A raíz de esto se ha despertado la inquietud de conocer si estos materiales representan un riesgo a la salud, ya que en estudios recientes se ha visto que la exposición a nanopartículas de metales y nanomateriales de carbono, pueden generar estrés oxidativo a nivel celular. En el caso de los biocompositos a base de quitosano destinados al control de hongos en productos poscosecha, aún es necesario obtener información acerca de los efectos tóxicos que podría presentar para el consumidor final, además de ampliar el conocimiento sobre su mecanismo de acción.

Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo sintetizar biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA), caracterizarlos fisicoquímicamente y biológicamente, además evaluar su efecto sobre la respuesta de estrés asociada al crecimiento y viabilidad de esporas de *Aspergillus niger in vitro*, e *in vivo* utilizando como modelo al fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma').

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Pérdidas de Cultivos por Plagas y Enfermedades

Factores como la globalización, el crecimiento demográfico, la circulación del comercio, la migración de personas e inclusive el cambio climático, contribuyen a la propagación de plagas alrededor del mundo, afectando no solo la economía de los países desarrollados y en vías de desarrollo, sino también amenazando la seguridad alimentaria (FAO, 2013).

Actualmente la sociedad moderna demanda alimentos variados y de buena calidad, lo cual implica un reto para los agricultores de frutas, hortalizas y granos, ya que deben producir lo suficiente para obtener ganancias y al mismo tiempo, evitar la contaminación del producto requerido por la población (Navarro-Montes, 2010). Dentro de los factores que limitan el correcto desarrollo de la Agricultura se encuentran diversas plagas de insectos, enfermedades ocasionadas por virus, bacterias y principalmente hongos, malezas, roedores y aves, los cuales afectan tanto a la producción vegetal como animal (contaminación de alimentos balanceados). Además, el rápido desarrollo de estos puede destruir cultivos o cosechas completas en pocas horas, constituyendo un riesgo latente y un hecho recurrente en la historia de la Agricultura (FAO, 2001).

A nivel mundial las pérdidas de cultivos producidas por hongos y microorganismos similares se estima que son alrededor del 10 % (Normile, 2010; Flood, 2010; Bebber *et al.*, 2014). Aunado a esto, investigaciones recientes sugieren que el cambio climático asociado a actividades humanas en las últimas décadas, ha favorecido la propagación de plagas en regiones que no solían ser aptas para su crecimiento, o simplemente no estaban presentes en esa región, pero existen sustratos que favorecen su crecimiento (Bebber *et al.*, 2013; 2014).

Importancia de la Contaminación por Hongos Fitopatógenos en Alimentos

Los hongos fitopatógenos representan un serio problema para los cultivos de alimentos, sean de frutas, hortalizas, granos o semillas. La susceptibilidad al ataque de microorganismos depende tanto del tipo de alimento como del grado de patogenicidad del microorganismo. Sin embargo, se conoce que existe riesgo de contaminación antes y después de la cosecha, generando pérdidas inclusive antes de que se obtenga el producto. Aunado a esto, se estima que cerca del 20% de las frutas y verduras cosechadas sufren un proceso de descomposición provocado principalmente por hongos fitopatógenos durante el almacenamiento (Heydari *et al.*, 2010; Hodges *et al.*, 2011).

Por otra parte, diversos hongos fitopatógenos son capaces de producir sustancias tóxicas resultado de su metabolismo secundario, denominadas micotoxinas. Estas se distribuyen con facilidad en el sustrato y pueden llegar a ser perjudiciales, aunque se encuentren en bajas concentraciones. Esto pone en duda la inocuidad de los alimentos, y representa un riesgo para la seguridad de los consumidores cuando no existe un control adecuado de estos contaminantes (Trigos *et al.*, 2008; Paster y Barkai-Golan., 2008).

La contaminación por hongos productores de micotoxinas también representa un problema económico para los países que se dedican a exportar sus productos, ya que al no cumplir con las normas de calidad establecidas por el país receptor, los productos se rechazan y no pueden ser reubicados para su venta. Además, el prestigio de los productores es afectado así como también la demanda del producto (Juárez Becerra *et al.*, 2010).

Principales especies relacionadas con pérdidas pre y poscosecha

En el 2010 las estadísticas apuntaban a que existían alrededor de 8,000 especies de hongos capaces de producir enfermedades y deterioro en una gran variedad de cultivos. Sin embargo, las especies de hongos más comunes relacionadas con el deterioro de frutas y hortalizas son *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Aspergillus*. Estas tienen la capacidad de producir patologías sobre los frutos, hojas y tallos, así como también en las raíces y tubérculos entre otros (Juárez-Becerra *et al.*, 2010; Velázquez-del Valle *et al.*, 2012).

Aspergillus spp

El género *Aspergillus spp.*, está ampliamente distribuido alrededor del mundo. Está constituido por alrededor de 600 especies de hongos filamentosos hialinos pertenecientes al filo *Ascomycota*. Puede desarrollarse y producir aflatoxinas en una amplia variedad de productos alimenticios derivados de plantas. Este género está relacionado a aspectos económicamente positivos, como su uso en procesos de biodegradación de diferentes sustratos para remediar suelos o aguas residuales, en la producción de enzimas y ácidos orgánicos, en la producción de alimentos y bebidas fermentadas principalmente de origen asiático (Rasooli, 2007; Duca *et al.*, 2012; Santos y Corso, 2014; Ghanem *et al.*, 2015). Sin embargo, muchos de ellos se caracterizan por su capacidad de producir micotoxinas, las cuales tienen un impacto negativo sobre la calidad de diversos cultivos y piensos para engorda de animales, ocasionando con ello grandes pérdidas económicas en los sectores agrícolas y pecuarios (FAO, 2001; Somashekar *et al.*, 2004).

Fisiología

Los hongos del género *Aspergillus* presentan un amplio rango de crecimiento, pues son capaces de crecer en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición (Mendoza *et al.*, 2011). Por lo general resisten en un amplio rango de temperatura (12-57 °C), ya que son termorresistentes, y sus esporas pueden sobrevivir a temperatura de hasta 70 °C. Son capaces de tolerar concentraciones de sal hasta en un 34%, ya que son organismos

osmotolerantes. Además, pueden desarrollarse en sustratos con una actividad acuosa (A_w) hasta de 0.40 y a un pH alrededor de 5. Una vez existiendo las condiciones necesarias para desarrollarse, colonizan rápidamente y pueden producir micotoxinas (Klich, 2003; Lubertozzi y Keasling, 2009). Específicamente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* pueden crecer y producir aflatoxinas en maíz cuando estos son experimentan factores ambientales como sequías y ambientes cálidos que les producen estrés. Inclusive cuando hay condiciones inadecuadas de temperatura y humedad durante su almacenamiento. En medios de cultivos nutritivos se ha observado que las condiciones para favorecer la producción de aflatoxinas van desde la actividad de agua en el medio (.95-9.8), temperatura de incubación (20-35 °C), concentración de esporas en el medio, cantidad y tipo de nutrientes, pH (5-7), edad del medio de cultivo y hasta aplicación de factores externos como la radiación (Klich, 2007).

Respecto a su estructura, los micelios que forman presentan colores en diversas tonalidades que van del verde, amarillo, naranja, café, negro y blanco a simple vista. El micelio generalmente es blanco, apenas visible (dependiendo del grado de desarrollo), y por lo general algunas características macroscópicas cambian según el medio de cultivo. Estos hongos se reproducen a través de la producción de fialoesporas y se caracterizan por tener un distintivo conidióforo con una base en forma de “T” o “L”, la cual se conecta con la hifa vegetativa. Sus vesículas pueden tener forma globosa o esférica, piriforme, espatulada y clavada. Algunas especies presentan cabezas conidiales uniseriadas, es decir, que los conidios crecen directamente en las fiálides, mientras que otras son biseriadas, presentando una segunda capa de células entre la vesícula y las fiálides, las cuales son llamadas métulas (Figura 1) (Klich, 2003; Lubertozzi y Keasling, 2009).

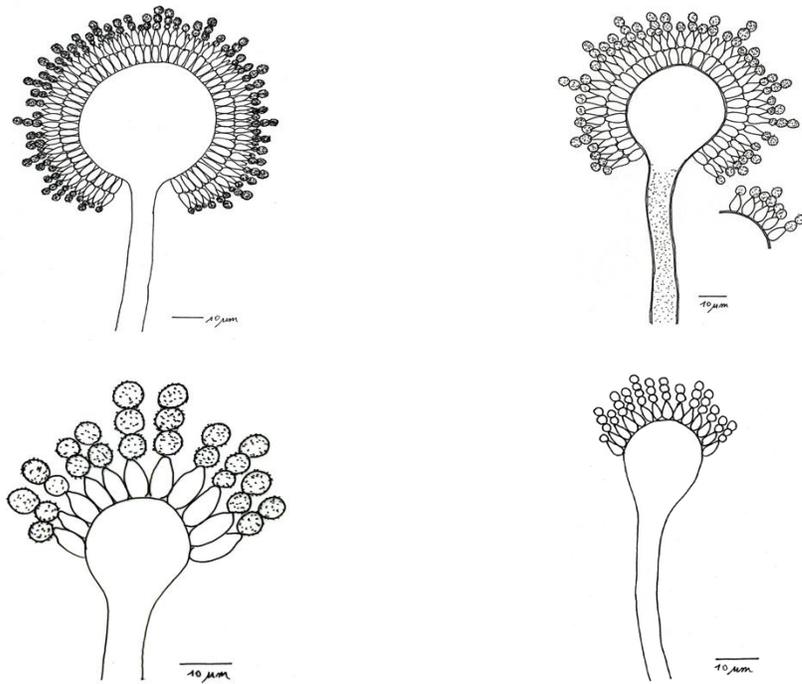


Figura 1. Morfología de conidióforos de diversas especies de *Aspergillus spp.*
Fuente: Página Web, www.Plantasyhongos.es

Aspergillus niger

Es una de las especies más comunes del género *Aspergillus*, el cual ha sido ampliamente reportado como contaminante de alimentos, especialmente en frutas cosechadas, frutos secos, vegetales y una diversidad de cereales. Se caracteriza por desarrollarse como un moho negro sobre la superficie de las plantas (Figura 2). Aparentemente las esporas negras de *A. niger* presentan resistencia a condiciones adversas como la luz solar y la luz UV, lo cual le proporciona una ventaja adaptativa en diversos hábitats (Ziani *et al.*, 2009; Plascencia Jatomea *et al.*, 2014).



Figura 2. Crecimiento de *Aspergillus niger* en agar papa dextrosa a 25 °C.
Fuente: Página web: <https://www.thinglink.com/scene/645070198272950273>

Debido a que se considera un microorganismo ubicuo de rápida propagación, su presencia se ha reportado en una diversidad cantidad de productos alimenticios, entre los cuales se puede mencionar principalmente a una variedad de nueces (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2014). También se ha aislado de cultivos de frutos y vegetales como son el tomate, tomate cherry y papa, principalmente con infecciones poscosecha (González-Álvarez *et al.*, 2015). En países africanos y en algunos estados de la India se ha perfilado como uno de los principales agentes causante de pérdidas durante el almacenamiento de cebolla, debido a las condiciones climáticas (Tropical-Sub-tropical), en las cuales *A. niger* puede desarrollarse sin problema (Bukari, 2014). Su patogenicidad también se ha reportado en frutos tropicales exóticos como Jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) y papaya (*Carica papaya*) (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012). Incluso forma parte de las principales especies (*A. ochraceus* y *A. carbonarius*) del género capaces de producir ocratoxina A, especialmente tóxica para los riñones. A esta micotoxina se le han atribuido otros efectos secundarios que la clasifican como hepatotóxica, inmunotóxica, teratogénica y neurotóxica. Además ha sido reportada como contaminante de una variedad de alimentos, principalmente uvas y productos obtenidos de ella como vinos o jugos, frutos secos, especias, café y cocoa (Peraica *et al.*, 2010; Rahimi y Shakerian, 2013; Mimoune *et al.*, 2016).

Condiciones de crecimiento. La germinación óptima de *A. niger* se ha reportado que ocurre a temperatura de 30-34 °C, con alto porcentaje de humedad (96-98%) y pH de 4.5-6.0. Bajo estas

condiciones se observa cerca del 90% de esporas germinadas después de 6 horas (Abdel-Rahim y Arbab, 1985; Van Leeuwen *et al.*, 2013; Krijgsheld *et al.*, 2013).

En la germinación de esporas se distinguen tres fases principales (Figura 3). La primer fase es el estado de dormancia (Krijgsheld *et al.*, 2013), el cual se ve interrumpido por factores ambientales como la presencia de agua, aire en combinación o no con sales inorgánicas, aminoácidos y/o azúcares fermentables (Osherov y May, 2001). En la segunda fase las esporas se hinchan uniformemente entre las 2 y 6 h después de la inoculación a 25 °C. En esta fase el diámetro de las esporas se incrementa debido a la absorción de agua y las moléculas absorbidas van directamente a la síntesis de membrana plasmática y pared celular. En la tercera fase de la germinación, el túbulo germinal se forma mediante un crecimiento polarizado, el cual se observa después de 6 horas de inoculación a 25°C. En etapas posteriores la velocidad de crecimiento de los túbulos germinales aumenta, hasta la formación de conjuntos de hifas que constituyen el micelio (crecimiento macroscópico) (Momany, 2002; van Leeuwen *et al.*, 2013).

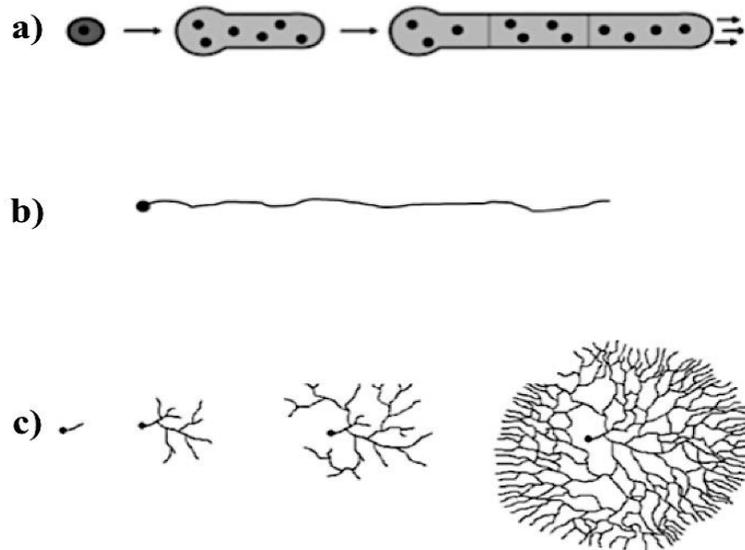


Figura 3. Etapas de crecimiento de *Aspergillus niger*: a) Germinación de espora y crecimiento polarizado del túbulo germinal para formación de hifa; b) Hifa desarrollada; c) Ramificación de hifas para formación de micelio.

Página Web: <https://hongosmasquecallampas.wordpress.com/tag/hongos-filamentosos-entre-la-hifa-y-el-micelio/>

Métodos para el Control de Hongos

Métodos químicos de control

El control químico es parte integral de cualquier programa de manejo integrado de plagas, y es exitoso inhibiendo el crecimiento de estas. Sin embargo, este es uno de los últimos métodos de control que deben ser aplicados, ya que se ha reportado que su uso indiscriminado provoca contaminación del medio ambiente, afecta la salud humana y animal, elimina organismos benéficos (microorganismos o insectos) y provocan desarrollo de resistencia por parte de las plagas hacia estos productos. Esto ha obligado a la industria agrícola a implementar nuevos métodos de control que presenten menor impacto negativo (Rogg, 2001; Audesirk *et al.*, 2003; Velázquez-del Valle *et al.*, 2012).

Dentro de las alternativas naturales que se están estudiando para el control de hongos filamentosos como *Aspergillus* spp., se encuentran el uso de quitosano, de extractos y aceites esenciales de plantas, el control biológico y recientemente la aplicación de algunos metabolitos secundarios producidos por especies de microorganismos antagonistas (Bluma *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2015; Teodoro *et al.*, 2014; Aloui *et al.*, 2014).

Extractos de plantas y aceites esenciales

El uso de metabolitos procedentes de diversas plantas, las cuales los producen como parte de su crecimiento normal o en respuesta a situaciones de estrés, ha sido propuesto como una alternativa natural, ya que se ha encontrado que existe una diversidad de compuestos que presentan actividad antimicótica contra especies de *Aspergillus* (Bluma *et al.*, 2008).

Para el control de *Aspergillus* de la sección *Flavi*, se han evaluado aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.), los cuales presentan la capacidad de inhibir su crecimiento (Bluma *et al.*, 2008). Inclusive se ha reportado que el aceite de canela es capaz de inhibir la producción de aflatoxinas (García-Camarillo *et al.*, 2006). Bluma y Etcheverry (2008), evaluaron la actividad antifúngica de aceites esenciales de *Pimpinella*

anisum L. (Anís), *Peumus boldus* Mol (Boldo), *Hedeoma multiflora* Benth (Tomillo de montaña), *Syzygium aromaticum* L. (Clavo) y *Lippia cornete* var. *Integrifolia* (Griseb) (Poleo), encontrando que estos retardaron el crecimiento de *A. flavus* así como la producción de aflatoxina B1 (AFB1).

En el caso particular de *Aspergillus niger*, también se ha evaluado el uso de aceites esenciales y extractos de plantas para su control. Li *et al.*, (2013) evaluaron la actividad antifúngica del aceite de citronela (*Cymbopogon citratus*) reportando una alta actividad inhibitoria, pues al utilizarlo al 0.5% (v/v) eliminaba completamente las esporas. Asimismo, Pawar y Thaker, (2007) evaluaron la actividad de 75 aceites esenciales, encontrando que el aceite de canela extraído de la corteza y de la hoja (*Cinnamomum zeylanicum* y *C. cassia*), así como el aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) y de *Cymbopogon citratus* presentaban una actividad inhibitoria prometedora sobre la etapa de germinación de esporas y la formación de hifas.

Si bien, los aceites esenciales han presentado actividad contra estos hongos, la oxidación producida por la exposición a la luz y las altas temperaturas, entre otros factores ambientales externos, pueden provocar la pérdida de la misma. Aunado a esto, se ha reportado que los hongos presentan mayor resistencia a compuestos naturales comparados con las bacterias (Rasooli, 2007). Por lo anterior, la introducción de nuevas tecnologías como la microencapsulación, ha permitido hacer más eficiente la actividad de los aceites esenciales y retardar procesos de oxidación, tal como en el caso de microcápsulas de romero con actividad contra *Aspergillus spp* (Teodoro *et al.*, 2014). Bernardos *et al.* (2015) evaluaron la actividad de cuatro compuestos activos encapsulados en sílica (carvacrol, cinamaldehído, eugenol y timol) aislados de distintos aceites esenciales contra *Aspergillus niger*. Ellos encontraron que el carvacol y timol encapsulados demostraron tener mayor actividad antifúngica en comparación con los compuestos puros, ya que inhibieron el crecimiento durante 30 días.

Metabolitos secundarios de origen microbiano

Bajo ciertas condiciones de crecimiento, los microorganismos (bacterias, hongos, algas, etc.) tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, los cuales pueden presentar algún

grado de bioactividad contra otros microorganismos (antagonismo microbiano), o bien actividad contra ciertos estados fisiológicos de un cuerpo enfermo (Bhatnager y Kim, 2010). Actualmente, las investigaciones de antagonismo microbiano están siendo de utilidad en la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural, debido a que representan una alternativa de control segura y eficiente contra patógenos de plantas.

Entre los estudios más recientes de antagonismo microbiano se encuentra el de Rios *et al.* (2016). Ellos evaluaron la actividad de aislados de *Bacillus spp.*, y *Trichoderma spp.*, contra hongos fitopatógenos comunes, encontrando que podían inhibir el crecimiento de *Aspergillus nidulans* hasta en un 58% cuando se utilizaba *T. asperellum*. Esta actividad se le atribuye a la producción de compuestos volátiles y no-volátiles (6-pentil- α -pirona), micro parasitismo así como a la competencia por espacio y nutrientes. Akocak *et al.* (2015), observaron cambios morfológicos durante la germinación de esporas y formación de micelio de *Aspergillus flavus* incubado con aislados de enzimas quitinasas producidas por *Pseudomonas fluorescens*. Lukkani y Reddy (2014) evaluaron la actividad antagónica de cepas fluorescentes de *Pseudomonas* sobre *Aspergillus niger*, y atribuyeron la inhibición del patógeno a la producción de metabolitos secundarios como el cianuro de hidrógeno, amoníaco, ácido salicílico, ácido indol acético, entre otros.

Otro de los microorganismos comúnmente reconocido por la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica es *Streptomyces spp.* (Bressan y Figueiredo., 2008; Nguyen *et al.*, 2012). Nguyen *et al.* (2015) estudiaron el efecto antagonista de metabolitos secundarios con actividad antifúngica producidos por *Streptomyces griseus* H7602, encontrando como responsable de la inhibición *in-vitro* de *Phytophthora capsici* al ácido pirrol-2-carboxílico, el cual fue aislado, purificado y caracterizado. Aunque anteriormente este compuesto ya había sido aislado junto con uno de sus derivados (pirrocol), su actividad antifúngica no se había evaluado (Dietera *et al.*, 2003; Robles-Yerena *et al.*, 2010).

Ácido pirrol-2-carboxílico. Una gran variedad de compuestos naturales derivados del pirrol han sido aislados y estudiados por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, sin embargo, es poca la información que se tiene sobre metabolitos pirrólicos aislados a partir de cultivos de

microorganismos (Chollet *et al.*, 2003; Dietera *et al.*, 2003; Refat y Fadda, 2013; Hormaza *et al.*, 2011).

El ácido pirrol-2-carboxílico (Figura 4) se sintetizó hace más de un siglo, aunque su historia como un compuesto de origen biológico ha sido recientemente descubierta. Primero se identificó como un producto de degradación de los ácidos siálicos (Gottschalk, 1995) y como un derivado de la oxidación de los isómeros D-hidroxiprolina por acción de enzimas aminooxidasas de mamíferos. De igual manera se ha encontrado que juega un papel importante en el control del cáncer de pulmón en humanos (Svojková, 1982), y recientemente se ha relacionado con la inhibición de *Phytophthora capsici* en pruebas *in-vitro* (Nguyen *et al.*, 2015).

Actualmente existe escasa información acerca del mecanismo de acción de su actividad antifúngica, no obstante, estudios de antagonismo por metabolitos de *Streptomyces spp.*, sugieren que tiene la capacidad de afectar el correcto desarrollo de las hifas provocando hinchazón, distorsión y excesiva ramificación, además de inhibir la germinación de esporas (Taechowisan *et al.*, 2009).

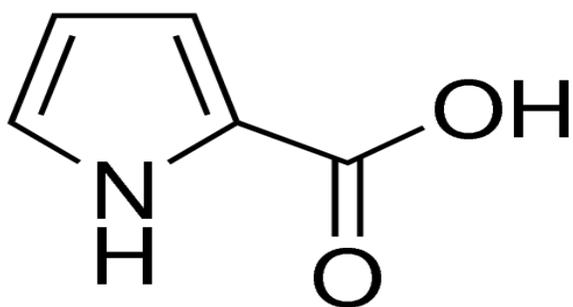


Figura 4. Estructura química del ácido pirrol-2-carboxílico. Página Web: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/p73609?lang=es®ion=MX>

Biopolímeros: Quitina y quitosano

Quitina. La quitina (β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa) es el segundo polímero natural más abundante en la naturaleza después de la celulosa, con una tasa de regeneración en la biósfera de 10^{9-11} toneladas anuales. Es el principal componente del exoesqueleto de los crustáceos e insectos, aunque también se encuentra en la pared celular de algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteriomicetos, y en algas como las diatomeas. Es un polisacárido de tonalidad blanca-amarillenta, rígido y no elástico (Pastor de Abram e Higuera, 2004; Raafat y Sahl, 2009). Estructuralmente es un polisacárido no ramificado formado por cadenas lineales de monómeros de N-acetil-D-glucosamina, los cuales están unidos mediante enlaces β (1-4) formando estructuras fibrilares y cristalinas semejantes a las de la celulosa (Figura 5). Es completamente insoluble en agua o en medio ácido (Badui, 2006; Pastor de Abram e Higuera, 2004).

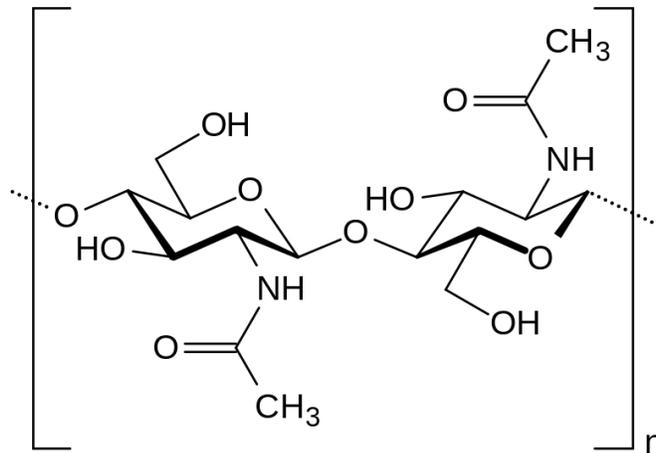


Figura 5. Estructura química de la quitina (parte de una cadena polimérica).

Fuente: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitin.svg>

Quitosano. El quitosano es un biopolímero de alto peso molecular derivado del proceso de desacetilación de la quitina. Presenta una estructura lineal de β -(1,4) 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranososa y 2-amino-2deoxi- β -D-glucopiranososa (Figura 6). Entre las propiedades biológicas del quitosano destaca su biocompatibilidad, la cual le permite ser tolerado cuando se

encuentra en contacto directo con tejidos vivos. Es biodegradable, ya que presenta susceptibilidad al ataque de enzimas específicas y no específicas como lisozimas, quitinasas, celulasas o hemicelulasas, proteasas, lipasas, β -1,3 y β -1,4-glucanasas. Además, presenta baja o nula toxicidad para mamíferos (LD₅₀ oral para ratón es de 16 g/ Kg de peso) (Baldrick, 2010; Raafat y Sahl, 2009).

Como parte de sus características fisicoquímicas, el quitosano es un biopolímero insoluble en agua, pero soluble en soluciones de ácidos orgánicos diluidos, comportándose en este medio como un polielectrolito catiónico, lo cual le confiere diferentes propiedades (Rinaudo, 2006; Raafat y Sahl, 2009; Li *et al.*, 2009). El grado de desacetilación, el peso molecular y la carga positiva que inducen los grupos amino, dan al quitosano la capacidad de interactuar con macromoléculas cargadas negativamente como proteínas, lípidos y metales entre otros. Desde hace unos años, el quitosano ha demostrado su potencial actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral (Cota-Arriola *et al.*, 2011; Martínez-Camacho *et al.*, 2011; Fernández-Pan *et al.*, 2015).

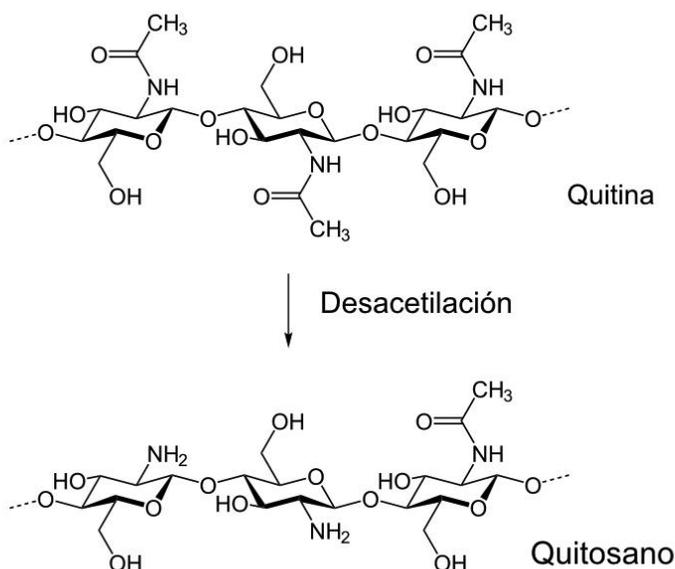


Figura 6. Obtención del quitosano a partir de la desacetilación de la quitina y su estructura química (parte de una cadena polimérica; grupos aminos en el C2).

Fuente: https://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan#/media/File:Chitosan_Synthese.svg

Mecanismos de acción del quitosano

Debido al gran interés de la sociedad científica por las múltiples aplicaciones del quitosano sobre todo en el área de control de patógenos, ha sido necesario investigar y proponer los mecanismos de acción que presenta contra diversos microorganismos como bacterias, hongos y virus; sin embargo, estos mecanismos no se han elucidado con exactitud.

La destrucción de la estructura celular, las alteraciones en la superficie celular y el aumento en la permeabilidad de la membrana de los patógenos expuestos al quitosano, están relacionados con procesos de interacción de cargas electrostáticas entre los grupos cargados positivamente en el quitosano ($-\text{NH}_3^+$) y los grupos cargados negativamente presentes en la superficie celular de las bacterias Gram (+) (ácidos teicoicos); Gram (-) (lipopolisacáridos) así como de hongos y virus (proteínas y glicoproteínas). Otro de los mecanismos atribuidos al quitosano es el daño a la membrana, donde se ha propuesto que primero existe una interacción quitosano y pared celular, haciendo que esta se separe de la membrana celular para poder desestabilizarla. Lee y Je (2013) evaluaron el efecto de conjugados de ácido gálico-quitosano sobre la membrana de cepas bacterianas Gram (-) (*Escherichia coli*) y Gram (+) (*Staphylococcus aureus*). Encontraron que estos al interactuar principalmente con lipopolisacáridos de la superficie bacteriana, ocasionaron un incremento en la liberación de componentes intracelulares, vía rompimiento de la membrana plasmática e incremento del proceso de permeabilización de la membrana interna y externa. En el caso de quitosano de bajo peso molecular, se ha reportado que este tiene la capacidad de difundirse a través de la célula, inactivando los procesos de reproducción al interactuar con el ADN inhibiendo así la síntesis de ARN mensajero (Goy *et al.*, 2009; Silva-Dias *et al.*, 2014).

Por otra parte, la capacidad quelante del quitosano le permite captar nutrientes esenciales e iones metálicos como el Mg^{2+} y Ca^{2+} , los cuales participan en reacciones metabólicas, así como elementos traza necesarios para el correcto funcionamiento celular. Por último, se ha propuesto como uno de los mecanismos de acción, la deposición de quitosanos de alto peso molecular en la superficie microbiana, donde este forma una capa gruesa que provoca que la membrana externa se vea alterada, además de impedir el transporte de nutrientes y la excreción de

metabolitos de desecho (Helander *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2002; Chung y Chen, 2008; Xing *et al.*, 2015).

Biocompositos de Quitosano como Acarreadores de Compuestos Bioactivos

Los avances en el área de la nanotecnología han permitido desarrollar sistemas poliméricos, capaces de acarrear sustancias con diferente tipo de actividad y liberarlas controladamente, siendo el quitosano un polímero versátil con capacidad de aplicaciones potenciales en el área de la biomedicina, farmacología, industria alimentaria y agrícola. En la agricultura, estos sistemas poliméricos nano y micro-estructurados, han permitido utilizar menor cantidad de materias primas, al incrementar la eficiencia de compuestos con baja solubilidad y/o estabilidad, y aunado a esto, se pueden producir formulaciones agroquímicas menos tóxicas (dependiendo del tipo de polímero y compuesto a encapsular) para el control de patógenos (Grillo *et al.*, 2015; Liu y He, 2015; Yadav *et al.*, 2015).

Materiales nano-estructurados a partir de polímeros

Existe una gran variedad de sistemas nano-estructurados que han sido propuestos para su utilización en farmacología y en agricultura. Dentro de los sistemas elaborados a partir de polímeros de origen sintético y natural, se están las micelas, nanoesferas, nanocápsulas y polimerosomas. Todos estos pueden estar constituidos por un solo tipo de polímero (homopoliméros), o bien de varios polímeros (co-polímeros) (Letchford y Burt, 2007).

Biocompositos o materiales de origen biológico multicompuestos

Los biocompositos son un tipo de material que está compuesto por una o varias redes poliméricas (matriz), en la cual se encuentra disperso un agente activo de origen biológico, pudiendo estar o no estar en forma de nanopartícula. El término *bio*-proviene del hecho de que el composito está conformado por compuestos de origen natural. Este puede incluir fibras vegetales como el algodón, el lino, el cáñamo o fibras de papel madera o residuos reciclados, e

incluso subproductos de cultivos alimentarios. Su fabricación exige que la matriz sea principalmente de recursos renovables, aunque el estado actual de la tecnología de biopolímeros dicta, que los polímeros termoplásticos y termoestables sintéticos dominan la producción de biocompositos comerciales (Hernández-Téllez *et al.*, 2016).

Actualmente, existen reportes de sistemas de nanopartículas que se han desarrollado utilizando biopolímeros como el quitosano. Sin embargo, en muchas de ellas su estudio se ha centrado principalmente en la eficiencia de encapsulación del compuesto activo añadido a la matriz de polímero, la capacidad de carga, la liberación controlada y diversos análisis químicos y físicos. Considerando que uno de sus atractivos es su aplicación en cultivos agrícolas para el control de patógenos microbianos (Baldrick, 2010), la falta de estudios que documenten la toxicidad y la bioseguridad de nanopartículas de quitosano en sistemas biológicos, plantea la duda de si estos sistemas son inocuos para los consumidores y para el medio ambiente.

Métodos de síntesis

Los biocompositos a base de quitosano pueden obtenerse mediante varios métodos de síntesis, los cuales permiten obtener sistemas de tamaño a escala nanométrica, micrométrica o una mezcla de ambos. Generalmente, en la síntesis de partículas (nano y micro), el polímero orgánico constituye una fase continua y el compuesto bioactivo forma la fase dispersa (Yao *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2013; Mukhopadhyay, 2014).

Existen varios métodos para la elaboración de nano y micropartículas poliméricas, así como también numerosas formas de incorporar los compuestos bioactivos. Estos pueden ser encapsulados en la matriz polimérica conjugados químicamente con el polímero, o bien, adsorbidos en la superficie de la partícula. Dentro de los métodos reportados para la síntesis de partículas de quitosano se encuentran el de emulsión por entrecruzamiento, emulsión por coalescencia, gelación iónica, spray drying, formación inversa/reversa de micelas y precipitación (Cota-Arriola *et al.*, 2013).

El método de emulsión por entrecruzamiento se basa en el entrecruzamiento de los grupos amino del quitosano con los grupos aldehído del agente reticulante. El quitosano se emulsiona en una

fase agua-aceite y después se estabiliza con un agente tensoactivo. Posteriormente, se hace reaccionar con un agente reticulante apropiado como formaldehído, glutaraldehído, genipina y glioxal entre otros. Finalmente, las partículas obtenidas pueden lavarse y secarse (Yin *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015). El proceso de emulsión por coalescencia se basa en el método de entrecruzamiento aunque se apoya con la técnica de precipitación. En este método, el ingrediente activo se incorpora en una solución de hidróxido de sodio que se añade gota a gota en la emulsión de quitosano, seguido de agitación a alta velocidad para generar colisiones entre las gotas para que se combinen y precipiten en forma de pequeñas partículas (Ichikawa *et al.*, 2014).

El método de gelificación iónica está basado en la formación de complejos mediante la unión electrostática de polianiones de carga negativa con los grupos aminos del quitosano, siendo el tripolifosfato (TPP) el polianión más utilizado hasta el momento por su baja toxicidad (Dong *et al.*, 2013). El método de spray drying es una técnica sencilla que no requiere múltiples pasos, en el cual una mezcla de quitosano en ácido acético diluido, el compuesto bioactivo y el agente entrecruzante (glutaraldehído, tripolifosfato, etc.), se atomizan a través de una corriente de aire caliente, causando la evaporación del disolvente formando las partículas deseadas (Agnihotri *et al.*, 2004; Cota-Arriola *et al.*, 2013, Kashyap *et al.*, 2015).

Otro método es el de precipitación, coacervación o desplazamiento de solvente, siendo uno de los más sencillos y de fácil realización, ya que requiere poco tiempo y energía. Particularmente, en el caso de la síntesis de partículas a base de quitosano, el método se basa en las propiedades fisicoquímicas de este, principalmente su insolubilidad en medios con pH alcalino (Ej. hidróxido de sodio, metanol, etc.) (Wang y Hong, 2011; Luque-Alcaraz *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2013). La formación de partículas (nano o micro) se da espontáneamente al introducir la solución de quitosano por goteo a flujo constante en una solución alcalina con agitación magnética. La incorporación de la sustancia activa puede ser de dos formas, en la fase del solvente o en la fase del no solvente. El tamaño y la forma de las partículas producidas son regulados mediante la viscosidad, el flujo, el diámetro de la boquilla de goteo y la concentración de quitosano. La separación y la purificación de las partículas se realizan mediante filtración y centrifugación, seguido de lavados con agua caliente o helada. Es un hecho que el método de precipitación es

sencillo y fácil de realizar, no obstante, algunas veces es necesario utilizar un agente entrecruzante que incremente la estabilidad de las partículas elaboradas, además de agentes tensoactivos que eviten los procesos de aglomeración/agregación de las partículas (Agnihotri *et al.*, 2004; Kashyap *et al.*, 2015).

Si bien todos los métodos descritos anteriormente se pueden utilizar para la síntesis de partículas poliméricas, la selección de estos depende de factores como los requisitos de tamaño de partícula, estabilidad térmica y química del agente activo, la reproducibilidad de los perfiles cinéticos de liberación, la estabilidad, la funcionalidad y la toxicidad residual asociada con el producto final (Agnihotri, *et al.*, 2004).

Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de los biocompositos de quitosano, ya sea a escala micro o nanométrica, pueden determinarse mediante una caracterización general que incluya diámetro hidrodinámico (tamaño), morfología, potencial Z, índice de polidispersión (PDI) y espectroscopía de infrarrojo. Estos parámetros dan una idea de la tendencia a la sedimentación o agregación que presentan las partículas, permitiendo así conocer la estabilidad del sistema.

Morfología y tamaño. La morfología y tamaño de sistemas nanoparticulados se puede determinar mediante técnicas como microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y microscopía de fuerza atómica (ATM) (Wang y Hong, 2011; Mathew y Kuriakose, 2013; Ruozi *et al.*, (2014); Kaur *et al.*, 2015; Pandiselvi y Thambidurai, 2015). Sin embargo, estos dependen de diversos factores como el método de síntesis, variaciones en los parámetros críticos para cada método (pH, temperatura, agente entrecruzante, adición de surfactante), la concentración, peso molecular y grado de desacetilación del quitosano, así como la proporción de polímero y compuesto activo (si se desea incorporar), entre otros.

Diversos autores han reportado que la concentración de quitosano a utilizar para la síntesis de micro y/o nanopartículas influye en el tamaño final, debido a que conduce a un aumento de la

viscosidad en la solución inicial generando redes poliméricas más fuertes, las cuales se oponen a la fuerza de corte, y por lo tanto, hay un mayor tamaño final de las partículas formadas (Deng *et al.*, 2006; Nafee *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2015; Madureira *et al.*, 2015). Otros factores que afectan el tamaño de partícula es la proporción de agente entrecruzante y polímero utilizado; cuando la proporción del agente entrecruzante aumenta, el tamaño de la partícula también se incrementa, probablemente debido a que al llevarse a cabo la reacción de entrecruzamiento hay atrapamiento de moléculas de agua, las cuales no se pueden difundir hacia fuera de la partícula y trae como consecuencia un mayor tamaño de las mismas (Deng *et al.*, 2006; Nafee *et al.*, 2009; Hellmers *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2015; Madureira *et al.*, 2015). Cuando el método requiere de agitación para lograr la síntesis de partículas, la velocidad de esta influye en el tamaño obtenido. Por ejemplo, Moura *et al.*, (2015) utilizaron el método de emulsión con entrecruzante y encontraron que el incremento de la fuerza de corte provocó que las gotas originales (emulsión) se hicieran más pequeñas antes de que ocurriera la reacción de entrecruzamiento, por lo que el tamaño de las partículas fue más pequeño. El peso molecular del quitosano y el grado de desacetilación también influyen en el tamaño de partícula. Existen estudios en los que se utilizaron quitosano de alto peso molecular para la síntesis, obteniendo un tamaño de la partícula de 743.6 ± 39.5 nm, el cual fue mayor que el obtenido con quitosano de bajo peso molecular (360.3 ± 29.7 nm) (Madureira *et al.*, 2015).

Por lo anterior, dependiendo de las condiciones en las partículas fueron elaboradas, estas pueden ser esféricas, ovaladas, ásperas o suaves en la superficie, compactas, heterogéneas en su tamaño o también puede agregarse o aglomerarse (Figura 7) (Deng *et al.*, 2006; Nafee *et al.*, 2009; Hellmers *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2015; Madureira *et al.*, 2015).

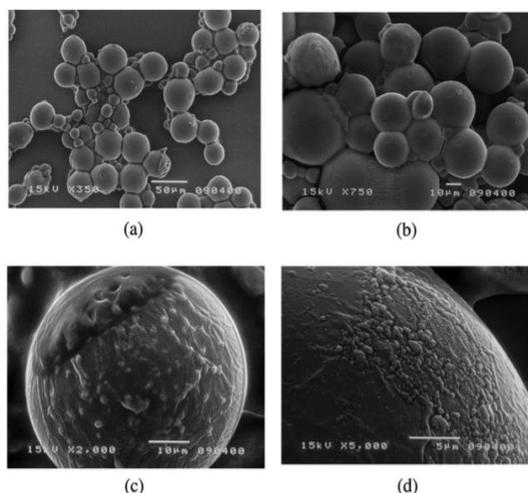


Figura 7. Micrografía obtenida con ESEM de partículas de quitosano entrecruzadas con genipina donde se pueden observar partículas agregadas con superficie áspera (a) 350×; (b) 750×; (c) 2000×; (d) 5000× Fuente: (Moura *et al.*, 2015).

Otra herramienta útil para estimar el tamaño y la estabilidad de una muestra de partículas es el método de dispersión dinámica de la luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic Light Scattering"). Este permite conocer varios parámetros como son el tamaño promedio de las partículas que se encuentran en la suspensión, el índice de polidispersión y el potencial Z (Foord *et al.*, 1970; Estelrich y Pons, 1991; Du *et al.*, 2009; Cuadros-Moreno *et al.*, 2014).

Esta técnica fisicoquímica sirve para determinar el tamaño de las partículas en suspensión o macromoléculas en solución, tales como proteínas o polímeros. Permite conocer el tamaño de partículas de 0.6 nm a 10 µm (dependiendo del equipo) en suspensiones muy diluidas (Foord *et al.*, 1970; Estelrich y Pons, 1991). Se basa en el seguimiento de las fluctuaciones de la luz dispersada debido al movimiento Browniano de las partículas en suspensión en función del tiempo. Al correlacionar la velocidad del movimiento Browniano con las fluctuaciones de la dispersión de luz mediante la ecuación de Stokes-Einstein, es posible obtener el valor del tamaño de partícula (Foord *et al.*, 1970; Estelrich y Pons, 1991; Cuadros-Moreno, 2014).

Índice de polidispersión o dispersidad (PDI). El término polidispersidad o más recientemente dispersidad, según la recomendación de la IUPAC, se utiliza para describir el grado de "falta de uniformidad" de una distribución. En el campo de la caracterización molecular y nanopartículas,

existen en principio dos definiciones diferentes de polidispersidad, dependiendo de la propiedad subyacente de interés. En cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de exclusión por tamaño, interesa la distribución de los pesos moleculares en la muestra, el cual se obtiene mediante la relación M_w/M_n (dispersidad o índice de polidispersidad), donde M_w es el peso molecular medido de la masa y M_n el número ponderado de peso molecular. Para una muestra "monodispersa" perfectamente uniforme, que consiste de exactamente uno y sólo un peso molecular, tanto el M_w y el M_n tendrían el mismo valor. Sin embargo, estos dos valores no son iguales en muestras reales. Además, la relación M_w/M_n se utiliza para describir cuán lejos de distribución uniforme se encuentra la distribución encontrada. Por su parte, en la dispersión dinámica de la luz (DLS), la propiedad de interés es la distribución del tamaño de las moléculas o partículas en una muestra. En este caso la dispersidad describe la cantidad de material de diferente tamaño que está presente en la muestra analizada. Aquí, la distribución nativa es la distribución de la intensidad, la que indica la cantidad de luz que se dispersa desde los diferentes tamaños encontrados en la muestra. El índice general de polidispersidad, PDI, es el cuadrado de la polidispersidad de la luz dispersada. Este parámetro es un indicativo de la anchura de los picos que corresponden al tamaño de partícula, y una alta polidispersidad indica la existencia de grupos de partículas con tamaño diferente, lo que puede significar la aparición de cierta agregación.

En la Tabla 1 se muestran los valores aproximados para el PDI según la técnica de dispersión dinámica de la luz. Estos valores son estrictos, por ejemplo, Madureia *et al.* (2015) reportaron PDI cercanos a 0.3 para partículas de quitosano, lo que se atribuyó a una distribución del tamaño monodispersa, es decir, todos los tamaños de nanopartículas fueron similares (Figura 8). Kaur *et al.* (2015), reportaron la obtención de nanocompositos de quitosano con cobre y zinc con una distribución polidispersa, es decir, diferente tamaño de partícula mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido (TEM), sin embargo, estos los resultados no fueron corroborados mediante dispersión dinámica de la luz. Nafee *et al.* (2009) reportaron que a medida que aumenta la concentración de quitosano en la formulación de nanopartículas de quitosano/ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), la distribución de tamaños se modificó dependiendo del medio que las contenía (agua y diferentes medios de cultivos celulares) así como de la cantidad de quitosano incorporada.

Tabla 1. Valores aproximados del índice de polidispersidad o dispersidad, según la técnica utilizada.

Parámetro	Definición	Tipo de Distribución			
		“monodispersa” uniforme	“monodispersa” angosta	“polidispersa” moderada	“polidispersa” ancha
PDI según GPC	=Mw/Mn	1.0	1.0-1.1	1.1-2.0	>2.0
PDI según DLS	=(anchura/media) ²	0.0	0.0-0.1	0.1-0.4	>0.4

GPC: Gel Permeation Chromatography; DLS: Dynamic Light Scattering (Fuente: Malvern Instruments <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>).

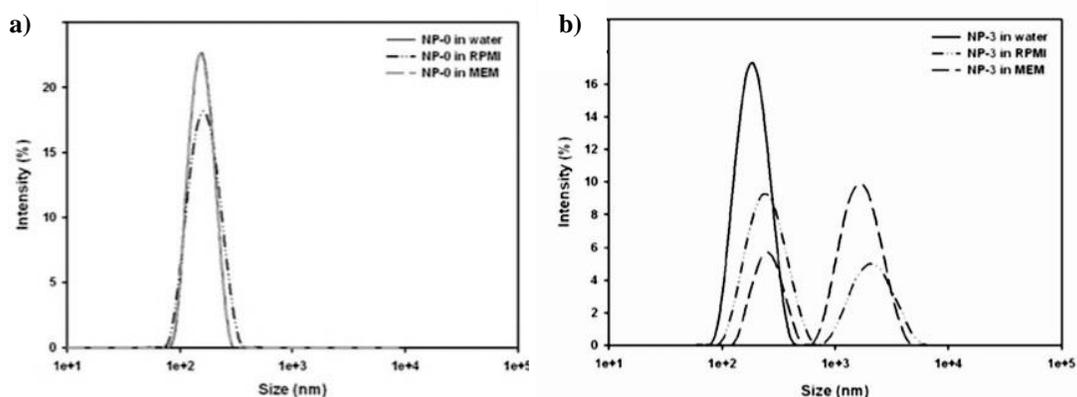


Figura 8. a) Partículas de PLGA con distribución de tamaños uniforme monodispersa; b) Partículas de quitosano/PLGA 0.3% (p/v) distribución moderadamente polidispersa. Fuente: (Nafee *et al.*, 2015).

Potencial Zeta. El potencial Z puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento de los coloides, puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre ellos. Debido a que no se puede medir la carga de la superficie de la partícula ni su potencial, se mide la diferencia de potencial que existe entre la zona de separación de la capa fija y de la capa difusa, y el punto de neutralidad (potencial Z) (Mayoral, 2014).

La importancia del potencial Z es que su valor está relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales, indicando el grado de repulsión entre partículas adyacentes cargadas en una dispersión. Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas, un potencial Z alto le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la

agregación. Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y se forman flóculos, en lugar de una dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial Z se estabilizan eléctricamente, mientras que los coloides con bajo potencial Z tienden a coagular o flocular (Hanaor *et al.*, 2012; Mayoral, 2014; Madureira *et al.*, 2015; Liu y He, 2015; Jardim *et al.*, 2015).

La estabilidad de las dispersiones también depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y las fuerzas de atracción de Van der Waals (Batalla-Mayoral *et al.*, 2014). Jardim *et al.* (2015) reportaron que a potenciales Z mayores de +30 mV, se favorece la estabilidad y se incrementa la posibilidad de que exista una interacción entre la superficie de las partículas con componentes cargados negativamente de las membranas celulares, como los lípidos. Sin embargo, el pH y la concentración del quitosano juegan un papel importante en dicho potencial, debido a que a pH menores de 6.3, los grupos amino (NH_3^+) se podrán protonar, y esto se verá reflejado en su potencial Z (Nafee *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012; Hellmers *et al.*, 2013; Grillo *et al.*, 2015).

Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier. La espectroscopía de infrarrojo ha sido una técnica indispensable en el análisis de materiales durante más de setenta años. Su aplicación recae en la identificación de compuestos en una muestra (ej. alteración de alimentos), en el seguimiento de la formación de un compuesto en determinada reacción (ej. síntesis de compuestos), la degradación de determinado tipo de compuesto en una muestra (ej. degradación de grasas por oxidación), hasta la identificación de microorganismos contaminantes en un alimento (ej. *Aspergillus niger* contaminante de cacahuete) (Jia *et al.*, 2016; Kaya-Celiker *et al.*, 2015; Motshekga *et al.*, 2015).

Debido a que cada material es una combinación única de átomos, no existen dos compuestos que produzcan exactamente el mismo espectro infrarrojo (huella digital basada en frecuencia e intensidad característica de bandas). Por lo tanto, la espectroscopía infrarroja brinda la posibilidad de identificar (análisis cualitativo) diferentes tipos de materiales. Además, el tamaño de los picos en el espectro es una indicación directa de la cantidad (análisis cuantitativo utilizando algoritmos de software modernos) de material presente.

Propiedades biológicas

La nanotecnología ha permitido el desarrollo de una gran variedad de materiales (fibras, geles, partículas sólidas, entre otras) de origen orgánico e inorgánico a escala nanométrica, con aplicaciones innovadoras en áreas como biotecnología, electrónica, administración de fármacos, cosméticos, ciencia de los materiales, ingeniería aeroespacial y biosensores.

Actualmente, se están explorando aplicaciones que sean amigables con el medio ambiente “verdes” en el área de la agricultura, como es el desarrollo de nuevos fertilizantes, aditivos, plaguicidas, conservadores, entre otros, de base biológica. Dentro de esta gran variedad de materiales se encuentran los biocompositos (nanopartículas compuestas de base biológica), a los cuales se le atribuyen propiedades fisicoquímicas únicas por su gran área superficial en relación al volumen, tamaño, forma y estructura la superficie. Su eficiencia se ha atribuido principalmente al tamaño, en donde a medida que este disminuye desde micro a nano escala, sus propiedades aumentan significativamente (Hsu *et al.*, 2011). Aunque estas propiedades son atractivas especialmente en la innovación de fármacos y en agricultura, su aplicación aún se encuentra en duda. Por ejemplo, en el caso de las nanopartículas metálicas se han encontrado ciertos riesgos potenciales para los seres humanos y el medio ambiente (Nel *et al.*, 2006), que han sido asociados con bioacumulación. Es por ello que cada vez se han vuelto más necesarios los estudios de toxicidad y biocompatibilidad de los sistemas nanoestructurados.

Toxicidad. Las investigaciones que se han realizado sobre la toxicidad de materiales nanoestructurados a base de quitosano, presentan evidencia de que no sólo el tamaño juega un papel importante en su toxicidad, sino un conjunto de factores como el tipo de compuesto cargado, concentración, solventes, agentes entrecruzantes y surfactantes, solubilidad, tipo de medio o solución en donde son resuspendidos, tiempo de exposición y tipo de organismo en donde se realiza el ensayo (Loh *et al.*, 2010; Grillo *et al.*, 2015; Sarhan y Azazzy, 2015).

Loh *et al.* (2010) evaluaron el efecto de nanopartículas de quitosano de mediano peso molecular a nivel hepatotóxico, encontrando que el tamaño ($< 25 \pm 7$ nm) y la concentración (0.1-1 % p/v) afectan de manera significativa la viabilidad y proliferación de líneas celulares provenientes de

hígado humano. El efecto citotóxico lo atribuyeron a la capacidad que tienen las nanopartículas de internalizarse en la célula (núcleo), debido a su tamaño menor a 25 nm. Lo anterior desata una serie de anomalías a nivel metabólico (aumento en la actividad de la enzima CYP3A4 capaz de metabolizar sustancias exógenas y endógenas e inhibición de la deshidrogenasa mitocondrial) y a nivel morfológico (daño a la membrana, citoplasma y organelos amorfos). Grillo *et al.* (2015) evaluaron el efecto ecotóxico y genotóxico de nanopartículas de quitosano-paracuat elaboradas a partir de quitosano de bajo peso molecular, cuyo tamaño fue de 213 ± 7.8 nm. Ellos observaron daños a nivel cromosómico en células de *Allium cepa* y en la viabilidad del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuestas al compuesto de nanopartículas quitosano-paracuat (moderadamente tóxico: 1-10 mg/L) y paracuat (altamente tóxico: 0.1-1 mg/L). Sin embargo, al encapsular el paracuat en la matriz de quitosano, se observó una reducción significativa de su toxicidad, lo cual fue atribuido al nulo efecto tóxico las partículas de quitosano solas (> 50 mg/L) en la viabilidad y a nivel cromosómico. Sarhan y Azazzy (2015) evaluaron el efecto citotóxico de nanofibras de miel-polivinil-alcohol-quitosano con y sin entrecruzamiento (con gluteraldehído) sobre fibroblastos de ratón recién nacido expuestos durante tres días, mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Evaluaron diferente proporción de los componentes de las nanofibras (30% miel: 7% polivinil-alcohol y 5.5, 3.5 y 1.5% de quitosano), encontrando que al crecer los fibroblastos en presencia de la nanofibra sin entrecruzante, estos presentaban un comportamiento similar al del control con respecto a su porcentaje de viabilidad ($\approx 100\%$) y su morfología. Sin embargo, en la nanofibra entrecruzada con gluteraldehído, el porcentaje de viabilidad disminuyó hasta 84%, probablemente debido a la presencia de trazas de gluteraldehído.

Como se mencionó anteriormente, se han realizado diferentes estudios para elucidar el efecto tóxico de materiales a base de quitosano, sin embargo, no hay reportes aún del efecto ecotóxico en organismos como la *Artemia salina* (pequeño crustáceo), los cuales son de utilidad para evaluar toxicidad aguda. El uso de este ensayo se ha extendido ampliamente en investigaciones de toxicología debido a la disponibilidad comercial de huevecillos secos, capaces de eclosionar exitosamente bajo condiciones estandarizadas en un laboratorio. Este ensayo es utilizado para evaluar la toxicidad de una gran diversidad de compuestos, desde extractos de plantas,

micotoxinas hasta materiales dentales (Solis *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1997; Molina-Salinas *et al.*, 2006).

Mutagenicidad. La identificación de agentes capaces de inducir mutaciones constituye un procedimiento importante para evaluar la seguridad y los riesgos para la salud humana de materiales con actividad biológica. Su aplicación va dirigida a la conservación de frutas y hortalizas en el área de la industria agrícola o en el área de la biomedicina. Los agentes mutagénicos, ya sean físicos o químicos, son capaces de inducir cáncer y esto ha conducido a la evaluación temprana de la mutagenicidad al proponer nuevos materiales. Como pruebas preliminares, las mutaciones génicas pueden ser detectadas en sistemas bacterianos debido a que la mutación causa cambios en los requerimientos necesarios para su crecimiento, mientras que el daño en los cromosomas de una célula de mamífero puede ser evaluado mediante la observación de la ruptura o reordenamiento de los cromosomas celulares (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000).

El ensayo de mutagenicidad de Ames (*Salmonella*/microsomale mutagenesis assay) está específicamente diseñado para detectar mutagénesis inducida químicamente y se realiza en cepas mutadas de *Salmonella typhimurium* (Ames *et al.*, 1983). La cepa *S. typhimurium* (His⁻) posee una mutación que no le permite crecer en ausencia del aminoácido histidina. Poseen características genotípicas y fenotípicas propias, entre ellas la capacidad de revertir espontáneamente la mutación His⁻ en His⁺ en un número repetible de colonias, al ser expuestas a sustancias mutagénicas de diversos orígenes (fármacos, aceites, alimentos, entre otras). Se considera que la sustancia es mutagénica cuando duplica el número de la reversión espontánea de estas cepas (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000).

En el caso particular de materiales a base de quitosano, se tiene poca información acerca de su efecto mutagénico evaluado mediante el ensayo de Ames. Hu *et al.* (2012) evaluaron el efecto mutagénico de nanomicelas de quitosano conjugado con ácido esteárico, y observaron que este material no induce mutaciones en cepas de *Salmonella*, lo cual hace que sean potencialmente seguras en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, es necesario complementar con estudios toxicológicos superiores a esté.

Actividad antifúngica. Actualmente es bien conocido el efecto antimicrobiano del quitosano y materiales elaborados a partir de él. Respecto a los nanomateriales, específicamente nanopartículas y micropartículas de quitosano, se ha observado un aumento en la eficiencia y eso se le atribuye a la relación tamaño-superficie. Sin embargo, aún se busca nuevo conocimiento sobre los mecanismos de acción que estas ejercen en la inhibición o retardo del crecimiento, especialmente en hongos fitopatógenos.

Dentro de los trabajos con nanomateriales a base de quitosano enfocados a la actividad antimicrobiana *in-vitro*, Cota-Arriola *et al.* (2013) evaluaron el efecto de nano y micropartículas de quitosano-tripolifosfato sobre la morfología y crecimiento *in-vitro* de *Aspergillus parasiticus*. Estos autores observaron un efecto fungistático mayor en el crecimiento radial de *A. parasiticus* en medio con partículas quitosano-tripolifosfato comparado con las partículas de quitosano. Este efecto se atribuyó a un posible efecto sinérgico entre los grupos protonables del quitosano y los grupos fosfatos capaces de interactuar con componentes esenciales para el crecimiento del hongo como iones divalentes (Ca^{+2} , Mg^{2+}) y proteínas. Además, a menor tamaño de partícula observaron mayor efecto inhibitorio en la germinación de esporas y cambios en la morfología, características de hifas y esporas. Por otra parte, Kaur *et al.* (2015) evaluaron el efecto antifúngico de nanocompositos de quitosano-zinc y quitosano-cobre sobre el crecimiento radial de *Aspergillus flavus*. Ellos encontraron un efecto sinérgico inhibitorio (93%) en *A. flavus* cuando fue expuesto a nanocompositos de quitosano-zinc. Además, al encapsular las nanopartículas de zinc o cobre en la matriz de quitosano (nanocomposito) se aumentó la biocompatibilidad. Sin embargo, los autores no detallan a que le atribuyen el efecto sobre el crecimiento radial, más allá del tamaño de las partículas (≈ 15 nm). Sarhan y Azzazy (2015) evaluaron el efecto antibacteriano de nanofibras elaboradas a partir de miel-polivinilalcohol-quitosano contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por el método de cuenta total de células viables. Se observó que estas presentaron un efecto dosis-respuesta en relación con la actividad antimicrobiana. Asimismo, se observó mayor actividad a las 24 y 48 horas de incubación sobre *S. aureus* y *E. coli* cuando la concentración de quitosano en la nanofibra aumentó (1.5-5.5%). Sin embargo, el efecto se potenció a las 48 horas, lo que fue atribuido a una mayor liberación de los grupos aminos en la nanofibra (biodegradable), provocando una mayor interacción con la superficie bacteriana.

Luque-Alcaraz *et al.* (2016) evaluaron el efecto de biocompositos de quitosano-aceite de pirul (*Schinus molle*) sobre la viabilidad y morfología de esporas de *Aspergillus parasiticus*. Se encontró que estas redujeron la viabilidad de esporas hasta 40-50% con las concentraciones más altas probadas ($\approx 200 \mu\text{g/mL}$). Además, mencionan que no observaron cambios en el diámetro de las esporas, ni irregularidades en el desarrollo de las hifas durante la germinación con respecto al control. El mecanismo de acción propuesto por estos autores es la desestabilización de la membrana celular debido a interacciones electrostáticas como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, ejercidas por el bionanocomposito con componentes cargados negativamente en la superficie de la spora (ej. proteínas y fosfolípidos).

Los estudios *in vivo* de compositos y biocompositos de quitosano aplicados para la prevención del crecimiento microbiano en frutas y hortalizas, han presentado buenos resultados respecto al control de enfermedades poscosecha. La mayoría de estos trabajos han utilizado la incorporación de iones metálicos, los cuales presentan una alta eficiencia. Chowdappa *et al.*, (2014) evaluaron tratamientos de compositos de quitosano-plata para la reducción de la enfermedad antracnosis en mango provocada por el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Estos compositos a una concentración del 1%, mostraron la capacidad de controlar el grado de lesión ($0.03 \pm 0.04 \text{ cm}^2$) en los frutos durante 7 días de almacenamiento, además de inhibir completamente la germinación de esporas *in vitro*.

Jia *et al.*, (2015) evaluaron la capacidad de compositos de quitosano-plata (100-200 nm) para reducir el crecimiento poscosecha de *Botrytis cinerea* sobre arándanos frescos. La aplicación de los tratamientos se realizó mediante inmersión de los frutos en diferente concentración de los compositos. Se encontró que estos lograron inhibir el crecimiento micelial característico hasta el cuarto día de almacenamiento o fue por cuatro días, cuando se utilizó una concentración de 0.4 mg/mL. A concentraciones mayores (0.8-1.6 mg/mL) no se observaron síntomas de crecimiento fúngico.

Si bien, los trabajos anteriormente mencionados han presentado excelentes resultados en el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de hongos fitopatógenos y otros microorganismos, uno de los principales inconvenientes de la aplicación de partículas metálicas es su toxicidad, debido a la

acumulación y al estrés oxidativo generado tras su exposición (Manke *et al.*, 2013). Esto hace necesario el desarrollo de nanomateriales antimicrobianos biocompatibles, biodegradables y de baja o nula toxicidad. .

JUSTIFICACIÓN

En investigaciones recientes se ha evidenciado que factores como la globalización, el crecimiento demográfico e inclusive el cambio climático generado a partir de la actividad humana, favorecen la propagación y crecimiento de plagas alrededor del mundo, encontrándose a nivel mundial que las principales pérdidas en cultivos son producidas por hongos. *Aspergillus* es uno de los principales géneros de hongos que se encuentran relacionados con pérdidas pre y poscosecha, desde granos y cereales hasta una gran variedad de frutas, verduras y frutos secos. Se ha reportado la presencia de *Aspergillus niger* y sus productos tóxicos (ocratoxina A) como contaminantes en diversos tipos de nueces, papaya, uva, papa y tomate, provocando infecciones cuando su almacenamiento no es adecuado y poniendo en duda la seguridad de los consumidores. La búsqueda de métodos para el control de hongos contaminantes de alimentos y de cultivos, se encuentra centrada en el desarrollo de materiales que sean eficientes, y que su aplicación no represente problemas para el medio ambiente ni para la salud del consumidor final. Ante estos retos, hoy en día se ha vuelto atractiva la aplicación de materiales biocompatibles, biodegradables y con baja toxicidad, como los metabolitos de origen microbiano y biopolímeros de origen natural con actividad antimicrobiana como el quitosano. Este biopolímero se perfila como un buen candidato en sus diferentes formas (derivados, recubrimientos comestibles, películas, hidrogeles, cápsulas, nanofibras, micropartículas y nanopartículas), ya que ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra varios géneros de hongos. Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción y toxicidad que ejerce el quitosano en su forma de matriz acarreadora (biocompuestos). Con base en lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo sintetizar, caracterizar parcialmente y evaluar la actividad biológica de biocompuestos de quitosano con ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA), un metabolito microbiano identificado como principio activo en biocontrol, para el control *in vivo* e *in vitro* de *Aspergillus niger*.

HIPÓTESIS

Mediante la técnica de nanoprecipitación es posible sintetizar biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico, los cuales presentan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro e in vivo de *Aspergillus niger*. Asimismo, estos presentan no efectos tóxicos y/o mutagénicos.

OBJETIVOS

General

Sintetizar, caracterizar parcialmente y evaluar la actividad biológica de biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) para el control *in vivo* e *in vitro* de *Aspergillus niger*.

Específicos

- Sintetizar biocompositos de quitosano con ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) mediante nanoprecipitación y caracterizarlos parcialmente
- Evaluar la toxicidad aguda y la mutagenicidad de los biocompositos (QT-PCA).
- Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de los biocompositos (QT-PCA) sobre el crecimiento macroscópico, microscópico y viabilidad de esporas de *Aspergillus niger*.
- Evaluar el efecto antifúngico *in vivo* de los biocompositos (QT-PCA) en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma') infectados artificialmente con *Aspergillus niger*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Quitosano (QT) Se utilizó una muestra comercial de quitosano (Sigma-Aldrich, 448877) de mediano peso molecular (153 kDa), con una viscosidad de 200-800 cps y un grado de desacetilación de 75-85%.

Ácido pirrol-2-carboxílico (PCA). Se utilizó ácido pirrol-2-carboxílico comercial (Sigma-Aldrich, P73609), con un peso molecular de 111.10 g/mol y 99% de pureza.

Ácido acético glacial. Se utilizó una muestra comercial (J.T. Baker, 9508-05) con un grado de pureza >99.7%.

Metanol. Se utilizó una muestra comercial (J.T. Baker, 9093) con un grado de pureza 99.8%.

Tween 80. Se utilizó una muestra comercial de surfactante polisorbato 80 (Faga Lab, 2378).

Ácido láctico. Se utilizó un muestra comercial (J.T. Baker, 0194-02) con un 85% de pureza.

Medios de cultivo. Se utilizó medio sólido papa dextrosa (BD, 213400), medio sólido Czapek (BD, 233910) y medio líquido Czapek, el cual se preparó con los siguientes reactivos: sacarosa (Fermont, 07642), nitrato de sodio (Faga Lab, 2279), sulfato de magnesio (Faga Lab, 2344), fosfato de potasio dibásico (Fermont, 35842), cloruro de potasio (24842) y sulfato ferroso (J.T. Baker, 2070-01).

Marcadores de fluorescencia. Blanco de Calcoflúor (F3543-5G, Sigma-Aldrich, USA), yoduro de propidio >94 % pureza (P4170, Sigma-Aldrich, USA), kit células vivas/muertas (04511 Cellstain double staining kit, Sigma-Aldrich, USA) y 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato >94 % pureza (35845-5G, Sigma-Aldrich, USA).

Síntesis de Biocompositos Quitosano-Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)

Elaboración de soluciones de quitosano

Para la elaboración de las soluciones de quitosano en un matraz volumétrico de 100 mL se agregaron 0.5% (p/v) de hojuelas de quitosano y 1% (v/v) de ácido acético glacial. Posteriormente, se aforó con agua tridestilada y se dejó en agitación magnética constante durante 24 horas. La solución de quitosano se consideró lista para usar cuando este se disolvió completamente y no había presencia de sólidos suspendidos o precipitados (Figura 9).

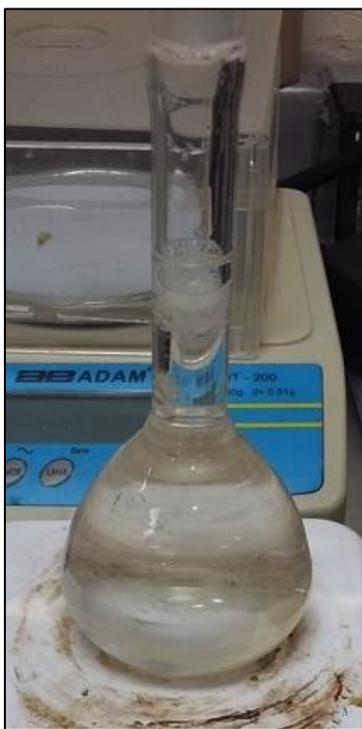


Figura 9. Solución de quitosano completamente diluida en 1% (v/v) de ácido acético.

Nanoprecipitación

Síntesis de partículas de quitosano. Las partículas de quitosano se sintetizaron mediante la técnica de nanoprecipitación con adición y sin adición de Tween 80, de acuerdo al método reportado por Luque *et al.* (2012, 2016) basado en las propiedades fisicoquímicas del quitosano. A una fase no solvente compuesta por 40 mL de metanol + 0.025 μ L de Tween 80 se le adicionaron 2.5 mL de una solución de quitosano al 0.5% (p/v) mediante goteo utilizando una bomba peristáltica (Bio-Rad, EUA) (Figura 10), a un flujo de 0.87 a 0.88 mL/min con una manguera plástica (1 mm grosor) colocada a dos centímetros por encima de la superficie. Este procedimiento se realizó bajo agitación magnética moderada (700 rpm). Una vez obtenidas las partículas, se eliminó el solvente en un rotavapor (Yamato, EUA), durante 45 min a 100 rpm y una temperatura no mayor a 45 °C. Las partículas se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua miliQ y se almacenaron en refrigeración por no más de una semana para los análisis posteriores.

Concentración de agente activo a utilizar. La concentración de ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) a incorporar en los biocompositos se seleccionó con base al trabajo de Nguyen *et al.*, (2012, 2015). Ellos reportan una concentración mínima inhibitoria de 4 μ g/mL para *Phytophthora capsici*, por lo que para nuestro estudio se seleccionó una proporción de 1:4 para la elaboración del biocomposito.

Síntesis de biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico.

Los biocompositos de QT-PCA se sintetizaron siguiendo el procedimiento anterior, pero adicionando 15.64 mg del agente activo a la fase no solvente (metanol + Tween 80). Una vez obtenidos los biocompositos, se eliminó el solvente en un rotavapor (Yamato, EUA), durante 45 min a 100 rpm y una temperatura no mayor a 45 °C. Las partículas se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua miliQ y se almacenaron en refrigeración por no más de una semana para los análisis posteriores.

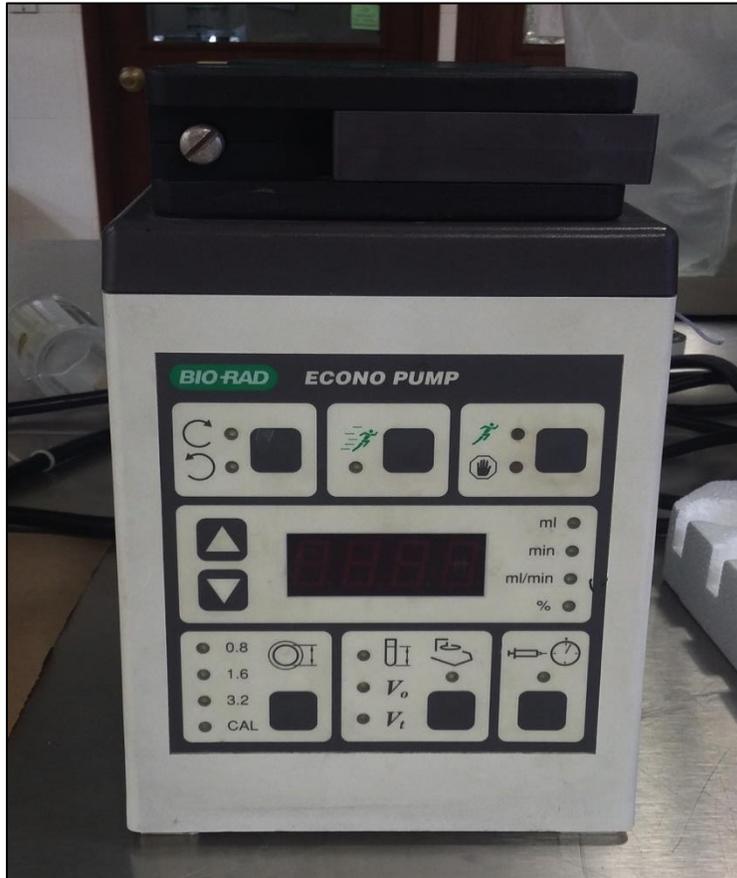


Figura 10. Bomba peristáltica utilizada en la síntesis de biocompositos (QT-PCA) y partículas de quitosano con y sin adición de Tween 80 como agente surfactante.

Caracterización Parcial de Biocompositos de Quitosano-Ácido Pirrol-2-Carboxílico (QT-PCA)

Microscopía electrónica de barrido ambiental

El tamaño y la morfología de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) y las partículas de quitosano, se determinó mediante un análisis de imágenes en un microscopio electrónico de barrido ambiental (SEM-A). Para ello en viales Eppendorf de 2 mL fueron inoculados con una alícuota de 1 mL de una suspensión de esporas de *A. niger* (2×10^6 esporas/mL). En un tubo se agregó una alícuota (1 mL) de la suspensión de biocompositos de QT-PCA y en el otro las partículas de quitosano, para tener una concentración final de esporas de 1×10^6 esporas/mL. Lo anterior se realizó por duplicado y los viales fueron incubados durante 12 horas a 28 °C. Posteriormente, las muestras fueron enviadas para su análisis al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) unidad Guaymas, en Guaymas, Sonora.

Dispersión dinámica de luz

Para determinar la distribución de tamaño de partícula, carga superficial (potencial Z) e índice de polidispersión (PDI), los biocompositos de QT-PCA se analizaron directamente en un instrumento de dispersión de luz Mobius (Wyatt Technology) equipado con un láser polarizado verticalmente. Se realizaron 10 mediciones a 25 °C con una longitud de onda de 532 nm. El ángulo de detección se mantuvo a 90° con respecto al haz de luz incidente con una duración de 60 segundos a temperatura ambiente. (Luque-Alcaraz *et al.*, 2016).

Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Para la caracterización y elucidación de las posibles interacciones en los biocompositos, se realizó un análisis de infrarrojo de las partículas de quitosano, ácido pirrol-2-carboxílico y los biocompositos de QT-PCA. Se obtuvieron sus respectivos espectros en un espectrofotómetro

Perkin Elmer a un rango de 4000 a 450 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} en modo de transmitancia.

Evaluación de la Toxicidad Aguda y Mutagenicidad de Biocompositos de Quitosano-Ácido Pirrol-2-Carboxílico (QT-PCA)

Toxicidad Aguda a *Artemia salina*

El ensayo de toxicidad aguda a *Artemia salina* de los biocompositos de QT-PCA, las partículas de quitosano (QT) y el ácido pirrol-2-carboxílico se llevó a cabo siguiendo la técnica de Jiménez *et al.*, (1997) y Molina-Salinas *et al.*, (2006)

Primeramente, los huevecillos de *A. salina* se mantuvieron almacenados a 20 °C antes de su uso. Se incubaron para su eclosión durante 24 horas a 25 °C en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de agua marina previamente esterilizada, al cual se le colocó un sistema de aireación mediante una bomba de aire para peceras e iluminación artificial (luz blanca) (Jiménez *et al.* 1997; Molina-Salinas *et al.* 2006). Después de su eclosión, los nauplios de *A. salina* se separaron en grupos de 10 especímenes, transfiriéndolos con una pipeta Pasteur del matraz de eclosión a tubos de ensayo de 18 x 150 mm con 5 mL de una mezcla de agua marina estéril para cada uno de los tratamientos a diferente concentración (150, 100, 50, 25, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los tubos se mantuvieron bajo iluminación y se expusieron a los tratamientos por 24 horas. Los nauplios sobrevivientes se contaron macroscópicamente y se determinó el porcentaje de mortalidad. Como control se utilizó agua marina mezclada con el diluyente de la suspensión de partículas (agua miliQ). Una vez concluida la prueba, los nauplios se sacrificaron mediante la adición de 100 μL de fenol al 5% a cada tubo de ensayo (Molina-Salinas *et al.* 2006; Jiménez *et al.* 1997).



Figura 11. Matraz para eclosión de *Artemia salina* durante 24 h a 25 °C en agua salina bajo aireación y luz artificial.

Mutagenicidad en *Salmonella* / Técnica de Ames

Para evaluar el posible efecto mutagénico de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico se realizó la prueba de mutagenicidad en *Salmonella* descrita por Maron y Ames (1983). La técnica utiliza cepas mutadas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) histidina dependientes creadas por ingeniería genética, las cuales tienen la capacidad de detectar compuestos que causan mutaciones génicas.

Primeramente, las cepas de *S. typhimurium* se incubaron en un baño María a 37 °C con agitación a 120 rpm durante 12 h (Maron y Ames, 1983). En este ensayo se utilizó una concentración máxima (6.25 mg/placa) y una mínima (625 µg/placa) para los biocompositos de QT-PCA y para las partículas de quitosano. En tubos de ensayo se añadió 2.0 mL de top agar con histidina y biotina y se mantuvieron a 45 °C. Posteriormente se les adicionó 100 µL de cultivo fresco de *S. typhimurium* (TA98 y TA100), y se les agregó la concentración de los biocompositos de QT-PC y las partículas de quitosano en ausencia o presencia de 500 µL de la mezcla enzimática S9 (extracto enzimático de hígado de rata). Los tubos se agitaron y se vertieron sobre placas con

agar mínimo glucosado las cuales, se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, se cuantificó el número de revertantes inducidas en cada placa.

En esta prueba se utilizó un control positivo que consistió en la contaminación con 500 ng de AFB₁ disuelto en DMSO para cada cepa (TA98 y TA100), y un control negativo (revertantes espontáneas) conteniendo solamente *S. typhimurium* (TA 98 y TA100), con y sin mezcla enzimática S9. Los resultados se expresaron como positivo cuando las revertantes inducidas mostraron una relación dosis-respuesta con respecto al control positivo y duplicaron el número de revertantes espontáneas del control negativo (Maron y Ames, 1983).

Evaluación de la Actividad Antifúngica *in-vitro* de Biocompositos de Quitosano-Ácido Pirrol-2-Carboxílico (QT-PCA)

La actividad antifúngica de los biocompositos de QT-PCA y las partículas de quitosano se determinó mediante el análisis de los parámetros de crecimiento (extensión radial y germinación de esporas), parámetros morfométricos (diámetro de hifas y esporas), viabilidad celular y ensayos de fluorescencia para evaluar el estrés oxidativo y el daño en las estructuras celulares (membrana plasmática, pared celular y septos) de *Aspergillus niger* (NRRL-3).

Propagación de la cepa *Aspergillus niger* (NRRL-3)

La propagación de la cepa de *Aspergillus niger* se realizó partiendo de un cultivo monospórico, se inocularon en matraces Erlenmeyer con agar papa dextrosa (Bioxon) e incubaron por 5 días a 28 ± 2 °C. Los matraces se almacenaron en refrigeración para su posterior uso. Este procedimiento se realizó en cada análisis para obtener una suspensión de esporas a partir de un cultivo joven.

Suspensión de esporas de *Aspergillus niger* (NRRL-3)

La suspensión de esporas de *A. niger* se realizó a partir de los matraces de propagación, previamente descritos. Para re suspender las esporas se añadió medio Czapek líquido estéril al matraz y se agitaron magnéticamente por no más de un minuto. El conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico (Leica DME, NY, USA). La concentración de esporas se ajustó dependiendo de los ensayos a realizar.

Viabilidad de esporas de *Aspergillus niger* por el método de XTT

El efecto de los biocompositos de QT-PCA y de las partículas de quitosano sobre la viabilidad de esporas de *A. niger* (NRRL-3) se realizó en base al método de XTT propuesto por Meletiadis *et al.*, (2001) con algunas modificaciones. Este método se basa en la reducción de sales de tetrazolio por las enzimas mitocondriales (principalmente succinato deshidrogenasa) a un compuesto colorido, formazan que es de color naranja. La formación del complejo colorido se monitoreó mediante espectroscopia UV-VIS a 450 nm, lo cual da una noción de la actividad metabólica de células viables (Meshulam *et al.*, 1995; Meletiadis *et al.*, 2001; Luque-Alcaraz *et al.*, 2016).

En una microplaca de 96 pozos se colocó una alícuota de 100 μ L de la suspensión de esporas de *A. niger* (2×10^6 esporas/mL) por triplicado y se incubó por 4 horas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, a cada pozo se le añadió una alícuota de 100 μ L de las diferentes concentraciones de cada tratamiento (QT-PCA, QT y PCA) (Tabla 1) para tener una concentración final de esporas de 1×10^6 y se re incubaron por 4 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Por último, se añadió 57 μ L de una mezcla de solución de XTT a una concentración de 2mg/mL (bromuro de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide y menadiona (1 mM) (SIGMA, EUA) en cada pozo. La microplaca se incubó por 5 h más en las mismas condiciones y al final se leyó en un lector de placas de Elisa (BIO-RAD Modelo iMark, EUA). El porcentaje de viabilidad de esporas se determinó con respecto al control del crecimiento normal sin tratamiento con el reactivo XTT.

Tabla 2. Concentraciones de los tratamientos evaluados por el método de viabilidad de esporas XTT

	Quitosano µg/mL	Compuesto Bioactivo (PCA) µg/mL
Partículas de Quitosano (QT)	1200	-
	800	-
	400	-
	200	-
	20	-
Partículas del composito quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)	1200	300
	800	200
	400	100
	200	50
	20	5
Ácido pirrol-2-carboxílico (PCA), en solución	-	300
	-	200
	-	100
	-	50
	-	5

Estimación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

A partir de los resultados generados en el ensayo de viabilidad de esporas, se realizó un análisis de supervivencia/confiabilidad (Probit Survival /Reliability test) (NCSS, versión 10) para obtener las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) de los biocompositos de QT-PCA, las partículas de quitosano y del ácido pirrol-2-carboxílico (PCA).

Germinación de esporas de *Aspergillus niger*

El efecto de los biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano sobre la germinación de las esporas de *A. niger* se realizó en medio líquido Czapek. En cada pozo de una placa de doce pozos, se colocó un portaobjetos circular estéril. A cada uno se le añadieron 750 µL de la suspensión de 2×10^5 esporas/mL y 750 µL de la suspensión de cada tratamiento siendo la concentración final en cada pozo la CI₅₀ anteriormente calculada. Finalmente, la placa se incubó a 28 ± 2 °C y se tomó un portaobjetos al azar a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de incubación. El conteo de esporas se realizó en un microscopio óptico (Leica DME, NY, USA) equipado con una cámara (Infinity 1). Se contó aleatoriamente 100 esporas, germinadas y no germinadas. Una

espora se consideró germinada cuando la longitud del túbulo germinal alcanzó el doble del diámetro total de la espora (Abdel-Rahim *et al.*, 1985).

El porcentaje de inhibición en la germinación se determinó con respecto al control mediante la ecuación 1 descrita por Martínez-Camacho *et al.*, (2011) y Cota-Arriola *et al.*, (2011):

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \left(\frac{Si}{Sc}\right) \times 100 \text{ (eq.1)}$$

Donde Sc es el porcentaje de esporas germinadas en el medio de control y Si , es el porcentaje de esporas germinadas en el medio con los biocompositos de QT-PCA, las nanopartículas de quitosano y el PCA.

Parámetros cinéticos para la germinación de esporas. Los datos experimentales de esporas germinadas (%) *versus* tiempo obtenido, se ajustaron en un modelo cinético logístico presente en la ecuación 2:

$$S = S_{\max} / [1 + ((S_{\max} - S_0) / S_0) \exp^{-kt}] \text{ (eq.2)}$$

Donde S es el porcentaje de esporas germinadas después de un determinado tiempo (t), S_{\max} es el máximo porcentaje de esporas germinadas cuando $t \rightarrow \infty$ (%), S_0 es el porcentaje inicial de esporas germinadas, y k es la velocidad de germinación (h^{-1}) (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003; Vélez-Haro, 2013).

Parámetros morfométricos

El diámetro de las esporas fúngicas e hifas en la etapa de germinación en cada tratamiento, se midió en un microscopio óptico (Olympus) integrado con una cámara Infinity 1, con un objetivo de 40X. Se tomaron imágenes de las esporas durante la germinación y fueron analizadas con el programa Image Pro-Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc., USA). De cada tratamiento se tomaron al menos 60 mediciones del diámetro de las esporas y de las hifas. Para una misma hifa

se midió un máximo de dos diámetros tomados en secciones diferentes. La longitud de las hifas fue monitoreada en cada tratamiento a las 12 horas de incubación con al menos 60 mediciones (Cota-Arriola *et al.* 2011; Plascencia-Jatomea, 2004).

Microscopía de fluorescencia para el análisis de componentes celulares

Para evaluar el efecto de los biocompositos de QT-PCA sobre la morfología de *A. niger* se utilizaron tinciones de fluorescencia. Primeramente en una placa de 12 pozos se colocó un portaobjeto circular estéril, donde se agregó una alícuota de 750 μL de una suspensión de 2×10^5 de esporas/mL en medio líquido Czapek. Posteriormente, se añadieron 750 de la suspensión de cada tratamiento (QT-PCA/Tween 80, NP's QT/Tween80 y PCA) siendo la concentración final en cada pozo la CI_{50} anteriormente calculada. La placa se incubó durante 12 h a 28 ± 2 °C y al finalizar el tiempo de incubación se retiraron los portaobjetos circulares y se colocaron sobre un portaobjetos rectangular para agregar cada uno de los siguientes colorantes:

Daños en septos e hifas. Este estudio se realizó mediante la tinción con 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Blanco de Calcoflúor. El colorante emite fluorescencia cuando se adhiere a la quitina y glucanos, permitiendo observar las paredes celulares y septos de las hifas. Para su visualización se utilizó un filtro azul-violeta a λ_{ex} 350-360 y λ_{em} 600-610 nm, respectivamente. Para este análisis se realizaron observaciones de las hifas y septos tras esperar 15-30 minutos a que se absorbiera el colorante (Cota-Arriola *et al.*, 2011; Plascencia-Jatomea, 2004).

Doble tinción de células vivas/muertas con Calceína-AM /Yoduro de Propidio. El efecto en la viabilidad de *A. niger*, se evaluó de acuerdo con el procedimiento estándar proporcionado por Sigma Aldrich (04511 Cellstain double staining kit) kit de viabilidad. Este método se basa en una doble tinción, ya que el acetoximetilo de calceína es convertido a calceína por las esterasas celulares, dando una coloración verde fluorescente (células viables; λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 515 nm); mientras que el yoduro de propidio solo se intercala con el ADN cuando las células presentan daño en sus membranas, produciendo un color rojo fluorescente (células muertas; λ_{ex} 535 nm, λ_{em} 617 nm). Para esto se añadieron 2 gotas de solución de colorantes a las muestras con esporas

control y esporas expuestas con cada tratamiento (QT-PCA/Tween 80, NP's QT/Tween80 y PCA) y se dejaron reposar de 30 a 60 minutos en una cámara húmeda con refrigeración.

Daño a la permeabilidad de la membrana. Se utilizó la tinción con yoduro de propidio (IP), ya que esta técnica evalúa el daño producido en la permeabilidad de la membrana por la exposición a un agente nocivo. Una vez que existe daño, es posible la penetración del IP al interior de la espora germinada, y se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN con una relación de una molécula de colorante por cada 4 o 5 pares de base, observándose un color rojo fluorescente intenso (λ_{ex} 535 nm, λ_{em} 617 nm) en toda la estructura. Si las esporas no presentan daño, el brillo rojo intenso puede ser observado solo alrededor de su membrana y no en el interior. A las muestras con esporas control y esporas expuestas con cada tratamiento (QT-PCA/Tween 80, NP's QT/Tween80 y PCA) se les agregó 2 gotas de IP a 3 μ M y se dejaron reposar de 30 a 60 minutos en una cámara húmeda con refrigeración.

Detección *in vitro* de la producción de ROS por la técnica de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína Diacetato (DCFH-DA). Para la determinar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por cada uno de tratamientos, se utilizó el método de 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) propuesto por LeBel *et al.*, (1992), Roesslein *et al.*, (2013) y Rastogi *et al.*, (2015). Este es un indicador de estrés oxidativo intracelular y también permite cuantificar especies reactivas de oxígeno. El método se basa en la tinción de esporas con el colorante no polar (2,7-DCFH₂-DA) capaz de atravesar la membrana plasmática; una vez dentro de la célula los grupos lipofílicos de la molécula son liberados por la acción de las enzimas estererasas, dejando la molécula cargada (compuesto polar, DCFH₂); que cuando es oxidado por las ERO intracelulares u otras peroxidasas pasa a ser altamente fluorescente (diclorofluoreceína; verde intenso λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 515 nm). A las muestras con esporas control y esporas expuestas con cada tratamiento (QT-PCA/Tween 80, NP's QT/Tween80 y PCA) les agregó 2 gotas de la solución stock de (2,7-DCFH₂-DA) a 5 μ M (35845 Sigma-Aldrich, USA) y se dejaron reposar de 12 horas en una cámara húmeda con refrigeración.

Al finalizar el tiempo de absorción para cada una de las tinciones, las muestras se observaron en un microscopio invertido (Leica DMI8) equipado con filtros de fluorescencia (filtro DAPI excitación 350/50 y emisión 460/40, filtro FITC excitación 480/40 y emisión 527/30, filtro RHOD excitación 546/10 y emisión 585/40), cámara enfriada DFC 450C (Leica) y software overlay de fluorescencia (LAS AF versión 3.1.0, Leica Microsystems, USA).



Figura 12. Microscopio invertido equipado con filtros de fluorescencia (Leica DMI8) y cámara enfriada DFC 450C (Leica).

Crecimiento radial de *Aspergillus niger*

La actividad de los biocompositos de QT-PCA y de partículas de QT en el crecimiento radial de *A. niger* se realizó en placas de Petri con agar Czapek, en las que se adicionó sobre su superficie 100 μ L de la CI_{50} de cada tratamiento. En el centro de cada placa se inoculó una concentración de 1×10^5 esporas/mL y se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que en la placa control el crecimiento micelial alcanzó la orilla. Como control se utilizaron placas sin tratamiento. El radio de las colonias se midió manualmente cada 12 h con una regla. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto al control sin tratamiento (Cota- Arriola *et al*, 2013).

$$\text{Inhibición(\%)} = 1 - \left(\frac{R_i}{R_c}\right) \times 100 \text{ (eq.3)}$$

Donde R_c es el radio promedio de la colonia en el medio de control, y R_i es el radio de la colonia en el medio con los tratamientos. El bioensayo se realizó por triplicado (Cota-Arriola *et al*, 2013).

Parámetros cinéticos para el crecimiento radial. Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados en el modelo modificado de Gompertz (ecuación 3), para estimar los parámetros cinéticos del crecimiento radial en el programa estadístico STATISTICA (Velez-Haro, 2013).

$$\text{Ln (Dt/Do)} = A \exp\{-\exp[(V_m \cdot e/A)(\lambda - t) + 1]\} \text{ (eq.4)}$$

Donde A es el máximo crecimiento alcanzado durante la fase estacionaria, V_m es la velocidad máxima de crecimiento (1/0.5 días), λ es la fase lag (0.5 días) y e es el exp (1).

Evaluación de la Actividad Antifúngica *in vivo* de los Biocompositos de Quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) en *Solanum lycopersicum* 'Roma'

El ensayo *in-vivo* del efecto antifúngico de los biocompositos QT-PCA sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* (NRRL-3), se realizó en tomate Saladette (*Solanum lycopersicum* 'Roma') variedad Tisey producido en el estado de Sinaloa. El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Tepic, en Tepic, Nayarit.

Propagación de la cepa *Aspergillus niger* (NRRL-3)

La propagación de la cepa de *A. niger* (NRRL-3) se realizó partiendo de un cultivo monospórico, donde se inocularon matraces Erlenmeyer con agar papa dextrosa (Bioxon), los cuales se incubaron por 5 días a 28 ± 2 °C. Los matraces se almacenaron en refrigeración para su posterior

uso. Este procedimiento se realizó en cada análisis para obtener una suspensión de esporas a partir de un cultivo joven.

Suspensión de esporas de *Aspergillus niger*

La suspensión de esporas de *A. niger* se realizó a partir de los matraces de propagación, previamente descritos. Para re suspender las esporas se le añadieron 5 mL de Tween 80 estéril al matraz y se agitó magnéticamente por no más de un minuto. El conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico (Leica DME, NY, USA). La concentración de esporas se ajustó dependiendo de los ensayos a realizar (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011).

Determinación de la concentración de esporas a utilizar y verificación de la patogenicidad sobre diferentes modelos de estudio

Para elegir un modelo biológico con un adecuado grado de daño se evaluó la patogenicidad de *A. niger* en papaya Maradol (*Carica papaya* L.), fresa (*Fragaria*), plátano (*Musa paradisiaca* L.), cebolla (*Allium cepa*), jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) y tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma') adquiridas en la central de abastos de la ciudad de Tepic, Nayarit.

Primeramente se realizó una desinfección de cada fruto por separado con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.5% por 5 minutos, se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. Posteriormente, con un punzón (2 mm de profundidad y 2 mm de ancho) se les realizó una herida en su superficie. Los frutos fueron inoculados utilizando dos técnicas diferentes: una mediante la aplicación de micelio en el área herida y otra depositando en la herida 30 μ L de la suspensión de esporas a diferente concentración (10^5 y 10^6 esporas·mL⁻¹). Finalmente las frutas se colocaron en charolas de unicel previamente etiquetadas y se protegieron con bolsas de plástico (45 cm de alto x 40 cm de largo x 15 cm de ancho). Dentro de la bolsa se colocó un vaso con 250 mL de agua para asegurar un 80-95 % de humedad relativa y se almacenaron a 25 ± 2 °C en una cámara de crecimiento (Novatech, CA-550).



Figura 13. Cámara de crecimiento con monitoreo de humedad relativa y temperatura (Novatech, CA-550).

Aplicación de los tratamientos por el método de aspersión

Para el ensayo *in-vivo* se seleccionó a *Solanum lycopersicum* 'Roma' y se siguieron los métodos propuestos por Ragazzo-Sánchez *et al.*, (2011) y Bautista-Rosales *et al.*, (2014) con algunas modificaciones.

La limpieza y desinfección de los frutos de tomate se realizó de igual forma que como se describió en el apartado anterior. Para cada tratamiento y los controles se seleccionaron 10 frutos sanos. A los frutos se les realizó una herida con un punzón (2 mm de profundidad y 2 mm de ancho) en la parte superior. Los tratamientos se aplicaron con un aspersor manual sobre la superficie de cada tomate y se dejaron secar en una campana de flujo laminar (Tabla 3). Los

frutos fueron inoculados directamente en las heridas con 1×10^6 esporas/mL de *A. niger* con una micropipeta (30 μ L) y se almacenaron en las condiciones ya mencionadas anteriormente.

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias medias de cada uno de los diferentes materiales, estimadas a partir de los datos experimentales *in-vitro* sobre *Aspergillus niger*

Concentración (μ g/mL)	Nanopartículas de Quitosano	Biocompositos de Quitosano-PCA
CI ₅₀	450	380
2 CI ₅₀	900	760
3 CI ₅₀	1350	1140

Se tuvieron dos grupos control: uno sin inocular y el otro inoculado con 30 μ L de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL esporas con agua estéril. La medición del diámetro de la lesión se tomó cada dos días durante nueve el almacenamiento con un vernier para calcular el porcentaje de reducción de heridas infectadas y de reducción de la severidad con las siguientes ecuaciones (5 y 6):

$$\text{Reducción de la severidad (\%)} = 100 - \left(\frac{(\text{Severidad del tratamiento en cm} * 100)}{\text{Severidad del control en cm}} \right) \text{ (eq. 5)}$$

$$\text{Reducción de heridas infectadas (\%)} = 100 - \left(\frac{(\text{Heridas infectadas en el tratamiento} * 100)}{\text{Heridas infectadas en el control}} \right) \text{ (eq. 6)}$$

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar y a los datos experimentales se les realizó un análisis de varianza a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey a un intervalo de confianza de 95 % (JMP versión 5.0).

Los datos experimentales de viabilidad de esporas se utilizaron para estimar la concentración inhibitoria media (CI₅₀), mediante un análisis de supervivencia/confiabilidad (Probit Survival /Reliability test) (NCSS, versión 10).

Para el ensayo *in-vivo* en tomate Saladette se utilizó un diseño unifactorial con 8 niveles por bloques de tiempo. El experimento se repitió dos veces (una heridas por fruto) y cada experimento constó de ocho grupos con diez miembros. A los datos experimentales se les realizó un análisis de varianza a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Se realizó una comparación de medias con la prueba de rangos múltiples de Tukey a un intervalo de confianza de 95 % (STATISTICA, versión 13).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de Biocompositos de Quitosano- Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) por Nanoprecipitación

Nanoprecipitación

La síntesis de los biocompositos de QT-PCA y las nanopartículas de quitosano se realizó con base al método de nanoprecipitación propuesto por Luque-Alcaraz *et al.* (2012, 2016), con algunas modificaciones como la adición de Tween 80 como surfactante para aumentar la estabilidad a la agregación/aglomeración. La concentración incorporada de Tween 80 (polisorbato 80) fue de 0.05% (p/v) y se obtuvieron suspensiones de partículas con y sin surfactante. Las suspensiones opalescentes del biocomposito de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (4:1) se almacenaron por 7 días en refrigeración para su caracterización parcial y evaluaciones posteriores (Figura 14)



Figura 14. Suspensión biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico obtenidas por el método de nanoprecipitación.

Caracterización Parcial Fisicoquímica de Biocompositos de QT-PCA

Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)

La formación y morfología de los biocompositos de QT-PCA/Tween 80 y de las partículas de quitosano/Tween 80 se determinó por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). En las imágenes se evidenció una gran cantidad de nanopartículas de quitosano y biocompositos QT-PCA/Tween 80 dispersas en medio líquido Czapek (Figura 15). Las formas que se alcanzan a apreciar en las imágenes son puntos diminutos, lo cual sugiere que los biocompositos y las nanopartículas presentan forma esférica. Respecto al tamaño, según la escala de medición en la imagen de ESEM, es menor a 1 μm . Con el método de síntesis propuesto por Luque-Alcaraz *et al.* (2012, 2016) se obtuvieron biocompositos de quitosano-aceite de pirul con un tamaño aproximado de 200-600 nm y nanopartículas de quitosano entre 50-100 nm, además de presentar forma esférica bien definida, lo cual es similar a lo obtenido en el presente trabajo.

Mediante este análisis se captaron imágenes de una suspensión de esporas de *A. niger* expuesta a los diferentes tratamientos (partículas de quitosano y biocomposito de QT-PCA/ Tween 80), incluyendo en tratamiento control. Se observó que a diferencia del control (Figura 16), las esporas inoculadas en el medio adicionado con las partículas perdieron su forma esférica, encontrándose esporas ovaladas o con pérdida total de su esfericidad (Figura 17).

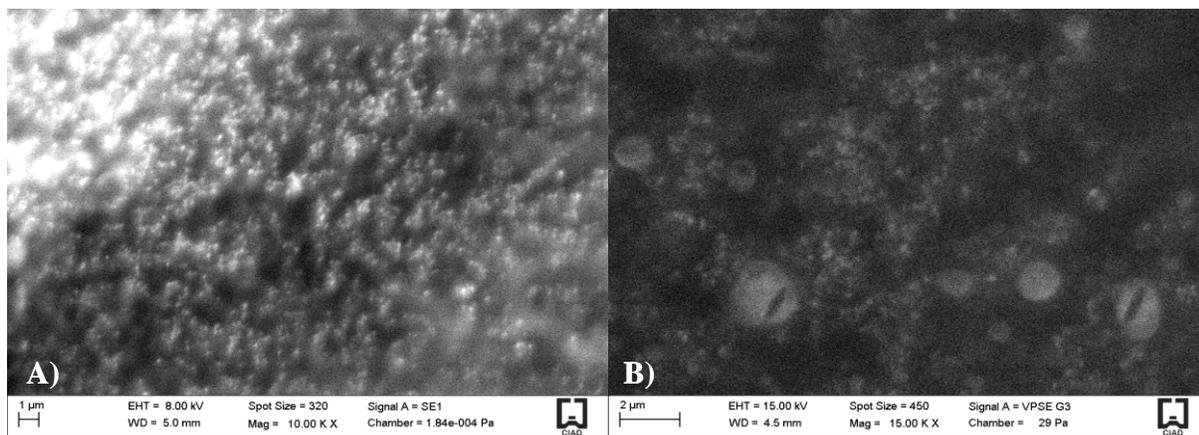


Figura 15. Imágenes de ESEM de: A) nanopartículas de quitosano; A) biocomposito de QT-PCA. Ambas partículas se encuentran suspendidas en medio líquido Czapek inoculado con esporas de *Aspergillus niger*, después de 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. La barra de escala representa 1 y 2 μm .

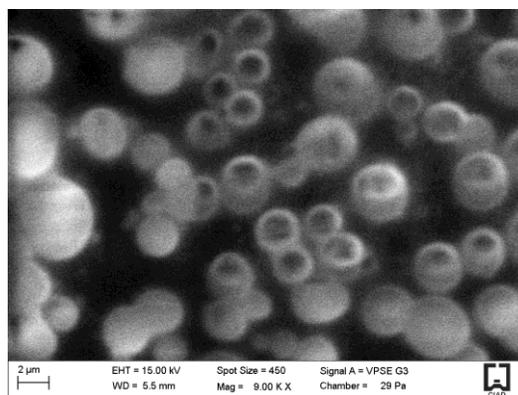


Figura 16. Imágenes de ESEM de esporas de *Aspergillus niger* después de 12 h de incubación a 28 ± 2 °C, mostrando zonas polarizadas que indican el inicio de un crecimiento normal. La barra de escala representa 2 μm .

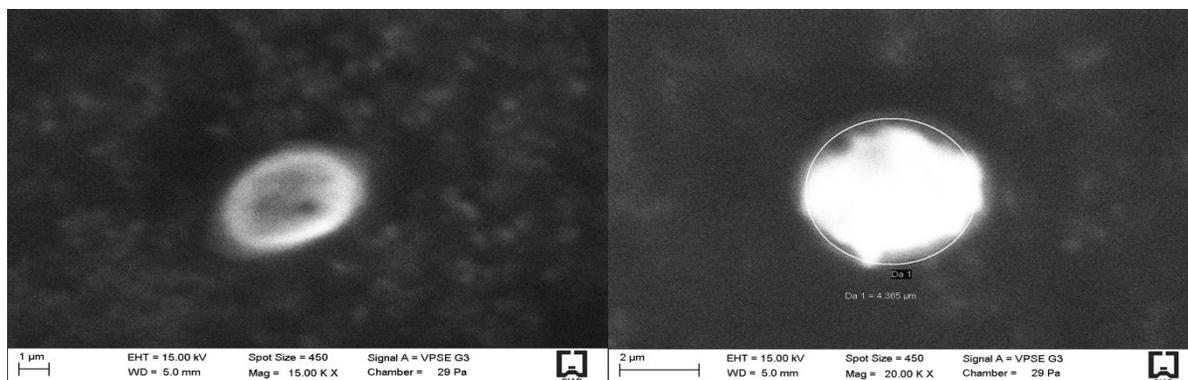


Figura 17. Imágenes de ESEM de esporas de *Aspergillus niger* inoculado en medio adicionado con partículas de quitosano, en la cual se observan cambios en su estructura después de 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. La barra de escala representa 1 y 2 μm .

Tamaño hidrodinámico, potencial Z e índice de polidispersión

El análisis de dispersión de luz indicó que el tamaño promedio de las partículas de quitosano y de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) sin surfactante (Tween 80) fue de 2919 ± 297 nm (distribución monomodal), y de 1793 ± 104 y 416.9 ± 5 nm (distribución bimodal), respectivamente (Figura 18, Tabla 4).

Tabla 4. Tamaño hidrodinámico, índice de polidispersión y potencial Z para partículas de quitosano y biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico

	Partículas de Quitosano		Biocomposito	Quitosano/ácido
	S/Tween 80	C/Tween 80	S/Tween 80	C/Tween 80
Tamaño	2919 ± 297 nm	278 ± 30 nm	1793 ± 104 nm 416.9 ± 5 nm	502 ± 72 nm
Potencial ζ (mV)	$+61 \pm 5$	$+46 \pm 17$	$+58 \pm 7$	$+55 \pm 15$
PDI	0.571 ± 0.18	0.571 ± 0.00	0.571 ± 0.00	0.571 ± 0.00

El tamaño promedio se obtuvo directamente del punto medio de las curvas diámetro (nm) vs intensidad (%). Los valores de tamaño hidrodinámico, potencial Z e índice de polidispersión corresponden a la media de 20 mediciones \pm desviación estándar.

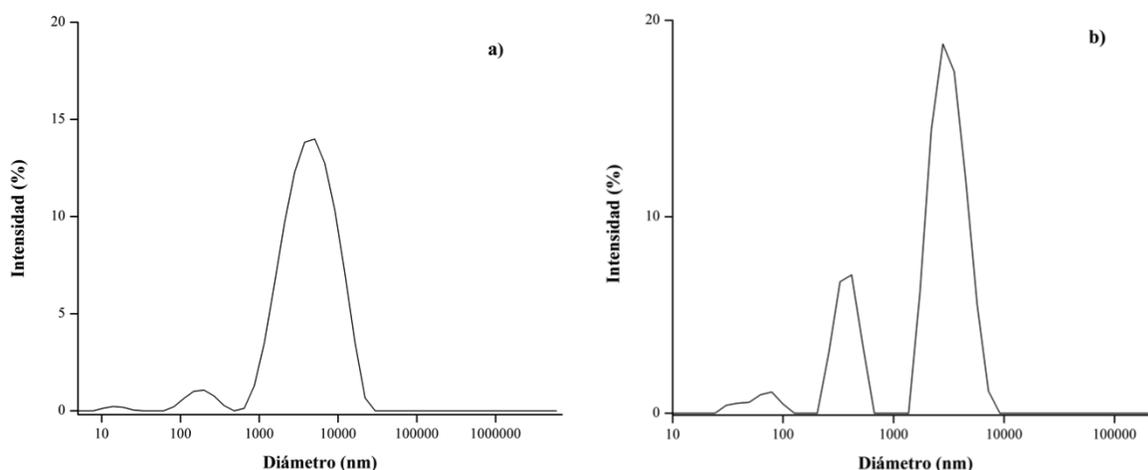


Figura 18. Dispersión de tamaños de partícula de: a) partículas de quitosano b) biocompositos quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico. Ambas partículas sintetizadas sin Tween 80 0.05%.

La incorporación del surfactante a la matriz polimérica durante la síntesis dio como resultado una reducción del tamaño de partícula, encontrando distribuciones monomodales con tamaños de 278 ± 30 y 502 ± 72 nm para las partículas de quitosano y del biocomposito QT-PCA, respectivamente (Figura 19, Tabla 4). Esto sugiere que el surfactante redujo los procesos de aglomeración en la suspensión, posiblemente debido a una reducción en el número de interacciones electrostáticas entre las moléculas (Madureira *et al.*, 2015; Liu y He, 2015; Jardim *et al.*, 2015), reduciendo el impedimento estérico y mejorando el arreglo tridimensional intra e intermolecular. Por lo anterior, su adición si tiene un efecto positivo en el sistema, controlando los procesos de aglomeración/agregación de las partículas en suspensión.

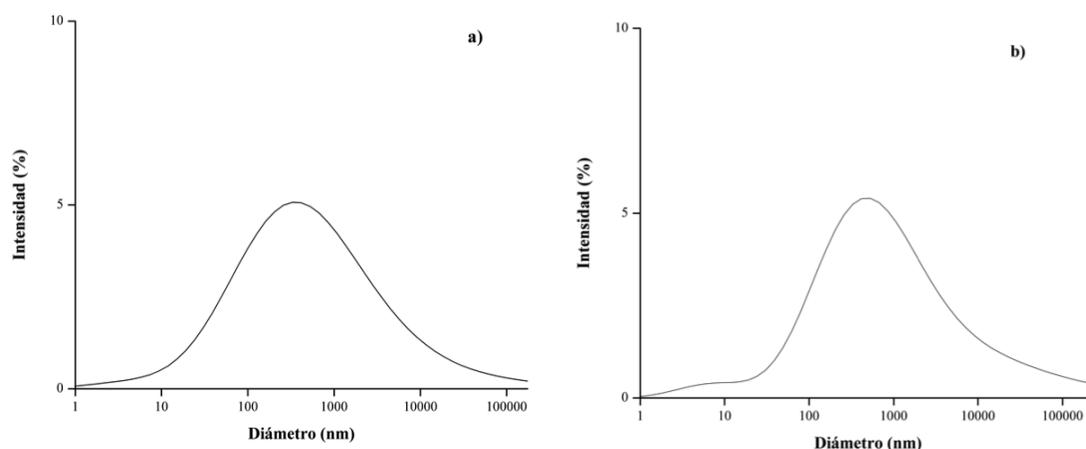


Figura 19. Dispersión de tamaños de partícula de: a) partículas de quitosano; b) biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico. Ambas partículas sintetizadas con Tween 80 al 0.05% (v/v) como surfactante.

La adición del surfactante causó una disminución de los valores del potencial Z en ambos tipos de partícula, siendo este más evidente en las partículas de quitosano. En general, se observaron altos valores de potencial Z positivo ($> +46$ mV), lo cual favorece la estabilidad de la dispersión impidiendo la agregación de las partículas debido a la repulsión entre cargas iguales (Hanaor *et al.*, 2012; Mayoral, 2014; Madureira *et al.*, 2015; Liu y He, 2015; Jardim *et al.*, 2015). Las partículas de quitosano mostraron menores valores de potencial Z con respecto al biocomposito QT-PCA, no obstante, la diferencia no fue notable.

Respecto a el índice de polidispersión, se encontró que todas las muestras analizadas fueron polidispersas (>0.4), es decir, que existen diferentes grupos de tamaños de partículas. Esto es importante, ya que puede favorecer la agregación después de determinado tiempo, lo que se asocia con una baja estabilidad (Figuras 18 y 19, Tabla 4). El tamaño obtenido para los biocompositos QT-PCA y las partículas de quitosano, con Tween 80, ofrece una mayor superficie de contacto con el exterior de la célula (espora), además, la carga superficial positiva permite establecer posibles interacciones con componentes cargados negativamente como proteínas y glucoproteínas (Xing *et al.*, 2015). Lo anterior podría relacionarse con una mayor actividad antimicrobiana.

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

A partir del análisis de FT-IR se obtuvieron espectros de nanopartículas de quitosano, ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) y del biocomposito QT-PCA (Figura 20, Tabla 5). Para las nanopartículas de quitosano se observaron claramente las bandas características de amina primaria a los $3,500-3,300\text{ cm}^{-1}$, además de los estiramientos básicos representativos del grupo $-\text{OH}$ presente en la molécula a los $3,715\text{ cm}^{-1}$. En el espectro del ácido pirrol-2-carboxílico se identificaron sus principales grupos funcionales: el carbonilo a los $1,649\text{ cm}^{-1}$, el estiramiento de la amina secundaria que conforma el anillo de pirrol a los $3,349\text{ cm}^{-1}$, así como la vibración de flexión a los 876 cm^{-1} . En el espectro correspondiente al biocomposito de QT-PCA, se observó la aparición de una señal entre los $1,475-1,575\text{ cm}^{-1}$ (Figura 20c), la cual puede atribuirse al grupo de las amidas. Esta señal sugiere una interacción del ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) con el quitosano a las condiciones utilizadas, la cual se puede dar mediante la reacción de amidación del quitosano (Figura 21).

Tabla 5. Resumen de señales características observadas en los espectros de FT-IR del biocomposito de QT-PCA/Tween 80, nanopartículas de quitosano/Tween 80 y ácido pirrol-2-carboxílico.

Ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) puro		Nanopartículas de quitosano		Biocomposito de QT-PCA	
Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
3600	-OH	3715	-OH	3698	-OH
3349	-NH	3500-3300	-NH amina I	3500-3300	-NH amina I
3124	=C-H-	2951	-CH ₃	2951	-CH ₃
1649	C=O; C=C	2843	-CH	2841	-CH
1552	-NH flexión	1693	-C=O	1673	-C=O
1435		1569	-N-H	1574	-N-H
1388		1406	-CH ₃	1404	-CH ₃
1320	-CN	1279	-C-N	1277	-C-N
1186	-C-OH	1114	-C-O-C-	1116	-C-O-C
1119		1015	-C-O	1014	-C-O
945	N/A	668	N/A		
876	-NH flexión (pirrol)			830	-NH flexión (pirrol)

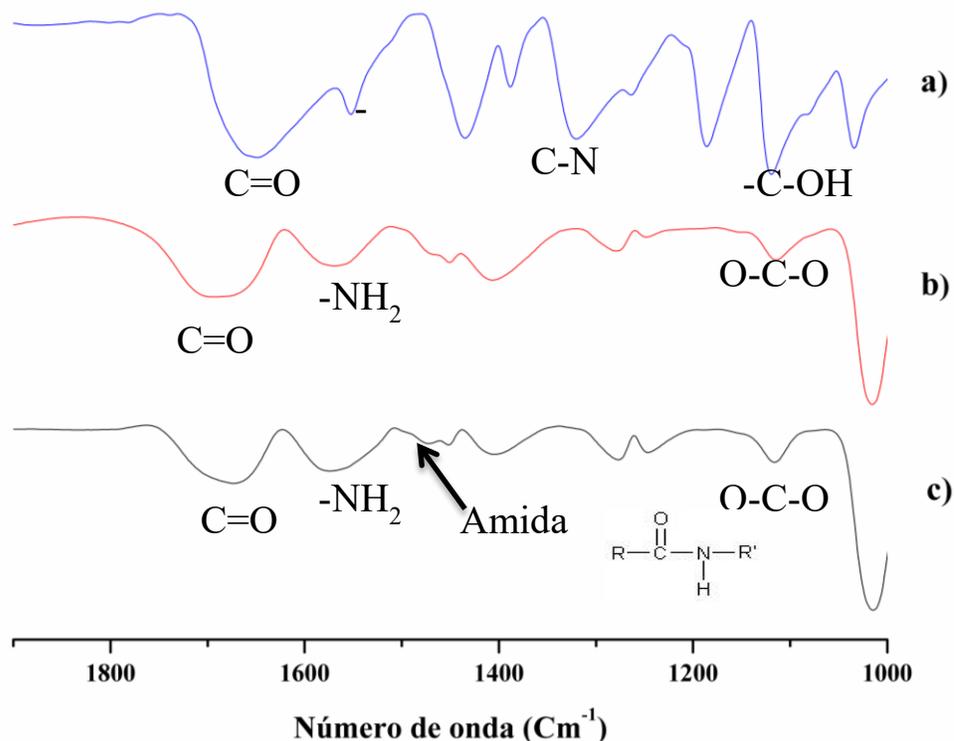


Figura 20. Espectros de infrarrojo de: a) ácido pirrol-2-carboxílico; b) partículas de quitosano/Tween 80; c) biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80, correspondiente a la región de 1,900 a 1,000 cm⁻¹.

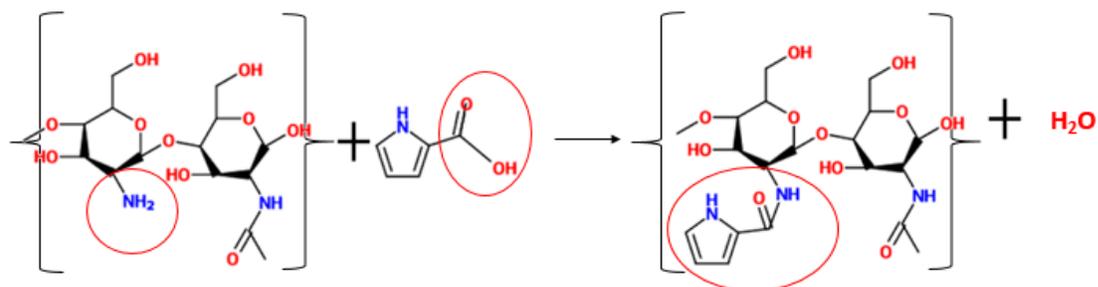


Figura 21. Reacción de amidación entre quitosano y un ácido carboxílico.

Actualmente, la reacción de amidación del quitosano se ha utilizado para obtener materiales modificados que presenten propiedades superplastificantes, para la obtención de membranas de inmovilización enzimática o para aumentar su solubilidad, entre otros fines (Bhattacharai *et al.*, 2006; Velásquez *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2014). Se ha reportado por Velásquez *et al.* (2007) la modificación de cadenas de quitosano con cloruro de oleilo mediante la amidación del grupo amina libre del quitosano y el carboxilo del cloruro de oleilo, reacción que se lleva a cabo sólo en presencia de un catalizador como el hidróxido de sodio (NaOH). Sin embargo, existen reportes que indican que esta reacción es posible sin el uso de un catalizador. Por ejemplo, Bhattacharai *et al.* (2006) conjugaron quitosano con ácido láctico basándose en la reactividad del grupo amino NH_3^+ y carboxilo COO^- de las dos moléculas. Lv *et al.* (2014) modificaron al quitosano con anhídrido málico, encontrando una señal correspondiente a amida II después de los $1,423\text{ cm}^{-1}$, la que evidencia la unión entre ambos compuestos. Por lo anterior, se sugiere que es posible que la señal presentada por los biocompositos de QT-PCA, corresponda a una reacción de amidación sin catálisis bajo las condiciones de la presente investigación.

Evaluación de Toxicidad Aguda y Mutagenicidad de Biocompositos de Quitosano-Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)

Toxicidad aguda mediante el ensayo de *Artemia salina*

Para conocer la toxicidad potencial de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) sin adición de Tween 80 como surfactante durante la síntesis, se realizó la técnica de toxicidad aguda usando como modelo a *Artemia salina*. Este es un organismo acuático de la familia de los crustáceos que es muy utilizada en pruebas básicas de toxicidad. En el presente estudio se realizaron dos experimentos por duplicado; el primero consistió en exponer a los nauplios de *Artemia salina* a diferentes concentraciones de una mezcla de la suspensión de partículas (QT o QT-PCA) y agua marina, a las cuales se les monitoreó el pH final. En el segundo experimento se monitoreó el pH inicial de cada suspensión y este se ajustó por arriba de 4.

En el primer experimento se observó 100 % de mortalidad en las suspensiones de biocompositos de QT-PCA y de partículas de quitosano en todas las concentraciones evaluadas, mientras que en la solución de ácido pirrol-2-carboxílico se encontró 100 % de supervivencia. Con lo anterior se puede sugerir que la causa de mortalidad es debido al pH ácido de la mezcla (agua de mar/partículas), el cual fue menor de 5. Esta aseveración se corroboró utilizando controles de las mezclas de agua de mar con agua ultra pura (mili Q) a pH de 3.2 y 5.3, respectivamente. Con esto se observó 100 % de mortalidad a pH ácido (3.21) y 100% de supervivencia a pH 5.3 (Tablas 6 y 7). El pH de las partículas sintetizadas fue alrededor de 3, lo cual fue un factor determinante en el experimento, debido a que *A. salina* presenta sensibilidad a pH menores de 6, siendo su óptimo entre 7.5-8.5 (Vos, 1979). Debido a que el pKa del quitosano es de 6.4, las soluciones del biopolímero y las partículas tendían a la precipitación del quitosano a valores de pH > 6.4. En la figura 22 se puede observar que el pH juega un papel importante en la supervivencia y desarrollo del ensayo de toxicidad con *Artemia*, ya que a pH menor de 5 el porcentaje de supervivencia disminuyó considerablemente. Debido a la variabilidad del pH no

fue posible establecer si las diferentes concentraciones del material presentaban o no un efecto tóxico.

Tabla 6. Valores de pH final para cada concentración de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico, partículas de quitosano y solución de ácido pirrol-2-carboxílico.

Proporción QT/PCA (µg/mL)	Biocompositos QT-PCA (pH)	Concentración de QT (µg/mL)	Partículas Quitosano (pH)	Concentración De PCA (µg/mL)	Solución PCA (pH)
150/37.5	3.40 ± 0.007	150	3.26±0.014	150	5.98±0.028
100/25	3.51 ± 0.007	100	3.40±0.007	100	6.49±0.021
50/12.5	3.89 ± 0	50	3.75 ± 0.00	50	7.35±0.035
25/6.25	4.51 ± 0.113	25	4.412±0.007	25	7.92±0.007
15/3.76	5.43 ± 0.155	15	5.40 ± 0.080	15	8.07±0.007

Los valores son las medias de dos réplicas ± la desviación estándar (DE).

Tabla 7. Valores de pH de las soluciones de agua de mar con diluyente con y sin ajuste de pH.

Controles	Agua de Mar	Agua de Mar	Agua de mar + Agua mili Q	Agua de mar + Agua mili Q
	Sin ajustar	Ajustado	Sin ajustar	Ajustado
pH	8.3	3.2	8.2	5.3

Los controles se ajustaron en base al menor pH detectado en los biocompositos y en las partículas. El ajuste de pH se realizó con HCl concentrado y/o NaOH 1N.

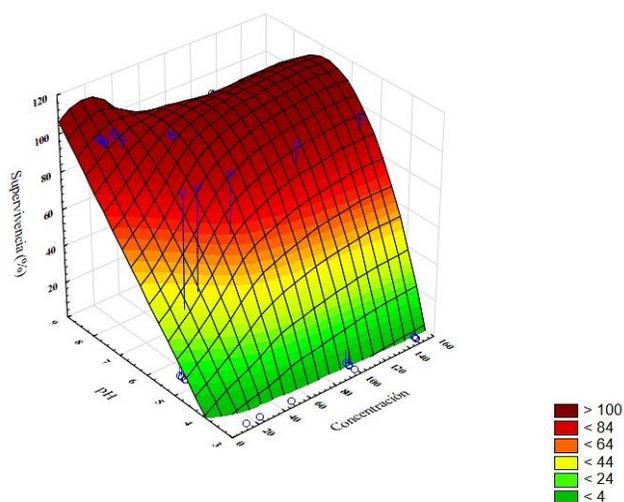


Figura 22. Superficie de respuesta del porcentaje de supervivencia de *Artemia salina* expuesta a pH final monitoreado para cada concentración de partículas de quitosano y de biocompositos de QT-PCA.

En el segundo experimento (con ajuste del pH) se observó un efecto dosis-respuesta para los tratamientos de partículas de quitosano y biocompositos de quitosano; es decir, a mayor concentración de partículas menor porcentaje de supervivencia ($p < 0.05$) (Figura 23). El pH del medio disminuyó al incrementarse la concentración de partículas, encontrándose un alto porcentaje de mortalidad de los organismos expuestos a las concentraciones mayores (Tabla 8) (Figura 24). Cuando el pH de la mezcla fue mayor a 6, se observó la precipitación de las partículas en la suspensión y valores alrededor del 15 % de supervivencia al final de las 24 horas. En los nauplios que no sobrevivieron se evidenciaron filamentos aparentemente de quitosano, lo cual redujo el movimiento hasta quedar casi inmóviles en el fondo del tubo de ensaye. Este fenómeno se puede explicar debido a la insolubilidad que presenta el quitosano cuando su pKa se encuentra por arriba de 6-6.5 (Pillai *et al.*, 2009; Baldrick, 2010; Jardim *et al.*, 2015). Al estar precipitado el quitosano, lleva a creer que la suspensión de partículas en la mezcla (partículas/agua marina) no fue homogénea (a $\text{pH} > 6-6.5$), dando como resultado que los nauplios no estuvieran en contacto directo con las partículas durante el ensayo. Por lo anterior no se puede atribuir completamente el efecto tóxico a las partículas de quitosano o a los biocompositos de QT-PCA.

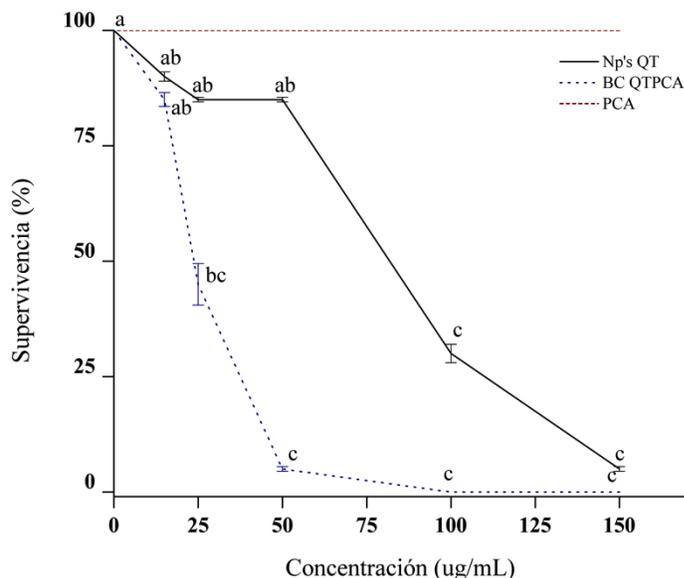


Figura 23. Porcentaje de supervivencia de *Artemia salina* (nauplios) expuestas a: a) biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (BC QT-PCA); b) partículas de quitosano (NP's QT); c) solución de ácido pirrol-2-carboxílico (PCA).

Tabla 8. Valores de pH final de suspensiones de biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico, partículas de quitosano y solución de ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) ajustado para cada concentración.

Proporción de QT/PCA (µg/mL)	Biocompositos QT-PCA (pH)	Concentración De QT (µg/mL)	Partículas Quitosano (pH)	Concentración De PCA (µg/mL)	Solución PCA (pH)
150/37.5	4.34±0.021	150	5.07±0.035	150	6.12±0.092
100/25	4.47±0.014	100	6.03±0.099	100	6.68±0.014
50/12.5	5.06±0.070	50	6.96±0.064	50	7.36 ±0.120
25/6.25	6.23± 0.120	25	7.26±0.134	25	7.89±0.071
15/3.76	6.68 ± 0.042	15	7.78±0.049	15	8.26± 0.042

Los valores son las medias de dos réplicas ± la desviación estándar. El ajuste del pH se realizó en la mezcla agua de mar + suspensión de partículas con HCl concentrado y/o NaOH 1N.

Tabla 9. Valores de pH de las soluciones de agua de mar con diluyente, con y sin ajuste de pH.

Controles	Agua de mar	Agua de mar	Agua de mar + Agua mili Q	Agua de mar + Agua mili Q
	Sin ajustar	Ajustado	Sin ajustar	Ajustado
pH	8.35	4.34	8.33	5.56

Los controles se ajustaron en base al pH menor encontrado en los biocompositos y en las partículas. El ajuste del pH se realizó utilizando solución de HCl concentrado y/o NaOH 1 N.

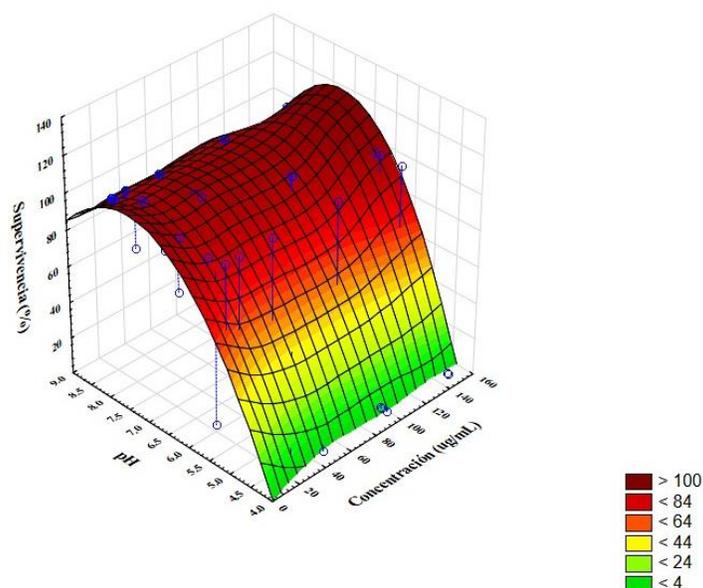


Figura 24. Superficie de respuesta del porcentaje de supervivencia de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de biocompositos QT-PCA y partículas de quitosano. El pH final fue ajustado arriba de 4.

De los resultados obtenidos a partir de este análisis se puede concluir parcialmente que el ensayo de toxicidad aguda con *Artemia salina* no es adecuado para evaluar el efecto tóxico de partículas de quitosano y los biocompositos de quitosano/ácido-pirrol-2-carboxílico. Lo anterior debido fundamentalmente a la insolubilidad que presentó el biopolímero a $\text{pH} > 6.4$. Además, el pH final del material sintetizado influyó en la supervivencia de estos organismos. Respecto al efecto de la solución de ácido pirrol-2-carboxílico, el estudio sugiere que no presenta toxicidad a las concentraciones evaluadas.

Mutagenicidad en cepas de *Salmonella* / Técnica de Ames

Para evaluar el efecto mutágeno de las partículas de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico sin la adición del Tween 80 durante la síntesis, se realizó la prueba de Ames descrita por Maron y Ames (1983), en la cual se utilizan cepas mutadas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) histidina dependientes (His^-) creadas por ingeniería genética. Estas cepas no crecen en medios libres de histidina a menos que exista una mutación (His^+), por lo que su crecimiento sirve como medida del grado de mutación que inducen ciertos compuestos o mezclas de compuestos. Se considera que un compuesto es mutágeno cuando se duplica el número de la reversión espontánea normal de estas cepas.

En este ensayo se evaluaron dos concentraciones para los biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (2.3 mg/mL y 231.8 $\mu\text{g/mL}$), y las partículas de quitosano (2.3 mg/mL y 231.8 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados obtenidos no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto al control de revertantes espontáneas de la cepa TA100, lo cual indica que no tienen la capacidad de inducir mutaciones de tipo puntual. Respecto al control de TA98, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) sólo para los biocompositos QT-PCA en la máxima concentración utilizada (2.3 mg/mL) donde se presentó una disminución en el número de revertantes espontáneas respecto al control, ya que el material ocasionó un efecto antibacterial en la cepa (Tabla 10) (Figura 25). Madureira *et al.* (2015) evaluaron el efecto inhibitorio de biocompositos de quitosano/polifenoles sobre bacterias Gram (-), entre ellas *S. typhimurium*, observando un efecto inhibitorio del 68 y 60 % al utilizar los biocompositos de quitosano de bajo y alto peso molecular con ácido protocatéquico, respectivamente. Por lo anterior, los

resultados obtenidos con la cepa TA98 sugieren que las partículas de QT y los biocompositos QT-PCA no tienen la capacidad de inducir mutaciones del tipo corrimiento del marco de lectura.

Hasta la fecha no se han reportado estudios epidemiológicos o estudios *in vitro* o *in vivo* sobre alguna asociación entre la exposición del quitosano y efectos mutagénicos en seres humanos o en animales (Raafat y Sahl., 2006). Por lo anterior, Baldrick (2010) sugiere que son necesarios estudios de toxicidad a corto plazo al proponer nuevos materiales a base de quitosano. En la presente investigación se evaluó si los materiales con actividad antifúngica sintetizados presentan la capacidad de inducir mutaciones o algún daño a ese nivel, debido a la evidencia de que quitosanos de bajo peso molecular atraviesan la membrana plasmática e interactúan con el ADN (Rabea *et al.* 2003; Goy *et al.* 2009). En la literatura actual no existe información acerca de evaluaciones del posible efecto mutágeno de quitosano en solución, partículas de quitosano o de biocompositos de quitosano con la prueba de mutagenicidad de Ames, sin embargo, existe evidencia del potencial antimutagénico de oligosacáridos de quitosano (Nam, Choi y Shon, 2001),

Tabla 10. Efecto mutagénico de biocompositos de QT-PCA y partículas de QT sin adición de Tween 80 como surfactante en *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

Concentración/placa	TA 98	TA 100
QT-PCA 2.3 mg/mL	11 ± 2 ^b	88±36 ^a
QT-PCA 231.8 µg/mL	18 ±3 ^{ab}	128 ±5 ^a
QT 2.3 mg/mL	26 ±4 ^a	132 ±18 ^a
QT 231.8 µg/mL	25 ±7 ^a	134 ±12 ^a

Revertantes espontáneas TA98: 17 ±1 y TA100: 131 ±12. Los valores son las medias de tres replicas ± DE. Diferente letra dentro de la columna indica diferencia significativa (p<0.05) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey.

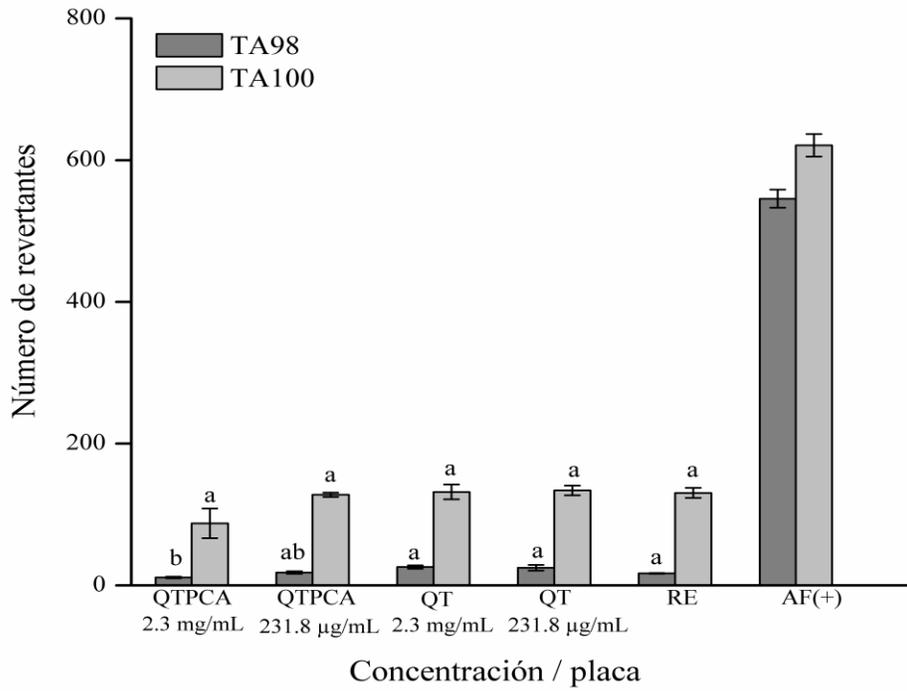


Figura 25. Efecto mutágeno de biocompositos de QT-PCA y partículas de QT en *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. RE: revertantes espontaneas; AF: aflatoxina (1000 µg/mL).

Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Biocompositos de Quitosano– Ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA)

Viabilidad de esporas de *Aspergillus niger* por el método de XTT y determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

El efecto de los biocompositos de QT-PCA y las partículas de quitosano sobre la viabilidad de esporas de *Aspergillus niger* se realizó mediante el método de XTT. Este método se basa en la reducción por enzimas mitocondriales de las sales de tetrazolio en formazan, un compuesto colorido (color naranja). La formación del complejo colorido se monitorea por espectroscopía UV-VIS, lo cual da una noción de la actividad metabólica de células viables (Meletiadis *et al.*, 2001).

El ensayo de viabilidad se llevó a cabo con dos formulaciones de partículas de quitosano y de biocompositos de QT-PCA: una adicionada con el surfactante (Tween 80, 0.05% v/v) y otra sin el surfactante. Se encontró que la viabilidad de las esporas de *A. niger* disminuyó al ser expuestas a ambas formulaciones de biocompositos, encontrándose un efecto dosis-respuesta. El porcentaje de esporas viables a las 9 horas se redujo ($p < 0.05$) al aumentar la concentración de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico, o bien, la concentración en las partículas de quitosano. Con la mayor concentración de biocomposito quitosano/PCA/Tween 80 (1,200/300 $\mu\text{g/mL}$) se alcanzó una reducción en la viabilidad del 58 %, mientras que en ausencia del Tween 80, la reducción en la fue mayor (cerca del 75 %). Se observó un comportamiento similar en la viabilidad de las esporas inoculadas en medio adicionado con partículas de quitosano (1, 200 $\mu\text{g/mL}$), con y sin surfactante (alrededor de 57 y 72%, respectivamente). En el presente ensayo, en los controles (Tween 80 y agua) se observaron valores \approx del 100 % de viabilidad de esporas (Figura 26 a y b).

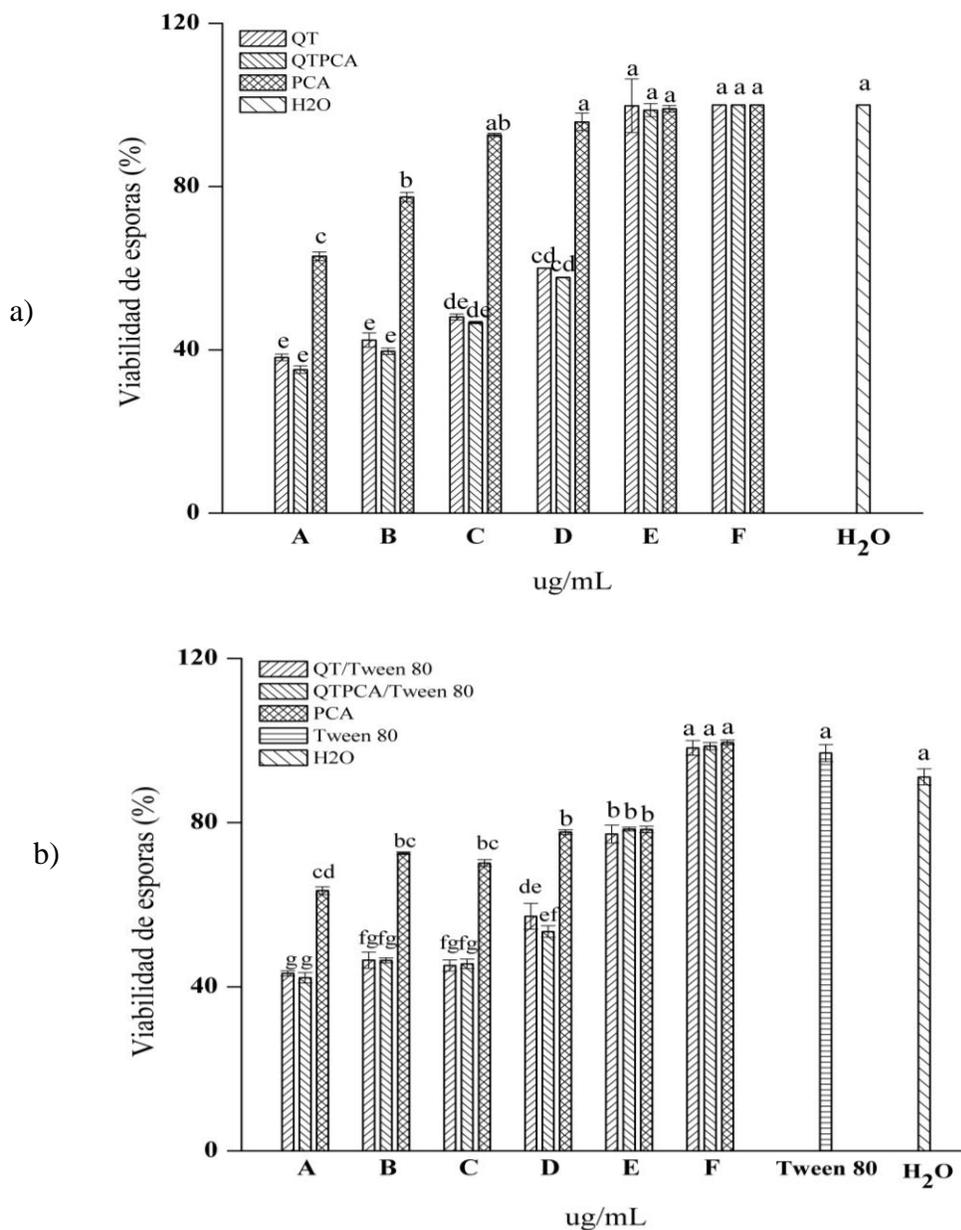


Figura 26. Viabilidad de esporas de *A. niger* por el método de XTT. a) Partículas de quitosano y biocompositos de quitosano con ácido pirrol-2-carboxílico; b) Biocompositos y partículas quitosano adicionadas con Tween 80. En ambas graficas la proporción utilizada para los biocompositos fue (A): 1200/300; (B):800/200; (C):400/100; (D):200/50; (E): 20/5. Partículas de quitosano (A): 1200; (B):800; (C):400; (D):200; (E): 20 y ácido pirrol-2-carboxílico (A): 300; (B):200; (C):100; (D):50; (E): 5. Controles: Tween 80, H₂O y (F): medio Czapek sin tratamiento.

A partir del análisis estadístico se encontró que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el efecto de las partículas de quitosano y los biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico, con y sin Tween 80, a todas las concentraciones evaluadas, ya que se observó un efecto similar en la viabilidad de *A. niger*. Lo anterior sugiere que no existe efecto sinérgico entre los componentes con actividad antifúngica del biocomposito quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico en *A. niger*.

La reducción de la actividad antifúngica producida por ambos tipos de partículas (biocompositos QT-PCA y las partículas de quitosano) formuladas con Tween 80, sugiere una posible interacción entre los componentes de las partículas con el surfactante, impidiendo así que los grupos funcionales del quitosano y del PCA interactúen con los componentes cargados negativamente de la membrana plasmática del hongo. La morfología de las esporas del hongo expuestas durante 8 horas a los diferentes tratamientos se vio afectada. En el medio con la proporción 1,200/300 $\mu\text{g/mL}$ del biocomposito QT-PCA se observaron esporas pequeñas, compactas y sin germinar. La falta de coloración naranja intenso se puede atribuir a una baja o nula actividad metabólica, lo que se traduce en reducción de la viabilidad. Con esto se evidencia que los biocompositos QT-PCA ejercen un daño en la germinación de las esporas de *A. niger* (Figura 27).

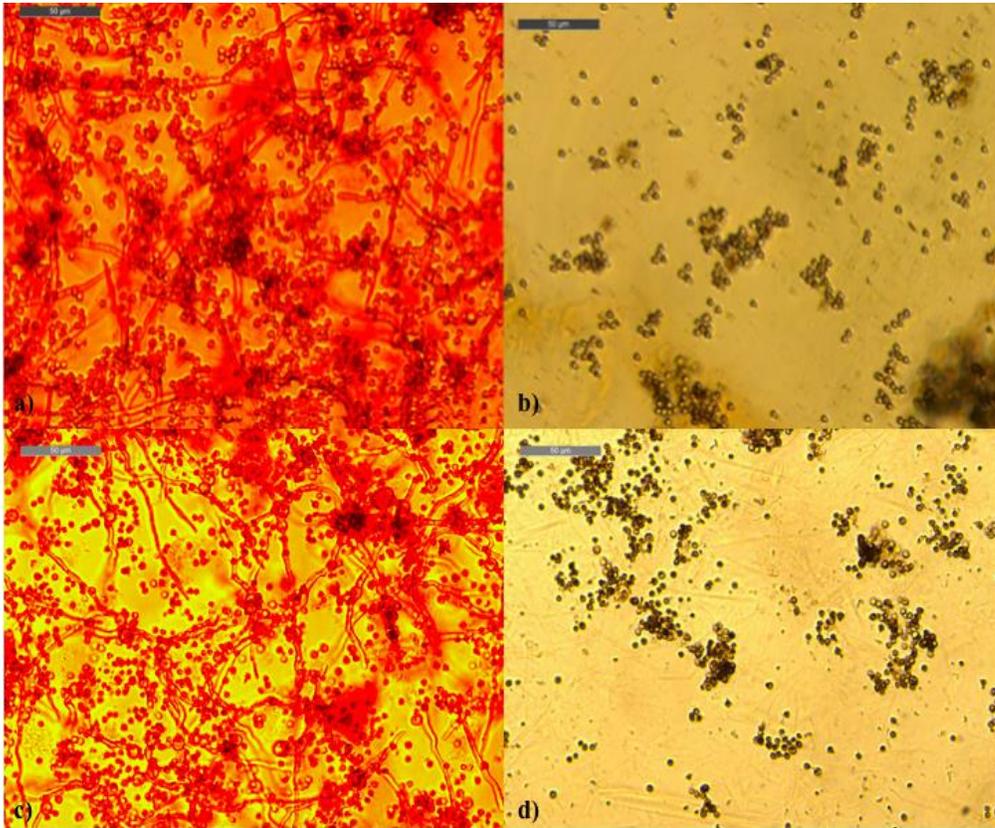


Figura 27. Esporas e hifas de *Aspergillus niger* inoculado en medio con partículas de quitosano y quitosano-PCA, a 40x. a) Control, mostrando un crecimiento normal; b) *A. niger* expuesto a biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico; c) Control Tween, mostrando un crecimiento normal del hongo; d) *A. niger* expuesto a biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80.

Al evaluar el efecto de la solución de ácido pirrol-2-carboxílico en la viabilidad de esporas, se observó que al aumentar la concentración hasta 300 µg/mL disminuyó el porcentaje de esporas viables, alcanzado una reducción de la viabilidad de un 37.5% (Figura 28). Sin embargo, el efecto antifúngico no es tan fuerte comparado con el ocasionado por las partículas de quitosano, o bien, por los biocompositos de QT-PCA ya que en esta forma su actividad se potencia ($p < 0.05$).

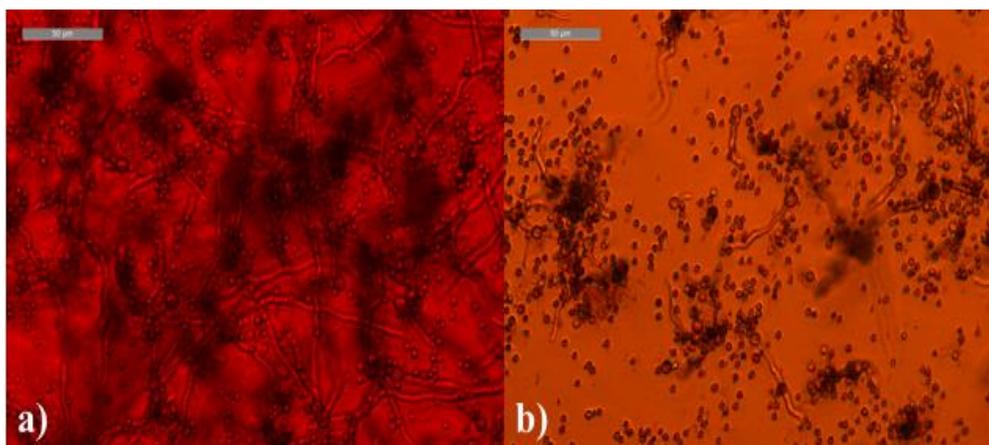


Figura 28. Esporas e hifas de *Aspergillus niger* inoculado en medio con PCA, a 40x. a) Control, mostrando un crecimiento normal b) Esporas germinadas y no germinadas del hongo creciendo en presencia de ácido pirrol-2-carboxílico 100 µg/mL.

Estimación de la concentración media inhibitoria (CI₅₀)

A partir de los resultados experimentales de la viabilidad de esporas se determinó la concentración media inhibitoria (CI₅₀) para el biocomposito QT-PCA y para las partículas de quitosano, con y sin incorporación del surfactante (Tween 80). Para ello se realizó un análisis de supervivencia/confiabilidad Probit. Los valores de CI₅₀ estimados (Tabla 11) se utilizaron en las evaluaciones posteriores.

Tabla 11. Concentraciones medias inhibitorias (CI₅₀) de materiales a base de quitosano.

Material	CI ₅₀ (µg/mL), sin Tween 80	CI ₅₀ (µg/mL), con Tween 80
Biocompositos de QT-PCA	222 ± 15	378 ± 59
Partículas de quitosano	336 ± 32	447 ± 65
Ácido pirrol-2-carboxílico	458 ± 52	458 ± 52

Al analizar los resultados de la CI₅₀ se encontró que al incorporar Tween 80 durante la síntesis, la concentración inhibitoria media de la viabilidad de esporas se incrementó comparada con las partículas sin Tween 80. Asimismo, se encontró que independientemente de la presencia de Tween, las partículas del biocomposito QT-PCA presentaron una menor CI₅₀ que las partículas de quitosano, lo que indica que estas exhiben una mayor actividad inhibitoria. El menor valor

de CI_{50} se obtuvo en para el biocomposito QT-PCA sin surfactante y este comportamiento fue congruente con los porcentajes de viabilidad de esporas (Figura 25), los cuales aumentaron al incorporar el Tween 80. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las CI_{50} de los biocompositos y las partículas con o sin Tween 80 ($p>0.05$). Existen reportes en donde se indica que el polisorbato 80 (Tween 80) es biocompatible con líneas celulares de fibroblastos (Arechabala *et al.*, 1999). Aunado a esto, es un compuesto ampliamente utilizado para realizar suspensiones de esporas y no se han reportado complicaciones respecto a su uso para la propagación de hongos (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003). Por lo anterior, con los resultado del presente estudio se sugiere que la reducción en la efectividad de las partículas y de los biocompositos, podría deberse a la interacción que se da entre la partícula con el surfactante, haciendo que queden grupos funcionales indisponibles para interactuar con los componentes celulares, además de dispersar las partículas en la suspensión y reducir los procesos de aglomeración/agregación. A la vez esto pudo causar una disminución en la interacción partícula-hongo con los componentes de la membrana plasmática cargados negativos o de la pared celular del hongo, como los ácidos grasos, ácido siálico, glicoproteínas, entre otros.

Considerando que las partículas formuladas sin Tween 80 mostraron menor estabilidad durante el almacenamiento en refrigeración y mayor tamaño de partícula, para los ensayos posteriores se utilizó la CI_{50} estimada para las partículas y los biocompositos sintetizados con Tween 80.

Germinación de esporas de *Aspergillus niger* en presencia de biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano

El efecto de biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano adicionadas con Tween 80 (0.05% v/v) en la germinación de esporas de *A. niger* se realizó en medio líquido Czapek. Se ha reportado que la germinación óptima para *A. niger* se presenta a 30-34 °C con un alto porcentaje de humedad (96-98%) y pH de 4.5-6.0. Bajo estas condiciones se ha observado cerca de un 90% de esporas germinadas después de 6 horas de incubación (Abdel-Rahim y Arbab 1985; Van Leeuwen *et al.*, 2013; Krijgsheld *et al.*, 2013).

En el presente ensayo la germinación de esporas se llevó a 28 ± 2 °C, realizando muestreos cada 6 horas durante 24 horas. A las 12 horas de incubación en el control (Tween/ácido acético, pH 4.5-5) se obtuvo un 96 ± 1 % de esporas germinadas. En la figura 29 se muestra la cinética de porcentaje de germinación donde se puede apreciar que solo existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) respecto al control a las 12 horas de incubación. En el medio con el biocomposito QT-PCA/Tween 80 se encontró un porcentaje de inhibición de 12.5 %. Estos resultados indican que el efecto inhibitorio del biocomposito es bajo comparado con el efecto de las partículas de quitosano (56 %). Por su parte, el ácido pirrol-2-carboxílico mostró un porcentaje de inhibición de 36 %, a las 12 horas.

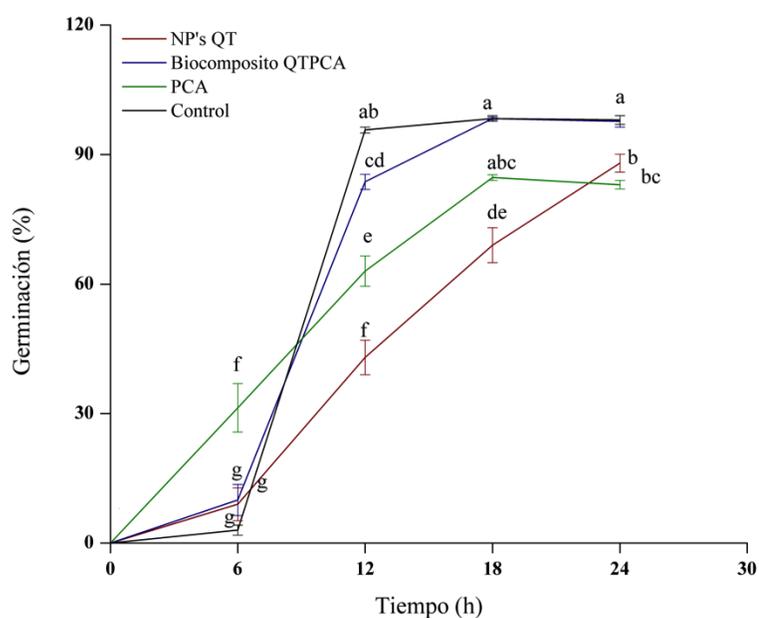


Figura 29. Cinética de germinación de esporas de *Aspergillus niger* expuestas a biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano adicionadas con Tween 80 al 0.05 % v/v durante la síntesis.

Al utilizar quitosano de mediano peso molecular (153 kDa) para la síntesis de nanopartículas, se encontró que estas sí presentaron una inhibición en la germinación de *A. niger*; sin embargo, se redujo al incrementarse el tiempo de incubación, encontrándose cerca del 90 % de esporas germinadas a las 24 horas. Kaur *et al.* (2014) estudiaron el efecto de nanopartículas y

nanocompositos de quitosano con diferentes metales en el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Ellos encontraron que las nanopartículas de puro quitosano presentaron baja actividad antifúngica (40 % de inhibición), lo cual concuerda a lo observado en este estudio.

Los porcentajes de esporas germinadas (S) se ajustaron al modelo logístico, tomándose el tiempo (t) como variable independiente y se estimó el porcentaje inicial de esporas germinadas (S_0), el porcentaje máximo de germinación de esporas (S_{max}), y la tasa de germinación de esporas (k), a una temperatura de 28 ± 2 °C.

Se encontró que a las 24 horas de incubación las esporas desarrolladas en el medio con el biocomposito QT-PCA presentaron una germinación máxima (S_{max}) similar a la del control, sin embargo la velocidad de germinación fue menor con el biocomposito. Comparando los resultados de los parámetros cinéticos de germinación del hongo en el medio con partículas de quitosano, estos sugieren que el biocomposito presenta un efecto inhibitorio moderado en las esporas de *A. niger*. Para las partículas de quitosano se encontró una máxima germinación de esporas estimada de 91 ± 6 % y una velocidad de germinación de 0.27 ± 0.05 h⁻¹, lo cual demuestra que presentan un mayor potencial para retardar el proceso de germinación a 28 °C. Con respecto al tratamiento con ácido pirrol-2-carboxílico, los datos experimentales no se ajustaron al modelo logístico, por lo que no fue posible obtener los parámetros cinéticos de germinación.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la germinación de esporas de *Aspergillus niger* expuestas a biocompositos de QT-PCA y partículas de quitosano adicionadas con Tween 80 al 0.05 % v/v durante la síntesis.

Tratamientos	S _{max} (%)	S ₀ (%)	k(h ⁻¹)	R ²
Control (4.5-5.5 pH)	98.17 ± 0.60	0.003 ± 0.002	1.18 ± 0.09	0.99902754
NP's quitosano	90.89 ± 6.33	2.74 ± 1.56	0.27 ± 0.05	0.96233726
Biocomposito	98.16 ± 1.46	0.22 ± 0.11	0.66 ± 0.5	0.99320143

En la figura 30 se muestran imágenes de las esporas e hifas del hongo desarrolladas en los diferentes tratamientos. En ellas es posible evidenciar que las partículas de quitosano (a) y del ácido pirrol-2-carboxílico (c) ejercen mayor efecto inhibitorio en la germinación, contabilizándose menor cantidad de esporas germinadas a las 12 horas.

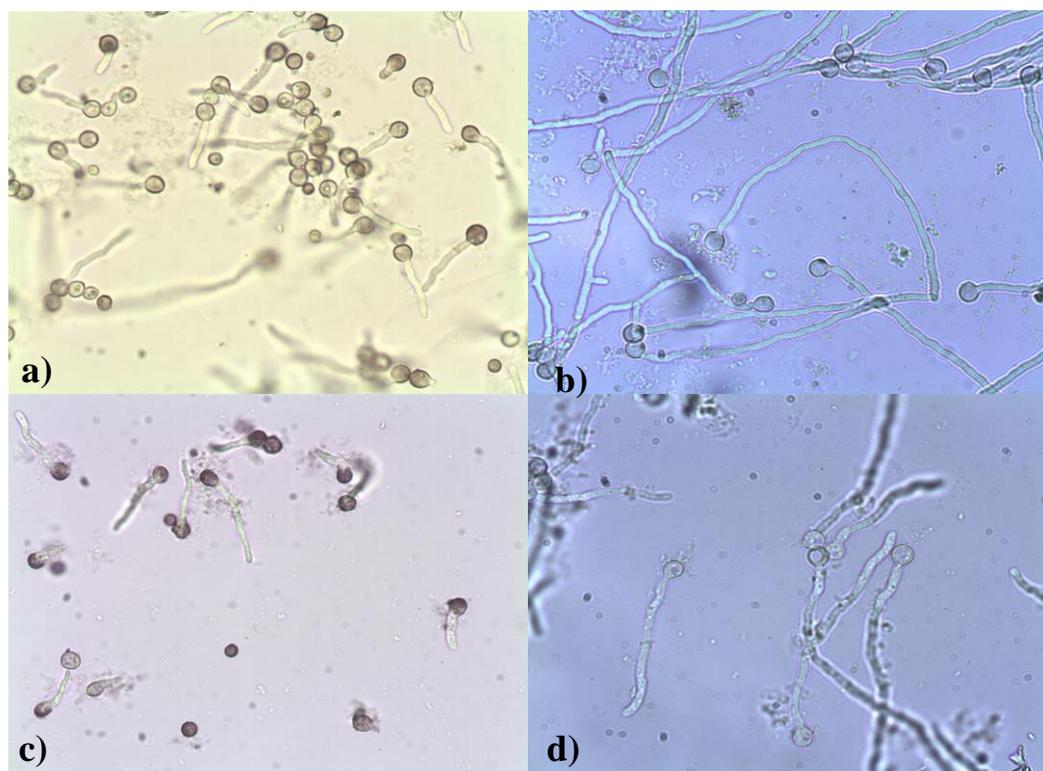


Figura 30. Esporas germinadas y no germinadas, a 40x, de *Aspergillus niger* a las 12 h de incubación en medio adicionado con (a) partículas de quitosano, (b) biocompositos de QT-PCA/Tween 80 (c), ácido pirrol-2-carboxílico (c), y (d) control.

Parámetros morfométricos de *Aspergillus niger* en presencia de biocompositos de QT-PCA

Los biocompositos de QT-PCA y las partículas de quitosano adicionadas con Tween 80 (0.05% v/v) presentaron un efecto diferente en la morfometría de las esporas de *A. niger* con respecto al control (Tabla 13). En el ensayo se utilizaron las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) estimadas para cada tratamiento. Se encontró que el biocomposito QT-PCA ($378 \pm 59 \mu\text{g/mL}$) provocó un aumento ($p < 0.05$) en el diámetro promedio de las esporas, el cual fue de $6.42 \pm 0.85 \mu\text{m}$ a las 6 horas de incubación (Figura 31). El aumento en el diámetro de la espora es un

fenómeno normal durante el proceso de germinación, sin embargo, con el tratamiento de QT-PCA se observó un hinchamiento significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto al control a las 6 y 18 horas de incubación.

Tabla 13. Efecto de biocompositos QT-PCA/Tween 80 y partículas de QT/ Tween 80 sobre la morfometría de esporas e hifas de *Aspergillus niger* durante la germinación en medio Czapek líquido, a 28 ± 2 °C

Tiempo (Horas)	Nanopartículas de quitosano/Tween 80		
	Diámetro de Esporas (μm)	Diámetro Hifas (μm)	Longitud Hifas (μm)
0	3.44 ± 0.41	-	-
6	4.11 ± 0.45^e	-	-
12	5.15 ± 0.5^d	2.35 ± 0.35^c	32 ± 9^a
18	5.76 ± 0.53^c	2.69 ± 0.44^b	ND
24	5.95 ± 0.6^a	2.65 ± 0.43^b	ND
Biocompositos quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80			
0	3.44 ± 0.41	-	-
6	6.42 ± 0.85^{ab}	-	-
12	5.81 ± 0.74^c	2.21 ± 0.38^c	80 ± 25^b
18	6.49 ± 1.47^{ab}	3.23 ± 0.41^a	ND
24	7.17 ± 0.92^{ab}	3.26 ± 0.47^a	ND
Control pH 4.5-5			
0	3.44 ± 0.41	-	-
6	5.22 ± 1.22^d	-	-
12	6.12 ± 0.63^{bc}	2.69 ± 0.43^b	67 ± 20^c
18	6.50 ± 0.64^{ab}	2.75 ± 0.36^b	ND
24	5.94 ± 0.57^a	3.07 ± 0.46^a	ND

Los valores obtenidos para los diámetros de esporas e hifas son las medias de 60 mediciones \pm DE. Longitud de hifas medias de 40 mediciones \pm DE. Diferente letra dentro de la columna indica diferencia significativa entre los tratamientos para cada tiempo ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey. ND: no determinado.

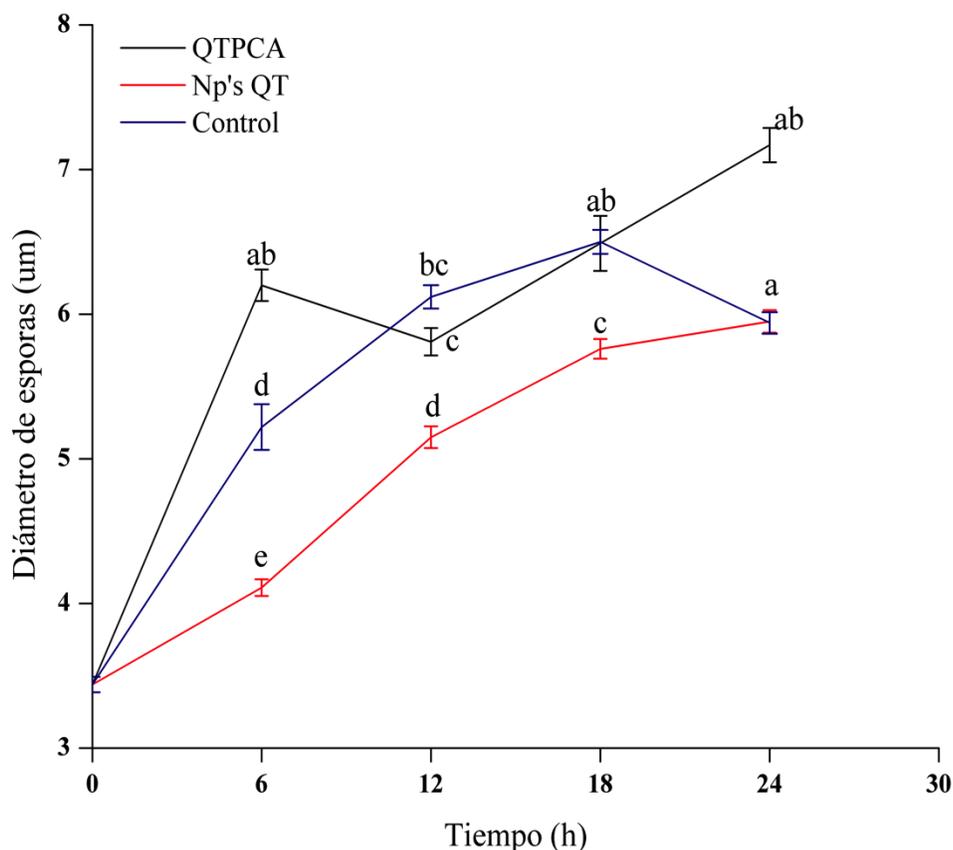


Figura 31. Cinética del efecto de partículas de quitosano y biocompositos de QT-PCA sobre el diámetro de esporas de *Aspergillus niger* durante 24 horas de incubación a 28 ± 2 °C.

En estudios anteriores se ha mencionado que el aumento en el diámetro celular está relacionado con un desequilibrio en la permeabilidad de la membrana, provocado por grupos electronegativos presentes en el exterior de la célula cuando entran en contacto con la superficie de esta. Este uno de los mecanismos de acción propuestos para el quitosano y sus diferentes materiales. Está basado en interacciones que dan como resultado el paso de líquidos del exterior al interior provocando turgencia, y por ende el hinchamiento de la célula microbiana (Chung y Chen, 2008; Xing *et al.*, 2014; García-Romo, 2015). Con respecto al efecto ejercido por las partículas de quitosano, se observó que estas causaron en las esporas menor diámetro ($5.95 \pm 0.6 \mu\text{m}$) durante las 24 horas de la cinética con respecto al control ($p < 0.05$) (Tabla 13). Este fenómeno se puede atribuir al efecto fungistático de las partículas de quitosano asociado a

interacciones electrostáticas entre las partículas y la superficie de las esporas, retardando así el proceso de germinación, y por lo tanto el hinchamiento normal de la espora para la absorción de nutrientes del medio.

Entre los mecanismos de acción antimicrobianos propuestos para quitosano y derivados de quitosano, se menciona que este puede depositarse en la superficie de algunas bacterias, impidiendo así el correcto transporte hacia el interior y exterior, provocando deficiencia de nutrientes y acumulación de materiales de desecho en el interior, por lo que su correcto desarrollo se ve comprometido. Al mismo tiempo, el quitosano puede actuar como un agente quelante de nutrientes y iones metálicos importantes para el crecimiento celular, como por ejemplo Mg^{+2} y Ca^{+2} (Kumar *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2015). Esto podría explicar el hecho de porqué el tamaño de las esporas en proceso de germinación expuestas a partículas de quitosano fue menor en comparación con las esporas del control, ya que como reveló nuestro estudio de dispersión dinámica de la luz, la suspensión de partículas es una mezcla de nanopartículas y micropartículas que pueden depositarse en la superficie de las esporas.

Las hifas de *A. niger* desarrolladas a las 18 horas en presencia del biocomposito QT-PCA presentaron un crecimiento irregular y un hinchamiento en el diámetro promedio ($3.23 \pm 0.41 \mu m$) con respecto a las del control (Figura 32, Tabla13). Las hifas desarrolladas en medio con partículas de quitosano también presentaron crecimiento irregular pero los diámetros fueron menores ($p < 0.05$) con respecto a las de los controles durante toda la cinética. A pesar de que el biocomposito provocó un hinchamiento mayor respecto al control, de acuerdo a la literatura esto se encuentra dentro del rango normal. Estudios previos han reportado que las hifas vegetativas no expuestas a condición de estrés e inoculadas en un medio rico en nutrientes, presentan un diámetro entre 2-3 μm (Krijgsheld *et al.*, 2013). Respecto a la elongación de las hifas, a las 12 horas de incubación se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a las del control, en el cual se encontraron hifas con longitud de $67 \pm 20 \mu m$. Mientras que en el tratamiento con biocomposito se observó la mayor elongación de las hifas ($80 \pm 25 \mu m$), en el medio con las partículas de quitosano fue de apenas $32 \pm 9 \mu m$.

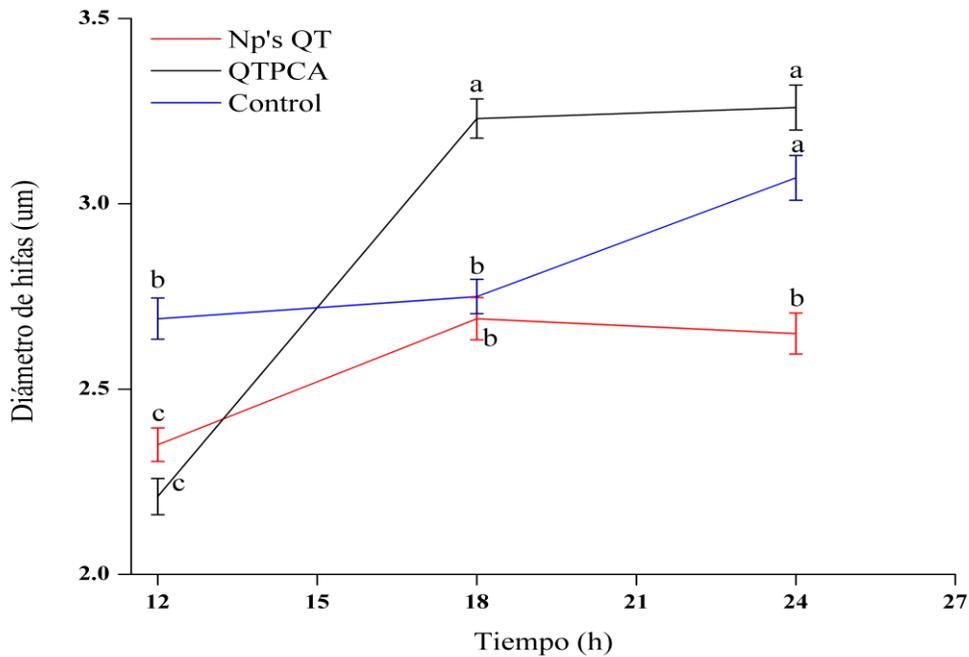


Figura 32. Cinética del efecto de partículas de quitosano y biocompositos de QT-PCA sobre el diámetro de hifas de *Aspergillus niger* durante 24 horas de incubación a 28 ± 2 °C.

En la figura 33 se puede observar los diferentes cambios presentados en la morfología de las esporas de *A. niger* durante la germinación. En el caso de las partículas de quitosano y los biocompositos de quitosano se evidenció la formación de dos túbulos germinales en una espora, cada uno con un crecimiento desfasado. Además, se observan ramificaciones tempranas en una gran cantidad de hifas. En el tratamiento con ácido pirrol-2-carboxílico se observaron hifas con irregular desarrollo, anchas o muy delgadas y deformes en la parte del ápice. Por último, se apreció el desarrollo de una coloración café intensa en las esporas inoculadas en los tratamientos con las partículas de quitosano y el ácido pirrol-2-carboxílico.

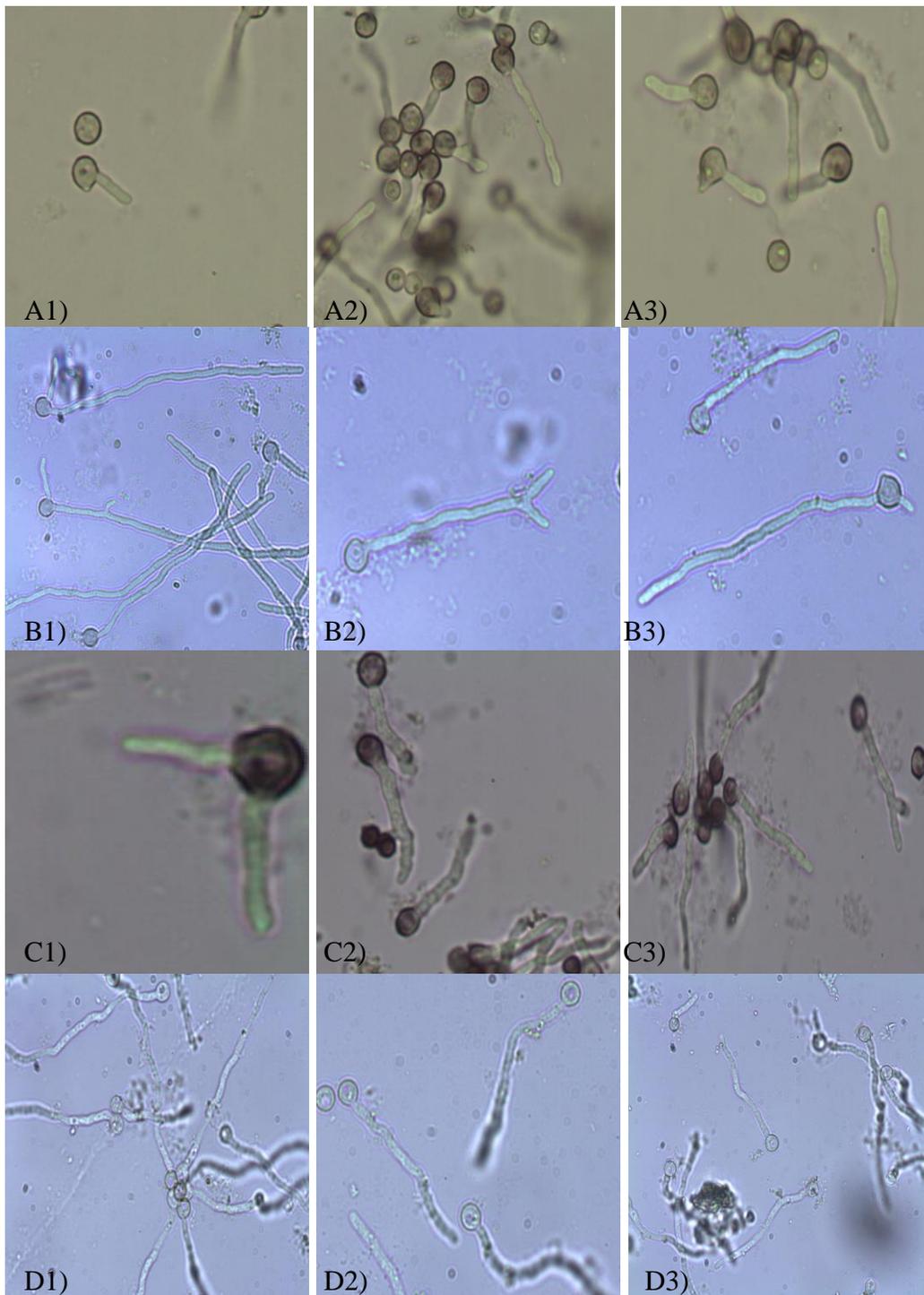


Figura 33. Cambios morfológicos en esporas germinadas de *Aspergillus niger* tras 12 h de exposición con: A) partículas de quitosano, B) biocompositos QT-PCA, C) ácido pirrol-2-carboxílico y D) control (pH 4.5-5).

En investigaciones se ha observado que las cepas de *Streptomyces spp.*, tienen capacidad de sintetizar entre sus metabolitos compuestos pirrólicos, los cuales presentan actividad antifúngica y antioxidante (Dieter *et al.*, 2003; Zapata-Cuartas, 2012; Nguyen *et al.*, 2014). Recientemente, el ácido pirrol-2-carboxílico fue aislado y purificado a partir de cepas de *S. griseus* H7602, y su efecto inhibitorio fue evaluado en el crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*, arrojando resultados satisfactorios al inhibirlo considerablemente (Nguyen *et al.*, 2014), sin embargo aun no existe ningún mecanismo de acción para el PCA. Aunque, se puede deducir que por su tamaño tiene la capacidad de penetrar la pared celular y la membrana, causando así toxicidad. En investigaciones anteriores en aislados de *Streptomyces spp.*, se observó que este afectó las hifas y esporas de *Colletotrichum musae*, causando hinchazón, distorsión y excesiva ramificación de las hifas, además de inhibir la germinación de esporas (Taechowisan *et al.*, 2009). Estos resultados concuerdan con lo observado en la morfología de *A. niger* al exponerlo a < 2 mg/mL de ácido pirrol-2-carboxílico (Figura 30) en nuestro estudio. Incluso en los biocompositos de QT-PCA se observaron algunos de estos cambios morfológicos, lo cual tiene sentido por estar presente el PCA en el composito. Sin embargo, este compuesto no tiene la capacidad de inhibir por completo el desarrollo de *Aspergillus niger*.

Plascencia-Jatomea *et al.* (2003) evaluaron el efecto *in vitro* de soluciones de quitosano de 400 kDa en la germinación de esporas de *A. niger* variando la temperatura de crecimiento. Ellos encontraron que el quitosano en solución tiene capacidad para causar cambios en la morfología como la formación protuberancias en su superficie. En nuestros tratamientos con partículas y biocompositos de quitosano de medio peso molecular (135 kDa), también se observó la presencia de protuberancias en la superficie de la espora, lo cual parece ser la brotación de una nueva hifa posiblemente provocado por un desequilibrio enzimático (Rodríguez-Córdova, 2016). Sin embargo, el efecto de las partículas de quitosano fue fungistático, es decir que solo tienen la capacidad de retrasar el proceso de germinación de las esporas.

En investigaciones anteriores, Yien *et al.* (2012) evaluaron la actividad antifúngica de soluciones y nanopartículas de quitosano con bajo (70 kDa) y alto (310 kDa) peso molecular, reportando que *A. niger* presentó mayor resistencia a las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular que a las de alto peso molecular. Por otra, parte Cota-Arriola *et al.* (2013)

reportaron que el potencial de inhibición depende del tamaño de la partícula, además, las partículas de quitosano presentaron un incremento en su actividad en comparación con el quitosano en solución. En la presente investigación no se evidenció un comportamiento similar, ya que se obtuvieron mejores resultados a mayor tamaño de partícula; sin embargo, existen otros factores que afectan la actividad, como la adición de agentes surfactantes.

Microscopía de fluorescencia para el análisis de componentes celulares

Para evaluar el efecto de los biocompositos de QT-PCA sobre los componentes celulares como septos, hifas y daño a la integridad de la membrana de las esporas de *A. niger*, se utilizaron tinciones de fluorescencia. Como análisis complementario se realizaron tinciones para evidenciar el estrés oxidativo, así como esporas viables y no viables. A partir de cada una de las muestras se captaron imágenes en un microscopio invertido.

El control se incubó durante 12 horas a 28 ± 2 °C y posteriormente se realizaron las tinciones de septos e hifas con el colorante Blanco de Calcoflúor, de esporas viables y no viables con las soluciones A y B del kit de tinción doble (Live/dead cell double staining kit) y el daño a la membrana con solución de yoduro de propidio. En la figura 34 se muestran imágenes en campo claro de las esporas e hifas desarrolladas en el medio control con las respectivas tinciones realizadas. La tinción con Blanco de Calcoflúor permitió teñir la pared celular de las esporas germinadas de *A. niger* y no se observaron anomalías a lo largo de las hifas. Además de las paredes celulares fue posible evidenciar partículas o vesículas teñidas a lo largo del interior de las hifas (Figura 34C), lo cual puede estar relacionado con la síntesis de glucanos o quitina, componentes principales de la pared celular fúngica. Las imágenes captadas teñidas con el kit de viabilidad evidenció la presencia de esporas germinadas viables con coloración verde y esporas no viables con coloración roja, estas últimas en menor proporción (Figuras 34B1 y 34B2). Por último, al observar las imágenes del hongo teñido con yoduro de propidio se encontró que la membrana se encontraba íntegra, es decir, sin daño visible; no se observaron esporas o hifas teñidas con el colorante. Cuando la membrana plasmática presenta alteraciones, el yoduro de propidio es capaz de penetrar al interior de la célula, reaccionar e intercalarse con 4-5 pares de bases en el ADN y emitir una fuerte fluorescencia color rojo.

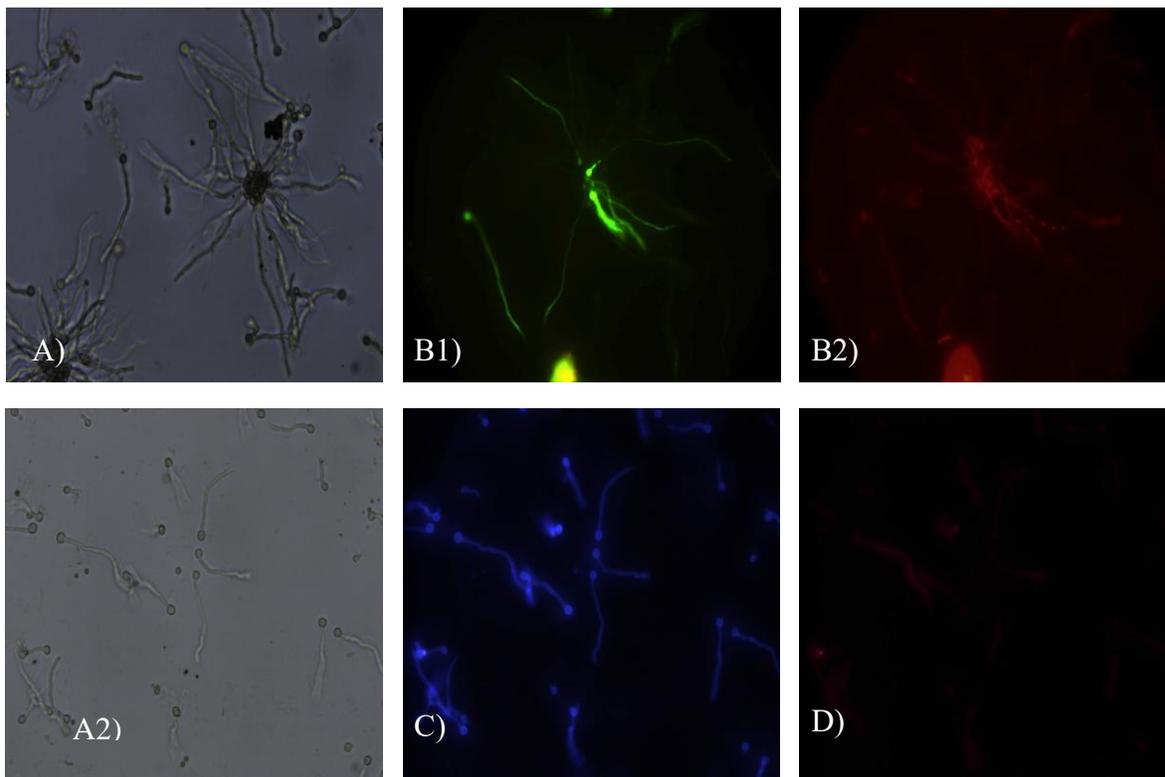


Figura 34. Imágenes de esporas control de *Aspergillus niger* durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C captadas a 40x. A, A2) Esporas en campo claro; B1, B2) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables y muertas; C) Tinción con Blanco de Calcoflúor; D) Tinción con yoduro de propidio.

Una vez realizada la exploración microscópica del hongo desarrollado en el medio control, se realizaron las tinciones en las esporas de *A. niger* expuestas a los diferentes tratamientos. En el caso de las esporas expuestas a < 2 mg/mL de PCA, sólo se les realizó la tinción de esporas viables y no viables (Figura 35), observando una mayor cantidad de esporas viables en proceso de germinación (tonalidades verdes-amarillas) comparado con las no viables (tonalidades rojas), lo que es congruente con los resultados obtenidos en la prueba de viabilidad por XTT. La intensa fluorescencia color rojo observada al interior de las células sugiere que el ácido pirrol-2-carboxílico es capaz de desestabilizar la membrana, lo cual permite explicar el efecto antimicrobiano que se ha atribuido en ensayos de control biológico (Nyungen *et al.*, 2015).

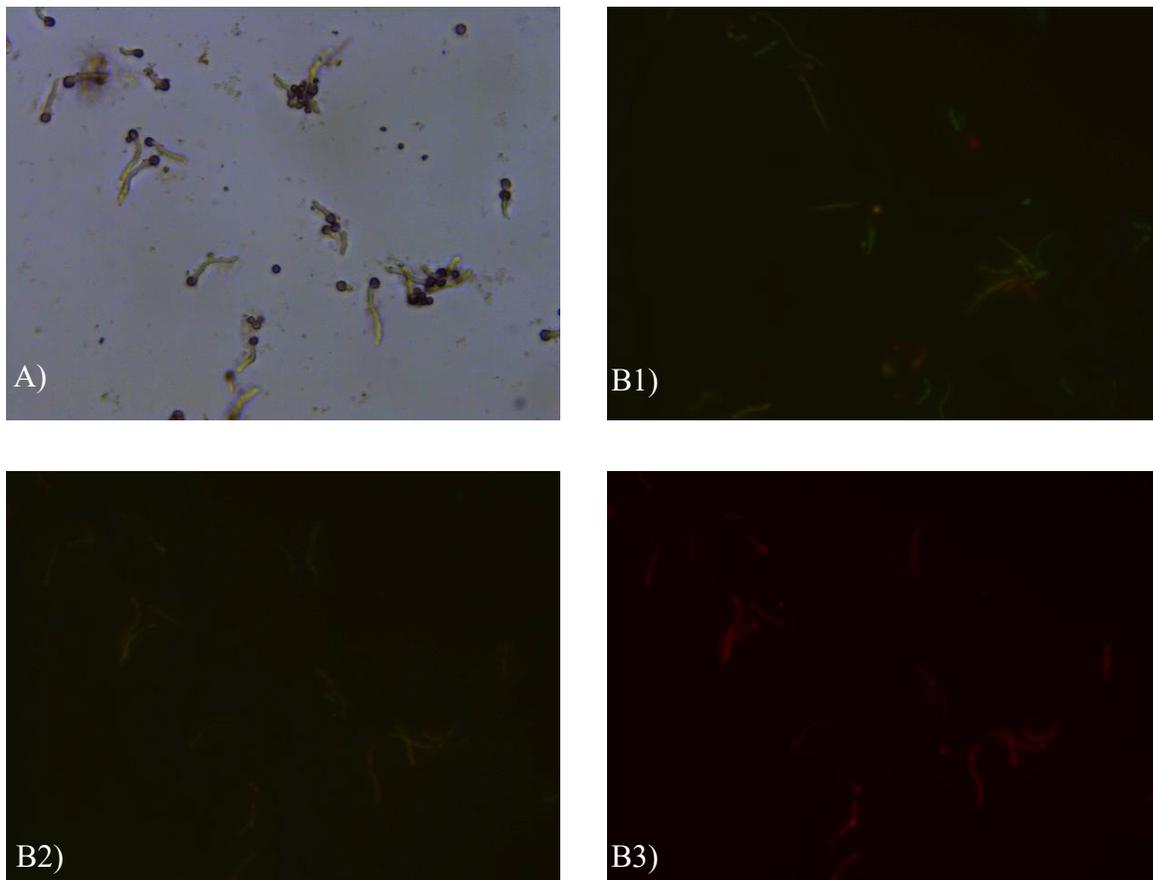


Figura 35. Imágenes de esporas de *Aspergillus niger* expuestas a ácido pirrol-2-carboxílico durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. A) Esporas en campo claro; B1, B2, B3) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables.

Para las esporas expuestas a partículas de quitosano/Tween 80, la tinción con Blanco de Calcoflúor evidenció la presencia de fluorescencia en zonas puntuales localizadas a lo largo de las estructuras de las hifas e inclusive en las esporas (Figura 36), lo cual podría estar relacionado con la producción de los componentes poliméricos de la pared celular. En investigaciones recientes se ha propuesto que el quitosano tiene la capacidad de inhibir la expresión de genes para la síntesis de la enzima glucano sintasa, productora de glucanos en la pared celular de los hongos y por lo tanto el contenido de (1-3)- β -D-glucanos se ve disminuida (Aranda-Martinez *et al.*, 2016). En un estudio por Rodríguez-Córdova (2016), se evaluó el efecto de biocompositos de quitosano/lisozima en la producción de enzimas glucano sintasa en esporas de *Aspergillus parasiticus*, encontrando reducción en la concentración de la enzima con respecto al control sin tratamiento. Asimismo, al teñir las esporas con Blanco de Calcoflúor se observó una disminución en la intensidad de la fluorescencia correspondiente a glucanos en la pared celular,

comportamiento similar al del presente estudio con *A. niger*. Lo anterior, sugiere que la baja intensidad de fluorescencia, asociada a la tinción de glucanos y quitina, se puede deber a un desequilibrio en la composición de la pared celular tras la exposición al tratamiento con partículas de quitosano.

El Blanco de Calcoflúor se ha utilizado ampliamente en la detección rápida de levaduras y hongos por microscopía de fluorescencia en frotis directos. Este es una sal disódica del ácido 4,4'-bis-[4-anilino-bis-dietilamino-5-triazín-2-ilamino]-2,2'-estilbeno-disulfónico y tiene la capacidad de fijarse a los polisacáridos β -(1-3), β -(1-4) (celulosa, quitina, quitosano, glucanos) y presenta una fluorescencia de color blanco azulado cuando se expone a la luz ultravioleta de longitud de onda larga (450 nm) y a la luz visible de longitud de onda corta, siendo la excitación óptima a una longitud de onda de 347 nm (Hoch *et al.*, 2005). La pared celular de los hongos sirve como mecanismo de defensa contra factores de estrés como calor, frío, radiación UV y sustancias con actividad antifúngica. Entre sus principales funciones destacan procesos fisiológicos, bioquímicos y de crecimiento. Aunado a esto, la pared celular también tiene la capacidad de adaptarse y cambiar constantemente dependiendo del ambiente en el que se encuentre. Está compuesta por redes de quitina, quitosano, (1-3)- β -D-glucanos, (1-6)- β -D-glucanos y glicoproteínas. Al existir un desorden enzimático en diferentes puntos a lo largo de la hifa, específicamente de enzimas relacionadas con la formación de pared celular como glucano sintasa, es posible que la estructura de la pared celular se sintetice con defectos, como por ejemplo un bajo porcentaje de (1-3)- β -D-glucanos y cambios morfológicos durante su crecimiento (Pontón, 2008; Aranda-Martinez *et al.*, 2016).

Respecto a la tinción con yoduro de propidio para evidenciar daño a la membrana, en las estructuras del hongo se observaron zonas teñidas con mayor intensidad (fluorescencia roja) (Figura 36), las cuales coincidían con las zonas teñidas con Blanco de Calcoflúor. Este comportamiento concuerda con estudios posteriores, en los que se han propuesto mecanismos de acción para la actividad antimicrobiana del quitosano y sus materiales, siendo uno de ellos el daño a la membrana por desestabilización de la permeabilidad ejercida por las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados positivos del quitosano (NH_3^+) y las moléculas cargadas negativamente en la superficie celular de los hongos y bacterias (Yien *et al.*, 2012;

Alui *et al.*, 2013; Aranda-Martinez *et al.*, 2016).

La tinción para esporas viables y no viables confirmó los resultados obtenidos al en la viabilidad mediante el método de XTT. Se observó que existe una proporción de células viables aún después de estar expuestas a una concentración de 1200 µg/mL de partículas de quitosano (Figuras 36D1 y 36D2), aunque con este tratamiento se encontró mayor cantidad de esporas no viables (rojas). Estos resultados evidencian la capacidad que tienen las partículas de quitosano/Tween 80 de reducir la viabilidad (actividad metabólica) de las esporas de *A. niger*. Comparando con las del control (Figura 34), se observan estructuras celulares teñidas con diacetato de 2,7-dichlorodihidrofluoresceína (2,7-DCFH2-DA) (Figura 36F), lo cual indica que las partículas de quitosano tienen la capacidad de inducir estrés oxidativo durante la germinación.

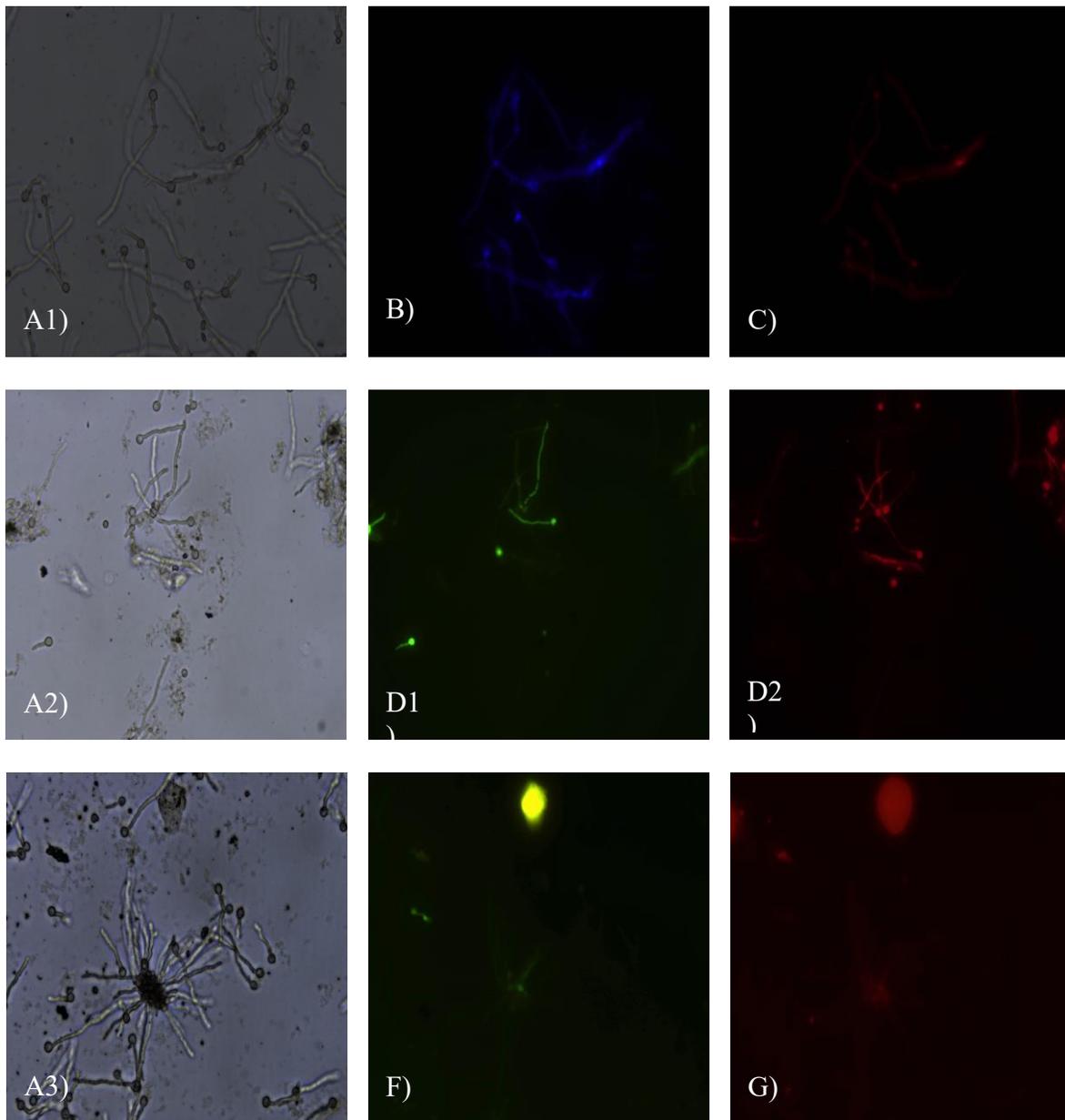


Figura 36. Imágenes de esporas de *Aspergillus niger* expuestas a partículas de quitosano/Tween 80 durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. A1, A2, A3) Esporas en campo claro; B) Tinción con Blanco de Calcoflúor; C) Tinción con yoduro de propidio; D1, D2) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables; F) Tinción estrés oxidativo con 2,7-DCFH2-DA.

En la figura 37 se observan las imágenes a las 12 horas de incubación del hongo inoculado en medio de cultivo adicionado con el biocomposito de quitosano-PCA/Tween 80. Las imágenes de campo claro de los incisos A1 y A2 corresponden a las estructuras desarrolladas en el medio con tratamiento en proceso de germinación. Si bien se observó que el proceso de germinación no se interrumpió con respecto al control, a las 12 h fue posible evidenciar el desarrollo de túbulos germinales o hifas con anomalías o alteraciones en la membrana (Figura 37C) y la pared celular (Figura 37B). Respecto a la tinción de células viables, se observó mayor proporción de esporas afectadas por el tratamiento (Figuras 37D1 y 37D2) con respecto a las desarrolladas en el medio control (Figuras 34B1 y 33B2). Al igual que en el tratamiento con partículas de quitosano, para evidenciar el posible efecto oxidativo provocado por los biocompositos de QT-PCA/Tween 80, se realizó la tinción con diacetato de 2,7-dichlorodihidrofluoresceína (2,7-DCFH₂-DA). Originalmente esta prueba se planteó para visualizar y medir el desarrollo de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, debido a que el 2,7-DCFH₂-DA puede ser oxidado por una gran cantidad de especies reactivas como óxido nítrico, aniones de peroxinitrito e inclusive por hidroperóxidos orgánicos, actualmente se sugiere que su aplicación sea para indicar el grado general de estrés oxidativo (Owusu-Ansah *et al.*, 2008). Desafortunadamente no existen reportes de investigaciones en las que mencione estrés oxidativo generado por partículas de quitosano o biocompositos a base de quitosano en hongos del género *Aspergillus*. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, es claro que los biocompositos de QT-PCA/Tween 80 y las partículas de quitosano/Tween 80 influyen en el estado oxidativo de las esporas, fundamentalmente en la etapa de germinación.

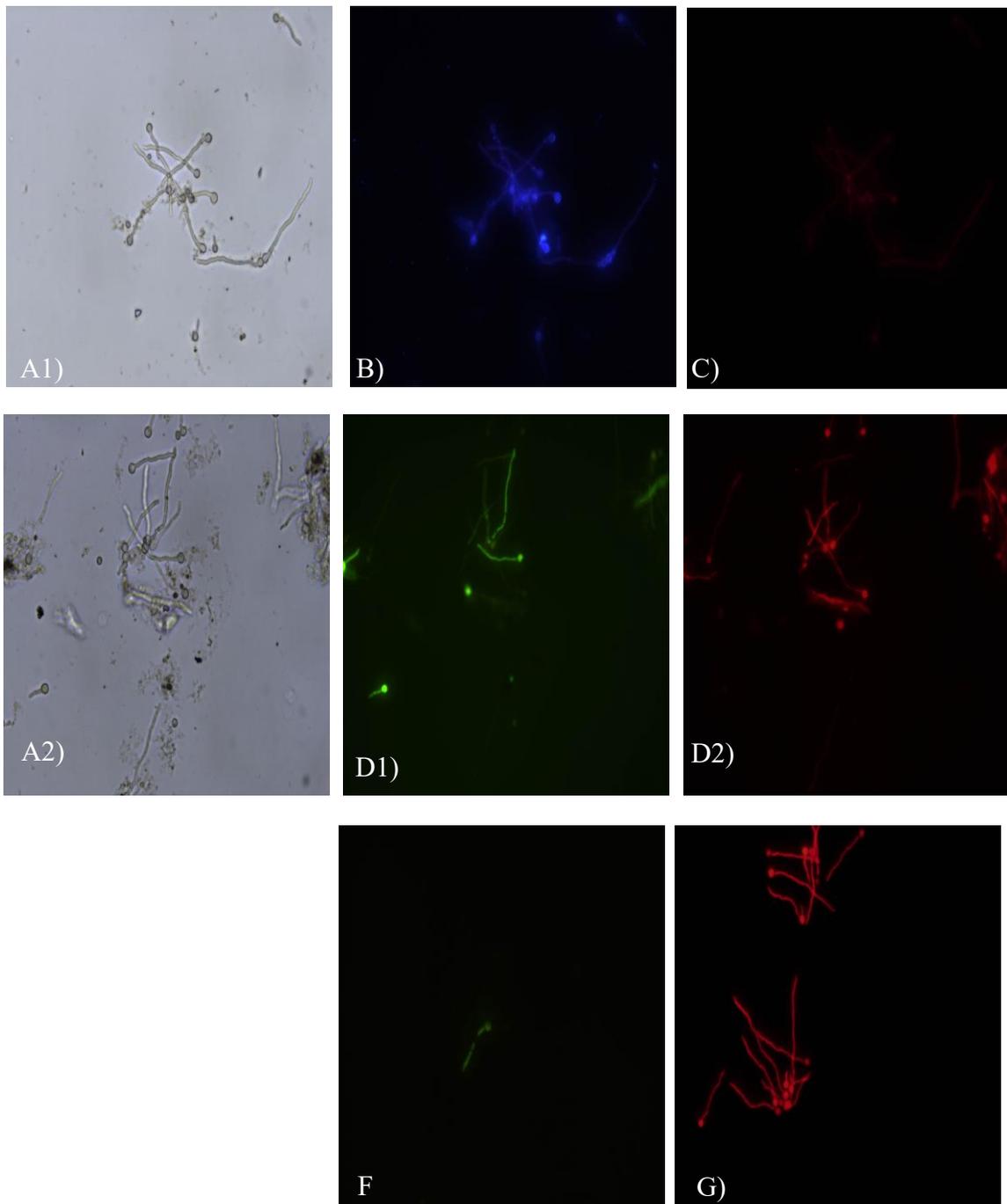


Figura 37. Imágenes de esporas de *Aspergillus niger* expuestas a biocompositos de QT-PCA/Tween 80 durante 12 h de incubación a 28 ± 2 °C. A1, A2) Esporas en campo claro; B) Tinción con Blanco de Calcoflúor; C) Tinción con yoduro de propidio; D1, D2) Tinción con acetoximetilo de calceína y yoduro de propidio (AMC/IP) para evidenciar esporas viables; F) Tinción estrés oxidativo con 2,7-DCFH2-DA; G) Tinción con yoduro de propidio.

Dependiendo del tipo de compuesto y su estructura química, se han propuesto diversos mecanismos de acción para los antifúngicos comerciales y los de origen biológico; ya sea de forma directa o indirecta. La mayoría de ellos se centran en gran medida en provocar alteraciones en el metabolismo o las estructuras celulares del hongo tales como la pared y la membrana plasmática, además en el ergosterol y su biosíntesis. Como se observó en este estudio, las partículas de quitosano y los biocompositos de QT-PCA con Tween 80 (0.05%) a las concentraciones probadas, conservan la capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana, alterar el proceso de formación de la pared celular, alterar la morfología de las esporas durante la germinación (hinchazón de esporas, deformación de hifas, etc.) y afectar la viabilidad del hongo. Aunado a esto, se sugiere que su exposición puede provocar estrés oxidativo durante la germinación de esporas.

Crecimiento radial de *Aspergillus niger* en presencia de biocompositos de QT-PCA

Se determinó el efecto de las concentraciones inhibitorias medias y concentraciones superiores a estas de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico y de partículas de quitosano en el crecimiento apical de colonias de *Aspergillus niger*. Se observó que ninguna de las concentraciones probadas presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento del micelio en comparación con el control ($p > 0.05$) (Figura 37). Las curvas de crecimiento o extensión radial de *A. niger* expuesto a las diferentes concentraciones de partículas de quitosano, biocompositos de QT-PCA y ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) en solución, mostraron un crecimiento logístico normal hasta las 158 horas, tiempo en que concluyó la cinética. Asimismo, no se observaron cambios en la coloración, forma y textura del micelio desarrollado en los diferentes tratamientos con respecto al control, por lo que es posible sugerir que a las concentraciones utilizadas no existe un patrón fisiológico que relacione la velocidad de extensión radial con la formación de micelio de *A. niger*.

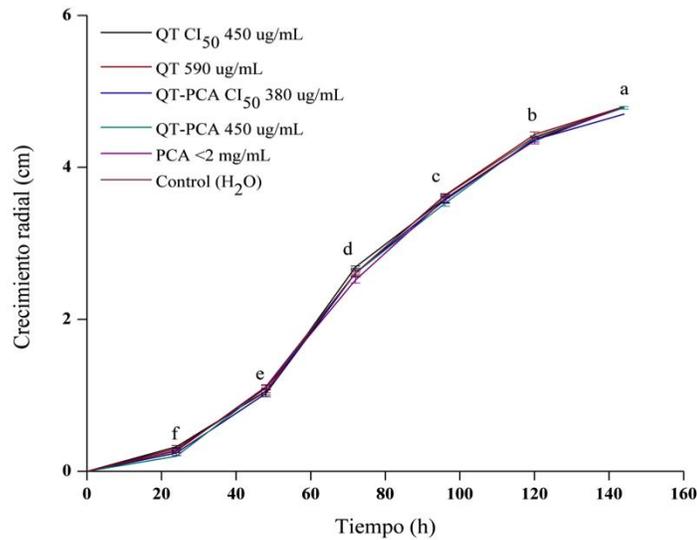


Figura 38. Cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* expuesto a) biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (CI₅₀: 380 µg/mL y 450 µg/mL); b) partículas de quitosano (CI₅₀: 450 µg/mL y 590 µg/mL); c) ácido pirrol-2-carboxílico (PCA: 2mg/mL) y c) control con agua miliQ.

Li *et al.* (2008) evaluaron quitosano de diversos pesos moleculares (1000-50 kDa) obtenido de cáscara de camarón, en el crecimiento radial de *A. niger*, y encontraron que la actividad antifúngica varió en función del peso molecular. Se encontró una mayor inhibición con los tratamientos de quitosano de bajo peso molecular (50 kDa), la cual se atribuyó a la destrucción de la membrana celular, engrosamiento de la pared celular e inclusive, a la destrucción del nucléolo debido a que este puede penetrar al interior de la espora. Estos resultados coinciden con nuestro estudio de germinación de esporas y cambios morfológicos, no obstante, es posible que las esporas viables que se encuentren parcialmente dañadas y puedan seguir desarrollándose hasta formar el micelio.

Existen pocos estudios sobre evaluaciones de nanopartículas de quitosano y su efecto en la germinación de esporas o crecimiento radial de *A. niger*. Sin embargo, existen evidencias de que los hongos que tienen quitina como componente de su pared celular son más resistentes a los efectos del quitosano. *Aspergillus niger*, al contener 10% de quitina en su pared (Allan *et al.*, 1979; Klis *et al.*, 2007), podría presentar mayor resistencia a las partículas de quitosano. Al

reconocerlo como un componente no extraño y/o degradarlo mediante enzimas como quitinasas o β -1,3-1,4-glucanasas, es posible que los microorganismos resistentes puedan utilizarlo como sustrato para reforzar su pared, esto debido a que el quitosano es susceptible a degradación por enzimas específicas y no específicas (Raafat y Salh, 2006). Otro aspecto importante en relación a la resistencia que tienen ciertas especies al quitosano, es debido a que este puede unirse a la superficie celular, aunque únicamente permeabiliza las membranas plasmáticas de los hongos sensibles a él. Xing *et al.* (2016) evaluaron la actividad de nanopartículas de oleoil-quitosano en cinco cepas de hongos fitopatógenos y su relación con el perfil de lípidos en su membrana celular. El estudio indicó que los hongos que contenían mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas (como ácidos grasos linoleico (C18:2,6) y oleico (C18:1,9) presentaban mayor resistencia a las partículas de oleoil-quitosano. Lo anterior fue atribuido a que los ácidos grasos poliinsaturados están relacionados con la fluidez y estabilidad de la membrana. *Aspergillus niger* contiene ácidos grasos poliinsaturados en su membrana, además de otros lípidos como el ácido linolénico (C18:9, 12,15) (Chattopadhyay *et al.*, 1987), lo cual puede estar relacionado con una mayor resistencia a las partículas de quitosano, según los resultados obtenidos en las evaluaciones de crecimiento radial y germinación de esporas en nuestro estudio.

A partir de este análisis se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento radial para *A. niger*, donde se encontró que el crecimiento máximo (A) en todos los tratamientos fue similar ($p > 0.05$) al control, así como la velocidad de extensión radial (V_m) y la fase lag (λ) (Tabla 14). Respecto a la velocidad de extensión radial, se encontró un comportamiento similar al control en todas las concentraciones de partículas de quitosano, biocompositos QT-PCA y ácido pirrol-2-carboxílico probadas. Por lo anterior, es posible deducir que a nivel de crecimiento apical de *A. niger*, las partículas de quitosano y los biocompositos QT-PCA no presentan un efecto inhibitorio significativo ($p > 0.05$), por lo que este puede seguir con su crecimiento normal después de un periodo de adaptación (Tabla 14).

Tabla 14. Parámetros cinéticos de crecimiento radial de *Aspergillus niger* en presencia de biocompositos de quitosano (QT-PCA), partículas de quitosano (QT) y ácido pirrol-2-carboxílico (PCA).

Tratamiento	µg/mL	A	Vm	λ	R ²
QT	450	5.2 ± 0.12	0.06 ± 0.00	27.4 ± 1.54	0.9979
QT	590	5.2 ± 0.07	0.06 ± 0.00	28.6 ± 0.88	0.9979
QTPCA	380	5.0 ± 0.06	0.06 ± 0.00	29.4 ± 0.89	0.9986
QTPCA	450	5.2 ± 0.09	0.06 ± 0.00	28.5 ± 1.13	0.9978
PCA	< 2 mg	5.2 ± 0.07	0.06 ± 0.00	27.9 ± 0.89	0.9986
Control (H ₂ O)	N/A	5.7 ± 0.04	0.06 ± 0.01	28.2 ± 0.54	0.9994

Valores estimados a partir de los datos experimentales de al menos 3 réplicas, utilizando el modelo logístico para crecimiento radial en el software estadístico STATISTICA.

Evaluación *in-vivo* de los Biocompositos de Quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA) en *Solanum lycopersicum* 'Roma'

Verificación de la patogenicidad sobre diferentes modelos de estudio

Para obtener un modelo biológico con un grado de daño adecuado se verificó la patogenicidad de *Aspergillus niger* sobre papaya Maradol (*Carica papaya* L.), fresa (*Fragaria*), plátano (*Musa paradisiaca* L.), cebolla (*Allium cepa*), jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) y tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma').

En este bioensayo se evaluaron dos tipos de inoculación: una consistió en infectar todos los frutos con micelio-agar (1 cm x 1 cm) y la otra en inocular con suspensiones de esporas (10⁵ y 10⁶) una herida en el fruto. Todos los frutos fueron almacenados durante una semana y monitoreados cada dos días para corroborar si se presentaba el desarrollo fúngico. No se realizaron mediciones del grado de lesión durante la verificación de la patogenicidad, solo se documentaron los cambios físicos y a los cuántos días se obtenía un crecimiento visible del hongo.

Al primer día de almacenamiento en los frutos inoculados con micelio-agar no se observaron indicios de crecimiento fúngico. Al tercer día se observó un crecimiento mínimo por encima del agar en todos los frutos con cambio de color alrededor del área de inoculación, excepto en jaca. En el caso de papaya y fresa se observó crecimiento de hongos nativos a pesar de la desinfección aplicada. Al quinto día en el plátano y la jaca el hongo siguió creciendo mínimamente sobre el agar pero al no observarse crecimiento en los alrededores del punto de inoculación, estos fueron descartados como candidatos. Por otro lado, el fruto de fresa fue descartado debido a que su pequeño tamaño no permitió observar el crecimiento gradual y al quinto día fue completamente cubierto por el micelio. En tomate y papaya se observó el crecimiento alrededor del punto de inoculación, por lo que su almacenamiento siguió por más días (Figura 39).

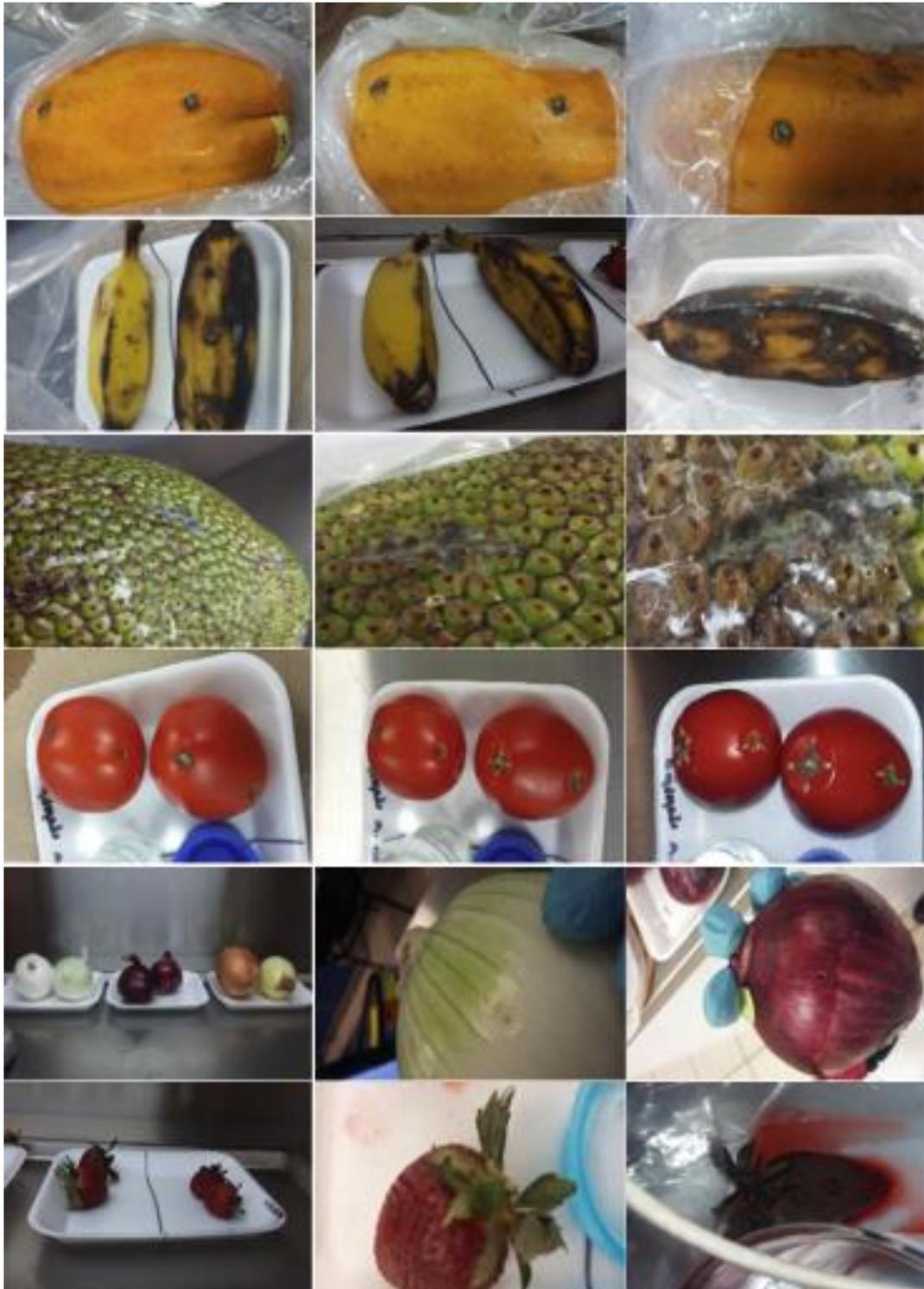


Figura 39. Evolución del crecimiento de *Aspergillus niger* en diferentes modelos de estudio; primera columna segundo día de inoculación, segunda columna cuarto día y tercer día sexto día de inoculación. En el caso del fruto de cebolla el tiempo de almacenamiento fue de 4 semanas.

Después del séptimo día se observó que no hubo cambios en el crecimiento alrededor del punto de inoculación en la papaya, por lo que fue descartado por la incapacidad de *A. niger* de invadir y adaptarse rápidamente a este sustrato. En el caso de la cebolla, debido a que *A. niger* forma parte de sus principales patógenos en condiciones de humedad y temperaturas extremas (El-Nagerabi *et al.*, 2003), el tiempo de almacenamiento se prolongó hasta cuatro semanas. Sin embargo, solo se observó crecimiento mínimo y un ligero cambio de color sobre el punto de inoculación con agar, mientras que con la suspensión de esporas no hubo ningún cambio. Por lo anterior, la cebolla también fue descartada como modelo de estudio (Figura 39).

Dentro de los fitopatógenos que atacan comúnmente a los frutos de tomate en poscosecha se encuentran *Botrytis cinerea*, *Alternaria tenuis*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Phytophthora parasitica*, *Erwinia carotovora* (Jaramillo *et al.*, 2007; Velázquez-del Valle *et al.*, 2012). A pesar de que *A. niger* no es un patógeno comúnmente reportados en *Solanum lycopersicum* 'Roma', este fruto tiene características que promueven el crecimiento de diversos hongos. Entre estas características están el pH ácido producido por la presencia de ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, contenido de azúcares principalmente fructosa y el alto contenido de humedad 93%. Por lo anterior, al final del tiempo almacenamiento se observó un grado de daño adecuado (medible), provocado por el crecimiento de *A. niger* en el tomate saladette, el cual se propagó rápidamente (cuarto día) hacía el interior y alrededor del punto de inoculación con micelio (Figura 39).

Posteriormente, el tomate fue seleccionado para evaluar el grado de infección utilizando inoculación con suspensión de esporas a dos concentraciones diferentes 10^6 y 10^5 esporas/mL. El crecimiento con esporas de *A. niger* fue más lento en comparación de la inoculación con micelio. Sin embargo, el hongo pudo desarrollarse sobre la superficie de los frutos de tomate a los 9 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C con 80-95 % de humedad relativa. Esta evaluación se realizó con dos concentraciones de esporas, 10^5 y 10^6 esporas/mL, obteniendo grado mayor de daño con la de 10^6 (Figura 40). Este tipo de inoculación se realizó por triplicado y se observó que de cada tres tomates infectados, solo en dos se desarrollaba la enfermedad. En todos los ensayos se corroboró la presencia de *A. niger* en un microscopio óptico adaptado con una cámara (Motic, BA310) (Figura 41).



Figura 40. Crecimiento de *Aspergillus niger* sobre tomate saladette (*Solanum lycopersicum* Roma'): A) Inóculo de 10^5 esporas/mL; B) Inóculo de 10^6 esporas/mL

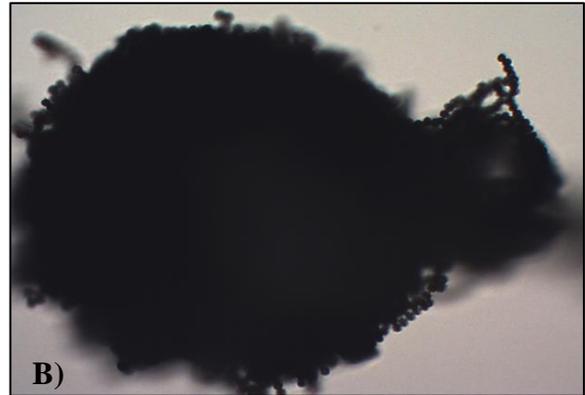
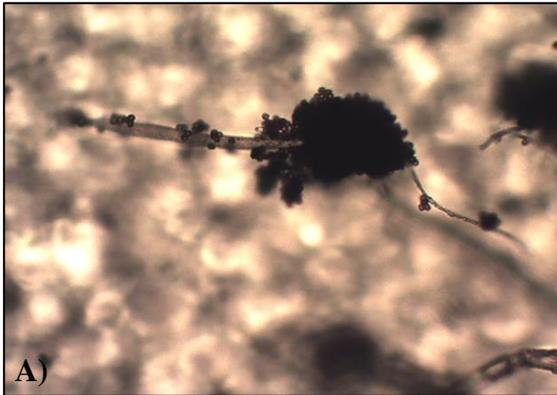


Figura 41. Conidióforo y conidios de *Aspergillus niger* desarrollados sobre tomate; A) Imagen captada a 10x y B) Imagen captada a 40x.

Efecto de biocompositos QT-PCA y partículas de QT sobre crecimiento de *Aspergillus niger* en tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma')

El efecto inhibitorio de los biocompositos de QT-PCA/Tween 80 y las partículas de quitosano/Tween 80 se evaluó sobre el crecimiento de *A. niger* en *Solanum lycopersicum* 'Roma' (tomate saladette). La forma de aplicación del tratamiento fue por aspersión manual de 10 mL de las diferentes concentraciones de la suspensión de partículas y biocompositos. Los tratamientos se aplicaron a seis grupos constituidos por diez frutos cada uno. Se tuvieron dos grupos control: uno sin inocular y el otro inoculado con *A. niger*. Estos se almacenaron en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C y 85-90 % de H.R durante 9 días. El diámetro de la lesión (herida) provocada por el hongo fue monitoreado cada dos días.

En la tabla 15 se puede observar un diámetro de crecimiento de 2.35 ± 0.54 cm² para el control sin tratamiento. Sin embargo, a las diferentes concentraciones de partículas de quitosano se observó un diámetro de lesión mayor con respecto del control al final de los 9 días de almacenamiento ($p < 0.05$). Los biocompositos de QT-PCA presentaron un comportamiento similar al ocasionado por las partículas de quitosano. Solo con la concentración de 760 µg/mL, los biocompositos QT-PCA inhibieron el diámetro promedio de la lesión en comparación con la muestra control ($p < 0.05$). En el grupo control sin inoculo no hubo incidencia de hongos nativos de tomate (Figura 42).

Tabla 15. Diámetro de lesión provocado por el crecimiento de *Aspergillus niger* en tomate saladette expuestos a tratamientos de biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico/Tween 80 y partículas de quitosano/Tween 80 durante 9 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C y 85-90 % de H.R.

Tratamientos	Diámetro de la lesión (cm ²)
Control	2.35 ± 0.54^{ab}
Nanopartículas de quitosano	
450 µg/mL	2.54 ± 0.62^a
900 µg/mL	2.70 ± 0.49^a
1350 µg/mL	2.45 ± 0.59^a
Biocompositos quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico	
380 µg/mL	2.92 ± 0.54^a
760 µg/mL	1.55 ± 0.58^b
1140 µg/mL	2.11 ± 0.60^{ab}

Las concentraciones utilizadas para cada tratamiento son el doble y triple de la concentración inhibitoria media estimada. Los datos son la media y el error estándar de una réplica. El experimento contenía 10 frutas y un punto de inoculación. Las letras minúsculas indican diferencia significativa a $p < 0,05$, según el test Tukey.

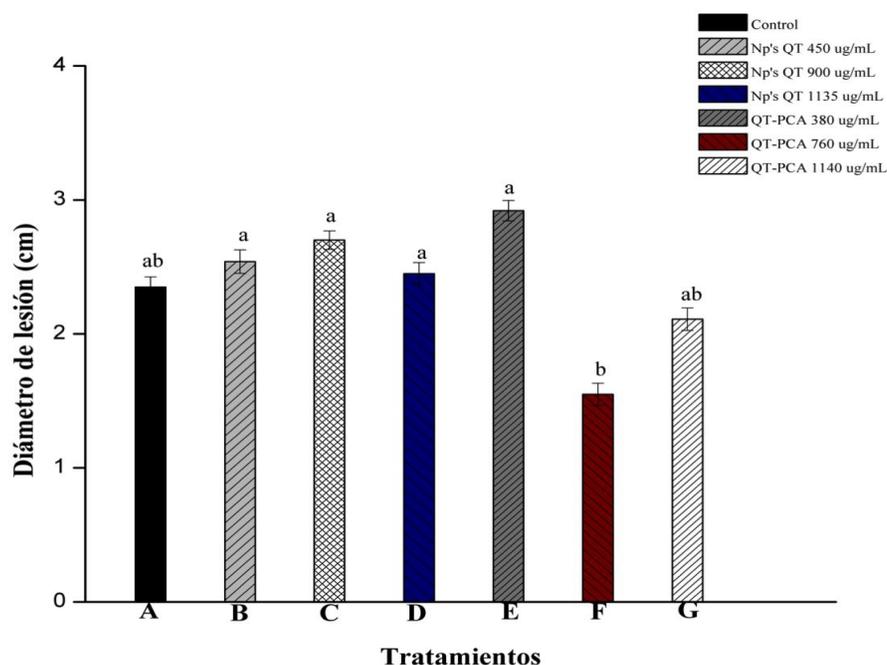


Figura 42. Diámetro de la lesión producida por *Aspergillus niger* en tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma') durante 9 días de almacenamiento controlado. A) Control; B) NP's QT 450 µg/mL; C) NP's QT 900 µg/mL; D) NP's QT 1135 µg/mL; E) QT-PCA 380 µg/mL; F) QT-PCA 760 µg/mL; G) QT-PCA 1140 µg/mL.

El porcentaje de reducción de la severidad de la herida, se obtuvo de los valores del diámetro de la lesión de los tratamientos con respecto al control al finalizar los nueve días de almacenamiento. En la Figura 43 se puede observar que hasta el tercer día de almacenamiento con la concentración de 760 y 1140 $\mu\text{g/mL}$ de biocompositos de QT-PCA, se retarda el crecimiento de *A. niger* en los frutos infectados, alcanzando una reducción del 53 y 50% respecto al control. Se observó que esta efectividad disminuyó después del quinto día de almacenamiento hasta un 34 y 6%, respectivamente. Sin embargo, con las partículas de quitosano solo se presentó efecto inhibitorio en el crecimiento de *A. niger* al tercer día de almacenamiento con la concentración de 450 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 43). En la figura 44 se puede observar como la concentración de 760 $\mu\text{g/mL}$ de biocompositos QT-PCA pudo reducir la severidad hasta el noveno día de almacenamiento.

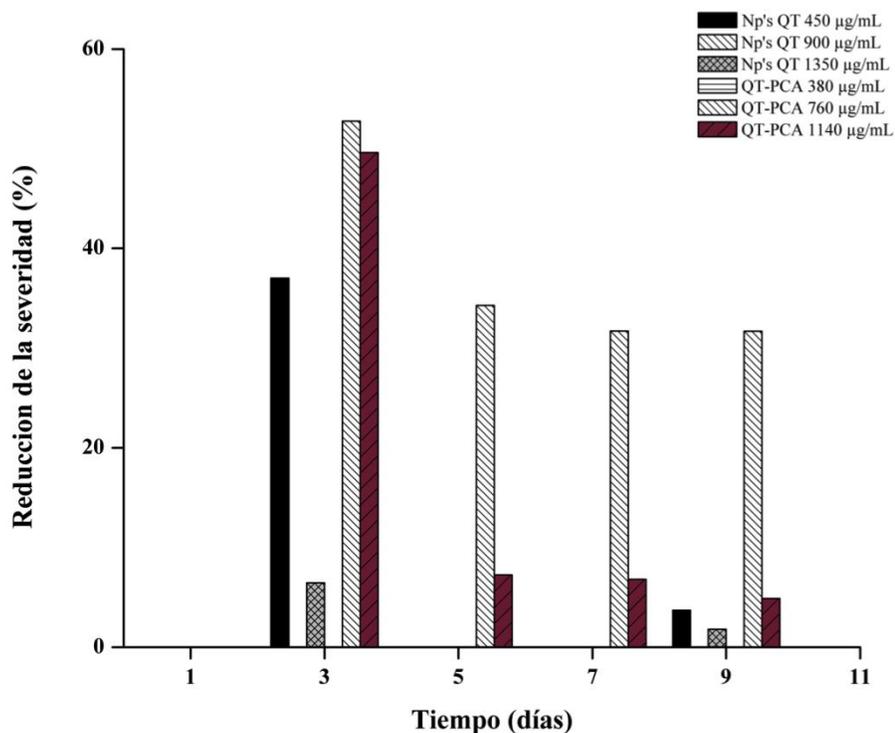


Figura 43. Porcentaje de reducción de la severidad provocada por el crecimiento de *Aspergillus niger* durante nueve días de almacenamiento controlado. A) NP's QT 450 $\mu\text{g/mL}$; B) NP's QT 900 $\mu\text{g/mL}$; C) NP's QT 1135 $\mu\text{g/mL}$; D) QT-PCA 380 $\mu\text{g/mL}$; E) QT-PCA 760 $\mu\text{g/mL}$; F) QT-PCA 1140 $\mu\text{g/mL}$.



Figura 44. Desarrollo de *Aspergillus niger* en tomate saladette (*Solanum lycopersicum* ‘Roma’) a los 3, 5, 7 y 9 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C con 80-95 % de humedad relativa.

Finalmente se calculó el porcentaje de reducción de heridas infectadas con el promedio de heridas infectadas por tratamiento con respecto a las del grupo control. Se encontró que los biocompositos de QT-PCA (760 $\mu\text{g/mL}$ y 1140 $\mu\text{g/mL}$) mostraron efecto inhibitorio de las heridas infectas por grupo durante los nueve días de almacenamiento. Las partículas de quitosano no influyeron en la reducción de heridas infectadas después del tercer día de almacenamiento (Figura 45).

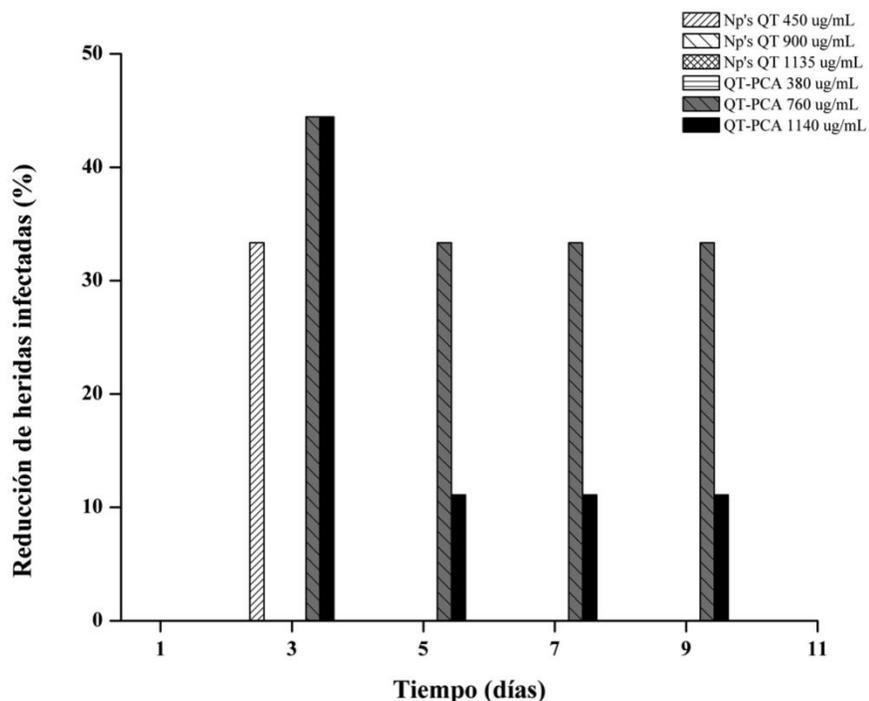


Figura 45. Porcentaje de reducción de heridas infectadas por *Aspergillus niger* en tomate durante 9 días de almacenamiento controlado. A) NP's QT 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B) NP's QT 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C) NP's QT 1135 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D) QT-PCA 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E) QT-PCA 760 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F) QT-PCA 1140 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En los ensayos *in vivo* se debe tomar en cuenta una gran variedad de factores para disminuir la variación y tener resultados confiables. Uno de estos es el estado de madurez del fruto según su tasa de respiración climatérica o no climatérica, el tamaño del fruto al momento de realizar el estudio, el número de heridas por fruto (si así se aplicara el inoculo) y la zona donde se realizará la herida, la concentración de inoculo a utilizar, la forma de aplicación de los tratamientos, las condiciones ambientales en que se desarrollará el estudio como son la temperatura, humedad relativa y por último los proveedores del fruto. En nuestro estudio se estimó la concentración mínima necesaria para el desarrollo de *A. niger* en tomate, la cual fue de 10^6 esporas/mL. Los frutos tenían tamaño de chico a mediano y las condiciones de almacenamiento fueron de 25 ± 2 °C y 85-90 % H.R. Sin embargo, el estado de maduración al iniciar el estudio es uno de los factores con más dificultad de controlar, aun así, estos presentaban un estado de maduración similar que se corroboró evaluando el color y la firmeza.

Entre las investigaciones del potencial antimicrobiano del quitosano y sus materiales con aplicaciones en almacenamiento poscosecha de frutos y hortalizas, está el de Hernández-Lauzardo *et al.* (2010), en el que se evaluó el efecto *in situ* de soluciones de quitosano de bajo peso molecular (17.4 kDa) en durazno, tomate y papaya. Ellos observaron en tomate que el quitosano a una concentración de 2 mg/mL tenía la capacidad de reducir el porcentaje de incidencia de *Rhizopus stolonifer* en un 33.43%. También se han incorporado aceites esenciales en soluciones de quitosano para la elaboración de recubrimientos y así aumentar su potencial antimicrobiano; tal es el caso el trabajo de Ali *et al.* (2015) quienes evaluaron soluciones de quitosano con aceite esencial de limón contra el crecimiento de *Colletotrichum capsici* en pimiento morrón (antracnosis). Los autores reportan que los frutos infectados con *C. capsici* y recubiertos con quitosano-aceite esencial de limón en relación 1:1, tuvieron un porcentaje de incidencia del 26.7 %. No obstante, cuando los recubrimientos eran solo con quitosano, el porcentaje de incidencia era significativamente menor que en combinación con el aceite de limón (20 %). Guerra *et al.* (2015) evaluaron el efecto poscosecha de recubrimientos con quitosano-aceite esencial de menta en tomate cherry para controlar el crecimiento de *A. niger* y no observaron síntomas de crecimiento durante 24 días de almacenamiento a baja temperatura. Sin embargo, en tomates infectados y almacenados por 12 días a temperatura ambiente presentaron un 35 % de incidencia. En varios estudios se ha observado que el quitosano incrementa la vida de anaquel de una diversidad de frutos cuando se aplica en forma de recubrimientos, además de interferir con el intercambio de gases que afectan el metabolismo y disminuir la pérdida de firmeza y agua (Velázquez-Del Valle *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2015).

En estudios previos se ha reportado la incorporación de metales como plata, cobre, zinc, manganeso, hierro y oro en quitosano para formar composites los cuales presentan gran potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, a las nanopartículas de metales se les han atribuido efectos adversos como estrés oxidativo o acumulación en ciertas líneas celulares, dejando en claro que son menos biocompatibles. Chowdappa *et al.* (2014) evaluaron el efecto inhibitorio de composites de quitosano-plata en el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en mango, el cual produce una enfermedad conocida como antracnosis. Los composites de quitosano-plata al 1 % redujeron en un 71.3 % la antracnosis, mientras que al 0.5% solo en un 45.7 %. Además, se observó que al incorporarles Tween 80, la inhibición subía

hasta el 84.6%. Comparando estos resultados con los obtenidos con las soluciones de quitosano, se observó que en forma de compositos (nanopartículas) si existe un incremento significativo en el potencial antifúngico. Jia *et al.* (2015) evaluaron el efecto inhibitorio de compositos de quitosano-plata sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* en arándanos, y observaron que 0.4 mg/mL de este material tenían la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo hasta el cuarto día de almacenamiento; mientras que con concentraciones mayores no se observó incidencia de la enfermedad. Los resultados de nuestro estudio sugieren que la suspensión de biocompositos de QT-PCA cuando se aplican por el método de aspersion retardan el crecimiento de *A. niger* hasta el quinto día de almacenamiento, por lo que son una opción potencial para seguirse estudiando y en un futuro poder aplicarlo para prevenir el ataque fúngico poscosecha.

CONCLUSIONES

A partir del método de nanoprecipitación se logró sintetizar biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico con tamaño promedio a nano escala. La incorporación de Tween 80 en la síntesis favoreció la estabilidad del sistema a la aglomeración/agregación. La caracterización fisicoquímica y morfológica de los biocompositos reflejó que existe una interacción del ácido pirrol-2-carboxílico (PCA) con la matriz a partir de reacciones de amidación del quitosano. Sin embargo, sus características morfológicas deben ser corroboradas en estudios posteriores.

La técnica de *Artemia salina* no es apta para evaluar la toxicidad aguda de los biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico, debido principalmente al pH final del material, además del uso de agua de mar. Por otra parte, los materiales sintetizados no inducen mutaciones en cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100), por lo que se consideran como potencialmente seguros.

El efecto antifúngico *in vitro* de los biocompositos quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico sobre *Aspergillus niger*, se considero moderado sobre la etapa de germinación de esporas y nulo durante su crecimiento apical. No obstante, disminuyen la viabilidad de esporas, afectan la integridad y permeabilidad de la membrana, alterando el proceso de formación de pared celular y morfología de las esporas durante la etapa de germinación (hinchazón de esporas, deformación de hifas, etc.). Además, tienen la capacidad de inducir estrés oxidativo en el hongo previo a la germinación de esporas.

La incorporación del ácido pirrol-2-carboxílico en la matriz de quitosano (biocompositos) representa una alternativa eficaz para el control preventivo pre-cosecha de *Aspergillus niger*. Estos biocompositos cuando se aplican por el método de aspersión tienen la capacidad de retardar el crecimiento fúngico hasta el quinto día de almacenamiento en tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma') infectado artificialmente, lo cual puede representar ganancias significativas al reducir las pérdidas por contaminación.

De manera general se logró sintetizar y caracterizar parcialmente biocompositos de quitosano/ácido pirrol-2-carboxílico (QT-PCA), los cuales presentan un efecto inhibitorio moderado sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus niger*. La capacidad de retardar el crecimiento fúngico *in vivo*, y de ser potencialmente seguros los hace una alternativa eficaz para aplicaciones en control de hongos en pre y poscosecha.

RECOMENDACIONES

Se recomienda reducir la concentración de ácido acético utilizado para preparar la solución de quitosano y que el material final no presente complicaciones por su pH bajo. Durante la síntesis por el método de nanoprecipitación, se recomienda evaluar en qué fase (no solvente y solvente) es más conveniente incorporar el agente bioactivo. Además, una vez sintetizado el biocomposito de quitosano con compuestos bioactivos, es necesario implementar técnicas para purificar y remover residuos de impurezas. En estudios posteriores se sugiere analizar el tipo de interacción de las moléculas candidatas a encapsularse en la matriz de quitosano, y si éstas afectan su interacción con los componentes de la pared/membrana del microorganismo.

Para evaluar la toxicidad de las partículas de quitosano y sus biocompositos se recomienda utilizar otra técnica, ya que la prueba de toxicidad aguda con *Artemia salina* presenta inconvenientes asociadas a las características del material elaborado con quitosano.

Se recomienda estudiar a fondo los efectos producidos por el PCA sobre *Aspergillus niger*, así como optimizar las concentraciones necesarias para inhibir su etapa de crecimiento apical; lo anterior debido a que en la etapa de germinación de esporas, el PCA afecta la morfología y el desarrollo. Respecto a los biocompositos de quitosano y sus partículas, se recomienda marcarlas con un fluorocromo para visualizar la posible introducción y acumulación o daño en organelos subcelulares. De igual modo, se recomienda realizar estudios para evidenciar si tienen la capacidad de interferir con la producción de enzimas relacionadas con la formación de pared celular, utilizando métodos cuantitativos y mediante técnicas de expresión y supresión de genes.

Se recomienda realizar experimentos poscosecha donde *Aspergillus niger* sea aislado de un sustrato donde pueda crecer de manera óptima, así como realizar un diseño de experimentos que permita minimizar todos los factores de error. Además, es conveniente establecer diferentes condiciones de almacenamiento como bajas temperaturas, que permitan inhibir el crecimiento fúngico en sinergismo al combinar el quitosano y el compuesto bioactivo. Por último, se recomienda analizar las características del sustrato (fruto, hortaliza, granos o cereales) para seleccionar técnicas apropiadas para la aplicación de agentes microbianos.

REFERENCIAS

- Abdel-Rahim, A. M., & Arbab, H. A. (1985). Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*. *Mycopathologia*, 89(2), 75-79.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.
- Akocak, P. B., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2015). Antagonistic effect of chitinolytic *Pseudomonas* and *Bacillus* on growth of fungal hyphae and spores of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Food Bioscience*, 10, 48-58.
- Ali, A., Noh, N. M., & Mustafa, M. A. (2015). Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 56-61.
- Allan, C. R., & Hadwiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental mycology*, 3(3), 285-287.
- Aloui, H., Khwaldia, K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2014). Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 21-28.
- Aranda-Martinez, A., Lopez-Moya, F., & Lopez-Llorca, L. V. (2016). Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Journal of Basic Microbiology*, 56(10), 1059–1070.
- Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L. J. M., & de Roeck-Holtzhauer, Y. (1999). Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology*, 19(3), 163-165.

- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biología: La vida en la Tierra*. Pearson educación. 400 p.
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos*. México. 4ta Edición Pearson educación, 106.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56(3), 290-299.
- Bautista-Rosales, P. U., Calderón-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N. A., Vázquez-Juárez, R., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2014). Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. *Crop Protection*, 65, 194-201.
- Bebber, D. P., Holmes, T., & Gurr, S. J. (2014). The global spread of crop pests and pathogens. *Global Ecology and Biogeography*, 23(12), 1398-1407.
- Bebber, D. P., Ramotowski, M. A. T., & Gurr, S. J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, 3, 985–988.
- Bernardos, A., Marina, T., Žáček, P., Pérez-Esteve, É., Martínez-Mañez, R., Lhotka, M., & Klouček, P. (2015). Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2824-2831.
- Bhatnagar, I., & Kim, S. K. (2010). Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs*, 8(10), 2673-2701.
- Bhattarai, N., Ramay, H. R., Chou, S. H., & Zhang, M. (2006). Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 181.
- Bluma, R., Amaiden, M. R., Daghero, J., & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section Flavi growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 203e214.
- Bressan, W., Figueiredo, J. E. F., (2008). Efficacy and dose–response relationship in biocontrol of *Fusarium* disease in maize by *Streptomyces* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 311– 316.
- Bukari Y. (2014). Studies of the infection of cultivars of shallot (*Allium ascalonicum* L.) in Ghana by *Aspergillus niger* van Tieghem and the effect of the host on some aspects of the biology of *A. niger*. Thesis (Ph. D.) University of Ghana, Ghana, Legon.

- Chattopadhyay, P., Banerjee, S. K., Sen, K., & Chakrabarti, P. (1987). Lipid profiles of conidia of *Aspergillus niger* and a fatty acid auxotroph. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(12), 1116-1120.
- Chollet, J., Hubschwerlen, C., Matile, H., & Ridley, R. G. (2003). Traducción de Patente Europea T3@ 86 Número de solicitud europea: 98935020.2.
- Chowdappa, P., Gowda, S., Chethana, C. S., & Madhura, S. (2014). Antifungal activity of chitosan-silver nanoparticle composite against *Colletotrichum gloeosporioides* associated with mango anthracnose. *African Journal of Microbiology Research*, 8(17), 1803-1812.
- Chung, Y. C., & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99:2806–2814
- 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.
- 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.
- Cuadros-Moreno, A., Casañas-Pimentel, R., San Martín-Martínez, E., & Yañes-Fernandez, J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4): 4314 1-5.
- Deng, Q. Y., Zhou, C. R., & Luo, B. H. (2006). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology*, 44(5), 336-342.
- Dietera, A., Hamm, A., Fiedler, H.P., Goodfellow, M., Müller, W. E., Brun, R., Beil, W., & Bringmann, G. (2003). Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain. *Journal of Antibiotics*, 7, 639–646.
- Dong, Y., Ng, W. K., Shen, S., Kim, S., & Tan, R. B. (2013). Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 940-945.

- 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.
- Duca G., Nuñez, C., Navarro A., Rubio, M. (2012). Bioremediation of Nickel (II) in aqueous solution by *Aspergillus niger* GC1. *Boletín Micológico*, 27:03 – 07.
- El-Nagerabi, S. A. F., & Ahmed, A. H. M. (2003). Storability of onion bulbs contaminated by *Aspergillus niger* mold. *Phytoparasitica*, 31(5), 515-523.
- Estelrich, J. & Pons, M. (1991). La espectroscopía de correlación fotónica y sus aplicaciones, *Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología* 4, 81-86. ISSN 0213-5574
- FAO. (2001). El estado mundial de la agricultura y la alimentación, Roma, Italia.
- FAO. (2001). Manual de capacitación. La importancia de comer frutas y hortalizas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 46. FAO, Roma, Italia.
- FAO. (2013). El cambio climático, las plagas y las enfermedades transfronterizas Boletín Informativo. Roma, Italia.
- Fernández-Pan, I., Maté, J. I., Gardrat, C., & Coma, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hydrocolloids*, 51, 60-68.
- Flood, J. (2010). The importance of plant health to food security. *Food Security*. 2, 215–231.
- Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E. & Peacocke, A. R. (1970). Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light. *Nature*. 227, 242-245.
- García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E., & Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (FA Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8-12.
- Ghanem, K. M., Al-Garni, S. M., & Alhomodi, A. F. (2015). Biodegradation of kerosene by *Aspergillus flavus* using statistical experimental designs. *Bioremediation Journal*, 19(1), 69-79.

- Gonzalez-Alvarez, M., Moreno-Limon, S., Salcedo-Martinez, S. M., & Perez-Rodriguez, E. C. (2015). In vitro evaluation of antifungal activity of Agave (*Agave scabra*, Salm Dyck) extracts against post-harvest mushrooms. *Phyton*, 84(2), 427-434.
- Gottschalk, A. (1995). 2-Carboxypyrrole: its preparation from and its precursor in mucoproteins. *Biochemical Journal*, 61, 298.
- Goy, R. C., Britto, D. D., & Assis, O. B. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241-247.
- Grillo, R., Clemente, Z., de Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Chalupe, V. C., Jonsson, C. M. & Oehlke, K. (2015). Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: the influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 562-572.
- Guerra, I. C. D., de Oliveira, P. D. L., de Souza Pontes, A. L., Lúcio, A. S. S. C., Tavares, J. F., Barbosa-Filho, J. M., & de Souza, E. L. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 168-178.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). Global food losses and food waste. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy.
- Hanaor, D., Michelazzi, M., Leonelli, C., & Sorrell, C. C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(1), 235-244.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2), 235-244.
- Hellmers, F., Ferguson, P., Koropatnick, J., Krull, R., & Margaritis, A. (2013). Characterization and in vitro cytotoxicity of doxorubicin-loaded γ -polyglutamic acid-chitosan composite nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 72-78.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Veranza-Castelán, L., Melo-Giorgana, G. E., & Guerra-Sánchez, M. G. (2010). Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained from peach, papaya and tomato. *Fruits*, 65(4), 245-253.

- Hernández-Téllez, C. N., Plascencia-Jatomea, M., & Cortez-Rocha, M. O. (2016). Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, 315.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10: 273–290.
- Hoch, H. C., Galvani, C. D., Szarowski, D. H., & Turner, J. N. (2005). Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*, 97(3), 580-588.
- Hodges, R. J., Buzby, J. C., & Bennett, B. (2011). Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. *Journal of Agricultural Science*, 149: 37–45.
- Hormaza, A., Vanegas, L. N., & García, E. S. (2011). Síntesis de derivados pirrólicos a través de una cicloadición 1, 3-dipolar. *Scientia Technica*, 2(48), 163-168.
- Hsu, S. H., Chang, Y. B., Tsai, C. L., Fu, K. Y., Wang, S. H., & Tseng, H. J. (2011). Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 198-206.
- Ichikawa, H., Uneme, T., Andoh, T., Arita, Y., Fujimoto, T., Suzuki, M., & Fukumori, Y. (2014). Gadolinium-loaded chitosan nanoparticles for neutron-capture therapy: Influence of micrometric properties of the nanoparticles on tumor-killing effect. *Applied Radiation and Isotopes*, 88, 109-113.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V. P., Guzmán, M., Zapata, M., & Rengifo, T. (2007). Manual técnico: buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. *CORPOICA. MANA. Gobernación de Antioquia–FAO*, 331.
- Jardim, K. V., Joanitti, G. A., Azevedo, R. B., & Parize, A. L. (2015). Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. *Materials Science and Engineering*, 56, 294-304.
- Jia, R., Duan, Y., Fang, Q., Wang, X., & Huang, J. (2016). Pyridine-grafted chitosan derivative as an antifungal agent. *Food Chemistry*, 196, 381-387.
- Jimenez, M., Huerta, T., & Mateo, R. (1997). Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from bananas. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 364-369.

- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14-23.
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36-51.
- Kaur, P., Thakur, R., Barnela, M., Chopra, M., Manuja, A., & Chaudhury, A. (2015). Synthesis, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity and antimicrobial activity of chitosan–metal nanocomposites. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(5), 867-873.
- Kaya-Celiker, H., Mallikarjunan, P. K., & Kaaya, A. (2015). Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus spp.* contamination in peanuts. *Food Control*, 52, 103-111.
- Klich, M. A. (2003). Identification of common *Aspergillus* species. *Micologist*, 17(3):128-128.
- Klich, M. A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48(2), 71-80.
- Klis, F. M., Ram, A. F. J., & De Groot, P. W. J. (2007). A molecular and genomic view of the fungal cell wall. In: *Biology of the fungal cell* (pp. 97-120). Springer Berlin Heidelberg.
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R. V., Van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74, 1-29.
- Kumar, A. B. V., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R., & Tharanathan, R. N. (2005). Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 391(2), 167-175.
- Lambert P A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 31:46S–54S
- Lee, D. S., & Je, J. Y. (2013). Gallic acid-grafted-chitosan inhibits foodborne pathogens by a membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6574-6579.
- Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and

- polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 259-269.
- Li, Q., Zhou, J., & Zhang, L. (2009). Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 47(11), 1069-1077.
- Li, W. R., Shi, Q. S., Ouyang, Y. S., Chen, Y. B., & Duan, S. S. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7483-7492.
- Li, X. F., Feng, X. Q., Yang, S., Wang, T. P., & Su, Z. X. (2008). Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Iranian Polymer Journal*, 17(11), 843-852.
- Liu, H., & He, J. (2015). Simultaneous release of hydrophilic and hydrophobic drugs from modified chitosan nanoparticles. *Materials Letters*, 161, 415-418.
- Loh, J. W., Yeoh, G., Saunders, M., & Lim, L. Y. (2010). Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(2), 148-157.
- Lubertozzi D., & Keasling J D. (2009). Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances*, 27(1):53-75.
- Lukkani, N. J., & Reddy, E. S. (2014). Evaluation of plant growth promoting attributes and biocontrol potential of native fluorescent *Pseudomonas* spp. against *Aspergillus niger* causing collar rot of ground nut. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4(4), 256-262.
- Luo, M., Peng, H., Deng, Z., Yin, Z., Zhao, Q., y Xiong, H. (2015). Preparation and characterization of genipin-crosslinked chitosan microspheres for the sustained release of salidroside. *International Journal of Food Engineering*, 11(3), 323-333.
- Luque-Alcaraz, A. G., Cortez-Rocha, M. O., Velázquez-Contreras, C. A., Acosta-Silva, A. L., Santacruz-Ortega, H. D. C., Burgos-Hernández, A., & 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, 1-10.

- Luque-Alcaraz, A. G., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Valdez, A. M., Acosta, A. L., Iloki-Assanga, S., Higuera-Ciapara, I., & Argüelles-Monal, W. (2012). Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-7.
- Lv, Y., Huang, H., Yang, B., Liu, H., Li, Y., & Wang, J. (2014). A robust pH-sensitive drug carrier: aqueous micelles mineralized by calcium phosphate based on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 111, 101-107.
- Madureira, A. R., Pereira, A., Castro, P. M., & Pintado, M. (2015). Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. *Journal of Food Engineering*, 167, 210-216.
- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*, 2013, 1-15.
- Maron D M., & Ames N B. (1993). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113:173-215.
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Castillo-Ortega, M. M., Burgos-Hernández, A., Ezquerro-Brauer, J. M., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Antimicrobial activity of chitosan nanofibers obtained by electrospinning. *Polymer International*, 60(12), 1663-1669.
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., Burgos-Hernández, A., & Plascencia-Jatomea, M. (2013). Extruded films of blended chitosan, low density polyethylene and ethylene acrylic acid. *Carbohydrate polymers*, 91(2), 666-674.
- Mathew, T. V., & Kuriakose, S. (2013). Photochemical and antimicrobial properties of silver nanoparticle-encapsulated chitosan functionalized with photoactive groups. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 4409-4415.
- Mayoral, J. B., Moreno, A. C., & Martínez, E. S. M. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 19.
- Meletiadis, J., Mouton, J. W., Meis, J. F., Bouman, B. A., Donnelly, J. P., Verweij, P. E., & Eurofung Network. (2001). Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3402-3408.

- Mendoza, J. L. H., Pérez, M. I. S., Olivares, J. G. G., Pérez, N. M., Prieto, J. M. G., & Velásquez, J. D. C. Q. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma spp* nativos del noreste de México. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 176-185.
- Meshulam, T., Levitz, S. M., Christin, L., & Diamond, R. D. (1995). A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *Journal of Infectious Diseases*, 172:1153–1156.
- Mimoune, N. A., Riba, A., Verheecke, C., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2016). Fungal contamination and mycotoxin production by *Aspergillus spp.* in nuts and sesame seeds. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(4), 301.
- Molina-Salinas, G. M., & Said-Fernández, S. (2006). A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacology online*, 3: 633-638.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 580-585.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1), 29-60.
- Motshekga, S. C., Ray, S. S., Onyango, M. S., & Momba, M. N. (2015). Preparation and antibacterial activity of chitosan-based nanocomposites containing bentonite-supported silver and zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Applied Clay Science*, 114, 330-339.
- Moura, M. J., Martins, S. P., & Duarte, B. P. (2015). Production of chitosan microparticles cross-linked with genipin - Identification of factors influencing size and shape properties. *Biochemical Engineering Journal*, 104, 82-90.
- Mukhopadhyay, S. S. (2014). Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnology, Science and Applications*, 7, 63.
- Nafee, N., Schneider, M., Schaefer, U. F., & Lehr, C. M. (2009). Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *International Journal of Pharmaceutics*, 381(2), 130-139.

- Nam, K. S., Choi, Y. R., & Shon, Y. H. (2001). Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu tests. *Biotechnology Letters*, 23(12), 971-975.
- Navarro-Montes, D. A. (2010). Manejo Integrado de Plagas. University Of Kentucky College Of Agriculture, Lexington, Ky, 40546. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627.
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Kim, Y. H., Moon, J. H., & Kim, K. Y. (2015). Antagonism of antifungal metabolites from *Streptomyces griseus* H7602 against *Phytophthora capsici*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(1), 45-53.
- Nguyen, X.H., Naing, K.N., Lee, Y.S., Tindwa, S. (2012). Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. *Plant Pathology Journal*, 28, 282–289.
- Normile, D. (2010). Spoiling for a fight with mold. *Science*, 327(5967), 807.
- Oshero, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, 199(2), 153-160.
- Pandiselvi, K., & Thambidurai, S. (2016). Synthesis of adsorption cum photocatalytic nature of polyaniline-ZnO/chitosan composite for removal of textile dyes. *Desalination and Water Treatment*, 57(16): 8343-8357
- Paster, N & Barkai-Golan, R. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 2. *World Mycotoxin Journal*, 1(4), 385-396.
- Pastor de Abram, A. e Higuera, I. (2004). Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Resultados del proyecto CYTED IV, 14.
- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49(4), 316-323.
- Peraica, M., Flajs, D., Domijan, A. M., Ivić, D., & Cvjetković, B. (2010). Ochratoxin A contamination of food from Croatia. *Toxins*, 2(8), 2098-2105.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.

- Plascencia-Jatomea, M. (2004). Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- 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.
- Plascencia-Jatomea, M., Yépiz-Gomez, M. S., & Velez-Haro, J. M. (2014). *Aspergillus* spp. (gray mold). *Postharvest Decay*, 267-282.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 186-201.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smaghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Ragazzo-Sanchez, J. A., Gutierrez-Escatel, A., Luna-Solano, G., Gómez-Leyva, J. F., & Calderon-Santoyo, M. (2011). Molecular identification of the fungus causing postharvest rot in jackfruit. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 9-15.
- Rahimi, E., & Shakerian, A. (2013). Ochratoxin A in dried figs, raisings, apricots, dates on Iranian retail market. *Health*, 5(12), 2077-2080.
- Rasooli, I. (2007). Food preservation—a biopreservative approach. *Food*, 1(2), 111-136.
- Refat H A., & Fadda A. A. (2013). Synthesis and antimicrobial activity of some novel hydrazide, benzochromenone, dihydropyridine, pyrrole, thiazole and thiophene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70: 419–426.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. M., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Marina, S., & Guerrero-Prieto, V. M. (2016). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 84-99.
- Robles-Yerena, L., Rodríguez-Villarreal, R. A., Ortega-Amaro, M. A., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., Rodríguez-Guerra, R., & Jiménez-Bremont, J. F. (2010). Characterization

- of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 248-255.
- Rogg, H. W. (2001). Manual: manejo integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana. IICA Biblioteca Venezuela. 12 p.
- Ruozi, B., Belletti, D., Vandelli, M. A., Pederzoli, F., Veratti, P., Forni, F., & Zapparoli, M. (2014). AFM/TEM Complementary structural analysis of surface-functionalized nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 4(4), 1.
- Santos, G. C., & Corso, C. R. (2014). Comparative analysis of azo dye biodegradation by *Aspergillus oryzae* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(7), 1-11.
- Sarhan, W. A., & Azzazy, H. M. (2015). High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: Biocompatibility and antibacterial effects. *Carbohydrate Polymers*, 122, 135-143.
- Silva-Dias, A., Palmeira-de-Oliveira, A., Miranda, I. M., Branco, J., Cobrado, L., Monteiro-Soares, M., & Rodrigues, A. G. (2014). Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Medical Microbiology and Immunology*, 203(1), 25-33.
- Singh, P., Mishra, A. K., & Tripathi, N. N. (2012). Assessment of mycoflora associated with postharvest losses of papaya fruits. *Journal of Agricultural Technology*, 8(3), 961-968.
- Solis, P. N.; Wright, C. W.; Anderson, M. M.; Gupta, M. P.; & Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica*, 59, 250–252.
- Somashekar, D., Rati, E. R., & Chandrashekar, A. (2004). PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 101-107.
- Surapuram, V., Setzer, W. N., McFeeters, R. L., & McFeeters, H. (2014). Antifungal activity of plant extracts against *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. *Natural product communications*, 9(11), 1603-1605.
- Svojtková, E., Deyl, Z., & Andrlíková J. (1982). Decrease in pyrrole-2-carboxylic acid excretion during lung cancer disease. *Neoplasma*, 29, 625–629.

- Taechowisan, T., Chuaychot, N., Chanaphat, S., Wanbanjob, A., & Tantiwachwutikul, P. (2009). Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*. *Biotechnology*, 8(1), 86-92.
- Teodoro, R. A. R., de Barros Fernandes, R. V., Botrel, D. A., Borges, S. V., & de Souza, A. U. (2014). Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2560-2569.
- Thomas, S., Joseph, K., Malhotra, S. K., Goda, K., & Sreekala, M. S. (2013). Front matter, in polymer composites: Volume 2, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Trigos, Á., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*, 28(2), 125-129.
- Van Leeuwen, M. R., Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., & Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74, 59-70.
- Velásquez, C. L., Rivas, A., Velásquez, W., & Bahsas, A. (2007). Amidación del quitosano con cloruro de oleoil. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 8(4), 229-240.
- Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-Lauzardo, A. N., Guerra-Sanchez, M. G., & Mariaca-Gaspar, G. I. (2012). Chitosan as an alternative to control phytopathogenic fungi on fruits and vegetables in Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6606-6611.
- Velez-Haro, J. M. (2013). Respuesta fisiológica de estrés por quitosano: cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* en medio sólido y líquido. Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos, Universidad de Sonora. Pp:
- Vos, J. (1979). Brine shrimp *Artemia salina* inoculation in tropical salt ponds: A preliminary guide for use in Thailand. FAO report THA/75 WPI3, 43 p.
- Wang, L. S., & Hong, R. Y. (2011). Synthesis, surface modification and characterisation of nanoparticles (p. 289). Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher.
- Xing, K., Shen, X., Zhu, X., Ju, X., Miao, X., Tian, J., & Qin, S. (2016). Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 830-836.

- 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.
- Yadav, S. K. (2015). Nanotechnology: a spark to the use of plant origin bioactive compounds in therapeutics. *Single Cell Biology*, 4, 1-2.
- Yao, K.J., Song, M., Hourston, D.J., and Luo, D.Z. (2002). Polymer/layered clay nanocomposites: 2 polyurethane nanocomposites. *Polymer*, 43, 1017.
- Yien, L., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 1-9.
- Yin, R., Wang, K., Du, S., Chen, L., Nie, J., & Zhang, W. (2014). Design of genipin-crosslinked microgels from concanavalin A and glucosyloxyethyl acrylated chitosan for glucose-responsive insulin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 103, 369-376.
- Zapata cuartas, J. (2012). Obtención de una nueva serie de compuestos pirrólicos y estudio teórico de su potencial actividad antioxidante. Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., & Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2309-2314.